

**FIOCRUZ**

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

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

**TESE DE DOUTORADO**

**ESTUDO CLÍNICO, GENÉTICO E MOLECULAR DE PACIENTES COM  
DISGENESIA TIREOIDIANA**

**TAÍSE LIMA DE OLIVEIRA CERQUEIRA**

**Salvador – Bahia**

**2016**

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

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

**ESTUDO CLÍNICO, GENÉTICO E MOLECULAR DE PACIENTES COM  
DISGENESIA TIREOIDIANA**

**TAÍSE LIMA DE OLIVEIRA CERQUEIRA**

Orientador: Prof. Dr. Helton Estrela Ramos  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angelina Xavier Acosta

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do grau de Doutor.

**Salvador – Bahia**

**2016**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

C416m Cerqueira, Taíse Lima de Oliveira.  
Estudo clínico, genético e molecular de pacientes com Disgenesia  
Tireoidiana. / Taíse Lima de Oliveira Cerqueira. - 2016.  
105 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Helton Estrela Ramos, Laboratório de Estudo da  
Tireoide - UFBA

Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) –  
Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2016.

1. Disgenesia Tireoidiana. 2. Hipotireoidismo Congênito. 3. PCR. 4.  
Mutações. I. Título.

CDU 616.441

"ESTUDO CLÍNICO, GENÉTICO E MOLECULAR DE PACIENTES COM DISGENESIA TIREOIDIANA."

TAÍSE LIMA DE OLIVEIRA CERQUEIRA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Dra. Marilda de Souza Gonçalves  
Pesquisadora Titular  
CPqGM



---

Dr. Luis Fernando Fernandes Adan  
Diretor da Faculdade de Medicina da Bahia  
FMB/UFBA



---

Dr. Fernando Giuffrida  
Professor  
UNEB

**FONTES DE FINANCIAMENTOS**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ (Edital N° 14/2012)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB (Edital N°12/2012)

Dedico este trabalho ao meu marido, companheiro, amigo e amor, Gezer Xavier de Cerqueira (*in memoriam*) que tanto torceu e se fez presente, mas infelizmente não o viu chegar ao fim.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, meu eterno obrigada!

Ao professor Helton Ramos por todas as oportunidades a mim concedidas, obrigada pela confiança e por acreditar em mim.

As professoras Angelina Acosta e Kiyoko Abé-Sandes pelo suporte e oportunidades, muito obrigada por me ensinarem tanto sobre o mundo científico.

Aos amigos do meu eterno grupo Sisgene, vocês são fantásticos!

Aos novos amigos do LET, formado há tão pouco tempo, mas tão forte! Obrigada pela convivência leve e divertida.

Aos amigos Laffec que fizeram toda diferença ao longo dessa caminhada.

A Vladimir Fernandes, obrigada pela dedicação, sem você esse trabalho não seria possível.

Aos alunos de iniciação científica: Mariana Souza, Giorgia Strappa, Jailciele Gonzaga, Yanne Rocha, Daniel San Martin, Lorena Maia, Camila e Paulo Henrique, sem eles essa pesquisa jamais teria acontecido, vocês foram essenciais na minha jornada.

Aos colaboradores da APAE, especialmente Tatiana Amorim, obrigada pelo envolvimento e preocupação, contar com o cuidado deles com a nossa pesquisa foi muito gratificante.

Aos amigos da vida, especialmente Jaciara Oliveira, minha irmã de alma.

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

À Ana Maria Fiscina, em nome da Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna, pela revisão bibliográfica do presente trabalho.

CERQUEIRA, Taíse Lima de Oliveira. Estudo clínico, genético e molecular de pacientes com Disgenesia Tireoidiana. 106 fl.il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Hipotireoidismo Congênito (HC), é uma das doenças metabólicas mais comuns na infância com incidência de 1:3.000 a 1:4.000 recém-nascidos. Um grupo de doenças relacionadas às alterações no desenvolvimento da tireoide, denominadas disgenesias tireoidianas (DT), responsabiliza-se por aproximadamente 85% de todos os casos de HC, sendo sua patogênese pouco conhecida. **OBJETIVOS:** *Geral:* Caracterização clínica e genética de pacientes com HC diagnosticados com disgenesia tireoidiana. *Específicos:* 1. Caracterizar clínica dos indivíduos com HC em acompanhamento na APAE/Salvador (Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais); 2. Avaliar a existência de associação entre malformações tireoidianas e malformações cardíacas; 3. Pesquisar polimorfismos e mutações nos genes candidatos: *PAX8*, *TSH-R*, *NKX2.5* e *HES1*, em pacientes diagnosticados com disgenesia tireoidiana; 4. Pesquisar o gene *TSH-R* numa coorte de pacientes com HC diagnosticados no programa de triagem neonatal da França. **METODOLOGIA:** Até o ano de 2016, 1.188 crianças foram diagnosticadas com HC e 773 estão em acompanhamento. Duzentos e dezoito crianças confirmadas com HC foram caracterizadas clinicamente através de testes de função da tireoide (TT4 e TSH), ultrassonografia e cintilografia, seguidas de dosagem de tireoglobulina. Toda a região codificantes dos genes *PAX8*, *TSH-R*, *NKX2.5* e *HES1* incluindo íntrons e éxons foram amplificadas a partir do DNA genômico através da PCR (Reação em cadeia da Polimerase) utilizando-se técnicas padrão seguida de Sequenciamento direto. **RESULTADOS:** Sessenta e três pacientes foram diagnosticados com DT e 155 com glândula tóptica normal. Hipoplasia representou 33,4% dos casos de DT, agenesia 19%, ectopia 27% e hemiagenesia 20,6%. Altas concentrações de TSH no teste do pezinho foram detectados no grupo das agenesias seguido das hipoplasias. Na análise genética/molecular, 31 (49,2%) dos pacientes foram identificados com o polimorfismo p.D727E em heterozigose e 4 (6,4%) em homozigose, no gene *TSH-R*; 4/63 pacientes tiveram o polimorfismo p.P52T em heterozigose; 14/63 apresentaram a variante polimórfica p.N181N e 2/63 apresentaram a substituição sinônima conhecida p.L645L, todos no gene *TSH-R*. o polimorfismo p.Glu21 foi encontrado em 54% dos pacientes e p.Gln181 encontrado em 1 paciente no gene *NKX2.5*. Nenhuma alteração foi encontrada no gene *HES1*, bem como em *PAX8*. **CONCLUSÕES:** Este é o primeiro estudo realizado na população de HC no Estado da Bahia. Análises clínicas revelaram um padrão distinto entre os subgrupos da DT quando comparados com glândula normal; 6 polimorfismos já descritos foram encontrados em dois genes candidatos. Nenhuma mutação patogênica foi encontrada. A descrição fenotípica é essencial para a correta avaliação genética e os mecanismos nela implicados, além de utilizados para predição da gravidade do HC. A identificação de novos genes ou eventos moleculares que controlam a função tireoidiana pós-natal seria de grande utilidade no esclarecimento das DT.

**Palavras-chave:** Disgenesia Tireoidiana; Hipotireoidismo Congênito; PCR; Mutações



CERQUEIRA, Taíse Lima de Oliveira. Estudo clínico, genético e molecular de pacientes com Disgenesia Tireoidiana. 106 fl. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Congenital hypothyroidism (CH), is the most common metabolic diseases in childhood with incidence of 1: 3000-1: 4000 newborns. A group of diseases related to alterations in the development of the thyroid, called thyroid dysgenesis (TD), is responsible for approximated 85% of all HC cases, and the majority has unknown pathogenesis. **OBJECTIVES:** General: clinical and genetic characterization of CH patients diagnosed with TD. Specific: 1. CH clinical characterization in individuals followed at APAE/Salvador; 2. evaluating the association between thyroid abnormalities and other abnormalities or syndromes; 3. search polymorphisms and mutations in known candidate genes for TD: *PAX8*, *TSH-R*, *NKX2.5* and *HES1*; 4. XX **METHODS:** Until the year 2016, 1.188 children were diagnosed for CH and 773 were actually follow in APAE-Salvador. A continuous series of 218 children with confirmed HC were characterized clinically through thyroid function tests (TT4 and TSH), thyroid ultrasound and scintigraphy, followed by serum thyroglobulin measurement. The entire coding region of the candidate genes (*PAX8*, *TSH-R*, *NKX2.5* and *HES1*), including exon/intron boundaries, was amplified from genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR) using standard techniques, followed by direct sequencing. **Results:** Sixty-three patients were diagnosed with DT and 155 with in situ thyroid gland (ISTG). Hypoplasia represented 33,4% of all cases of DT, agenesis (19%), ectopy (27%) and hemigenesis (20,6%). The higher screening TSH levels was in the agenetic group followed by hypoplasia. In the genetic/molecular analysis, 31 (49,2%) patients were identified with a polymorphism of *TSH-R* gene (p.D727E); 4/63 patients had a heterozygous p.P52T; 14/63 patients showed p.N187N polymorphic variants of the gene; and 2/63 patients presented a known p.L645L synonymous substitution. The polymorphism p.Glu21 was found in 54% of patients, and p.Gln181 found in only one patient in the *NKX2.5* gene. None alteration was detected in *HES1* gene. **CONCLUSIONS:** This is the first CH population-based study in State of Bahia, Brazil. Clinical analysis revealed distinct hormonal patterns in DT subgroup when compared with ISTG, with only 6 known polymorphisms identified in few cases of TD in *TSH-R*, *PAX8*, *NKX2.5* and *HES1* genes. No mutation was found in a candidate genes studied. A detailed description of phenotype might be essential to target the correct genetic and mechanism implicated, and useful to predict CH severity. The identification of additional genes or molecular events controlling early postnatal thyroid function would be helpful.

**Keys word:** Thyroid Dysgenesis; Congenital Hypothyroidism; PCR; Mutations

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema apresentando vista anterior da tireoide humana adulta com as principais veias e artérias..... 13
- Figura 2.** Composição celular da tireoide.....14
- Figura 3.** Vista frontal da região de arcos em E11 de camundongos; B: Vista ventral de órgãos derivados da região faríngea .....15
- Figura 4.** Desenvolvimento da tireoide e expressão de marcadores tireoidianos em humanos.....17

## LISTA DE ABREVIATURAS

APAE	Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais
CT	Calcitonina
CUB	Corpo-ultimobranquial
CFT	Célula folicular tireoidiana
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DT	Disgenesia tireoidiana
E	Estágio embrionário em camundongos
FOXE-1	Gene/proteína <i>forkhead box E</i> , também: TITF2, TTF-2, TTF2
FGF4	Gene <i>fibroblast growth factor 4</i>
GATA	Gene <i>GATA-binding protein</i>
GTN	Glândula tópica de tamanho normal
HC	Hipotireoidismo congênito
HES1	Gene/proteína <i>hairy/enhancer of split 1</i>
HHEX	Gene <i>hematopoietically expressed homeobox</i>
HT	Hormônio tireoidiano
IGF	Fator de crescimento insulina símile
NIS	Transportador de iodo
NGF	Fator de crescimento neuronal
NKX2-1	Gene/proteína <i>NK2 homeobox 1</i> , também: NKX2.1, NKX2A, T/EBP, TITF1, TTF-1, TTF1
NKX2.5	Gene/protein <i>NK2 transcription factor related, locus 5</i>
PAX8	Gene/proteína <i>paired box 8</i>
PKU	Fenilcetonúria
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
SHH	Gene <i>sonic hedgehog</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina ou tiroxina

TBX1	Gene <i>T-box 1</i>
TG	Tireoglobulina
TPO	Tireoperoxidase
TRH	Hormônio liberador da tirotrófina
TSH	Hormônio estimulante da tireoide ou tirotrófina
TSH-R	Gene/proteína receptor do TSH
USG	Ultrassonografia

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1 ANATOMIA-HISTOLOGIA-HORMONOSÍNTESE TIREOIDIANA.....	13
1.2 DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA TIREOIDE.....	14
1.3 GENÉTICA DO DESENVOLVIMENTO TIREOIDIANO.....	16
<b>1.4 Hipotireoidismo Congênito.....</b>	<b>18</b>
1.4.1 Etiologia do HC.....	20
1.4.2 Disgenesia Tireoidiana – DT.....	21
1.4.3 Bases genéticas e moleculares da Disgenesia Tireoidiana.....	22
1.5 HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO NA BAHIA.....	25
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
2.1 OBJETIVOS GERAL .....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>3. RESULTADOS - Capítulo 1.....</b>	<b>28</b>
Artigo 1 - Manuscrito referente aos objetivos específicos desta tese, com ênfase nos objetivos específicos números 1 e 3.....	29
<b>4. RESULTADOS - Capítulo 2.....</b>	<b>53</b>
Artigo 2 - Referente aos objetivos específicos desta tese, com ênfase no objetivo específico número 2.....	54
<b>5. RESULTADOS - Capítulo 3.....</b>	<b>61</b>
Artigo 3 - Referente aos objetivos específicos desta tese, com ênfase no objetivo específico número 4.....	62
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....</b>	<b>78</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>
<b>APÊNDICE 1 – Metodologia.....</b>	<b>85</b>
<b>APÊNDICE 2 – Protocolo de Avaliação Hipotireoidismo Congênito.....</b>	<b>91</b>
<b>APÊNDICE 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos Pais.....</b>	<b>96</b>
<b>APÊNDICE 4 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos Filhos.....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO 1- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Edgard Santos – HUPES.....</b>	<b>104</b>

<b>ANEXO 2</b> – Parecer do Núcleo de Pesquisa Científica da Associação de Pais e Amigos do Excepcionais – Apae/Salvador – Bahia.....	105
<b>ANEXO 3</b> - Termo de Compromisso para Utilização de Dados em Prontuários de Pacientes e de Bases de Dados em Projetos de Pesquisa.....	106

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ANATOMIA-HISTOLOGIA-HORMONOSÍNTESE TIREOIDIANA

A tireoide é uma glândula bilobada situada na base cervical, em frente à traquéia (Figura 1). Os dois lobos são conectados por um istmo que apresenta, por vezes, um pequeno lobo suplementar chamado lobo piramidal. Constituída por dois tipos de células produtoras de hormônio, as células foliculares e as células C (ou parafoliculares) (Figura 2), a tireoide possui rica vascularização, garantida pelas artérias tireoidianas inferiores, ramos da subclávia, artérias tireoidianas inferiores e ramos das carótidas externas (Figura 1) (INZUCCHI, 1999).

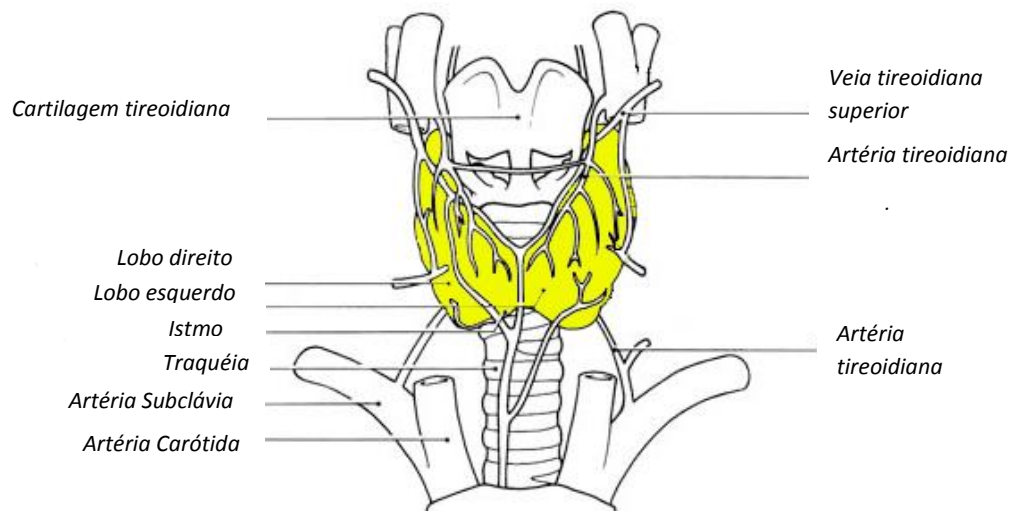


Figura 1. Esquema apresentando vista anterior da tireoide humana adulta com as principais veias e artérias. Adaptado de INZUCCHI, 1999.

O tecido tireoidiano maduro é constituído principalmente de unidades funcionais esféricas denominadas folículos (Figura 2) compostos de camada única de células epiteliais (células foliculares ou tireócitos) em torno de uma cavidade, o lúmen, onde se situa o colóide, sintetizado pelas células foliculares onde se concentra a quase totalidade do iodo intraglandular e armazena os hormônios tireoidianos (HT) (INZUCCHI, 1999).

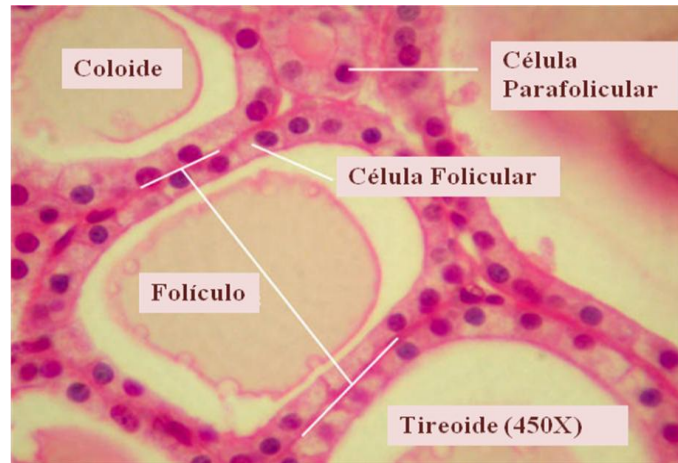


Figura 2. Composição celular da glândula tireoide. Adaptado de INZUCCHI, 1999.

As células foliculares produzem os hormônios tireoidianos  $T_3$  (triiodotironina) e  $T_4$  (tetraiodotironina ou tiroxina) pelo mecanismo de organificação de iodo. Este processo necessita de quatro proteínas principais: o receptor de TSH (Hormônio Estimulante da Tireoide), o cotransportador de sódio e iodo (NIS), a tireoglobulina (TG) e a tireoperoxidase (TPO). Contudo é importante salientar que a síntese de HT é controlada pela disponibilidade de TSH e iodo. O TSH, sintetizado pela adenohipófise, influencia todas as etapas da síntese do HT, estimulando a expressão de NIS, TPO, TG, a produção de  $H_2O_2$ , aumentando a formação de  $T_3$  e  $T_4$  e desencadeando a internalização de TG pelas células foliculares (KOPP, 2002).

Os hormônios tireoidianos agem diretamente no crescimento estatoponderal, metabolismo basal e termogênese; aumentam o débito cardíaco, ritmo cardíaco e a sensibilidade de células adiposas ao efeito lipolítico de outros hormônios. O seu papel é particularmente importante no período neonatal e durante os primeiros anos de vida, quando seu déficit ocasiona graves problemas de maturação do sistema nervoso central (neurogênese, migração neuronal, crescimento de axônios e dendrítico, mielinização e formação de sinapses) (FLAMANT; KOIBUCHI; BERNAL, 2015).

## 1.2 DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA TIREOIDE

A glândula tireoide é o primeiro órgão endócrino a se desenvolver no embrião humano, por volta do 24º dia de gestação em humanos, a partir do espessamento e invaginação do assoalho faríngeo (POLAK, 2014). O broto tireoidiano é composto por dois grupos celulares com origem embriológica distinta: as células parafoliculares, ou células C, que possuem



origem em dois esboços laterais, os corpos ultimobranquiais que provêm da quarta bolsa endofaringiana; e as células foliculares tireoidianas (CFTs), originadas a partir do espessamento do endoderma do assoalho faríngeo, que muito precocemente já expressa diversos fatores de transcrição (*HHEX*, *NKX2-1*, *PAX8* e *FOXE*), e possuem papel crucial na formação do broto tireoidiano, e na diferenciação funcional da glândula (FAGMAN; NILSSON, 2010a, 2010b). O processo inicial de mudanças morfológicas e bioquímicas das células endoteliais é conhecido como especificação (Figura 3A). A partir de então, com a formação do broto tireoidiano, inicia-se o processo de proliferação e migração das CFTs através do ducto tireoglossso até a base do pescoço, perdendo a ligação com o assoalho faríngeo e mantendo-se em proliferação. A glândula assume então sua forma final bilobulada, seguida da foliculogênese - formação dos folículos (DE FELICE; DI LAURO, 2004; RAMOS; NESI-FRANÇA; MACIEL, 2008) (Figura 3B).

Após atingir a sua posição final, as CFTs iniciam processo de diferenciação funcional que depende da expressão de genes essenciais para a biossíntese dos hormônios tireoidianos: *TG*, *TPO*, *TSH-R* e *NIS* (FAGMAN; NILSSON, 2010b; RAMOS; NESI-FRANÇA; MACIEL, 2008).

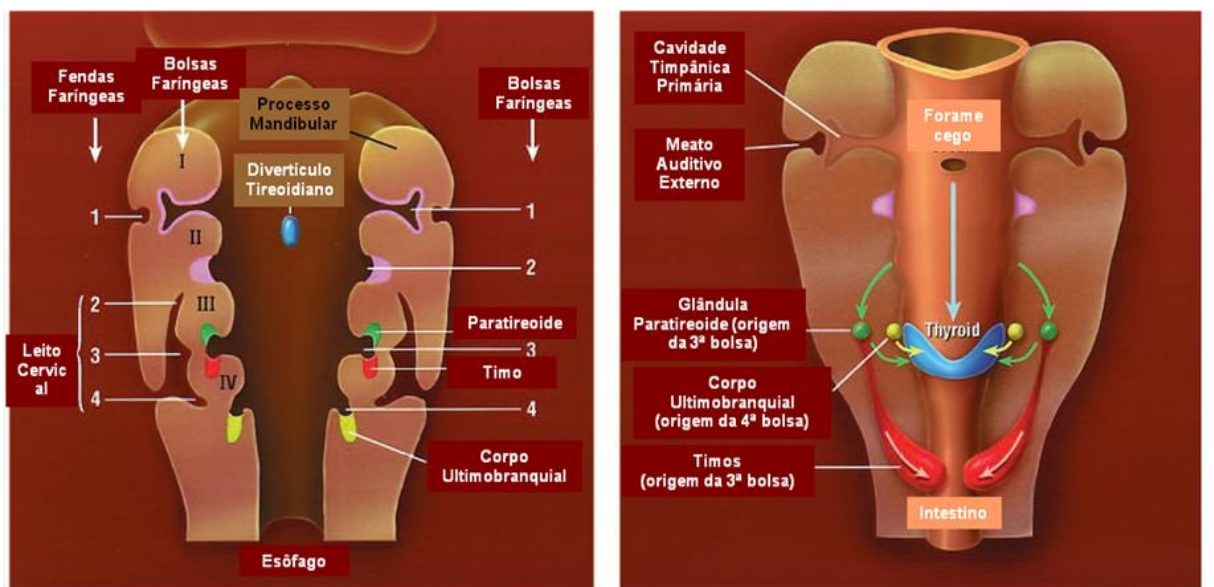


Figura 3: A: Vista frontal da região de arcos faríngeos em E11 de camundongos; B: Vista ventral de órgãos derivados da região faríngea. Adaptado de MANLEY AND CAPECCHI, 1995.

### 1.3 GENÉTICA DO DESENVOLVIMENTO TIREOIDIANO

- Especificação: o espessamento do epitélio endodérmico localizado no assoalho faríngeo correspondente à base da língua abriga um conjunto de células que representa as CFT primordiais ou primórdio tireoídiano. Esta estrutura primitiva pode ser observada por volta do vigésimo segundo dia da gestação, em humanos, e já apresentam a coexpressão entre os fatores de transcrição: *HHEX*, *NKX2-1*, *PAX8* e *FOXE1* – que as diferencia de células do epitélio endodérmico vizinho (FAGMAN; NILSSON, 2010b; NILSSON; FAGMAN, 2013; SZINNAI, 2014; TRUEBA et al., 2005) (Figura 4). O controle desse mecanismo ainda é desconhecido e acredita-se na ação da sinalização adjacente. Estudos realizados com modelos animais com inativação específica de genes essenciais para a formação do intestino primitivo como fatores de transcrição reguladores do *Nodal*, *FGF4*, membros da família *GATA* ou *SOX*, e que, portanto, seriam potenciais candidatos reguladores da especificação, não foram completamente informativos. Na grande maioria destes modelos animais há interrupção do processo de desenvolvimento embrionário antes mesmo do surgimento do primórdio tireoídiano (PARLATO et al., 2004). Outros possíveis genes candidatos, mas ainda não identificados, seriam fatores de transcrição responsáveis pelo início da expressão e controladores dos genes *HHEX*, *NKX2-1* e *PAX8*. Portanto, problemas na etapa de especificação deveriam gerar agenesia tireoídiana (total ausência da glândula) como consequência do grave defeito de organogênese (NILSSON; FAGMAN, 2013; PARLATO et al., 2004; SZINNAI, 2014).

- Formação e migração do broto tireoídiano: o primórdio tireoídiano invagina-se e invade o mesênquima adjacente, formando, por volta do vigésimo sexto dia, em humanos, uma estrutura alongada conhecida como broto tireoídiano primitivo (Figura 4). Este processo envolve o aumento muito rápido do número de células progenitoras, e parece acontecer por recrutamento das células do endoderma vizinho (FAGMAN; ANDERSSON; NILSSON, 2006). A partir daí, o broto tireoídiano migra caudalmente perdendo a interação com o assoalho faríngeo. A deficiente interação entre os genes *HHEX*, *PAX8*, *NKX2-1* e *FOXE1*, durante esse processo implica em prejuízo para a sobrevivência e proliferação das CFT primordial (TRUEBA et al., 2005). Por volta do quadragésimo oitavo dia gestacional, a tireoide primitiva alcança seu posicionamento final (FAGMAN et al., 2003; NILSSON; FAGMAN, 2013; SZINNAI, 2014).

- Lobulação e foliculogênese: em torno dos setenta dias gestacional a tireoide primitiva tem formato semi-circular e dois lobos rudimentares paratraqueais definidos. Paralelo a este processo, a foliculogênese também é iniciada (Figura 4).

Qualquer problema no processo de lobulação pode resultar em hemiagenesia da glândula. Os mecanismos controladores da formação de lobos, organogênese e da proliferação celular nesta etapa, ainda são obscuros. Estudos em modelos animais apontam para a influência do gene *Shh* (*Sonic hedgehog*) e de outras interações celulares envolvendo genes expressos em tecidos adjacentes (FAGMAN et al., 2004; NILSSON; FAGMAN, 2013; SZINNAI, 2014; XU et al., 2002).

- Diferenciação funcional e hormonogênese: o processo de diferenciação completa-se apenas quando a glândula atinge sua localização final; porém, esta localização normal não é exatamente um requisito absoluto para que as CFTs completem sua diferenciação funcional; isto explica o fato de pacientes com glândula ectópica sublingual produzirem normalmente o hormônio tireoidiano (HT), porém, em menor quantidade (DE FELICE; DI LAURO, 2004). A diferenciação funcional inicia-se precocemente, por volta dos quinze dias de vida do feto humano, através da expressão de proteínas essenciais para a produção do HT: TG, TPO, TSH-R, NIS, DUOX e PDS, quando a produção de T4 já pode ser observada (DE FELICE; DI LAURO, 2004; NILSSON; FAGMAN, 2013; SZINNAI, 2014) (Figura 4).

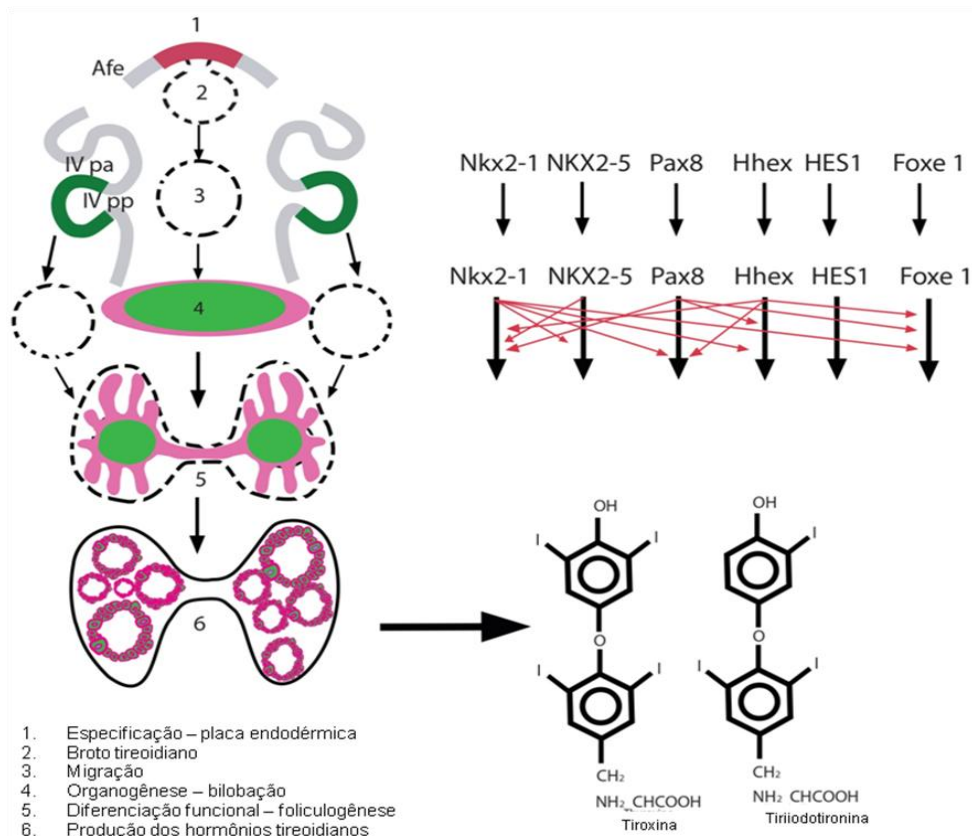


Figura 4. Desenvolvimento da tireoide e expressão de marcadores tireoidianos em humanos. Fonte: Arquivo de imagens do Laboratório de Estudo da Tireoide da Universidade Federal da Bahia.

#### 1.4 HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO

O hipotireoidismo congênito (HC) é a endocrinopatia congênita mais comum, afetando cerca de 1:2.000-3.000 nascidos-vivos, e a mais frequente causa prevenível de retardo mental (LÉGER et al., 2014; TORRESANI, 2014). O HC possui etiopatogenia variada: a) iododeficiência; b) defeitos na morfogênese da glândula tireoide (Disgenesia Tireoidiana); c) defeitos na biosíntese dos HTs (Disormonogênese); d) disfunção hipotalâmica ou hipofisária (Hipotireoidismo Central) d) destruição autoimune da tireoide e; e) HC transitório (RASTOGI; LAFRANCHI, 2010).

Os HTs são de importância fundamental na vida fetal e neonatal, uma vez que estimulam a síntese de fatores de crescimento como o fator de crescimento neuronal (NGF) e o fator de crescimento insulina semelhante (IGF), dos quais depende a ativação dos processos de proliferação, sinaptogênese e mielinização neuronal (FLAMANT; KOIBUCHI; BERNAL, 2015). A ativação da transcrição do gene do NGF no sistema nervoso central regula todos estes processos, razão pela qual, no HC, pode haver acentuado grau de retardo mental (LARSEN; DAVIES, 2005). A maioria das crianças com HC apresenta sinais e sintomas inespecíficos de hipotireoidismo durante o período neonatal e, em apenas 5% delas, é possível estabelecer o diagnóstico somente através do exame clínico nos primeiros dias de vida. Isto se deve, sobretudo, à passagem transplacentária do T<sub>4</sub> materno para o feto durante a gestação (LAFRANCHI, 1999b; LINDSAY; TOFT, 1997). Os sinais de hipotireoidismo mais comumente reconhecidos são icterícia prolongada ou recorrente, dificuldade de sucção e letargia. Posteriormente, com piora do quadro, pode-se observar macroglossia e fontanela posterior aberta. Nos meses subsequentes, há progressivo atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, déficit do crescimento e atraso na maturação óssea, podendo surgir mixedema por acúmulo de ácido hialurônico, que altera a composição da substância básica da derme e de outros tecidos, responsável pela aparência grosseira e edemaciada (RASTOGI; LAFRANCHI, 2010; SZINNAI, 2014). As crianças com HC têm ainda, maior risco de apresentarem outras anormalidades congênicas, que ocorrem em torno de 10% desta população em contraposição aos 3% observados na população geral (KUMAR et al., 2009; OLIVIERI et al., 2002). Anormalidades cardíacas são as mais frequentes e incluem defeitos nos septos atriais e ventriculares e estenose pulmonar. Anormalidades renais e risco de

desordem no desenvolvimento neurológico também são maiores em indivíduos com HC do que na maioria da população (AZAR-KOLAKEZ et al., 2013; CERQUEIRA et al., 2015; LÉGER et al., 2014a).

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 (Ministério da Saúde, [www.saude.gov.br/bvs](http://www.saude.gov.br/bvs)). 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 SUS - Sistema Único de Saúde. 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](http://www.saude.gov.br/bvs)). O diagnóstico de HC deve ser precoce, preferencialmente entre 48-72h de vida, e é realizado através da triagem neonatal com coleta de sangue em papel filtro com determinação do TSH (LÉGER et al., 2014; TORRESANI, 2014). 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 9mUL/I no sangue total, nenhum seguimento é feito. Crianças com resultados de TSH acima de 9mUL/I realizam nova dosagem hormonal. Sendo este segundo resultado superior a 9mUL/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 T<sub>4</sub> total ou T<sub>4</sub> livre (Ministério da Saúde, [www.saude.gov.br/bvs](http://www.saude.gov.br/bvs)). 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 (SETIAN, 2007). O tratamento consiste na reposição hormonal com Levotiroxina (L-T<sub>4</sub>) com o objetivo de normalizar os níveis de T<sub>4</sub> e TSH. A dose inicial de L-T<sub>4</sub> é de 10-15 µg/Kg diária, sendo que, crianças com valores muito baixos de T<sub>4</sub> livre (T<sub>4</sub>l), devem ser tratados com uma dose inicial de L-T<sub>4</sub> mais alta (MACIEL, 2013).

A dosagem de TG sérica, ultrassonografia (USG) e cintilografia são exames complementares importantes no diagnóstico etiológico do HC (JACOB; PETERS, 2015). A

dosagem de TG permite identificar a presença de tecido tireoidiano por ser uma proteína tireoide-específica, afastando o diagnóstico de agenesia. A USG é um exame rápido e não invasivo que não precisa de preparação ou interrupção do tratamento, e quando combinado com a cintilografia torna-se uma ferramenta esclarecedora nos casos de agenesia e até mesmo ectopia que geralmente não são visualizadas na USG. Além disso, a cintilografia também é um exame funcional que permite quantificar a captação de iodeto pela glândula, podendo ser realizado com radioiodo ( $I^{123}$ ) ou tecnécio ( $^{99m}Tc$ ), sendo o  $I^{123}$  o mais indicado uma vez que quantifica a captação do iodo em 2 e 24 horas, além de fornecer imagem nítida que determina tamanho e posição da tireoide. BELTRÃO et al., 2010. A combinação desses exames permitirá definir a etiologia do HC: disgenesia ou disormonogênese. No entanto, independente da etiologia, o tratamento deve ser mantido e o paciente monitorado periodicamente (LÉGER et al., 2014).

#### 1.4.1 Etiologia do HC

O HC pode ser classificado em: a) primário, decorrente de alterações da glândula tireoide, principal causa de HC; b) secundário, devido a distúrbios hipofisários; c) terciário, causado por distúrbios hipotalâmicos e d) transitório (KNOBEL; NOGUEIRA; MEDEIROS-NETO, 2001).

Mundialmente, a principal causa de HC é a deficiência nutricional de iodo. Nesta situação, ocorre diminuição do conteúdo de iodo intra-tireoidiano e consequente comprometimento da produção dos hormônios da tireoide, causando graus variados de hipotireoidismo e elevada prevalência de bócio (GRÜTERS; BIEBERMANN; KRUDE, 2003; GRÜTERS; KRUDE; BIEBERMANN, 2004). Nos países iodo-suficientes a disgenesia tireoidiana (DT), decorrente de distúrbios da ontogênese, é a causa predominante de HC, responsável por até 85% dos casos de crianças afetadas e ocorre de forma esporádica. Os defeitos de síntese hormonal, disormonogênese, acontecem entre 10 e 15% dos casos de HC (POLAK et al., 2004; RASTOGI; LAFRANCHI, 2010; SZINNAI, 2014). Deficiência na função de qualquer uma das proteínas envolvidas na biossíntese dos hormônios da tireoide pode originar bócio. Diversas mutações humanas em genes implicados na etiopatogenia da disormonogênese já foram relatadas: transportador sódio/iodo *SCL5A5/NIS* (defeito no transporte de iodo, OMIM #274400); pendrina, *SCL26A4/PDS* (síndrome de Pendred, OMIM #274600); tireoglobulina, *TG* (OMIM #274700); tireoperoxidase, *TPO* (OMIM #274500); dual oxidase 2, *DUOX2* (OMIM #607200); fator de maturação da dual oxidase 2, *DUOX2A*

(OMIM #274900); ou iodotirosina desiodase, *IYD/DEHALI* (OMIM #274800) (CANGUL et al., 2013; SZINNAI, 2014). Estas mutações possuem herança autossômica recessiva não associadas com outras malformações, com exceção da Síndrome de Pendred, que se associa com surdez neurosensorial (KOPP et al., 1999). O diagnóstico molecular deve ser procedido pela descrição cuidadosa do fenótipo do paciente com HC, incluindo o exame morfológico da tireoide (LÉGER et al., 2014).

#### 1.4.2 Disgenesia Tireoidiana (DT)

Um grupo heterogêneo de doenças relacionadas às alterações no desenvolvimento da tireoide, a DT, é responsável por aproximadamente 80-85% de todos os casos de HC, sendo 2% familiar, e compreende todas as diferentes formas de desordem do desenvolvimento da tireoide (CASTANET et al., 2010; POLAK et al., 2004; RAMOS; NESI-FRANÇA; MACIEL, 2008; SZINNAI, 2014). É mais frequente no sexo feminino (2:1) e na população caucasiana (LAFRANCHI, 1999).

A DT inclui um espectro de anormalidades do desenvolvimento da glândula, sendo agenesia e ectopia as formas mais comuns: a) agenesia ou atireose: corresponde a 25-30% dos casos de HC, caracterizada pela ausência total de tecido tireoidiano e representa a forma mais grave de HC; b) glândula ectópica: forma mais comum de DT devido ao deficiente processo migratório, nestes casos a tireoide está localizada fora do local usual (sublingual, lingual, intratraqueal, intraesofágica ou torácica), em 90% dos casos a tireoide encontra-se em posição sublingual (RASTOGI; LAFRANCHI, 2010); c) hipoplasia: caracterizada por uma glândula pouco desenvolvida e hipofuncional devido a deficiente proliferação celular; corresponde a 10% dos casos de HC; d) hemigenesia: apenas um dos dois lobos tireoidiano está presente. Na maioria dos casos os indivíduos permanecem eutireoidianos (RASTOGI; LAFRANCHI, 2010). A porcentagem de diagnóstico para cada subgrupo varia de acordo com o uso conjunto de USG e cintilografia (BELTRÃO et al., 2010). Particularmente, a DT pode ser subdiagnosticada devido à falta de uma avaliação sistemática utilizando esses exames, tornando necessário um estudo detalhado dos aspectos clínicos e perfil hormonal dos pacientes (CASTANET et al., 2010, 2015; POLAK et al., 2004).

Embora o número de células progenitoras que inicialmente formam o primórdio tireoidiano possa ser um fator limitante para o tamanho final da glândula, existe um grande número de evidências que indicam que alguns fatores tróficos são importantes para a propagação da linhagem de células foliculares durante estágios subsequentes da morfogênese

(FAGMAN; ANDERSSON; NILSSON, 2006). O processo de proliferação celular é contínuo durante a embriogênese, envolvendo o período de fusão com o corpo ultimobraquial e etapas da morfogênese final como a formação dos lobos (FAGMAN; ANDERSSON; NILSSON, 2006). Do ponto de vista clínico, um melhor entendimento dos mecanismos de controle morfogenéticos da tireoide é extremamente útil e relevante, uma vez que os distúrbios de desenvolvimento da glândula são responsáveis pela maioria dos casos de HC e, aparentemente, possuem diferentes comportamentos, evolução clínica e prognóstica (CASTANET et al., 2010; RAMOS; NESI-FRANÇA; MACIEL, 2008; RAMOS et al., 2008).

#### 1.4.3 Bases Genéticas e Moleculares da Disgenesia Tireoidiana

A etiopatogenia molecular da DT não está completamente esclarecida (CASTANET et al., 2010). Adicionalmente, existe ampla variabilidade fenotípica e penetrância incompleta em alguns casos familiares que apontam para possíveis mecanismos multigênicos de herança não mendeliana (PARK; CHATTERJEE, 2005). A busca pela etiologia molecular envolvendo mecanismos genéticos encontra respaldo no fato de ter maior prevalência no sexo feminino (2-3:1), possuir associação comum a outras síndromes genéticas e malformações congênitas, além de possuir maior prevalência em famílias com histórico de consanguinidade (CASTANET et al., 2001; DEVOS et al., 1999; LÉGER et al., 2002; PERRY et al., 2002).

Nos últimos anos, a descoberta de alguns genes candidatos (especialmente fatores de transcrição envolvidos na diferenciação das células foliculares tireoidianas) e outros mecanismos implicados na morfogênese tireoidiana possibilitaram maior esclarecimento sobre as bases genéticas da ontogênese tireoidiana. Entretanto, apenas 2% a 5% dos pacientes com DT apresentam mutações nos genes candidatos identificados: receptor do *TSH* (*TSH-R*, OMIM #275200), *PAX8* (OMIM #167415), *NKX2-1* (OMIM #600635), *FOXE1* (OMIM #602617) e *NKX2.5* (OMIM #225250), indicando que sua patogênese é muito mais complexa (CASTANET et al., 2009; DE FELICE; DI LAURO, 2004, 2011).

- ***TSH-R***: O receptor do TSH está localizado no cromossomo 14q31, tem dez éxons e codifica uma proteína de 765 aminoácidos (WEISS; WEINBERG; REFETOFF, 1993). Responsável por intermediar as ações do TSH no crescimento, metabolismo e funções celulares, com o objetivo de estimular a síntese e secreção hormonal, a via de sinalização ativada através da ligação do TSH ao seu receptor (*TSH-R*) é de grande importância para o desenvolvimento de uma tireoide de tamanho normal e bem diferenciada (VAN WASSENAER et al., 2002). Acredita-se que a expressão do *TSH-R* dependa da interação entre os fatores de transcrição



*NKX2-1*, *FOXE-1* e *PAX8*, desta forma, mutações inativadoras destes genes poderiam afetar negativamente a proliferação, diferenciação e função glandular gerando tanto uma tireoide normal quanto hipoplásica ou ainda agenesia tireoidiana aparente (FAGMAN; NILSSON, 2010b; POLAK et al., 2004; SUNTHORNTHEPVARAKUL et al., 1995). Mais de 60 mutações com perda-de-função no gene do *TSH-R* já foram descritas. São identificadas como a causa mais comum de resistência ao TSH, tendo a variabilidade fenotípica como principal característica das mutações nesse gene, representado o achado genético mais comum em pacientes com DT (CASSIO et al., 2013).

- ***PAX8***: o gene *PAX8* (*paired box gene 8*) humano está localizado no cromossomo 2q14-q14e consiste de 12 éxons. Pertence a uma família de genes caracterizados pela presença do domínio de ligação específico ao DNA e altamente conservado (GRÜTERS; KRUDE; BIEBERMANN, 2004). É membro da família dos fatores de transcrição sendo expresso no desenvolvimento da glândula tireoide, sistema nervoso central e sistema excretor. Durante o desenvolvimento tireoidiano, *PAX8* interage com *TTF-1* sendo importantes reguladores de genes tireoide-específicos, como: *TPO*, *TG* e *NIS* (MACCHIA et al., 1998). Diversos estudos demonstram mutações heterozigóticas em pacientes com HC e DT, tanto em casos familiares como esporádicos, com padrão de herança autossômico dominante e fenótipo bastante variável, englobando pacientes com tireoide tóxica de tamanho normal à hipoplasia acentuada mesmo dentro de uma mesma família (MEEUS et al., 2004; VINCENZI et al., 2014). Apenas em um caso foi encontrado ectopia (RAMOS et al., 2014).

- ***NKX2.5***: O gene que codifica *Nkx2.5* localiza-se no cromossomo 5q34, fundamental para a morfogênese e miogênese cardíaca é expresso precoce e transitoriamente no primórdio tireoidiano. Algumas mutações inativadoras foram identificadas em pacientes com cardiopatia congênita, sendo que, os defeitos de septo e distúrbios de condução figuram entre os defeitos mais comumente encontrados (BENSON et al., 1999). Durante a embriogênese, parece haver íntima relação entre o desenvolvimento tireoidiano e cardiovascular, sobretudo referente ao processo de migração do primórdio tireoidiano. Estudos *in vitro* indicam que *NKX2.5* seja um forte indutor de *NIS* (simportador sódio-iodeto) e que interaja sinergisticamente com *TTF-1*, podendo influenciar ainda a expressão de genes específicos como o da pendrina e da *TG* (ALT et al., 2006; VAN ENGELEN et al., 2012). As malformações congênitas cardíacas são as mais frequentemente associadas em pacientes com DT, aparentando, o *NKX2.5*, ser um bom candidato para o estudo das DT (OLIVIERI et al., 2002). Algumas mutações inativadoras do *NKX2.5* foram encontradas em pacientes com DT associadas a malformações cardíacas, sendo mais comuns os defeitos de septo e os distúrbios de condução. As alterações

tireoidianas encontradas incluem ectopia e agenesia (DENTICE et al., 2006; HERMANNNS et al., 2011).

- **NKX2-1**: é um fator de transcrição da família NKX2 codificado por um gene localizado no cromossomo 14q13. Durante a vida embrionária, o gene *TITF-1* (*TTF-1*, *NKX2-1* ou ainda *T/EBP*, *thyroid specific enhancer binding protein*) se expressa no primórdio tireoidiano, traquéia, pulmão, cérebro e neuro-hipófise (KRUDE et al., 2002). De acordo com o observado em camundongos *knockout*, os animais com mutação em homozigose apresentam agenesia, ausência da região anterior do cérebro e, no lugar dos pulmões, estruturas em formato de bolsas com alvéolos hipoplásicos, supondo-se que sua mutação inativadora em homozigose seria praticamente incompatível com a sobrevivência no período neonatal (KRUDE et al., 2002). De fato, os pacientes até então identificados apresentam mutação em heterozigose com uma extrema variedade fenotípica que inclui problemas respiratórios no período neonatal, distúrbios neurológicos (hipotonia, ataxia, disartria, microcefalia, atraso global do desenvolvimento e coreoatetose) e fenótipo tireoidiano variável entre eutireoidismo, HC com tireoide normal à hipoplásica e agenesia tireoidiana aparente (KRUDE et al., 2002; CARRÉ et al., 2009; GUILLOT et al., 2010). A análise de famílias estabelece forte relação com coréia hereditária benigna (distúrbio de movimento autossômico dominante) (PEALL; KURIAN, 2015). A imensa variação fenotípica e a falta de correlação com a extensão do defeito genético indicam a presença de penetrância incompleta e influência de genes moduladores, assim como de fatores ambientais (PARK; CHATTERJEE, 2005).

- **FOXE-1**: *forkhead box E1*, também conhecido como *TITF-2*, é um fator de transcrição (*thyroid transcription factor 2*), cujo gene está localizado em 9q22 sua expressão ocorre muito precocemente na tireoide, bolsa de Rathke, língua e esôfago e, mais tardiamente, no palato, coanas e folículos pilosos (DE FELICE; DI LAURO, 2004). Mutações no *TITF-2* resultam em um fenótipo sindrômico complexo conhecida como síndrome de Banfort-Lazarus caracteriza-se por fenda palatina, atresia bilateral de coanas, epiglote bífida, alteração do couro cabeludo (cabelos espetados) e agenesia tireoidiana (BAMFORTH et al., 1989). Mutações em homozigose já foram descritas em pacientes com HC, indivíduos heterozigotos são normais e os portadores de mutação com atividade residual podem apresentar fenótipo incompleto (BARIS et al., 2006).

- **HES1**: (*hairly/enhancer of split 1*) localizado no cromossomo 3q28, pertencente ao grupo bHLH (*basic helix-loop-helix*) é controlado pela via *notch* de sinalização, comumente implicado na regulação da diferenciação, crescimento e manutenção celular sendo expresso em diferentes tecidos. Em estudo realizado por FERRETTI et al., 2008, foi detectado a

expressão de *HES1* em tireócitos humanos, onde o mesmo parece regular a transativação de *NIS*. CARRE et al., 2011, demonstrou que, em embriões de animais *Hes1*<sup>-/-</sup>, a tireoide apresentava-se hipoplásica, já que havia redução na proliferação das células precursoras dos tireócitos e células C, além da redução da função endócrina dos tireócitos, o que demonstra a importância do *Hes1* na correta organogênese da glândula. Foi verificado também, que a expressão de *HES1* estava mantida na glândula completamente desenvolvida, sugerindo assim, um papel importante para a função glandular.

### 1.5 HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO NA BAHIA

Apesar do programa de triagem neonatal ter sido credenciado em 1992 pelo Ministério da Saúde, somente no ano de 2001 foi estabelecido o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), organizando o serviço prestado pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Durante o ano de 2012 o Estado da Bahia foi habilitado a entrar na Fase III do PNTN, passando então a fazer o diagnóstico para fibrose cística, além dos exames habituais para fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, doenças falciformes e outras hemoglobinopatias. 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 (MINISTÉRIO DA SAÚDE). Em 24 anos do programa de triagem neonatal (1992-2016) 1.188 crianças foram diagnosticadas com HC, e atualmente, encontram-se em acompanhamento 773 pacientes.

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, atualmente, TSH neonatal inferiores a 9mUL/I no sangue total, nenhum seguimento é feito. Crianças com resultados de TSH acima de 9mUL/I realizam nova dosagem hormonal. Sendo este segundo resultado superior a 9mUL/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 T<sub>4</sub>total (T<sub>4</sub>t) ou T<sub>4</sub>livre (T<sub>4</sub>l) (APAE, 2006). 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 (LAFRANCHI, 1999).

Habitualmente, outros exames complementares para definição da etiologia do HC e posterior auxílio ao tratamento **não** são realizados pelo serviço de triagem neonatal da Bahia,

como: dosagem de TG, ultrassonografia da tireoide e cintilografia. Embora, independente da etiologia do HC, o tratamento constitua-se de reposição hormonal com tiroxina sintética (levotiroxina ou L-tiroxina) para manutenção dos níveis séricos de tiroxina em valores normais, permitindo assim, o desenvolvimento neuropsicomotor normal do paciente, em pacientes com HC devido a DT nem sempre a reposição hormonal precoce garante boa evolução clínica, podendo ocorrer danos neurológicos ( LINDSAY; TOFT, 1997; LÉGER et al., 2014).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterização clínica e genética de pacientes com HC diagnosticados com disgenesia tireoidiana;

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar clínica dos indivíduos com HC em acompanhamento na APAE – Salvador (Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais);
2. Avaliar a associação entre malformações tireoidianas e outras anormalidades e síndromes.
3. Pesquisar polimorfismos e mutações nos genes candidatos: *PAX8*, *TSH-R*, *NKX2.5* e *HES1*, em pacientes diagnosticados com disgenesia tireoidiana;
4. Pesquisar o gene *TSH-R* numa coorte de pacientes com HC diagnosticados no programa de triagem neonatal da França.

Desta forma, para os objetivos específicos 1-3 desta tese, realizamos estudos colaborativos empregando, por um lado, a experiência acumulada da equipe do Laboratório de Estudo da Tireoide da UFBA (LET) no diagnóstico molecular de doenças da tireoide; por outro lado, a casuística bem documentada da APAE-Salvador que desenvolve no Estado da Bahia um sistema bem estruturado de rastreamento e seguimento do hipotireoidismo congênito. Boa parte das crianças detectadas pelo programa têm o diagnóstico confirmado e são seguidas regularmente. Desta forma, quando procuramos estudar a patogênese molecular das DT, optamos por utilizar as crianças que constituem a coorte do Programa do Estado da Bahia, colaborando com a implementação da rotina de investigação e diagnóstico etiológico preciso dos pacientes com HC no estado. Além disso, uma parte dos trabalhos realizados no período de doutoramento refere-se ao objetivo específico 4.

### 3. RESULTADOS: Capítulo 1

**Manuscrito:** Referente aos objetivos específicos desta tese, com ênfase nos objetivos específicos números 1 e 3.

#### **Thyroid Embryogenesis Genes *PAX8*, *NkX2.5*, *TSH-R*, *HES1* Not Responsible for Thyroid Dysgenesis in Cohort of 63 Brazilian Children**

Oliveira, TLC; Ramos, YR; Strappa, GB; Jesus, MS; Santos, JG; Souza, CL; Fernandes, VM; Boa-Sorte, N; Amorim, T; Silva, TM; Ladeia, AM; Acosta, AX; Ramos, HE.

Este artigo será submetido a revista Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism.

**Thyroid Embryogenesis Genes PAX8, NkX2.5, TSH-R, HES1 Not Responsible for  
Thyroid Dysgenesis in Cohort of 63 Brazilian Children**

Oliveira, TLC<sup>1,2</sup>; Ramos, YR<sup>1</sup>; Strappa, GB<sup>1</sup>; Jesus, MS<sup>1</sup>; Santos, JG<sup>1</sup>; Souza, CL<sup>1</sup>; Fernandes, VM<sup>3</sup>; Boa-Sorte, N<sup>4</sup>; Amorim, T<sup>4</sup>; Silva, TM<sup>5</sup>; Ladeia, AM<sup>6</sup>; Acosta, AX<sup>2</sup>; Ramos, HE<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Department of Biorregulation, Thyroid Study Laboratory, Health & Science Institute, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil

<sup>2</sup>Post-graduate Program in Biotechnology in Health and Investigative Medicine, Gonçalo Moniz Research Center (CPqGM/FIOCRUZ), Salvador, Brazil.

<sup>3</sup>Fleury Group.

<sup>4</sup>Association of Parents and Friends of Exceptional Friends – APAE- Salvador, Brazil

<sup>5</sup>Post-graduate Program in Public Health –Federal University of Bahia, Salvador, Brazil

<sup>6</sup>Post-graduate Program in Human Health and Medicine, Bahiana School of Health and Medicine, Salvador, Brazil

Corresponding author: Helton E. Ramos, M.D., Ph.D. Department of Biorregulation, Federal University of Bahia, Avenida Reitor Miguel Calmon, S/N. Vale do Canela. Room 301. Salvador-BA, Brazil. 40110-102. Tel. +55-071-3283-8908 FAX. +55-071-3283-8908 18.  
E-mail: ramoshelton@gmail.com

Abbreviated Title: Genetic Aspects of Thyroid Dysgenesis in 63 Brazilian Children

Keywords: thyroid dysgenesis, congenital hypothyroidism.

Word count: 3,395

Financial support: This work was supported in part by grants from FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado da Bahia) (AMTL and HER) – Edital N°12/2012 and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/ National Counsel for Scientific Development and Technology) (HER) – Chamada N° 14/2012. TLOC has financial support by CPqGM/FIOCRUZ-BA.

The authors have no conflicts of interest to disclose.

## ABSTRACT

**Context:** Thyroid dysgenesis accounts for 85% of congenital hypothyroidism resulting in severe developmental abnormalities if untreated. Genes thought to be involved in thyroid embryology causing structural deformities, are inconsistent in humans. **Objective:** Evaluate 4 candidate genes (PAX8, NKX2.5, TSH-R and HES1) in 63 confirmed cases of thyroid dysgenesis. **Methods:** Refine the diagnosis of congenital hypothyroidism into specific subtypes of thyroid dysgenesis with hormone levels (TT4 and TSH), thyroid ultrasound and scintigraphy. Genetic analysis investigating the presence of mutations in the 4 genes. **Results:** No mutations in the 4 genes identified. The overall birth prevalence of congenital hypothyroidism was 1:3,549. In situ thyroid gland represented 71.1% of all cases of permanent primary congenital hypothyroidism, followed by hypoplasia (9.6%), ectopia (7.8%), hemiagenesis (6.0%) and agenesis (5.5%). The highest neonatal screening TSH levels were in the agenesis group ( $p < 0.001$ ). **Conclusions:** Thyroid dysgenesis is possibly a polygenic disorder - the result of multiple factors.



## INTRODUCTION

Congenital hypothyroidism (CH) is the most common disorder of the endocrine system among newborns. The global incidence of CH is 1/3000-4000 is relatively stable, indicating that it is distinct from hypothyroidism acquired from iodine deficiency (i.e., environmental influences). Untreated CH can cause dwarfism and severe intellectual disability, with the delayed onset of thyroid replacement therapy by only a few weeks after birth associated with reduced development of mental functions later on in life (1). Therefore, neonatal screening programs have been implemented to identify these patients early to ensure proper somatic growth and development of the central nervous system in infants (2).

The causes of CH are broadly categorized into dyshormonogenesis accounting for 15% of the cases, and thyroid dysgenesis (TD) accounting for 85% of the cases (3-6). Dyshormonogenesis is caused by autosomal recessive mutations of key molecules of thyroid hormone synthesis where thyroid hormone production fails in a structurally sound thyroid gland (7). TD is caused by a wide range of different structural malformations in the thyroid that result in a wide variety of different phenotypes of CH (6, 8-10). TD is subcategorized into: 1) thyroid agenesis – the most severe form which has a complete lack of thyroid tissue (i.e. both lobes); 2) thyroid hemiagenesis – one of the thyroid lobes completely missing; 3) thyroid hypoplasia – the gland is smaller but still has a normal position; 4) thyroid ectopia – the gland is not positioned normally but rests along the migratory path of the primordium.

While TD appears sporadically in the vast majority of cases (8), several findings have pointed to a genetic underpinning. In about 2% of the cases there are familial inheritance patterns (11) and a higher prevalence has been found in girls and in Hispanics and Caucasians in comparison to Blacks (12). Several genes have been implicated from animal models with

possible associations with TD, however in human genotyping studies results have been inconsistent.

The importance for understanding the genetic underpinnings of TD has wide implications in not only a further understanding of the genotype/ phenotype relationship of the disorder but also with future drug development and screening programs for CH.

In collaboration with the Brazilian neonatal screening program by the Association of Parents and Friends of Exceptional Children (APAE), this study identified patients with confirmed cases of permanent CH to investigate: 1) the etiology of the diagnosis of CH and identify those with confirmed cases of TD into sub-categories (i.e. agenesis, hemiagenesis, hypoplasia, ectopia); 2) 4 different candidate genes that have been suggested in thyroid embryogenesis (paired box gene 8 (PAX8), thyroid stimulating hormone receptor (TSH-R), transcription factor related locus 5 (NKX2.5) and hairy/enhancer of split 1 (HES1)). We believe this study will contribute to the base of knowledge in the search for the genetic basis of CH caused TD.

## METHODS

This study was approved by both the Federal University of Bahia - Ethical Committee for Research Projects and The APAE-Salvador and carried out in accordance with the Declaration of Helsinki (13) of the World Medical Association. Participation was voluntary with written consent obtained from at least one parent or guardian. The data are reported in accordance with the STROBE reporting guidelines for observational research (14).

### Setting

The study was performed in the northeastern state of Bahia (20° 30'-20° 30' N, 20° 30' -20° 30' W), approximately 1500 km to the northeast of Brasilia in Brazil. The Brazilian northeast is the poorest region in Brazil, with a median annual income of USD 1800 (15) and a human

development index of 0.660, which is considered very low at position 22 of the 27 states in Brazil (16). According to the 2014 national census, the state of Bahia has 15,126,371 inhabitants.

### Study Design

In collaboration with their electronic patient records were used to retrieve patients from the period of 2001-2008 who had been referred for treatment for elevated levels of TSH indicating CH from neonatal screening. The time period was chosen based upon the availability of electronic records (only after the year 2001) and having a confirmed diagnosis from APAE after the age of 3 (analysis performed in 2011, allowing up to the year 2008 to be considered for participation). Patients underwent routine monitoring and treatment in accordance to APAE-Salvador procedures.

This study refined the diagnosis of CH of the eligible patients to identify those patients whose CH was due to dysgenesis by measuring thyroglobin (TG) levels, performing a thyroid US and scintigraphy. Patients were classified into 5 diagnostic categories: 1) ectopy, 2) agenesis (true or apparent), 3) hypoplasia, 4) hemigenesis and 5) in situ thyroid gland (ISTG) and/or goiter. Retrospective analysis of patient medical records was conducted for all patients for whom a diagnosis was reached to evaluate the clinical presentation of these patients including: 1) TSH, total T4 (TT4) and free T4 (fT4) at the time of neonatal screening; and 2) congenital heart defects or other congenital malformations in subjects appearing >3 years of age.

Patients who were classified in the first 4 diagnostic categories (ectopy, agenesis, hypoplasia and hemigenesis) met the diagnostic criteria for TD and underwent molecular analysis to evaluate the role of 4 different candidate genes believed to be associated with PAX8, TSH-R, NKX2.5 and HES1.

### APAE – Association of Parents and Friends of Exceptional Children

The APAE was established in 1954 as a national Brazilian program whose main objective is to promote comprehensive care to people with disabilities, primarily those with intellectual and multiple disabilities. Currently, they have 23 Federations in 23 states and more than 2143 APAEs distributed throughout the country (17).

### Routine examines at APAE

The State of Bahia Neonatal Screening Program conducted by APAE-Salvador performs a dried blood spot sample on filter paper from a small heel prick within the first 48 hours of life of newborns and test for different health conditions, including TSH - using the Delphia Perkin-Elmer immunofluorimetric assay (TSH cut-off <10 mU/L). Neonates with TSH levels surpassing 20mU/L are referred for evaluation and treatment; with those with TSH levels between 10-20 mU/L are retested within 24 hours and referred if the retest confirms TSH levels above 10 mU/L. Once referred, the neonates medical history is obtained and they undergo a physical examination including a blood sample to confirm diagnosis. Diagnosis is confirmed through chemoluminescent assays of serum levels of TSH, TT4 and free T4 fT4 (reference range of 1.36-8.8 mU/L, 4.6-12 µg/dL and 1.2-2 ng/dL, respectively). After the confirmation of results, levothyroxine (L-T4) replacement treatment, 10-15 µg/kg/day, is started and L-T4 dosage is adjusted during infancy and childhood according to serum TSH and TT4/fT4 measures. When the infants reach 3 years, they follow a protocol to determine if the CH is permanent or transient, consisting of serum thyroid function tests (TSH and TT4/fT4) performed after 15 to 30 days of L-T4 therapy discontinuation.

### Subjects

Patients eligible for inclusion in the study: 1) had a confirmed diagnosis of congenital hypothyroidism in the APAE database after the age of 3; 2) had a subtype diagnosis of TD

based upon TG levels, thyroid ultrasound and scintigraphy and; 3) had appropriate consent forms to participate. Patients were excluded if they were unable to complete the study protocol between May 2012 - June 2015 TG levels, thyroid ultrasound and scintigraphy impeding the ability to make a diagnosis due to insufficient testing results.

#### Tests outside of routine APAE protocols

##### Thyroglobulin

In accordance to standard protocols, patients were advised to fast the night prior and to refrain from ingesting L-T4 replacement therapy within 24 hours of blood collection. Morning samples of 5mL of venous blood were collected between 0800-1000 h in all cases. Serum TG level was measured using a Cobas E411 analyzer and an electrochemiluminescence assay (Roche Diagnostics International, Rotkreuz, Switzerland).

##### Imaging

Thyroid ultrasound was performed by a single ultrasonographer using a portable Mindray DP-4900/SK-40 (Shenzhen Mindray Bio-medical Electronics Co., Ltd.; Nanshan, Shenzhen, P.R. China). The subjects were in a supine position with the neck hyperextended for examination. The thyroid volume of each lobe was calculated using the formula (18-20): width (cm) x length (cm) x depth (cm) x 0.479 for each lobe. The thyroid volume was the sum of the volume of both lobes; isthmus volume was not taken into account.

Thyroid scintigraphy was performed by an outside laboratory Clínica Diagnoson with a gamma camera equipped with a pinhole collimator and an aperture 5 mm or less in diameter. No patients were pregnant or lactating at the time of the procedure. All patients were advised to avoid any material that may interfere with the test including: medications (i.e., thyroid hormones and antithyroid agents affecting the pituitary-thyroid axis) and; iodine containing food (e.g. kelp) and medications (e.g. iodinated contrast, amiodarone, betadine). One or more

planar images were obtained of the thyroid within 15-30 minutes after intravenous injection of Tc99m pertechnetate. The test was performed with patients in a supine position and the neck hyperextended for examination. In patients who were unable to lie supine, the sitting position was employed.

#### Genetic testing

DNA was extracted from whole blood using standard techniques. The entire coding region and promoter of the PAX8 gene, including exon/intron boundaries, was amplified from genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR) using standard techniques. All 10 individual TSH-R exons were sequenced, with exon 10 subdivided with 2 overlapping primers. The coding region of the NKX2.5 gene was studied and each of 2 exons were amplified by a total of 3 PCRs. HES1 was sequenced entirely using 5 pairs of primers with exon 4 divided into two parts. PCR products were sequenced directly on a ABI3100 genetic analyzer. (All primers and PCR conditions are available upon request).

#### Statistical Analysis

The clinical parameters (TSH and fT4 serum levels) of the patients diagnosed with TD were compared to patients diagnosed with ISTG to assess the severity of patients with different phenotypes. Statistical analysis was conducted with SPSS 2.0 and Stata 12 software packages. Mann-Whitney U, Kuskall-Wallis, Chi-square and Fisher's Exact Tests were used whenever appropriate and a p value of <0.05 was considered significant. A bonferroni correction was used for multiple comparisons.

## RESULTS

A flowchart describing the pre-study APAE procedures and the current study procedures and patient inclusion/exclusion are illustrated in Figure 1. Of the 1,256,642 newborns screened during the period of 2001-Dec 2008, abnormal TSH levels were confirmed in 376 newborns resulting in a prevalence of congenital hypothyroidism of 1:3549 newborns. Of these, 5.85% (N=22) were found to be transitory primary congenital hypothyroidism based upon spontaneous normalization of TSH between screening and diagnosis or no rise in TSH after stopping T4 treatment or gradually reduced L-T4 requirement during the follow-up followed by hormone levels normalization by the age of 3 – thus resulting in 354 patients eligible for inclusion.

<insert Figure 1 here>

During the study period May 2012-June 2015, TG was measured in all 354 patients, however only 218 patients were able to complete the remaining imaging tests in the study duration; excluding those patients whose diagnosis could not be delineated (114 patients who lacked an ultrasound image and 22 patients who did not complete a scintigraphy exam).

Of the 218 patients diagnosed, 155 (71.1%) had ISTG with the remaining 28.9% (N=63) having some form of TD: ectopy (N=17; 7.1%), agenesis (N=12; 5.0%), hypoplasia (N=21; 8.8%) and hemiagenesis (N=13; 5.4%). The overall gender distribution was 118 females: 100 males. While the patient totals are small, ectopy and agenesis showed a gender bias with females comprising over 80% of those diagnosed with ectopy (N=14 of 17) and agenesis (N=10 of 12) compared with the other 3 groups where there was a near equal distribution between the genders. Along with a greater gender discrepancy, those with ectopy ( $p \leq 0.05$ )

and agenesis ( $p \leq 0.001$ ) had medians that were notably higher of TSH at the initial newborn screening and confirmatory serum TSH testing compared to the other TD phenotypes. A summary of the clinical parameters evaluated in newborns is shown in Table 1. Comparing more broadly, patients with TD compared with those with ISTG had significantly higher screening TSH levels ( $p < 0.001$ ) and confirmatory serum TSH levels ( $p < 0.05$ ) (Figure 2). This difference is likely due to the group of agenesis as this group showed significantly higher levels than the other groups of TD (Figure 3). In addition, the agenesis subgroup had lower fT4 levels (0.4, IQR 0.3-1.2 $\mu$ g/dL) followed by the ectopy group (0.8, IQR 0.3-1.1 $\mu$ g/dL) compared to the other groups.

<insert Table 1 here>

<insert Figure 2 here>

<insert Figure 3 here>

### Genetic findings

None of the 63 patients with TD (41 females and 22 males) had mutations in the studied candidate genes PAX8, TSH-R, NKX2.5 and HES1.

Six known single nucleotide polymorphisms (SNP) were found in patients with TD. Two in the NKX2.5 gene: a) p.Glu21 was found in 34/63 (54%) patients - 19 heterozygotes, 15 homozygotes; b) p.Gln181 was found in one patient (1/63 - 2%). Four polymorphisms were found in the TSH-R gene: a) p.D727E was found in 31/63 (49%) patients - 27 heterozygotes, 4 homozygotes; b) p.P52T was found in 4/63 (6%) - all heterozygotes; c) p.N187N was found



in 14/63 (22%) - all heterozygotes and; d) p.L645L was found in 2/63 (3%) patients - both compound heterozygotes with the p.D727E polymorphism.

## DISCUSSION

We found that 4 of the candidate genes (PAX8, NKX2.5, TSH-R and HES1) proposed as most likely causing TD were not responsible for the confirmed TD in our cohort of 63 Brazilian children. This finding implies that there are other genes that are responsible for TD. In the cases of the patients with agenesis and ectopia, there was a clear gender bias towards females that was not seen in the ISTG, hypoplasia or hemiagenesis groups which had a virtual equal distribution in both genders. The difference between the groups of patients with TD and ISTG was caused by patients with agenesis who displayed widely different clinical values at the time of screening than both other subtypes of TD than both groups of patients with other subtypes of TD and ISTG. To our knowledge we are the first in Brazil to perform this type of genetic analysis for candidate thyroid embryonogenesis genes PAX8, NKX2.5, TSH-R and HES1 on confirmed cases of permanent CH TD. It should be noted that we excluded NKX2.1 and FOXE-1 from our analysis based upon the presenting phenotype of our cohort showed no signs of Bamforth-Lazarus syndrome or neurological findings.

Overall, the incidence of CH from the Brazilian neonatal screening was 3,549, falling well within the expected global incidence reported of 1/3000-4000 infants (3,6,9). ISTG was the most common etiology found in our cohort, with a rise in incidence from previously reported measures, primarily attributed to the diagnosis of milder cases of CH due to a lower TSH threshold used for screening.

The severity of hypothyroidism in children with TD has been variable between studies. In our study of 63 children with TD, we found that children with agenesis, present clinical parameters significantly different than the other subtypes at both neonatal screening and

confirmatory testing for hormone levels, this is consistent with other studies that have demonstrated that agenesis children present worse neuropsychological development in comparison with children with hypoplasia, ectopy or dyshormonogenesis and require higher doses of L-T4 (21). So, it is possible that treatment and follow-up schedules for TD need to consider the unique hormonal patterns and different responses to therapy in each different etiological category.

Similar to our study, only a few mutations have previously been found in large panels of patients (22-24). Mutations have been previously identified in familial groups with TD, though our population are likely to be sporadic cases and could be an important factor. Of the polymorphisms found, p.D727E in the TSH-R gene has been frequently reported in the Brazilian population (22,23,25) with a frequency as high as 10% (26) representing the second highest reported alteration in patients with CH. Previous studies, have found PAX8 mutations ranging from 0-3.4% (8). Inactivating mutations on the human TSH-R gene can cause a resistance to TSH with a strongly variable disease type. Several studies have found that TSH-R mutations are more frequent than expected in patients with TD with prevalence in cohorts between 3-6% and even as high as 16.5% (8). HES1 has yet to be found in patients with TD (27). NKX2.5, also associated with cardiac malformations, was found in a single study with 3 heterozygote mutations in a cohort of 241 patients (28).

As the molecular mechanisms underway in the very early steps of thyroid organogenesis have been hypothesized to possibly underlie the molecular pathogenesis of TD, it remains difficult to draw many conclusions from the murine models as many fundamental differences have been found (i.e. localization, mode of inheritance and penetrance). For instance, while heterozygous PAX8 mutations in murine models do not display a pathological phenotype, there have been reports of heterozygous PAX8 mutations in sporadic and familial CH patients with thyroid hypoplasia or ectopy (29-32) though with a varied biochemical and

morphological phenotype among patients with the same PAX8 mutation (30,31). Currently, findings suggest that one's genetic background plays an important role in phenotypic presentation (33). TD is likely to be of polygenic origin (34) and unlikely to occur from mendelian transmission (35); with the existence of several modifier alleles contributing to a resulting phenotype (7,27-29,36,37). This is consistent with the theory that suggests that the molecular mechanisms resulting in defective thyroid morphogenesis may be “modulated by the genetic make-up of the embryo and/or the hormonal milieu of the fetus” (38). While many genes have been identified as important contributors to survival, proliferation and migration of thyroid precursors cell, they, in fact, act as an integrated and complex regulatory network (7) and will likely require large samples of individuals to unravel the etiopathogenesis of TD.

One of the significant limitations of thyroid ultrasound is poor sensitivity in visualization of ectopic thyroid compared to radionuclide scanning (25,39). In attempts to reduce the chances of misdiagnosis of TD etiology we included only those patients with adequate testing to confidently and accurately perform a diagnosis. In doing so, there were a total of 136 patients who were eliminated from our study which may reflect a reporting bias with the prevalence of the different forms of CH that may not necessarily reflect the actual distribution of TD subtypes. This report only represents analysis of 19% of the children diagnosed with CH in the State of Bahia, Brazil during our specified time period and may be subject to referral bias. Our genetic analysis was performed following standard protocol, though we did not perform any analysis on other modifications found in the promoter or intronic regions, which should as well be considered.

In conclusion, we did not find any mutations in the proposed thyroid embryogenesis genes TSH-R, PAX8, NKX2.5 and HES1 in 63 confirmed cases of TD. We did find that patients with agenesis had clinically distinctive hormone levels at the time of the neonatal screening

from those with other types of CH. The few genetic polymorphisms identified in the TSH-R, PAX8, NKX2.5 and HES1 were not enough to clarify the pathophysiology and the molecular mechanisms underlying defects in the cases of TD.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for Renata Arruti, Monica Lima and all team from APAE-Salvador. We appreciate the cooperation of all the patients and their families. We would also like to thank Hattie Cobb for her editorial contributions to the manuscript.

#### LIST OF NON-STANDARD ABBREVIATION

CH - Congenital hypothyroidism

ISTG - In situ thyroid gland

TD - Thyroid dysgenesis

## REFERENCES

1. Klein AH, Meltzer S, Kenny FM. Improved prognosis in congenital hypothyroidism treated before age three months. *J. Pediatr.* 1972; 81:912–915.
2. Morreale de Escobar G. The role of thyroid hormone in fetal neurodevelopment. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2001; 14 (Suppl. 6):1453–1462.
3. Lafranchi SH. Newborn screening strategies for congenital hypothyroidism: an update. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2010; 33:1–9.
4. Olney RS, Grosse SD, Vogt RF. Prevalence of congenital hypothyroidism--current trends and future directions: workshop summary. *Pediatrics* 2010; 125 (Suppl):S31–S36.
5. Szinnai G. Clinical genetics of congenital hypothyroidism. *Endocr. Dev. Basel* 2014; 26:60-78.
6. Rastogi MV, Lafranchi SH. Congenital hypothyroidism. *Orphanet J. Rare Dis.* 2010; 5:17.
7. Fagman H, Nilsson M. Morphogenesis of the thyroid gland. *Molecular and cellular endocrinology.* 2010 Jul 8; 323(1):35-54
8. Szinnai G. Genetics of normal and abnormal thyroid development in humans. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol Metab* 2014; 28(2):133–150.
9. De Felice M, Di Lauro R. Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr. Rev* 2004; 25(5):722–46.
10. Ramos HE, Nesi-França S, Maciel R. Novos aspectos da genética e dos mecanismos moleculares da morfogênese da tiróide para o entendimento da disgenesia tiroídiana:[revisão]. *Arq. bras. endocrinol. metab.* 2008 Dec; 52(9):1403-15.
11. Moreno JC, Vijlder JMJ, Vulsma T, Ris-Stalpers, C. Genetic basis of hypothyroidism: recent advances, gaps and strategies for future research. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:318–26.

12. Knobel M, Medeiros-Neto G. An outline of inherited disorders of the thyroid hormone generating system. *Thyroid* 2003;13:771–801.
13. World Medical Association. Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA* 2013; 310:2191–2194.
14. von Elm E, Altman D, Egger M, Pocock S, Gøtzsche PC et al. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement: guidelines for reporting observational studies. *Epidemiology* 2007; 18:800–804.
15. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Available at <http://www.ibge.gov.br/home/>
16. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Estados@ - Índice de desenvolvimento humano Municipal – IDHM. Available at <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=ba&tema=idhm>
17. APAE Brasil. O que fazemos? Available at <https://www.apaebrasil.org.br/#/oquefazemos>
18. Kim BK, Choi YS, Oak CH, Park Y, Kim JH et al. Determination of Thyroid Volume by Ultrasonography among Schoolchildren in Philippines. *Int J Endocrinol.* 2012; 2012:387971
19. Zimmermann MB, Hess SY, Molinari L, de Benoist B, Delange F et al. New reference values for thyroid volume by ultrasound in iodine-sufficient schoolchildren: a World Health Organization/Nutrition for Health and Development Iodine Deficiency Study Group Report. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2004 Feb 1; 79(2):231-7.
20. Ueda D. Normal volume of the thyroid gland in children. *Journal of Clinical Ultrasound.* 1990 Jul 1; 18(6):455-62.
21. Ruchała M, Szczepanek E, Sowiński J. Diagnostic value of radionuclide scanning and ultrasonography in thyroid developmental anomaly imaging. *Nucl Med Rev Cent East Eur.* 2011 Jul 12; 14(1):21-8.

22. Ramos HE, Nesi-Franca S, Boldarine VT, Pereira RM, Chiamolera MI et al. Clinical and molecular analysis of thyroid hypoplasia: a population-based approach in southern Brazil. *Thyroid*. 2009 Jan 1; 19(1):61-8.
23. Brust ES, Beltrao CB, Chammas MC, Watanabe T, Sapienza MT et al. Absence of mutations in PAX8, NKX2. 5, and TSH receptor genes in patients with thyroid dysgenesis. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2012 Apr; 56(3):173-7.
24. Mahjoubi F, Mohammadi MM, Montazeri M, Aminii M, Hashemipour M. Mutations in the gene encoding paired box domain (PAX8) are not a frequent cause of congenital hypothyroidism (CH) in Iranian patients with thyroid dysgenesis. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2010 Aug; 54(6):555-9.
25. Beltrão CB, Juliano AG, Chammas MC, Watanabe T, Sapienza MT et al. Etiology of congenital hypothyroidism using thyroglobulin and ultrasound combination. *Endocrine journal*. 2010; 57(7):587-93.
26. Alves EA, Cruz CM, Pimentel CP, Ribeiro R, Santos AK et al.. High frequency of D727E polymorphisms in exon 10 of the TSH-R gene in Brazilian patients with congenital hypothyroidism. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 2010; 23(12):1321-8.
27. Carré A, Rachdi L, Tron E, Richard B, Castanet M et al. Hes1 is required for appropriate morphogenesis and differentiation during mouse thyroid gland development. *PLoS One* 2011; 6:e16752.
28. Dentice M, Cordeddu V, Rosica A, Ferrara AM, Santarpia L et al. Missense mutation in the transcription factor NKX2.5: a novel molecular event in the pathogenesis of thyroid dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:1428–33.

29. Macchia PE, Lapi P, Krude H, Pirro MT, Missero C et al. PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nature genetics*. 1998 May 1; 19(1):83-6.
30. Hinton CF, Harris KB, Borgfeld L, Drummond-Borg M, Eaton R et al. Trends in incidence rate of congenital hypothyroidism related to select demographic factors: data from the United States, California, Massachusetts, New York, and Texas. *Pediatrics* 2010; (125 Suppl. 2):S37–47
31. Olivieri A, Stazi MA, Mastoiacovo P, Fazzini C, Medda E et al. A population based study on the frequency of additional congenital malformations in infants with congenital hypothyroidism: data from the Italian Registry for Congenital Hypothyroidism (1991–1998). *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:557–62.
32. Weller G. Development of the thyroid, parathyroid and the thymus glands in man. *Contrib Embryol* 1933;24:93–140
33. Amendola E, De Luca P, Macchia PE, Terracciano D, Rosica A et al. A mouse model demonstrates a multigenic origin of congenital hypothyroidism. *Endocrinology* 2005; 146:5038–5047.
34. Pohlenz J, Dumitrescu A, Zundel D, Martine U, Schonberger W et al. Partial deficiency of thyroid transcription factor 1 produces predominantly neurological defects in humans and mice. *J. Clin. Invest.* 2002; 109:469–473.
35. Daladoey J, Vassart G, Van Vliet, G. Possible non-Mendelian mechanisms of thyroid dysgenesis. *Endocr Dev.* 2007; 10:29-42
36. Fagman H, Nilsson M. Morphogenetics of early thyroid development. *Journal of molecular endocrinology*. 2011 Feb 1; 46(1):R33-42.
37. Vilain C, Rydlewski C, Duprez L, Heinrichs C, Abramowicz M et al. Autosomal Dominant Transmission of Congenital Thyroid Hypoplasia Due to Loss-of-Function



- Mutation of PAX8 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001 Jan 1; 86(1):234-8.
38. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews*. 2009 Jun; 30(4):293-342.
39. Perry RJ, Maroo S, MacLennan AC, Jones JH, Donaldson MD. Combined ultrasound and isotope scanning is more informative in the diagnosis of congenital hypothyroidism than single scanning. *Archives of disease in childhood*. 2006 Dec 1; 91(12):972-6

## TABLE AND FIGURE LEGENDS

Figure 1: Flowchart of the study design and the patient's included. Figure illustrates the 2 phases of the study design including: 1) pre-study procedures performed by APAE and; 2) the methodology of the current study,

Figure 2: Comparison of median TSH levels of patients with thyroid dysgenesis and those with in situ thyroid gland. A) Comparison of Neonatal screening TSH levels B) Initial serum TSH

Figure 3: Comparison of screening TSH levels amongst the different subtypes of thyroid dysgenesis.

## TABLES

Table 1

**Table 1. Newborn Screening Results by Diagnostic Category**

N=218	<i>n</i> (%)	<i>Gender</i>		<i>Screening</i>	<i>Confirmatory</i>	<i>Serum</i>	<i>Age of LT4</i>
		<i>F</i>	<i>M</i>	<i>TSH (mU/L)</i> <i>Median</i>	<i>TSH (mU/L)</i> <i>Median</i>	<i>ft4 (µg/dL)</i> <i>Median</i>	<i>start (days)</i> <i>Median</i>
ISTG	155 (71.1)	77	78	31.3	23.5	0.95	18.5
Ectopy	17 (7.8)	14	3	53.6	95.0	0.8	15.5
Agenesis	12 (5.5)	10	2	344	100.0	0.4	27
Hypoplasia	21 (9.6)	11	10	39.4	26.5	1.0	29
Hemiagenesis	13 (6.0)	6	7	39.6	21.8	1.1	21

ISTG - In situ thyroid gland

## FIGURES

Figure 1

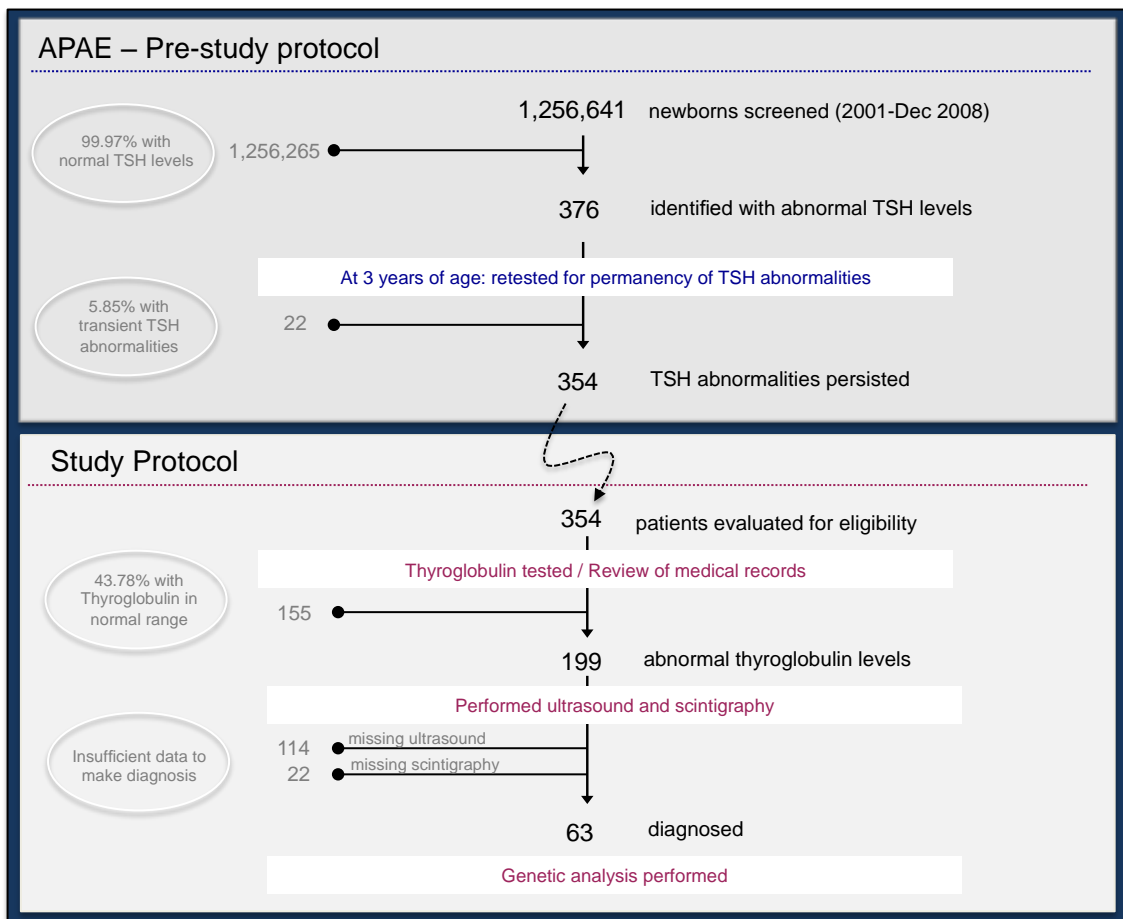


Figure 2

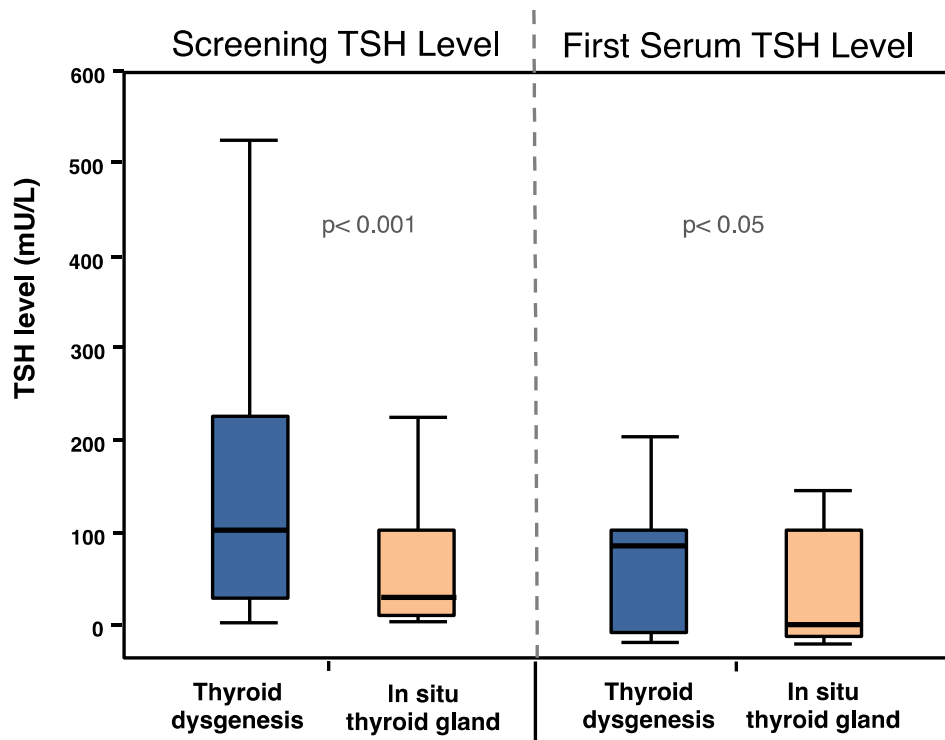
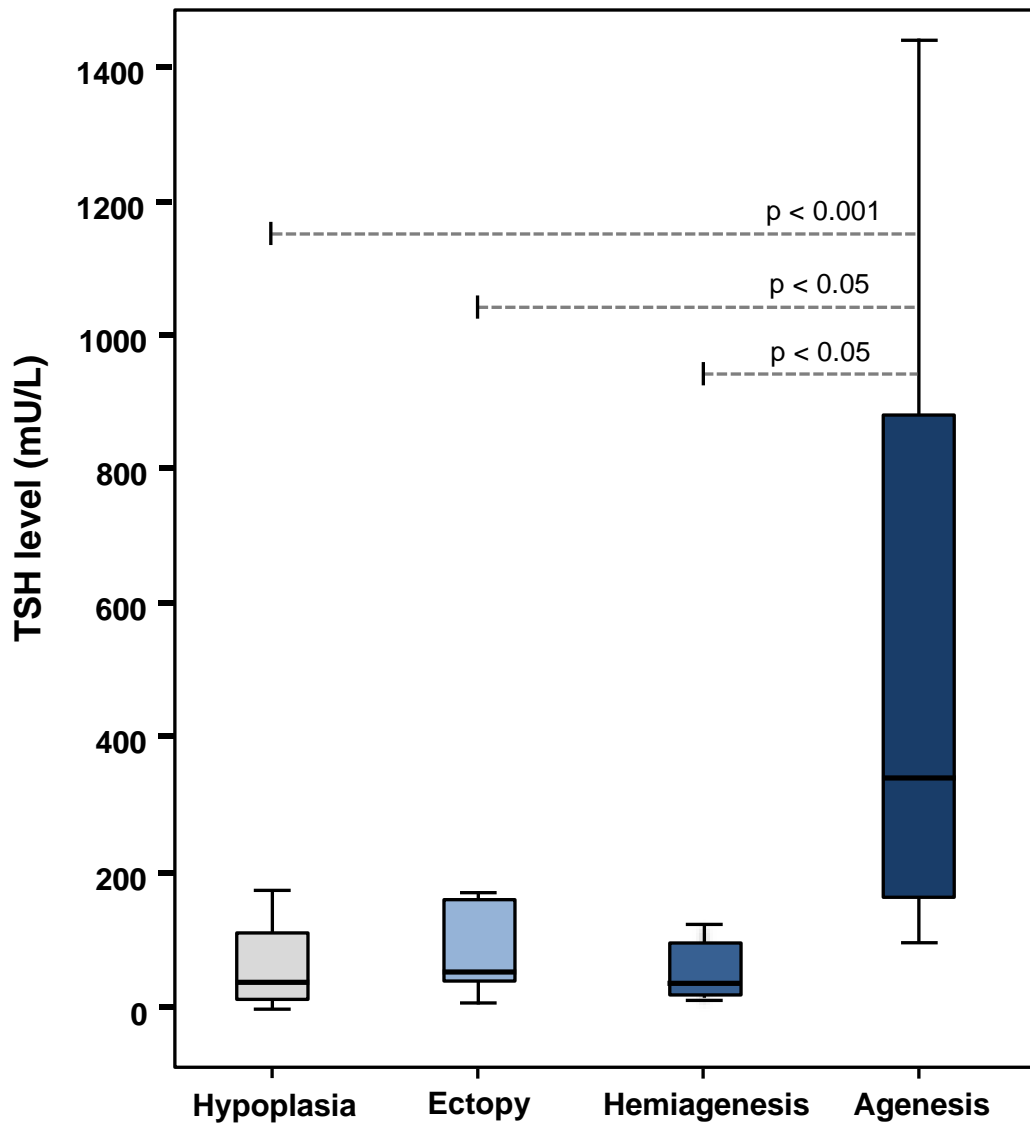


Figure 3



#### **4. RESULTADOS: Capítulo 2.**

**Artigo 1:** Referente aos objetivos específicos desta tese, com ênfase no objetivo específico número 2.

**The c.63A>G polymorphism in the *NKX2.5* gene is associated with thyroid hypoplasia in children with thyroid dysgenesis.**

Artigo publicado em Setembro de 2015 na revista Archives of Endocrinology and Metabolism.

# The c.63A>G polymorphism in the *NKX2.5* gene is associated with thyroid hypoplasia in children with thyroid dysgenesis

<sup>1</sup> Departamento de Biorregulação, Laboratório de Estudo da Tireoide (LET), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil  
<sup>2</sup> Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM), Curso de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, Salvador, BA, Brasil  
<sup>3</sup> Pós-graduação em Medicina e Saúde Humana, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Hospital Santa Izabel, Salvador, BA, Brasil  
<sup>4</sup> Grupo Fleury, Salvador, BA, Brasil  
<sup>5</sup> Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais, APAE, Salvador, BA, Brasil  
<sup>6</sup> Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, BA, Brasil

## Correspondence to:

Taise Lima de Oliveira Cerqueira  
 Universidade Federal da Bahia,  
 Instituto de Ciências da Saúde,  
 Departamento de Biorregulação  
 Av. Reitor Miguel Calmon, s/n, sala 301  
 40110-102 – Salvador, BA, Brasil  
 taisellima@hotmail.com

Received on Jun/5/2015  
 Accepted on Jul/27/2015

DOI: 10.1590/2359-399700000100

Taise Lima de Oliveira Cerqueira<sup>1,2</sup>, Yanne Ramos<sup>1</sup>, Giorgia Strappa<sup>1</sup>, Daniel San Martin<sup>1</sup>, Mariana Jesus<sup>1</sup>, Jailciele Gonzaga<sup>1</sup>, Paulo Ferreira<sup>1</sup>, Anabel Costa<sup>3</sup>, Vladimir Fernandes<sup>4</sup>, Tatiana Amorim<sup>5</sup>, Ana Marice Ladeia<sup>6</sup>, Helton Ramos<sup>1,2</sup>

## ABSTRACT

**Objective:** To search for genetic alteration in *NKX2.5* gene in patients presenting both congenital heart disease (CHD) and TD. **Subjects and methods:** Individual phenotypes were carefully analyzed in 86 children with thyroid dysgenesis (TD) using thyroid function tests, scintigraphy, ultrasound and echocardiography. DNA was extracted and *NKX2.5* gene coding region was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and sequenced. **Results:** CHD were found in 8.1% of patients with TD. The mutation screening revealed two known polymorphisms in patients with isolated TD or TD associated with CHD. None of them are predicted to result in codon change in conserved domain. The c.63A>G polymorphism was detected in 54/86 patients (49 with isolated TD and 5 with TD combined with CHD). There was a significant association of c.63A>G polymorphism with hypoplasia ( $p < 0.036$ ). The c.541G>A polymorphism was observed in only one patient with isolated thyroid hypoplasia. **Conclusion:** *NKX2.5* mutations were not found. The c.63A>G polymorphism might be associated with thyroid hypoplasia. Arch Endocrinol Metab. 2015;59(6):562-7

## Keywords

Thyroid dysgenesis; congenital hypothyroidism; congenital heart disease; *NKX2.5*

## INTRODUCTION

Congenital hypothyroidism (CH) occurs in 1:3,500-1:4,000 newborns. In 80-85% of the cases, CH is due to thyroid dysgenesis (TD), which are developmental abnormalities of the thyroid gland including thyroid ectopy, thyroid agenesis or athyreosis, thyroid hypoplasia, and thyroid hemiagenesis (1). Several specific transcriptional factors, in view of their important role in thyroid organogenesis and thyroid specific gene expression, would be strong candidate genes for the etiology of TD; thus, the thyroid transcription factor 1 (*TTF-1*, also known as *NKX2.1*), forkhead box E1 (*FOXE1*) and the paired homeodomain factor *PAX8* have been described as causes of human TD (1). However, abnormalities in these genes have been found in only a small proportion of patients with TD (2-5).

*NKX2.5* appears to function during the early period of organogenesis in the developing embryo. Murine *Nkx2.5* is expressed in early heart progenitor cells, as well as in thyroid, tongue, stomach and spleen (3,6,7). The *NKX2.5* transcription factor is known to be essential for normal heart morphogenesis, myogenesis and function (8,9). Several loss of function mutations in *NKX2.5* (OMIM 600584) have been described in patients with Congenital Heart Disease (CHD) and the most frequent one were atrial septal defect, ventricular septal defect and tetralogy of fallot (10,11). CHD has a higher frequency in children with CH than in the general population (11,12). Clinical interest in this gene have arisen from the identification of heterozygous mutations involved in the pathogenesis of human TD, including a mutational screening conducted in 241 patients with TD in Italy, allowing identification of three mutations in four patients (7).



In mouse, *Nkx2.5* expression has been recently demonstrated in precursors of thyrocytes in the pharyngeal floor at embryonic day 8.5 (E8.5), a period coincident with the appearance of *Titf-1*, *PAX8* and *Pax8*, but disappears around E12.5 (12). Therefore, once *Nkx2.5* mRNA is present in the thyroid primordium at an early stage of development, it might be required in normal thyroid morphogenesis. *Nkx2.5*<sup>-/-</sup> embryos exhibited a smaller outgrowing bud of endodermal cells, indicating that *Nkx2.5* is required as component of the genetic control of thyroid development (7). These observations propose a functional impact of *NKX2.5* on genetic pathogenesis of TD and motivate us to address the question if genetic abnormalities of *NKX2.5* could play an important role in patients presenting both CHD and TD or isolated TD. Our results indicate that no *NKX2.5* mutations are not common in patients presenting TD, even in combination with CHD. However, the variant c.63A>G was significantly associated with hypoplasia.

## SUBJECTS AND METHODS

### Subjects

Between 2001 and 2013 we have identified 1,051 newborns with CH in the neonatal thyroid screening program of the State of Bahia, Brazil by dry blood spot TSH measurement collected after 24 hours of life from a heel prick (TSH cut-off 9 mU/L, Delphia Perkin-Elmer immunofluorimetric assay). Within 24 h of a positive screening result, the neonates had a history and a physical examination performed and a blood sample was taken for confirmation of diagnosis [serum TSH and total T4 (TT4)] employing chemoluminescent assays; reference intervals are 6-12 µg/dL for TT4 and 0.3-4 mU/L for TSH. After the confirmation of results, levothyroxine (L-T4) replacement treatment, 10-15 µg/kg/day, was started and L-T4 dosage was adjusted during infancy and childhood according to serum TSH and TT4. When the infants reach 3 years, they follow a protocol to determine if the CH is permanent or transient, consisting of serum thyroid function tests (TSH and TT4), thyroid <sup>123</sup>I or <sup>131</sup>I scanning, and thyroid ultrasound after 30 days of L-T4 therapy discontinuation. According to the results, children were divided into five groups: 1) ectopy, 2) agenesis, 3) hypoplasia, 4) hemiagenesis and 5) normal eutopic thyroid gland or goiter. Eight hundred fifty one patients were confirmed for

permanent CH, from which 710 have been followed in our institution.

We have selected 86 patients with TD for clinical and molecular studies. The cardiac phenotype was evaluated by history, review of medical records, physical examination, 12-lead electrocardiogram (EKG), and 2-dimension transthoracic echocardiography. Family history of CHD and thyroid disease was investigated by chart report (i.e., clinical testing of parents was not performed for the purpose of this study). Medical records of all patients were reviewed to determine whether any non-cardiac congenital malformations or other recognized genetic syndromes were present. Clinical studies were performed without knowledge of genotype. Written informed consent was obtained from the parents of all participants in accordance with protocols approved by the Federal University of Bahia.

### Genotype analysis

Deoxyribonucleic acid was extracted from whole blood using standard techniques. The coding region of the *NKX2.5* gene, including exon/intron boundaries, was amplified from genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR). The exon 1 were amplified using two pair of primers: 1F 5'-CTTGTGCTCAGCGCTACCT-3' and 1R 5'-CTCCTGGCCCTGAGTTTCTT-3'. The exon 2 were amplified by a total of 2 PCRs with the following two pair of primers derived from the flanking introns: 2AF 5'-GCGCTCCGTAGGTCAAGC-3', 2AR 5'-TAGGGATTGAGGCCACG-3', 2BF 5'-CAGACTCTGGAGCTGGTGG-3' and 2BR 5'-CCC-GAGAGTCAGGGA-3'. 100 ng of genomic DNA was amplified in a 25-µL volume containing: 40 ng of each oligonucleotide primers; 200 µmol/L each of deoxyadenosine triphosphate, and deoxythymidine triphosphate; 1,5 nM of MgSO<sub>4</sub> and Taq polymerase. The reaction of exon 1 started with 5 minutes at 94C followed by 35 cycles of 30 seconds 94C, 30 seconds at 56C and 30 seconds at 72C and finished with a 10 minutes extension period at 72C. For the exon 2, all reactions started with 2 minutes at 95C followed by 35 cycles of 45 seconds at 95C, 30 seconds at 59C or 60C, and 45 seconds at 72C and finished with a 10-minute extension period at 72C. DMSO (0.2 mL/20-µL reaction) was added to standard reagents for the exon 1 and for the first reaction of exon 2. PCR products were purified with PureLink Quick PCR Purification kit (Invitrogen, Germany) and sequenced using the ABI PRISM Dye

Terminator cycle sequencing Ready Reaction kit (PE Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Bidirectional sequencing was performed by an automated sequencer (ABI3100 genetic analyzer). Sequences were analyzed with Bioedit Software and alterations were examined in context of the open reading frame. One hundred normal individuals were screened for the identified sequence alterations.

### Statistical analysis

We used *t* test and Hardy-Weinberg test to estimate the differences in the frequency of NKX2.5 polymorphisms in our cohort and the general population and between each subgroup of TD. We built a two-way contingency table comparing the group of positive heart disease with each type of TD, thus we tested for dependence between each categorization and patients without CHD. The association of subtype of TD or presence of CHD in each subgroup and NKX2.5 polymorphisms was analyzed by  $\chi^2$  (Fisher's Exact Test).

## RESULTS

### Clinical observations

We found a high prevalence of CHD in patients with TD (7/86; 8.1%). Seventy nine infants presented with isolated TD (32 ectopy, 15 agenesis, 30 hypoplasia and 2 hemiagenesis). The overall female:male ratio was 2:1 (Table 1).

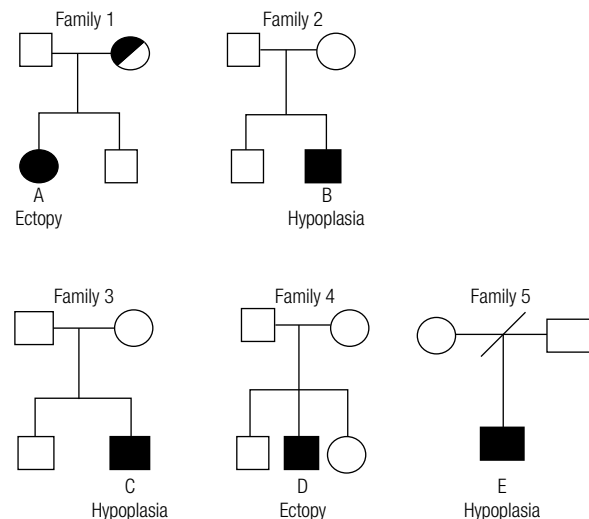
Five from seven patients with TD associated with CHD harbored the c.63A>G NKX2.5 polymorphism (Table 1). In family 1, the mother was diagnosed with autoimmune hypothyroidism. Her affected daughter (Patient A, Figure 1) was detected by neonatal screening, when the TSH level was 91.4 uIU/ML. The ultrasound showed an agenesis, but the level of serum Tg was 4.5 ng/mL and the thyroid scan showed an ectopic gland (Table 1, Figure 1). In family 2, a male patient (Patient B) was diagnosed lately and the ultrasound detected a hypoplastic thyroid gland (Table 1, Figure 1). In family 3 (Patient C, Figure 1), the neonatal TSH screening was 40 uIU/ML and a hypoplastic gland was confirmed by ultrasound. All the probandus from families 1-3 presented atrial septal defect on cardiac evaluation (Table 1, Figure 1). In Family 4, the proband (Patient D) had an absent thyroid gland by ultrasound associated with serum Tg levels of 17.3 ng/mL and an ectopic gland detected by thyroid scintigraphy. This

patient had pulmonary stenosis (Table 1, Figure 1). The patient of family 5 (Patient E) was diagnosed with twenty-three days of birth and hypoplasia was observed by ultrasound (Figure 1, Table 1).

**Table 1.** Phenotype/Genotype summary in seven patients with TD associated with CHD

Patient	Gender	Thyroid phenotype	Cardiac phenotype	Polymorphism
1	Female	Ectopy	ASD	c.63A>G
2	Male	Hypoplasia	ASD	c.63A>G
3	Female	Hypoplasia	Lown-Ganong-Levine Syndrom	No
4	Male	Hypoplasia	ASD	No
5	Male	Hypoplasia	ASD	c.63A>G
6	Male	Hypoplasia	AVB	c.63A>G
7	Male	Ectopy	PS	c.63A>G

ASD: atrial septal defect; PS: pulmonary stenosis; AVB: atrio-ventricular block.



**Figure 1.** Pedigrees of the five families with patients harboring the c.63A>G polymorphism associated with TD and CHD. All family members were analyzed. Squares, men; circles, women; open symbols, clinically unaffected individuals; solid black symbols, affected by hypothyroidism with ectopy or hypoplasia; half black symbol represent a individual with hypothyroidism.

### Correlating NKX2.5 polymorphisms and clinical phenotype

We did not find any NKX2.5 mutation in patients with both TD and CHD or isolated TD. Table 2 shows the polymorphisms found. The known c.63A>G NKX2.5 polymorphism was detected in heterozygosity in 33 (38.3%) of patients and in homozygosity in 21 (24.3%) of cases (Table 2) (Figure 2). Among patients positive

for the c.63A>G polymorphism, 49 had isolated TD (18 ectopy, 24 hypoplasia, 6 agenesis, 1 hemigenesis) (Table 2). The polymorphism c.63A>G was associated with hypoplasia ( $p < 0,036$ ).

A second polymorphism, c.541G>A was observed, in heterozygosity, in only 1 patient with isolated TD (Figure 2). A girl, diagnosed in neonatal screening (TSH 32.2 uIU/ML) presenting a hypoplastic thyroid gland.

## DISCUSSION

Since *NKX2.5* is one of the earliest transcription factors expressed in the thyroid lineage of developing vertebrate embryos and its targeted disruption results in perturbed morphogenesis, we hypothesized that it might be involved in TD etiology. The importance in human ontoge-

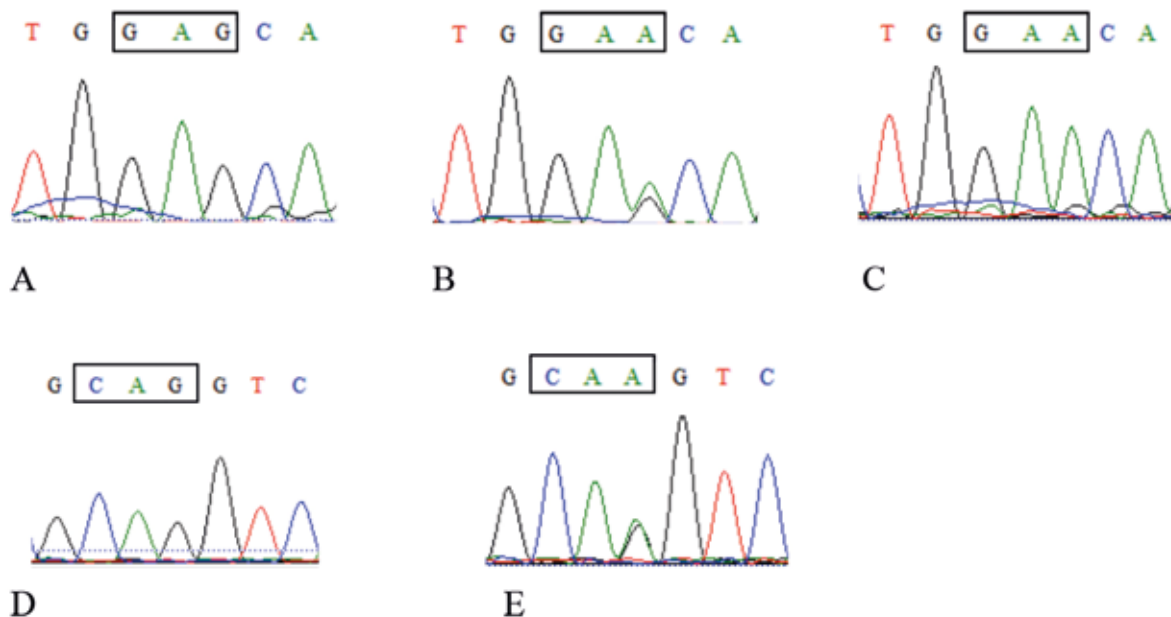
nesis was further underscored by recent identification of patients with *NKX2.5* mutation associated with TD (7). In this study of 86 infants with TD detected by Neonatal Screening Program for CH, in Brazil, we hypothesized the possible contribution of *NKX2.5* gene to the pathogenesis of TD, firstly provided by Dentice and cols. (7).

In our screening for germline inactivating mutation in the *NKX2.5* gene, in a group of DT patients without a family history, we observed no significant variation but a positive association between the c.63A>G polymorphism and thyroid hypoplasia as phenotype.

This A → G polymorphism was previously detected in other studies and we have also found in normal subjects (13,14). Candidate gene mutations have been previously identified in familiar groups of CH, thus the patient's selection may have played an important role because we analyzed patients selected from an entire

**Table 2.** *NKX2.5* polymorphisms identified among 86 patients with TD

Polymorphism	Site	Polymorphism type	Allele frequency in patients	Allele Frequency in controls
c.63A>G	TN domain	Silent	A/G 0.372	A/G 0.160
p.Glu21			G/G 0.243	G/G 0.000
rs2277923			A/A 0.385	A/A 0.840
c.541G>A	Homeodomain	Silent	G/A 0.012	G/A 0.000
p.Gln181			A/A 0.000	A/A 0.000
rs72554028			G/G 0.988	G/G 1.000



**Figure 2.** Chromatograms showing the polymorphisms found in exon 2 of *NKX2.5* gene. Top, Left: homozygous A-to-G transition at position 63 of codon 21 in the *NKX2.5* gene; top middle: heterozygous A-to-G transition at position 63 of codon 21 in the *NKX2.5* gene; top right: wildtype sequence; Bottom, left: wildtype sequence; Bottom, right: heterozygous G-to-A transition at position 541 of codon 181 in the *NKX2.5* gene.

population, mostly sporadic cases. Our results indicate that the mutation rate of *NKX2.5* gene is rare in patients with TD, even in a phenotype-focused study from a different genetic background. In fact, a population-based study in a Czech cohort of 170 patients with CH, including 15 with CHD, has not found mutations on *NKX2.5* gene (15). Similarly a Japanese study enrolling 102 patients, 37 with thyroid ectopy, did not find any mutations and confirms that *NKX2.5* mutations are rare (4). Indeed, a closer look at the Italian's publication shows that some unaffected parents also carried the c.73C>T variant, suggesting that it might be not disease-causing but perhaps only disease-predisposing (7).

In Brazil, another study including 27 patients with TD without CHD, identified the same c.63A>G polymorphism in *NKX2.5* gene (20). We might consider that hypothetical mechanisms such as epigenetic or somatic changes could cause the inactivation of this gene (13,16). It is still discussed if somatic nature and mosaicism of *NKX2.5* mutations are major etiological pathway in CHD because the results obtained from fresh frozen diseased tissue sample are different from data obtained from formalin fixed archival tissues (13,16). However, unknown genes, but functionally similar in the same embryonic path, might be involved in the pathogenesis of TD associated or not with CHD, as for example, the report indicating that deficiency of the T-box transcription factor *Tbx1* results in hemiagenesis and hypoplasia of the thyroid gland due to a failure of the embryonic thyroid to establish contact with vessels derived from the cardiac outflow tract at a critical step necessary for the proper guidance of bilateral growth and lobulation (2). Such genes may be either uniquely or differentially expressed and encode proteins including ion channels and signaling molecules. Indeed, the initial induction of follicular thyroid cells has been shown to be associated with factors secreted by endothelial cells and may involve input from epigenetic mechanical factors (2). Recent data revealed that *NKX2.5* was expressed in multipotent progenitors during cardiac development, suggesting role in regulation of the endocardial/endothelial fate in the developing heart and embryo, although the molecular mechanisms are unknown (17). Thyroid formation begins at approximately embryonic day (E) 20-22 in the human when progenitor cells migrate through the primitive streak to the more caudal side of the embryo to form the thyroid gland (18). Although a cooperative

action of *NKX2.5* with other cellular factors could be essential for the maintenance of gene expression during thyroid embryogenesis, alternatively, loss of function of *NKX2.5* can lead to a limited gradual diminution of a downstream target genes during development, without interfere at its initial regulation. As *NKX2.5* is expressed so early at thyroid bud, it can potentially interact with other crucial transcription factors and modulates their activity post-translationally by changing its dimerization process.

In addition to the polymorphisms described in TD, many different heterozygous germline *NKX2.5* mutations have been identified in patients suffering from CHD (OMIM 600584). Those previously reported mutations associated with CHD are more primarily localized within the homeodomain. In this report, five of the patients positive for the c.63A>G polymorphism had a CHD phenotype. Although most published cases in CHD phenotype are in sequences affecting the homeodomain, there is no clear genotype-phenotype correlation. CHD of these patients with *NKX2.5* germline mutations were mainly of atrial septal defect with or without AV block, although there were reports of patients with tetralogy of Fallot, ventricular septal defect, double-outlet right ventricle, interrupted aortic arch, truncus arteriosus, L-transposition of the great arteries, hypoplastic left heart syndrome and aorta coarctation. So, the spectrum of *NKX2.5* mutations is diverse in terms of mutation type, position of the affected amino acid and its predicted impact on protein-protein interactions. In fact, experimental studies have shown that other portions of *NKX2.5*, even far away from the homeodomain, are also functionally very important (21). The *NKX2.5* gene from diseased cardiac tissues of patients with complex cardiac malformations typically contains multiple mutations (14). As well, thyroid growth defect could be associated with single germline mutations or, alternatively, additional mutations arising in the hypoplastic gland could amplify the effect of the germinal polymorphisms. Therefore, studies in which there is only examination of lymphocytic DNA may not reveal the molecular basis of TD.

*NKX2.5* appears to be an unlikely candidate gene for CHD associated with TD. The molecular mechanisms of TD with or without CHD are complex: while familial TD occurs at greater-than-random frequency, monozygotic (MZ) twins are discordant (19). We believe that germline predisposing factors likely exist but

additional mechanisms are required to explain MZ twin discordance (somatic events, random mono-allelic expression even CNV – *copy number variants*).

However, it is known that, in the heart, *NKX2.5* could have an essential role during the early thyroid morphogenesis, and might be implicated as a partner of the genetic circuit controlling thyroidal cell specification and migration and have pointed to the importance of its dosage in thyroid development (20). Importantly, *NKX2.5* mutations are known to be central to the genesis of CHD and, in this case, might be necessary but not sufficient for TD. *NKX2.5* binding elements has been identified in a number of expressed genes and many other tissues as in lingual muscle, spleen, stomach and in the lung (21).

It would be of interest to attempt to identify additional *NKX2.5* downstream target genes and upstream signaling pathways for a more complete knowledge of its function during thyroid morphogenesis.

Acknowledgements: the authors are grateful for Ney Boa-Sorte, Paula Leite, Renata Arruti and Helena Pimentel support. We appreciate the cooperation of all patients, their families, and endocrinologists involved in their care.

Financial support: this work was supported in part by grants Fapesb (Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado da Bahia) (AMTL and HER), and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) (HER). TLOC has financial support by Fiocruz.

Disclosure: no potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## REFERENCES

1. Nilsson M, Fagman H. Mechanisms of thyroid development and dysgenesis: an analysis based on developmental stages and concurrent embryonic anatomy. *Curr Top Dev Biol.* 2013;106:123-70.
2. Fagman H, Nilsson M. Morphogenesis of the thyroid gland. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;323:35-54.
3. Gruters A, Krude H, Biebermann H. Molecular genetic defects in congenital hypothyroidism. *Eur J Endocrinol.* 2004;151 Suppl 3:U39-44.
4. Narumi S, Muroya K, Asakura Y, Adachi M, Hasegawa T. Transcription factor mutations and congenital hypothyroidism: systematic genetic screening of a population-based cohort of Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(4):1981-5.
5. Ramos HE, Nesi-Franca S, Boldarine VT, Pereira RM, Chiamolera MI, Camacho CP, et al. Clinical and molecular analysis of thyroid hypoplasia: a population-based approach in southern Brazil. *Thyroid.* 2009;19:61-8.
6. Komuro I, Izumo S. *Csx*: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:8145-9.
7. Dentice M, Cordeddu V, Rosica A, Ferrara AM, Santarpia L, Salvatore D, et al. Missense mutation in the transcription factor *NKX2-5*: a novel molecular event in the pathogenesis of thyroid dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:1428-33.
8. Weismann CG, Gelb BD. The genetics of congenital heart disease: a review of recent developments. *Curr Opin Cardiol.* 2007;22:200-6.
9. Winston JB, Erlich JM, Green CA, Aluko A, Kaiser KA, Takematsu M, et al. Heterogeneity of genetic modifiers ensures normal cardiac development. *Circulation.* 2010;121:1313-21.
10. Kasahara H, Lee B, Schott JJ, Benson DW, Seidman JG, Seidman CE, et al. Loss of function and inhibitory effects of human *CSX/NKX2.5* homeoprotein mutations associated with congenital heart disease. *J Clin Invest.* 2000;106:299-308.
11. Gioli-Pereira L, Pereira AC, Mesquita SM, Xavier-Neto J, Lopes AA, Krieger JE. *NKX2.5* mutations in patients with non-syndromic congenital heart disease. *Int J Cardiol.* 138:261-5.
12. Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP. *Nkx-2.5*: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development.* 1993;119:969.
13. Draus JM Jr, Hauck MA, Goetsch M, Austin EH, 3rd, Tomita-Mitchell A, Mitchell ME. Investigation of somatic *NKX2-5* mutations in congenital heart disease. *J Med Genet.* 2009;46:115-22.
14. Reamon-Buettner SM, Hecker H, Spanel-Borowski K, Craatz S, Kuenzel E, Borlak J. Novel *NKX2-5* mutations in diseased heart tissues of patients with cardiac malformations. *Am J Pathol.* 2004;164:2117-25.
15. Al Taji E, Biebermann H, Limanova Z, Hnikova O, Zikmund J, Dame C, et al. Screening for mutations in transcription factors in a Czech cohort of 170 patients with congenital and early-onset hypothyroidism: identification of a novel *PAX8* mutation in dominantly inherited early-onset non-autoimmune hypothyroidism. *Eur J Endocrinol.* 2007;156:521-9.
16. Inga A, Reamon-Buettner SM, Borlak J, Resnick MA. Functional dissection of sequence-specific *NKX2-5* DNA binding domain mutations associated with human heart septation defects using a yeast-based system. *Hum Mol Genet.* 2005;14:1965-75.
17. Ferdous A, Caprioli A, Iacovino M, Martin CM, Morris J, Richardson JA, et al. *Nkx2-5* transactivates the *Ets*-related protein 71 gene and specifies an endothelial/endocardial fate in the developing embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:814-9.
18. De Felice M, Di Lauro R. Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr Rev.* 2004;25:722-46.
19. van Vliet G, Vassart G. Monozygotic twins are generally discordant for congenital hypothyroidism from thyroid dysgenesis. *Horm Res.* 2009;72:320.
20. Brust ES, Beltrão CB, Chammas MC, Watanabe T, Sapienza MT, Marui S. Absence of mutations in *PAX8*, *NKX2-5*, and *TSH* receptor genes in patients with thyroid dysgenesis. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2012;56(3):173-7.
21. Reamon-Buettner EM, Sattlegger E, Ciribilli Y, Inga A, Wessel A, Borlak J. Transcriptional defect of an inherited *NKX2-5* haplotype comprising a SNP, a nonsynonymous and a synonymous mutation, associated with human congenital heart disease. *PLoS ONE.* 2013;8(12):e3295.

## **5. RESULTADOS: Capítulo 3**

**Artigo 3:** Referente aos objetivos específicos desta tese, com ênfase no objetivo específico número 4.

**Functional characterization of the novel sequence variant p.S304R in the hinge region of TSH-R in a congenital hypothyroidism patients and analogy with other formerly known mutations of this gene portion**

Artigo publicado na Journal Pediatric Endocrinology and Metabology, em Julho de 2014.

## Patient report

Taise Lima Oliveira Cerqueira, Aurore Carré, Lucie Chevrier, Gabor Szinnai, Elodie Tron, Juliane Léger, Sylvie Cabrol, Chrystelle Queinnec, Nicolas De Roux, Mireille Castanet, Michel Polak and Helton Estrela Ramos\*

# Functional characterization of the novel sequence variant p.S304R in the hinge region of TSHR in a congenital hypothyroidism patients and analogy with other formerly known mutations of this gene portion

## Abstract

**Context:** Thyroid dysgenesis may be associated with loss-of-function mutations in the thyrotropin receptor (*TSHR*) gene.

**Objectives:** The aim of this study was to characterize a novel *TSHR* gene variant found in one patient harboring congenital hypothyroidism (CH) from a cohort of patients with various types of thyroid defects.

**Materials and methods:** This cross-sectional cohort study involved 118 patients with CH and their family members, including 45 with familial and 73 with sporadic diseases. The thyroid gland was normal in 23 patients, 25 patients

had hypoplasia, 25 hemithyroid agenesis, 21 had athyreosis, and 21 had ectopy. Genomic DNA was extracted, and 10 exons of the *TSHR* gene were amplified and sequenced. Mutations in other candidate genes were investigated. Ortholog alignment was performed, and *TSHR* functional assays were evaluated.

**Results:** We identified one previously unknown missense variation in the hinge region (HinR) of the *TSHR* gene (p.S304R) in one patient with thyroid hypoplasia. This variant is conserved in our ortholog alignment. However, the p.S304R *TSHR* variant presented a normal glycosylation pattern and signal transduction activity in functional assays.

\*Corresponding author: Helton Estrela Ramos, Federal University of Bahia, Health and Science Institute, Department of Biorregulation, Avenida Reitor Miguel Calmon, S/N, Sala 301, Vale do Canela, 40110-102 Salvador, Bahia, Brazil, Phone: +55 71 3283 8890, Fax: +55 71 3283 8927, E-mail: ramoshelton@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-2900-2099>; Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz-FIOCRUZ/BA, Salvador, Bahia, Brazil; INSERM U845, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; Pediatric Endocrine Unit, Centre des Maladies Endocriniennes Rares de la Croissance, Hôpital Necker Enfants Malades, AP-HP, Paris, France; and Departamento de Biorregulação, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

**Taise Lima Oliveira Cerqueira** : Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz-FIOCRUZ/BA, Salvador, Bahia, Brazil; and Departamento de Biorregulação, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

**Aurore Carré and Elodie Tron**: INSERM U845, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

**Lucie Chevrier and Nicolas De Roux**: Pediatric Endocrine Unit, Hôpital Armand Trousseau, AP-HP, Paris, France

**Gabor Szinnai**: Pediatric Endocrinology, University Children's Hospital Basel, University Basel, Switzerland

**Juliane Léger**: Pediatric Endocrine Unit, Centre des Maladies Endocriniennes Rares de la Croissance, Hôpital Robert Debré, AP-HP, Paris, France

**Sylvie Cabrol**: Pediatrics department, CHU, Bordeaux, France

**Chrystelle Queinnec**: Pediatrics department, CH de Cornouailles-hôpital Laennec, Quimper, France

**Mireille Castanet**: INSERM U845, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; Pediatrics department, CH Charles Nicolle, University Hospital of Rouen, Rouen, France; and Pediatric Endocrine Unit, Centre des Maladies Endocriniennes Rares de la Croissance, Hôpital Necker Enfants Malades, AP-HP, Paris, France

**Michel Polak**: INSERM U845, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; and Pediatric Endocrine Unit, Centre des Maladies Endocriniennes Rares de la Croissance, Hôpital Necker Enfants Malades, AP-HP, Paris, France

**Conclusion:** We report the occurrence of a novel nonsynonymous substitution in the HinR of the large N-terminal extracellular domain of the *TSHR* gene in a patient with thyroid hypoplasia. In contrast with four others in whom TSHR mutations of the hinge portion were previously identified, the p.S304R *TSHR* variation neither affected TSH binding nor cAMP pathway activation. This *TSHR* gene variant was documented in a CH patient, but the current data do not support its role in the clinical phenotype.

**Keywords:** congenital hypothyroidism; hinge portion; thyroid dysgenesis; TSH receptor; variants.

DOI 10.1515/jpem-2014-0194

Received May 13, 2014; accepted July 14, 2014

## Introduction

Thyrotropin (TSH) exerts its effects on the thyroid cell by binding to specific receptors on the cell surface (1). The thyrotropin receptor (TSHR) belongs to the superfamily of seven-transmembrane receptors that trigger signal-transduction pathways through their synergy with guanine-nucleotide-binding regulatory proteins (G proteins) (1–4). As such, they contain a canonical serpentine region containing seven transmembrane helices typical of rhodopsin-like glycoprotein hormone receptor (GPCRs), and a large (350–400 residues) amino-terminal ectodomain containing leucine-rich repeats, which is responsible for the high affinity and selective binding of the corresponding hormones (1). The amino-terminal segment is responsible for high affinity binding of the hormones and recognition specificity (5). The hinge region (HinR) is the least conserved GPCR portion and the most variable in size, between the extracellular leucine-rich repeat motif and the transmembrane helices (6–10). The importance of this region for hormone binding, signal transduction, and receptor activation has been indicated in several studies; however, the hormone TSHR interaction mechanisms have yet to be completely understood (8–10). The intramolecular transduction mechanism of the signal, by which binding of TSH to the extracellular region of the receptor is transduced via the membrane-spanning regions to the cytoplasmic compartment of the receptor that interact with the G proteins, is not well known. A current model for the activation of TSHR would examine a zone of discrete states characterized by different configurations (2, 3).

In the frame of our discussion, it is worth noting that amino acid substitutions in the ectodomain of GPCRs

might affect their function by modifying the electrostatic surface map of the variant receptor, thereby leading to a loss of specificity, or affinity through a shift on sialylated and sulfated carbohydrate structure (1, 11).

Germline TSHR loss-of-function mutations in the *TSHR* gene have been involved as the molecular answer for TSH resistance and congenital hypothyroidism (CH) (OMIM no. 275200). Subjects with a heterozygous loss of function mutation appear to have a dominant transmission of partial TSH resistance, which is attributed to intracellular entrapment, reduced maturation, and oligomerization between inactive mutants and the WT receptor (12–16). Indeed, in the past years, many germline TSHR variants, culminating in amino acid substitutions have been discovered (12). Two of these are located in the extracellular domain of the receptor (p.D36H and p.P52T), and one is located in the intracellular domain (p.D727E) (17–19). The *TSHR* variant p.D727E allele associated with lower levels of plasma TSH without effect on FT<sub>4</sub> levels, point toward a higher sensitivity of the variant compared with the WT *TSHR*. This is because less TSH is needed to achieve normal FT<sub>4</sub> levels, as reported in two studies (20, 21). However, others have not been able to reproduce such data (22, 23). Despite the fact that the p.P52T and p.D36H polymorphisms have not been correlated with modifications in serum TSH levels in healthy individuals, conflicting data are also available regarding the response of the extracellular domain p.P52T variant to TSH stimulation (24, 25).

In the current study, we report a novel germline variant, p.S304R, located in the hinge region (HinR) of the extracellular domain of the TSHR, which is present in heterozygosity in a patient with congenital hypothyroidism. We examined the functional properties of this variant by transient expression in HEK293 cells, with particular interest in the effect on binding ability, cAMP production, and glycosylation profile. The knowledge about the contribution of systematically conserved residues within the TSHR HinR to hormone binding is very important in the further clarification of their precise functional importance in hormone-receptor interactions.

## Materials and methods

### Subjects

We enrolled 118 patients with CH, including 45 with familial and 73 with sporadic diseases recruited from the French Neonatal Screening Program, along with their family members (Table 1). The thyroid gland was normal in size and position in 23 of these patients; 92 patients had hypoplasia (n=25), hemithyroid agenesis (n=25),



**Table 1** Patient characteristics.

Variable	
Number, male, female	118 (47, 71)
Age, year, median, range	11.0 (1.1–23.2)
Family history of CH, n	45
Sporadic cases of CH, n	73
Blood-spot TSH at screening, mU/L, median, range	72.9 (16.9 to >200)
Thyroid morphology, n	
Ectopy	21
Athyreosis	21
Hypoplasia	25
Hemithyroid	25
Normal	23
Not evaluated	03
Kidney malformation	07

CH, congenital hypothyroidism.

athyreosis (n=21), or ectopy (n=21); and thyroid gland morphology was unknown in three patients. Informed consent was obtained from all patients and their families, and blood samples were collected. The study was approved by the local Ethical Committee.

## TSHR sequencing

Genomic DNA was extracted from whole blood, and 10 exons of the *TSHR* gene were amplified in 15 separate PCRs (26). PCR products were purified using the Qiaquick PCR purification kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and sequenced using the ABI PRISM Dye Terminator cycle sequencing Ready Reaction kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturers' instructions. Sequences were analyzed using Sequence Navigator Software (PE Applied Biosystems Division, Perkin Elmer, Foster City, CA, USA). Bidirectional sequencing was performed using an automated cycle sequencer (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Vernon Hills, IL, USA). Sequence alterations were examined in the context of the open reading frame to determine whether the alteration changed the corresponding amino acid. A total of 100 normal individuals were screened for the identified sequence alterations. Mutations in other candidate genes (*PAX8*, *NKX2.1*, *NKX2.5*) were excluded.

## Annotation of the human TSHR protein

Genbank accession no. NP\_16473 (www.ncbi.nlm.nih.gov) was used for the human TSHR protein reference. Exon positions were calculated from the annotation at the University of California, Santa Cruz, Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>).

## Prediction of TSHR orthologs and alignment with human TSHR sequence

The corresponding proteins for each of the 11 non-human species (*Pan troglodydes*, *Macaca mulatta*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*,

*Bos taurus*, *Dasybus novemcinctus*, *Monodelphis domestica*, *Gallus gallus*, *Xenopus tropicalis*, *Takifugu rubripes* and *Oryzias latipes*) used in this study were obtained as described here. First, the genomic sequence was obtained from all species; second, protein predictions were obtained for each DNA sequence using GENSCAN software (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/genSCAN-simple.html>) (27) and default parameters; third, results from GENSCAN were compared with the NP\_16473 reference sequence using BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) (28) to identify TSHR orthologs; and fourth, TSHR protein orthologs were aligned to the human reference using CLUSTALW (<http://clustalw.genome.ad.jp>) (29). Accession numbers corresponding to all sequences used in this study are provided under solicitation.

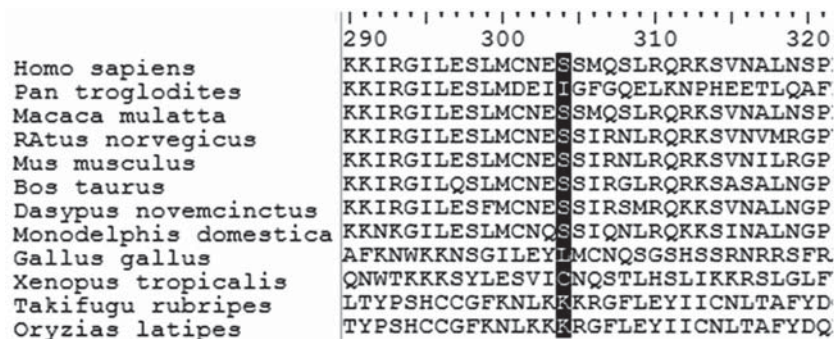
## TSHR-S304R functional studies

Western-blot analysis and <sup>125</sup>I-TSH binding experiments were performed as previously described (30). Accumulation of cAMP was measured using the cAMP dynamic 2 kit (Cisbio Bioassays, Bagnols-sur-Cèze, France) according to the manufacturer's instructions. Transient HEK293-cell transfection with plasmid-encoded *TSHR*-WT or *TSHR*-S304R was performed, and 48 h later the cells were washed once with phosphate buffer saline (PBS) and detached with PBS-ETDA 5 mM. The cells were then resuspended in stimulation buffer (Krebs buffer with 0.28 M sucrose) and plated in 384-well plates. The cells were stimulated for 30 min with various TSH concentrations in stimulation buffer, which was supplemented with 0.5 mM of IBMX. After stimulation, fluorophore d2-labeled cAMP and anti-cAMP antibody conjugated to cryptate were added and incubated for 1 h at room temperature, and the plate was read at 620 nm and 665 nm using the PARADIGM™ Detection Platform (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Data were analyzed using GraphPad Prism Software (GraphPad, San Diego, CA, USA).

## Results

### Genetic screening and clinical phenotype

The family pedigree has been previously described (31). Direct *TSHR* gene sequencing identified one different heterozygous *TSHR* variant (p.S304R) in three family members: the propositus, his father, and the older brother (Figures 1 and 2A). The affected boy is the second child of healthy, nonconsanguineous parents and was born at term, following an uncomplicated pregnancy and delivery, with a weight of 3.400 kg. Neonatal TSH screening showed a TSH level of 155 μU/mL (normal <20 μU/mL) and an FT<sub>4</sub> level of 0.8 ng/dL (normal 0.8–1.8). He presented jaundice, mild hypotonia, and a large posterior fontanelle. LT<sub>4</sub> therapy was started at 13 days of age. By 18 days of age, a <sup>123</sup>I scintigraphy showed a hypoplastic gland in normal position (Figure 1). The parents



**Figure 1** Partial alignment of the human TSHR N-terminal hinge region with amino acid conservation.

Sequencing alignment from different species shows the status of conservation of the mutated amino acid residue. This human TSHR sequence includes 31 amino acid residues located within the HinR of the *TSHR* gene and multiple sequence alignments with 11 orthologs. The shaded boxes indicate the position of the reported p.S304R variant.

were clinically unaffected, but biological investigations showed moderate TSH elevation in the father (TSH, 6.2  $\mu\text{U}/\text{mL}$ ; normal: 0.4–4.5) with an  $\text{FT}_4$  level of 1.0 ng/dL (normal: 0.8–1.8). The propositus' brother had a normal thyroid gland at ultrasound and normal thyroid function tests with a TSH of 2.5  $\mu\text{U}/\text{mL}$  (normal: 0.4–4.5). Subsequent analysis of the direct family members revealed that his paternal grandmother had medical history of a mild high TSH of 9.4  $\mu\text{U}/\text{mL}$  (normal: 0.4–4.5). By 5 years old, thyroid ultrasound revealed a very hypoplastic thyroid gland. Clinical assessment to date reveals normal growth and development. All family members were studied for mutation in other known candidate genes for thyroid dysgenesis. The patient's father and brother have a normal PAX8 coding sequence, and there were no other *TSHR* sequence variations among the members of this family. The propositus was heterozygous for the previously reported p.R31C PAX8 mutation as previously reported in other studies (31–33). The p.S304R variant was not found in 100 normal individuals.

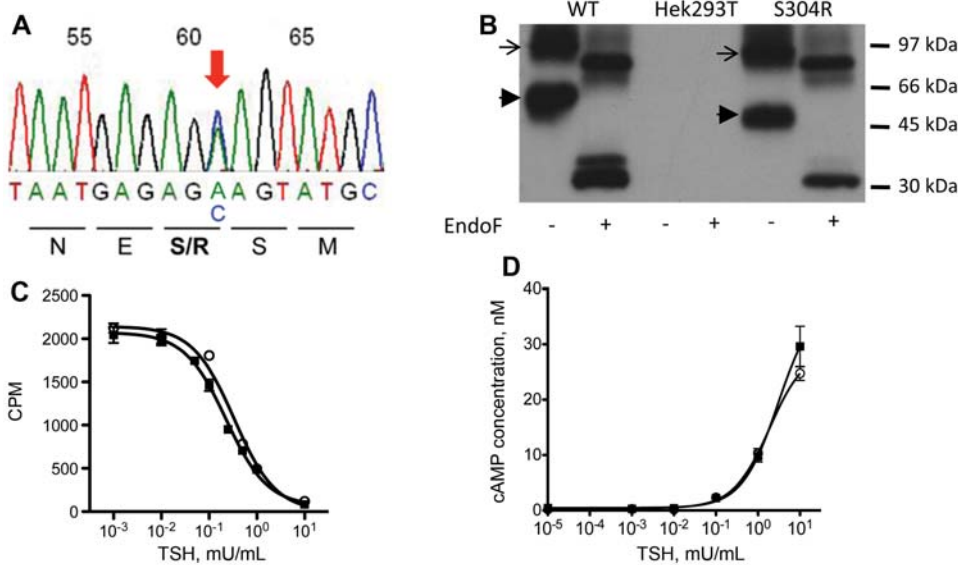
## Ortholog alignment

Our analysis rests on the idea that the differences in standard physicochemical properties between the “wild-type” amino acid and the missense variant are the root cause of functional impairment, and that evolutionary variation among orthologs in the affected position is a sample of the physicochemical properties tolerated at that position. We first built a multiple alignment of orthologs with ClustalW2 (Figure 1) (34); paralogs were excluded to avoid including evolutionary variation that specified functional differences. We have predicted orthologous TSHR protein sequences from the genomic

sequences of 11 non-human vertebrate species, including two primates, one artiodactyl, one carnivore, three rodents, one bird, one amphibian and two teleost species, successfully aligning all to the human reference (Figure 1). The corresponding proteins for each of the abovementioned species were identified and aligned (Figure 1). As expected, maximal identity was observed between the reference (human) and the most recently diverged species, the non-human primates. Similarity decreased as we progressed through the mammalian radiation to greater evolutionary distances, and was at its lowest as we reached the avian and teleost species.

## Functional studies of *TSHR-S304R*

Substitution of an arginine for serine 304 modified the consensus sequence of an N-glycosylation site (NXS/T), changing the  $^{302}\text{NES}^{304}$  sequence to  $^{302}\text{NER}^{304}$ . The glycosylation status of the S304R-mutated *TSHR* gene (S304R-*TSHR*) was determined by Western blot, with an antibody directed against the extracellular domain of TSHR. In protein extracts from cells transiently expressing WT-*TSHR*, this antibody revealed two bands corresponding to the high-mannose form at 95 kDa and to the alpha subunit at 56 kDa (35). After deglycosylation by endoglycosidase F (EndoF), which removed all complex sugars from the N-glycosylation site, two bands appeared, at 80 and 37 kDa, respectively (Figure 2B). In membrane proteins extracted from HEK293 cells transiently expressing S304R-*TSHR*, two bands were also detected, but their molecular weights were slightly lower than those observed for WT-*TSHR* (Figure 2B). These differences between S304R-*TSHR* and WT-*TSHR* disappeared after EndoF treatment. Therefore, the S304R substitution



**Figure 2** Functional analysis of the S304R-TSHR variant in transiently transfected HEK293 cells.

(A) Chromatograms showing the heterozygous p.S304R TSHR variant found in family 2. (B) Analysis of the glycosylation profile of WT-TSHR and S304R-TSHR by Western immunoblotting with and without EndoF treatment. The high-mannose immature form (arrow) and the alpha subunit (arrowhead) of TSHR are shown. (C)  $^{125}$ I-TSH competitive binding curve with intact cells transiently expressing WT-TSHR (black square) or S304R-TSHR (open circle). (D) cAMP production in HEK293 transiently expressing WT-TSHR (black square) or S304R-TSHR (open circle). Each point represents the mean  $\pm$  SEM of hexaplicates.

disrupted N-glycosylation of asparagine 302 (Figure 2B). Functional analyses showed that the S304R substitution affected neither TSH binding to TSHR nor adenylate-cyclase pathway activation, thus indicating that neither N-glycosylation of N302 nor  $^{302}$ NES $^{304}$  sequence was critical for TSHR function (Figures 2C and 2D).

## Discussion

In a CH patient, we identified a novel heterozygous germline point mutation, at codon 304, which resulted in the substitution of a serine for an arginine (p.S304R) of the TSHR. The mutant receptor was transiently expressed in HEK293 cells and caused equivalent activation of the cAMP pathway when compared with the WT TSHR (Figure 2). The p.S304R variant was identified in only one of the 440 chromosomes analyzed in this cross-sectional study and control population. Therefore, this variation is not considered polymorphism but may be considered a rare sequence variant instead. The analysis of amino acid residue serine in the position 304 of the protein of the TSHR gene showed conservation among *Homo sapiens*, *Macaca mulatta*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Bos taurus*, *Dasybus novemcinctus* and *Monodelphis domestica* (Figure 1). However, although mutational analyses may

be significantly enhanced by deep evolutionary sequence comparisons, they may not account for all sources of functional constraint and phenotypic impact.

The TSHR ectodomain can be subdivided into leucine-rich repeat (LRR) and the HinR, which links the LRR with the serpentine domain and is assumed to be represented by amino acids placed between positions 280 and 410, which contain multiple possible TSH binding sites (9). Therefore, it was likely that the change of a polar hydrophilic S304 into a positive charged arginine residue disrupted the HinR structure, leading to a reduction in the receptor binding capacity. The p.S304R variant is located in a glycosylation HinR position within the onset of the of the cysteine box 2/3 linker region, which is known to be responsible to connect the N- and C-terminally located cysteine boxes [cysteine box 2 (C-b2) and Cysteine box 3 (C-b3)] (36). The value of the C-b2/3 linker in the maintenance of the signaling competence of the receptor has been revealed by several studies (5, 36). More specifically, the role for the serine in the 304 position has been explored and its substitution for alanine (p.S304A mutant) had 32% reduction in the expression and a slight but significant impairment (15%) in binding both bovine TSH (bTSH) and TR1401 (a human TSH analog) (10). Nevertheless, another study confirmed that p.S304A had decreased cell surface expression and transfection efficiency by FACS analysis,

but the basal and stimulated cAMP accumulation were normal compared with WT receptor (36).

Actually, the cysteine box 2/3 linker region and C-terminal portion of HinR harbor other previously described, naturally occurring inactivating mutations (p.R310C, p24X, p.C390W, p.D403N, and p.D410N), and site-directed mutagenesis studies have demonstrated that even the replacement of a single amino acid residue (e.g., p24X, p.C390W, and p.D403N) can severely impair the expression of a functional receptor protein (26, 37–43) (Table 2). Most described patients with a TSHR mutation within the HinR have a thyroid of reduced size, suggesting that this region plays an important role in the signal transduction and, consequently, in the thyroid gland growth (Table 2) (26, 37–45, 47).

Meanwhile, the mutations p.R310C and p.C390W are related with impaired binding and cAMP generation, confirming the hypothesized inhibitory effect of the extracellular domain on a noisy transmembrane; this also explains the compensated TSH resistance in affected patients. On the one hand, the mutation D410N has been reported to be associated with normal binding but

defective cAMP generation, and such findings confirm the role of the HinR in conveying the signal from the extracellular domain to the serpentine domain. On the other hand, our functional analysis could express cDNA for the WT and the p.S304R receptor variant in HEK293 cells. The <sup>125</sup>I-thyrotropin binding capacity analysis also showed that both forms exhibited similar specific and saturable binding of thyrotropin and the amount of expressed cells on the surface (Figure 2B–D). Further, the additional functional characterization of the *TSHR*-S304R variant showed that the absence of one N-glycosylation site did not modify receptor function (Figure 2B). In this context, the p.S304R hinge variant does not seem to be functionally important, and the described dysgenetic phenotype would only be explained by the heterozygous p.R31C mutation, which was exclusively found in the proband patient. The deleterious effect of PAX8 mutation has already been demonstrated (33). We can assume that the wearing 2 mutations on the PAX8 and TSHR synergize default size and functional thyroid.

Understanding the structure and function of the HinR is an important step in achieving a complete picture of the

**Table 2** Spectrum of clinical features and functional effects in patients with *TSHR* gene missense mutations located at the hinge portion identified to date.

Protein	No. of cases	Genotype	Thyroid morphology	Thyroid function	Functional analysis of the mutations	References
S304R	1	HET	Hypoplasia	CH	nl cAMP nl Glycosilation	Present study
R310C	5 <sup>a</sup>	3 HET 2 HOM	nl	MH SH	↓ TSH Binding ↓ cAMP	(44)
C390W	1	HET	Nl	MH		(40)
	1	HET	enlarged	MH	↓ Expression at cell surface	(26)
	3 <sup>a</sup>	2 HET	nl	MH	↓ TSH binding ↓ cAMP	(40)
D403N	4 <sup>a</sup>	3HET 1HOM	nl Hypoplasia	EU CH		(36)
	1	HET	na	MH		(37)
	1	HET	na	MH	↓ TSH binding	(38)
	2 <sup>a</sup>	HET	na	EU, IH	↓ Expression at cell surface ↓ cAMP	(39)
	2 <sup>a</sup>	HET	Hypoplasia	MH, IH		(40)
D410N	1	HET	na	IH		(41)
	1	CHET	na	CH		(43)
	2 <sup>a</sup>	HET	nl	MH, IH	=TSH Binding ↓ cAMP	(40)
	1	CHET	nl	MH		(26)
	2 <sup>a</sup>	HET	nl	IH		(45)

Adapted from Cassio et al. (12) and Persani et al. (46). EU, euthyroidism; IH, isolated hyperthyrotropinemia; MH, mild hypothyroidism; SH, severe hypothyroidism; CH, congenital hypothyroidism; HOM, homozygous; HET, heterozygous; CHET, compound heterozygous. <sup>a</sup>Member of the same family. na, not given; nl, within normal limits.

necessary mechanisms for the TSHR activation and signaling. Recent reports have shown that the HinR is not only a scaffold for maintaining binding of the glycoprotein hormones, but may also work as an important signal transmitter for TSH-induced activation.

**Conflict of interest statement:** The authors have no conflict of interest to disclose. Informed consent has been obtained from the patient (or patient's guardian) for publication of the case report.

**Financial support:** This work was supported in part by grants from Electricité de France (RB 200605), European Society for Pediatric Endocrinology (ESPE) Research Unit (MP), *Fondation Grace de Monaco* and PHRC 2011 Hypotygen sponsored by the French Ministry, Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado da Bahia (FAPESB) (HER), Société française d'endocrinologie (SFE), Merck Serono Grant (MC), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (HER). TLOC obtained financial support from CAPES.

## References

- Vassart G, Pardo L, Costagliola S. [A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors](#). *Trends Biochem Sci* 2004;29:119–26.
- Duprez L, Parma J, Van Sande J, Rodien P, Sabine C, et al. Pathology of the TSH receptor. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1999;12:295–302.
- Vassart G, Desarnaud F, Duprez L, Eggerickx D, Labbe O, et al. The G protein-coupled receptor family and one of its members, the TSH receptor. *Ann NY Acad Sci* 1995;766:23–30.
- Tonacchera M, Van Sande J, Parma J, Duprez L, Cetani F, et al. TSH receptor and disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996;44:621–33.
- Vlaeminck-Guillem V, Ho SC, Rodien P, Vassart G, Costagliola S. [Activation of the cAMP pathway by the TSH receptor involves switching of the ectodomain from a tethered inverse agonist to an agonist](#). *Mol Endocrinol* 2002;16:736–46.
- Duprez L, Parma J, Costagliola S, Hermans J, Van Sande J, et al. Constitutive activation of the TSH receptor by spontaneous mutations affecting the N-terminal extracellular domain. *FEBS Lett* 1997;409:469–74.
- Hamidi S, Chen CR, Mizutori-Sasai Y, McLachlan SM, Rapoport B. [Relationship between thyrotropin receptor hinge region proteolytic posttranslational modification and receptor physiological function](#). *Mol Endocrinol* 2011;25:184–94.
- Jaeschke H, Schaarschmidt J, Gunther R, Mueller S. The hinge region of the TSH receptor stabilizes ligand binding and determines different signaling profiles of human and bovine TSH. *Endocrinology* 2011;152:3986–96.
- Mueller S, Jaeschke H, Gunther R, Paschke R. [The hinge region: an important receptor component for GPCR function](#). *Trends Endocrin Met* 2009;21:111–22.
- Mueller S, Szkudlinski MW, Schaarschmidt J, Gunther R, Paschke R, et al. Identification of novel TSH interaction sites by systematic binding analysis of the TSHR hinge region. *Endocrinology* 2011;152:3268–78.
- Smits G, Govaerts C, Nubourgh I, Pardo L, Vassart G, et al. Lysine 183 and glutamic acid 157 of the TSH receptor: two interacting residues with a key role in determining specificity toward TSH and human CG. *Mol Endocrinol* 2002;16:722–35.
- Persani L, Calebiro D, Cordella D, Weber G, Gelmini G, et al. Genetics and phenomics of hypothyroidism due to TSH resistance. *Mol Cell Endocrinol* 2010;322:72–82.
- Sunthornthepvarakul T, Gottschalk ME, Hayashi Y, Refetoff S. Brief report: resistance to thyrotropin caused by mutations in the thyrotropin-receptor gene. *N Engl J Med* 1995;332:155–60.
- Calebiro D, de Filippis T, Lucchi S, Covino C, Panigone S, et al. Intracellular entrapment of wild-type TSH receptor by oligomerization with mutants linked to dominant TSH resistance. *Hum Mol Genet* 2005;14:2991–3002.
- Calebiro D, Gelmini G, Cordella D, Bonomi M, Winkler F, et al. Frequent TSH receptor genetic alterations with variable signaling impairment in a large series of children with nonautoimmune isolated hyperthyrotropinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:E156–60.
- Polak M, Sura-Trueba S, Chauty A, Szinnai G, Carre A, et al. Molecular mechanisms of thyroid dysgenesis. *Horm Res* 2004;62:14–21.
- Sunthornthepvarakul T, Hayashi Y, Refetoff S. [Polymorphism of a variant human thyrotropin receptor \(hTSHR\) gene](#). *Thyroid* 1994;4:147–49.
- Gustavsson B, Eklof C, Westermark K, Westermark B, Heldin NE. Functional analysis of a variant of the thyrotropin receptor gene in a family with Graves' disease. *Mol Cell Endocrinol* 1995;111:167–73.
- Gabriel EM, Bergert ER, Grant CS, van Heerden JA, Thompson GB, et al. Germline polymorphism of codon 727 of human thyroid-stimulating hormone receptor is associated with toxic multinodular goiter. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3328–35.
- Peeters RP, van Toor H, Klootwijk W, de Rijke YB, Kuiper GG, et al. Polymorphisms in thyroid hormone pathway genes are associated with plasma TSH and iodothyronine levels in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2880–88.
- Hansen PS, van der Deure WM, Peeters RP, Iachine I, Fenger M, et al. The impact of a TSH receptor gene polymorphism on thyroid-related phenotypes in a healthy Danish twin population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;66:827–32.
- Nogueira CR, Kopp P, Arseven OK, Santos CL, Jameson JL, et al. Thyrotropin receptor mutations in hyperfunctioning thyroid adenomas from Brazil. *Thyroid* 1999;9:1063–68.
- Sykiotis GP, Neumann S, Georgopoulos NA, Sgourou A, Papatzopoulos A, et al. Functional significance of the thyrotropin receptor germline polymorphism D727E. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;301:1051–56.
- Cuddihy RM, Bryant WP, Bahn RS. [Normal function in vivo of a homozygotic polymorphism in the human thyrotropin receptor](#). *Thyroid* 1995;5:255–57.
- Loos U, Hagner S, Bohr UR, Bogatkewitsch GS, Jakobs KH, et al. Enhanced cAMP accumulation by the human thyrotropin receptor variant with the Pro52Thr substitution in the extracellular domain. *Eur J Biochem* 1995;232:62–65.

26. de Roux N, Misrahi M, Brauner R, Houang M, Carel JC, et al. Four families with loss of function mutations of the thyrotropin receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:4229–35.
27. Karlin S, Mrazek J, Gentles AJ. Genome comparisons and analysis. *Curr Opin Struct Biol* 2003;13:344–52.
28. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403–10.
29. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673–80.
30. Sura-Trueba S, Aumas C, Carre A, Durif S, Leger J, et al. An inactivating mutation within the first extracellular loop of the thyrotropin receptor impedes normal posttranslational maturation of the extracellular domain. *Endocrinology* 2009;150:1043–50.
31. Ramos HE, Gabor Szinnai AC, Tron E, Cerqueira TL, Leger J, et al. PAX8 Mutations in congenital hypothyroidism: New evidence for phenotypic variability from normal to ectopic thyroid gland. *Eur J Endocrinol* 2014, in Press. DOI: <http://dx.doi.org/10.1530/EJE-13-1006>.
32. Komatsu M, Takahashi T, Takahashi I, Nakamura M, Takahashi I, et al. Thyroid dysgenesis caused by PAX8 mutation: the hypermutability with CpG dinucleotides at codon 31. *J Pediatr* 2001;139:597–99.
33. Ramos HE, Labedan I, Carre A, Castanet M, Guemas I, et al. New cases of isolated congenital central hypothyroidism due to homozygous thyrotropin beta gene mutations: a pitfall to neonatal screening. *Thyroid* 2010;20:639–45.
34. Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, et al. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3497–500.
35. Trueba SS, Auge J, Mattei G, Etchevers H, Martinovic J, et al. PAX8, TITF1, and FOXE1 gene expression patterns during human development: new insights into human thyroid development and thyroid dysgenesis-associated malformations. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:455–62.
36. Kleinau G, Mueller S, Jaeschke H, Grzesik P, Neumann S, et al. Defining structural and functional dimensions of the extracellular thyrotropin receptor region. *J Biol Chem* 2011;286:22622–31.
37. Biebermann H, Schoneberg T, Krude H, Schultz G, Gudermann T, et al. Mutations of the human thyrotropin receptor gene causing thyroid hypoplasia and persistent congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3471–80.
38. Calaciura F, Motta RM, Miscio G, Fichera G, Leonardi D, et al. Subclinical hypothyroidism in early childhood: a frequent outcome of transient neonatal hyperthyrotropinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3209–214.
39. Camilot M, Teofoli F, Gandini A, Franceschi R, Rapa A, et al. Thyrotropin receptor gene mutations and TSH resistance: variable expressivity in the heterozygotes. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;63:146–51.
40. De Marco G, Agretti P, Camilot M, Teofoli F, Tato L, et al. Functional studies of new TSH receptor (TSHr) mutations identified in patients affected by hypothyroidism or isolated hyperthyrotrophinaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009;70:335–38.
41. Nicoletti A, Bal M, De Marco G, Baldazzi L, Agretti P, et al. Thyrotropin-stimulating hormone receptor gene analysis in pediatric patients with non-autoimmune subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:4187–94.
42. Rapa A, Monzani A, Moia S, Vivenza D, Bellone S, et al. Subclinical hypothyroidism in children and adolescents: a wide range of clinical, biochemical, and genetic factors involved. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:2414–20.
43. Tonacchera M, Agretti P, De Marco G, Perri A, Pinchera A, et al. Thyroid resistance to TSH complicated by autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4543–46.
44. Narumi S, Muroya K, Abe Y, Yasui M, Asakura Y, et al. TSHR mutations as a cause of congenital hypothyroidism in Japan: a population-based genetic epidemiology study. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:1317–23.
45. Russo D, Betterle C, Arturi F, Chiefari E, Girelli ME, et al. A novel mutation in the thyrotropin (TSH) receptor gene causing loss of TSH binding but constitutive receptor activation in a family with resistance to TSH. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4238–42.
46. Cassio A, Nicoletti A, Rizzello A, Zazzetta E, Bal M, et al. Current loss-of-function mutations in the thyrotropin receptor gene: when to investigate, clinical effects, and treatment. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2013;5:29–39.
47. Tonacchera M, Di Cosmo C, De Marco G, Agretti P, Banco M, et al. Identification of TSH receptor mutations in three families with resistance to TSH. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;67:712–18.

## 6. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo de avaliação dos aspectos clínico-genético-molecular em pacientes com hipotireoidismo congênito no Estado da Bahia. O HC é uma doença relativamente frequente que, em regiões iodo-suficientes, afeta aproximadamente 1 em cada 4.000 recém-nascidos, sendo uma das principais causas de retardo mental (LAFRANCHI, 2010). A frequência é maior em brancos do que em negros, sendo sua ocorrência três a quatro vezes maior no sexo feminino (LAFRANCHI, 2010). No Brasil, em 2007, a incidência de HC foi de 1:3.500 (SETIAN, 2007). Na Bahia, segundo Almeida, no ano de 2003, a incidência de HC foi de 1:4.000. Durante o período analisado neste estudo, a incidência foi de 1:3.070 nascidos-vivos (LACERDA et al., 2009). Dados obtidos pelo Centro de Triagem Neonatal de Porto Alegre em 2000, demonstraram incidência de 1:3.500 (RIBEIRO et al., 2002), enquanto em Minas Gerais, a incidência foi 1:4.375 (SILVA et al., 2005). Podemos concluir que a incidência de HC pode sofrer variação entre diferentes etnias, áreas geográficas, na presença de movimentos migratórios e de consanguinidade na população. Recentemente, PEARCE et al., 2010 sugeriram que fatores ambientais possam influenciar no aumento global da incidência de HC. Além disso, dados qualitativos do serviço de triagem neonatal como a cobertura e utilização de pontos de corte mais baixos (exemplo: de 20-25mU/L para 6-10 um/L), paralelo ao uso generalizado de métodos laboratoriais mais acurados, vem colaborando para elevada identificação de formas mais leves de HC e consequente impacto na incidência da doença (LAFRANCHI, 2011). Nosso estudo avaliou um grande número de crianças, em população etnicamente estável do Brasil, utilizando ultrassonografia e cintilografia como importantes ferramentas de caracterização clínica. Desta forma, através do uso combinado destes exames para o diagnóstico do HC, podemos observar nítido aumento do número de pacientes identificados com glândula tópica e de tamanho normal, que passaram a representar a maior parte dos casos acompanhados na amostra estudada. Este evento vem sendo observado nos últimos anos e foi descrito em estudos realizados na Itália (CORBETTA et al., 2009), Grécia (MENGRELI et al., 2010), Argentina (CHIESA; MENDEZ, 2013) e França, onde, CASTANET et al., 2015, verificaram que estes pacientes apresentam uma heterogeneidade clínica e bioquímica cujos mecanismos desencadeantes são desconhecidos, e, embora uma parte destes casos normalize o TSH ao longo do tratamento de reposição hormonal com L-T4, observa-se a necessidade de orientações quanto a tentativa sistemática da retirada da L-T4 evitando o prolongamento desnecessário do tratamento, principalmente quando não há necessidade de adaptação na dose do medicamento.

Habitualmente é difícil estabelecer o diagnóstico baseado exclusivamente no exame clínico do paciente nos primeiros dias de vida devido à apresentação inicialmente quase assintomática da doença uma vez que existe passagem transplacentária de hormônios tireoidianos, ressaltando a importância do rastreio neonatal no diagnóstico de HC. Durante o período do estudo, a cobertura da triagem no Estado da Bahia foi de 87,7%. Os dados de cobertura dos programas de triagem neonatal são bem variáveis no Brasil. Na região norte (Pará), a cobertura foi de 50% (BENEVIDES et al., 2006); em outro estado do nordeste, Sergipe, 76,8% (RAMALHO et al., 2008); no sudeste (Minas Gerais) a cobertura atingiu 99% (PEZZUTI et al., 2009); enquanto que no sul, Santa Catarina tem cobertura de 81% (NASCIMENTO et al., 2003) e Paraná de 99% (MEDEIROS-NETO, et al., 2008). Atualmente (ano de 2015), houve discreta piora na cobertura da triagem neonatal realizada no estado da Bahia (86,6%). Mas estes dados não são tão precisos já que parte do rastreio é realizado na rede privada e, portanto, não é contabilizado.

Uma variedade de sinais ou sintomas foram comumente identificados nos pacientes do nosso estudo: extremidades frias (43,7%), pele seca (40,4%), hérnia umbilical (53,3%) e choro rouco (40,4%); indicando que o diagnóstico baseado no exame clínico é possível quando ainda há substancial atraso no rastreio neonatal da doença. No SRTN da APAE-Salvador, os pacientes ainda são diagnosticados tardiamente, uma vez que a média da idade no início do tratamento foi de  $45,5 \pm 61,9$  dias (mediana 39 dias) e isto permite o aparecimento de sintomas e sinais de hipotireoidismo. Em todo caso, o tratamento deve sempre ser instituído imediatamente, possibilitando a minimização de distúrbios neurológicos (JACOB, PETERS, 2015; LÉGER et al., 2014a; MACIEL, 2013). Do mesmo modo, RAMALHO et al., 2000 ao avaliar o programa no estado de Sergipe, também verificou atraso na realização dos exames e convocação dos pacientes para início do tratamento, com a maioria das crianças passando dos 72 dias de vida no momento da avaliação; em análise posterior (2008), o mesmo serviço demonstrou mediana da idade ao diagnóstico de 45 dias. Em estudo realizado na região norte (Pará) por BENEVIDES et al., 2006, o diagnóstico também foi tardio, e a maioria dos pacientes iniciava o tratamento em torno dos 90 dias de vida. Na região sudeste, em estudo realizado por PEZZUTI, et al, em 2009, no Estado de Minas Gerais, apesar de 53% das crianças iniciarem o tratamento ainda no primeiro mês de vida, a maioria só foi tratada depois dos 15 dias de vida. No Sul, apesar de apresentar uma cobertura de 81% de recém-nascidos, a média de idade de início do tratamento foi de 33,6 dias, em estudo realizado em 2003 (NASCIMENTO et al., 2003). Esses dados podem refletir que, de um modo geral, a



qualidade atual dos programas de triagem neonatal não é a ideal, já que o tempo de início adequado para o tratamento deve ser inferior a duas semanas de vida (JACOB; PETERS, 2015; LÉGER et al., 2014a; MACIEL, 2013). Há urgente necessidade de adequação dos SRTNs, sobretudo das regiões norte e nordeste, para atingir aspectos preconizados pelo Ministério da Saúde.

A disgenesia tireoidiana classicamente representa 80-85% da população de HC (SZINNAI, 2014). Nestes casos HC decorre de distúrbios na ontogênese tireoidiana, resultando em agenesia, hipoplasia, hemiagenesia ou ectopia. O defeito mais comumente observado nos estudos populacionais é a falha no processo de migração da tireoide para sua posição normal, resultando em ectopia, seguido de agenesia e hipoplasia, alguns poucos casos são representados pela ausência de um dos lobos e, ocasionalmente, também do istmo da tireoide, as chamadas hemiagenesias tireoidianas. A maioria dos pacientes com hemiagenesia permanece eutireoidiana (RASTOGI; LAFRANCHI, 2010). A investigação da etiologia do HC é extremamente importante para o prognóstico, a ultrassonografia e cintilografia da tireoide devem ser considerados, ainda no período neonatal, em todos os casos, desde que não causem atraso no início do tratamento. O uso combinado dessas duas técnicas propicia melhor acurácia na caracterização clínica e direciona o estudo genético (KREISNER et al., 2003; BELTRÃO et al., 2010; RUCHAŁA; SZCZEPANEK; SOWIŃSKI, 2011; JACOB; PETERS, 2015; LÉGER et al., 2014b). No nosso estudo, avaliamos uma amostra de 239 pacientes diagnosticados com HC primário permanente, e através da realização dos exames de USG, cintilografia da tireoide e dosagem sérica da TG foi possível definir o fenótipo da maioria dos pacientes. A USG é uma importante ferramenta para o esclarecimento dos casos de HC uma vez que apresenta baixo custo e não requer preparação ou interrupção do tratamento. Uma das limitações da USG é a baixa sensibilidade na visualização das glândulas muito hipoplásicas ou ectópicas. Já a dosagem de TG sérica é método sensível para a detecção de tecido tireoidiano funcional, pois, se detectável, pode auxiliar no diagnóstico diferencial dos pacientes com USG e cintilografia negativas. Contudo, na maioria dos nossos casos (155, 64,8%), foi possível a identificação de glândula tópica de tamanho normal (GTN) e, em somente 63 (26,3%) dos casos, identificamos defeitos na morfogênese tireoidiana. Através do uso combinado desses métodos, foi possível confirmar o fenótipo dos 63 casos de DT: 21 hipoplasias (33,4%), 13 hemiagenesias (20,6%), 12 agenesias (19%) e 17 casos de ectopia (27%). Assim como em outros estudos, observou-se predominância do sexo feminino nos pacientes com DT (41/63 pacientes), diferente dos casos de glândula tópica de tamanho

normal, onde houve uma igualdade na distribuição entre os sexos (77F/78M) (DE SILVA et al., 2014; DEVOS et al., 1999).

Em 22 (9,2%) dos casos não foi possível esclarecer o fenótipo tireoidiano, uma vez que os pacientes apresentaram resultado negativo na USG de tireoide (glândula não visualizada) e possuíam concentrações normais (detectáveis) de TG sérica (USG-/TG+), sugerindo que a glândula possa ser extremamente hipoplásica (tópica) ou ectópica. Em 6/22 dos casos de USG-/TG+, o exame de cintilografia foi realizado e nenhum tecido tireoidiano foi visualizado. Este resultado pode ser encontrado em até 50% dos pacientes que apresentam esse padrão de USG-/TG+. Em 1983, CZERNICHOW et al, encontraram concordância entre TG sérica indetectável e ausência de absorção do tecnécio na cintilografia em 6 pacientes com HC e propôs que a mensuração da TG sérica fosse rotina na avaliação etiológica, particularmente no diagnóstico diferencial de agenesia e ectopia. Alguns autores utilizam o termo “atireose aparente” para estes casos e “atireose verdadeira” para os casos em que a TG plasmática é indetectável (SZINNAI, 2014). Ainda existe discussão conceitual sobre a utilização do termo agenesia, que significaria ausência da gênese do primórdio tireoidiano nos casos de DT. Como os mecanismos moleculares da gênese do primórdio tireoidiano ainda não são completamente elucidados seria, de fato, inapropriado afirmar que os casos de glândula não visualizada por métodos de imagem (atireose) são oriundos de uma agenesia ou de, simplesmente, sobrevivência reduzida das células foliculares primordiais. Casos de atireose aparente, sobretudo com a combinação USG-/Cintilografia-/TG+ são descritos em muitos estudos populacionais (TONACCHERA et al., 2007; MATHAI et al., 2008). DJEMLI et al, reavaliaram a contribuição da dosagem sérica de TG em 31 pacientes com DT e sugeriram que, se os níveis de TG forem indetectáveis a cintilografia pode ser evitada. Acreditamos que a TG possa ser útil na caracterização clínica se incorporada junto ao TSH, na ocasião do exame confirmatório, realizado aos 3 anos de idade (BELTRÃO et al., 2010; DE SILVA et al., 2014).

Ao compararmos o TSH dosado no rastreio neonatal entre os grupos GTN, (mediana 31.3, IQR 18.9-96.7 mU/L) vs. DT (mediana 91.4, IQR 35.4-226.5 mU/L), observamos diferença significativa ( $p < 0.001$ ), confirmando que os casos de GTN representam formas mais leves de HC. Quando os subgrupos de DT são comparados entre si, observamos uma diferença nos valores do TSH da triagem neonatal, presente principalmente ao comparar hipoplasia (39.4, IQR 14.0-118 mU/L) vs. agenesia (344, IQR 150.0-1057.6mU/L) ( $p \leq 0.001$ ). Essa diferença também foi expressiva ao comparar agenesia vs. ectopia (53.6, IQR

37,8-169 mU/L) ( $p \leq 0.005$ ), e hemiagenesia (39.6, IQR 17.8-106.7 mU/L) ( $p=0,024$ ). De fato, por apresentarem um quadro mais grave, as crianças com agenesia conhecidamente apresentam um pior prognóstico neurológico e requerem doses maiores de L-T<sub>4</sub> (RASTOGI; LAFRANCHI, 2010). De acordo com o atual consenso da ESPE (European Society of Pediatric Endocrinology), o início do tratamento deve ser precoce (LÉGER et al., 2014a). A recomendação de dose de 10-15µg/Kg de L-T<sub>4</sub> por dia deve ser seguida, sendo que crianças com fenótipos mais graves (agenesia) podem requerer doses mais altas de L-T<sub>4</sub> (LÉGER et al., 2014a; RASTOGI; LAFRANCHI, 2010; UYTTENDAELE et al., 2016).

Dentre os pacientes com DT foram encontrados sete pacientes com malformações cardíacas: defeito de septo atrial (n=4), estenose pulmonar (n=1), bloqueio átrio-ventricular (n=1) e Síndrome de Lown-Ganong-Levine (n=1), além de síndrome de Down (n=4) e síndrome de Willians (n=1) (CERQUEIRA et al., 2015). Malformações extra-tireoidianas são conhecidamente mais prevalentes em pacientes com HC do que na população geral (2-3%) (CALACIURA et al., 1995; BENSON et al., 1999; HERMANNNS et al., 2011; OLIVIERI, 2002). Esta associação, no entanto, pode ser mais óbvia nos casos de DT, sugerindo a participação de genes simultaneamente envolvidos na morfogênese tireoidiana e cardíaca. O coração e a tireoide primitivos, estão intimamente relacionados durante a embriogênese e parecem sofrer forte influência de fatores epigenéticos e genéticos locais (BENSON et al., 1999; DENTICE et al., 2006; NARUMI et al., 2010; VAN ENGELEN et al., 2012). Alguns estudos apontam para prevalência elevada de malformações urinárias e urológicas, porém este dado não foi sistematicamente reproduzido em outras populações e o rastreo ultrassonográfico sistemático destas alterações ainda é controverso (OLIVIERI et al., 2002). Na nossa população, todas as crianças foram rastreadas com USG renal e apenas 1 caso de agenesia renal unilateral foi identificado em um indivíduo com DT (agenesia).

Do ponto de vista clínico, um melhor entendimento dos mecanismos de controle morfogenéticos da tireoide seria extremamente útil e relevante, uma vez que os distúrbios de desenvolvimento da glândula aparentemente possuem diferente evolução clínica e prognóstica (RAMOS; NESI-FRANÇA; MACIEL, 2008; CASTANET et al., 2010; RAMOS et al., 2014). Assim como outros estudos envolvendo pacientes com DT, não encontramos mutação nos genes candidatos *TSH-R*, *PAX8*, *NKX2.5* e *HES1* (ALVES et al., 2010; BRUST et al., 2012; RAMOS et al., 2008). Esta é a primeira vez que o gene *HES1* é rastreado em pacientes com HC. Estudos em camundongos transgênicos *knockout* para o *Hes1* demonstraram a relação da

importância da expressão do *HES1* na sobrevivência das células foliculares durante a embriogênese (CARRE et al., 2011).

Gene *NKX2.5*: Cinquenta e sete pacientes com DT, (20 ectopias, 30 hipoplasias, 6 agenesias e 1 hemiagenesia), apresentaram polimorfismos previamente descritos no gene *NKX2.5*. O polimorfismo p.Gln181 (c.541G>A) foi encontrado em heterozigose um paciente com hipoplasia. Quarenta e nove pacientes apresentaram o polimorfismo p.Glu21 (c.63A>G) (21 homozigose, 33 heterozigose). O nosso estudo é o primeiro a evidenciar associação deste polimorfismo à hipoplasia da glândula ( $p < 0,036$ ) (CERQUEIRA et al., 2015). Este achado reforça a ideia de que o gene *NKX2.5* pode estar implicado no crescimento e sobrevivências das células foliculares durante a morfogênese tireoidiana. DENTICE et al, 2006, em estudo italiano realizado de pacientes com HC, identificou duas novas mutações, p.A119S e p.R161P, ambas em pacientes com glândula ectópica. Um paciente, afetado pela mutação p.R161P, apresentava malformação cardíaca (insuficiência de válvula mitral). Uma terceira mutação (p.R25C) já descrita em previamente em pacientes com malformações cardíacas foi encontrada em outros dois pacientes com DT isolada (ectopia e agenesia). O estudo funcional dessas mutações demonstrou significativa redução da atividade de ligação ao DNA e propriedades de efeito dominante negativo. Esses dados demonstram que o gene pode estar envolvido na patogênese molecular da DT porém, a prevalência de mutações ainda é muito baixa nos pacientes com DT associada ou não à malformações cardíacas. Assim como nos casos de pacientes com cardiopatia congênita, é possível que mutações somáticas possam ser encontradas nos casos de DT, porém isso ainda não foi investigado (DRAUS et al., 2009). O papel do gene *NKX2.5* no circuito genético de controle da morfogênese e organogênese tireoidiana deve ser melhor investigado.

Gene *TSH-R*: O polimorfismo p.D727E é amplamente descrito na população e tem sido reportado com frequência na população brasileira (BRUST et al., 2012; CAMILOT et al., 2005; ESPERANTE et al., 2008; MACCHIA et al., 1998; RAMOS et al., 2008). ALVES et al., 2010, relataram frequência de 10% em pacientes com hipotireoidismo subclínico, representando a segunda maior alteração nestes pacientes. No nosso estudo, este polimorfismo foi encontrado em 31/63 (49,2%) (heterozigose) e 4/63 (6,4%) (homozigose) dos casos de DT. Ainda, no estudo de colaboração envolvendo o grupo de pacientes da França (N=118), detectamos nova variante do *TSH-R* (p.S304R), localizada na região *hinge* da proteína, em três membros da mesma família cujo probando apresentava hipoplasia tireoidiana. No estudo funcional da variante p.S304R não houve alteração significativa de ligação ao TSH e

produção de AMP cíclico, mas houve interferência no sítio de glicosilação da proteína (CERQUEIRA et al., 2014).

Em resumo, não conseguimos identificar a etiopatogenia molecular da DT na totalidade dos casos de pacientes com DT da APAE-Salvador. O fato de termos analisado casos esporádicos (não familiares) de DT e da análise ter sido limitada às regiões codificadoras dos genes pode ter influenciado neste resultado. Sabemos que apenas 2-5% dos casos de DT apresentam mutações nos genes candidatos até o momento identificados e que existe ampla variabilidade fenotípica e de penetrância (mesmo nos casos familiares), apontando para outros possíveis mecanismos multigênicos de herança não mendeliana e talvez a influência de mecanismos epigenéticos (CASTANET et al., 2010; LAFRANCHI, 2010; RAMOS et al., 2014; RASTOGI; LAFRANCHI, 2010). Nos últimos anos, a descoberta de genes candidatos (especialmente fatores de transcrição envolvidos na diferenciação das células foliculares tireoidianas) e outros mecanismos implicados na morfogênese tireoidiana, possibilitaram um maior esclarecimento sobre as bases genéticas da ontogênese tireoidiana (FAGMAN; NILSSON, 2010a, 2010b; NILSSON; FAGMAN, 2013).

## 7. CONCLUSÕES

Este estudo oferece uma contribuição para a melhor compreensão do HC no Estado da Bahia, uma vez que é o primeiro estudo de avaliação clínica e genética realizado nesta população. A descrição fenotípica cuidadosa dos pacientes com HC, incluindo a análise morfológica da glândula tireoide, é necessária para o correto diagnóstico etiológico da doença. A clínica da DT revelou diferentes concentrações hormonais nos seus diferentes subgrupos, e a análise genética confirmou que outros genes precisam ser estudados para o melhor esclarecimento dos mecanismos da DT, bem como nos casos associados a outras síndromes.

Alcançar a triagem plena dos recém-nascidos em tempo hábil e manter o tratamento regular a longo prazo nos pacientes detectados, bem como elucidar a etiologia em um número cada vez maior de afetados, continua sendo um desafio contínuo para os profissionais envolvidos com o diagnóstico e tratamento da doença. O diagnóstico genético de HC pode facilitar o acompanhamento interdisciplinar e o suporte para os pacientes.

## **8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO**

As limitações do estudo incluem: a) estudo retrospectivo; b) necessidade de padronização dos registros nos prontuários de atendimento; c) a caracterização do fenótipo tireoidiano por ultrassonografia e cintilografia da tireoide e dosagem sérica de tireoglobulina ainda não é rotina no atendimento do HC no estado da Bahia;

## REFERÊNCIAS

- ALT, B. et al. Arteries define the position of the thyroid gland during its developmental relocalisation. **Development**, v. 133, n. 19, p. 3797–3804, 2006.
- ALVES, E. A. C. et al. High Frequency of D727E Polymorphisms in Exon 10 of the TSHR Gene in Brazilian Patients with Congenital Hypothyroidism. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v. 23, p. 1–8. 2010.
- AZAR-KOLAKEZ, A. et al. All-cause and disease-specific mortality and morbidity in patients with congenital hypothyroidism treated since the neonatal period: A national population-based study. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 98, n. February 2013, p. 785–793, 2013.
- BAMFORTH, J. et al. Congenital hypothyroidism, spiky hair, and cleft palate. **Journal of Medical Genetics**, v. 26, n. 5, p. 49–60, 1989.
- BARIS, I. et al. A novel missense mutation in human TTF-2 (FKHL15) gene associated with congenital hypothyroidism but not athyreosis. **The Journal of Clinical Endocrinology And Metabolism**, v. 91, n. 10, p. 4183–4187, 2006.
- BELTRÃO, C. B. et al. Etiology of congenital hypothyroidism using thyroglobulin and ultrasound combination. **Endocrine Journal**, v. 57, n. 7, p. 587–593, jan. 2010.
- BENEVIDES, A. et al. Perfil epidemiológico de portadores de hipotireoidismo congênito. **Revista Paraense de Medicina**, v. 20, n. 3, p. 23–26, 2006.
- BENSON, D. W. et al. Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. **Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 11, p. 1567–1573, 1999.
- BRUST, E. S. et al. Absence of mutations in PAX8, NKX2.5, and TSH receptor genes in patients with thyroid dysgenesis. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabolismo**, v. 56, n. 3, p. 173-1777, 2012.
- CAMILOT, M. et al. Thyrotropin receptor gene mutations and TSH resistance : variable expressivity in the heterozygotes. **Clinical Endocrinology**, v. 63, p. 146–151, 2005.
- CANGUL, H. et al. Thyroid dysmorphogenesis is mainly caused by TPO mutations in consanguineous community. **Clinical Endocrinology**, v. 79, p. 275–281, 2013.
- CARRE, A. et al. Hes1 is required for appropriate morphogenesis and differentiation during mouse thyroid gland development. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.
- CARRÉ, A. et al. Five new TTF1/NKX2.1 mutations in brain-lung-thyroid syndrome: rescue by PAX8 synergism in one case. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 12, p. 2266–76, 15 jun. 2009.
- CASSIO, A. et al. Thyrotropin Receptor Gene : When to Investigate, Clinical Effects , and Treatment. **Journal of Clinical Research Pediatric Endocrinology**, v. 5, Suppl 1, p. 29-39, 2013.
- CASTANET, M. et al. Nineteen years of national screening for congenital hypothyroidism: familial cases with thyroid dysgenesis suggest the involvement of genetic factors. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 5, p. 2009–2014, 1 maio 2001.



CASTANET, M. et al. Nineteen Years of National Screening for Congenital Hypothyroidism : Familial Cases with Thyroid Dysgenesis. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 86, n. 5, p. 2009–2014, 2009.

CASTANET, M. et al. Epidemiology of thyroid dysgenesis: The familial component. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 73, n. 4, p. 231–237, jan. 2010.

CASTANET, M. et al. Natural History and Management of Congenital Hypothyroidism with in situ Thyroid Gland. **Hormone Research in Paediatrics**, p. 102–110, 2015.

CERQUEIRA, T. L. O. et al. Functional characterization of the novel sequence variant p.S304R in the hinge region of TSHR in a congenital hypothyroidism patients and analogy with other formerly known mutations of this gene portion. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, 28(7-8):777-84, 2014.

CERQUEIRA, T. L. O. et al. The c.63A>G polymorphism in the NKX2.5 gene is associated with thyroid hypoplasia in children with thyroid dysgenesis. **Archives Endocrinology Metabolism**, v. 59, n. 6, p. 562-567, 2015.

CHIESA, A.; MENDEZ, V. Prevalence and Etiology of Congenital Hypothyroidism Detected through an Argentine Neonatal Screening Program ( 1997 – 2010 ). **Hormone Research Paediatrics**, v. 80, p. 185–192, 2013.

CORBETTA, C. et al. A 7-year experience with low blood TSH cutoff levels for neonatal screening reveals an unsuspected frequency of congenital hypothyroidism (CH). **Clinical Endocrinology**, v. 71, n. 5, p. 739–745, 2009.

DE FELICE, M.; DI LAURO, R. Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 5, p. 722–746, out. 2004.

DE FELICE, M.; DI LAURO, R. Minireview: Intrinsic and extrinsic factors in thyroid gland development: an update. **Endocrinology**, v. 152, n. 8, p. 2948–2956, ago. 2011.

DE SILVA, A. et al. The role of scintigraphy and ultrasound in the imaging of neonatal hypothyroidism: 5-year retrospective review of single-centre experience. **Journal of Medical Imaging and Radiation Oncology**, v. 58, 2014.

DENTICE, M. et al. Missense mutation in the transcription factor NKX2-5: a novel molecular event in the pathogenesis of thyroid dysgenesis. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 4, p. 1428–1433, abr. 2006.

DEVOS, H. et al. A search for the possible molecular mechanisms of thyroid dysgenesis: sex ratios and associated malformations. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, n. 7, p. 2502–2506, jul. 1999.

RAMOS, H.E. **Disgenesias tiroidianas : estudo clínico e pesquisa molecular dos genes candidatos pax8 , receptor de tsh**. Tese (Doutorado). 2007.

ESPERANTE, S. A et al. Identification and characterization of four PAX8 rare sequence variants (p.T225M, p.L233L, p.G336S and p.A439A) in patients with congenital hypothyroidism and dysgenetic thyroid glands. **Clinical Endocrinology**, v. 68, n. 5, p. 828–835, maio 2008.

FAGMAN, H. et al. Expression of Classical Cadherins in Thyroid Development : Maintenance of an Epithelial Phenotype throughout Organogenesis. **Endocrinology**, v. 144, p. 3618–3624, nov. 2003.

- FAGMAN, H. et al. Genetic Deletion of Sonic Hedgehog Causes Hemiagenesis and Ectopic Development of the Thyroid in Mouse. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1865–1872, 2004.
- FAGMAN, H.; ANDERSSON, L.; NILSSON, M. The developing mouse thyroid : embryonic vessel contacts and parenchymal growth pattern during specification , budding , migration , and lobulation. **Developmental Dynamics**, v. 235, p. 444–455, 2006.
- FAGMAN, H.; NILSSON, M. Morphogenesis of the thyroid gland. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 323, n. 1, p. 35–54, 8 jul. 2010a.
- FAGMAN, H.; NILSSON, M. Morphogenetics of early thyroid development. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 46, n. 1, p. R33–R42, 15 dez. 2010b.
- FERRETTI, E. et al. Notch signaling is involved in expression of thyrocyte differentiation markers and is down-regulated in thyroid tumors. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 10, p. 4080–4087, 2008.
- FLAMANT, F.; KOIBUCHI, N.; BERNAL, J. Editorial: “Thyroid hormone in brain and brain cells”. **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, en20132058, July, 2015.
- GRÜTERS, A.; BIEBERMANN, H.; KRUDE, H. Neonatal Thyroid Disorders. **Hormone Research**, v. 59, n. Suppl. 1, p. 24–29, 2003.
- GRÜTERS, A.; KRUDE, H.; BIEBERMANN, H. Molecular genetic defects in congenital hypothyroidism. **European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 151 Suppl , p. U39–44, nov. 2004.
- GUILLOT, L. et al. NKX2-1 mutations leading to surfactant protein promoter dysregulation cause interstitial lung disease in “Brain-Lung-Thyroid Syndrome”. **Human Mutation**, v. 31, n. 2, p. E1146–62, fev. 2010.
- HERMANNNS, P. et al. Mutations in the NKX2.5 gene and the PAX8 promoter in a girl with thyroid dysgenesis. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 6, p. E977–981, jun. 2011.
- JACOB, H.; PETERS, C. Screening, diagnosis and management of congenital hypothyroidism: European Society for Paediatric Endocrinology Consensus Guideline. **Archives of Disease in Childhood. Education and practice edition**, v. 100, n. 5, p. 260–263, 2015.
- KNOBEL, M.; NOGUEIRA, C. R.; MEDEIROS-NETO, G. Genética Molecular do Hipotireoidismo Congênito. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, 2001.
- KOPP, P. et al. Phenocopies for Deafness and Goiter Development in a Large Inbred Brazilian Kindred with Pendred ’ s Syndrome Associated with a Novel Mutation in the. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 1, p. 336–341, 1999.
- KOPP, P. Perspective: genetic defects in the etiology of congenital hypothyroidism. **Endocrinology**, v. 143, n. 6, p. 2019–2024, jun. 2002.
- KRUDE, H. et al. Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human NKX2-1 haploinsufficiency. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 4, p. 475–480, 2002.
- KUMAR, J. et al. Increased prevalence of renal and urinary tract anomalies in children with congenital hypothyroidism. **Journal of Pediatrics**, v. 154, n. 2, p. 263–266, 2009.

- LAFRANCHI, S. Congenital hypothyroidism: etiologies, diagnosis, and management. **Thyroid**, v. 9, n. 7, p. 735–740, jul. 1999a.
- LAFRANCHI, S. H. Congenital hypothyroidism-etiological, diagnosis and management. **Thyroid**, v. 9, p.735-740. 1999b.
- LAFRANCHI, S. H. Newborn screening strategies for congenital hypothyroidism: an update. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 33, p. 1–9, 2010.
- LAFRANCHI, S. H. Increasing incidence of congenital hypothyroidism: some answers, more questions. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 8, p. 2395–2397, 2011.
- LÉGER, J. et al. Thyroid developmental anomalies in first degree relatives of children with congenital hypothyroidism. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 2, p. 575–580, 2002.
- LÉGER, J. et al. European society for paediatric endocrinology consensus guidelines on screening, diagnosis, and management of congenital hypothyroidism. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 81, p. 80–103, 2014a.
- LÉGER, J. et al. European society for paediatric endocrinology consensus guidelines on screening, diagnosis, and management of congenital hypothyroidism. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 81, n. 2, p. 80–103, 2014b.
- LINDSAY, R. S.; TOFT, A. D. Hypothyroidism. **Lancet**, v. 349, n. 9049, p. 413–417, 8 fev. 1997.
- MACCHIA, P. E. et al. PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. **Nature Genetics**, v. 18, p.83-86, 1998.
- MACIEL, L. M. Z. ET AL. Hipotireoidismo congênito: recomendações do Departamento de Tireoide da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, p. 166–183, 2013.
- MEEUS, L. et al. Characterization of a novel loss of function mutation of pax8 in a familial case of congenital hypothyroidism with in-place , Normal-Sized Thyroid. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 9, p. 4285–4291, 2004.
- MENGRELI, C. et al. Screening for congenital hypothyroidism: The significance of threshold limit in false-negative results. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 9, p. 4283–4290, 2010.
- NARUMI, S. et al. Transcription factor mutations and congenital hypothyroidism: systematic genetic screening of a population-based cohort of Japanese patients. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 4, p. 1981–1985, abr. 2010.
- NASCIMENTO, M. L. et al. Avaliação do programa de rastreamento neonatal para hipotireoidismo congênito da Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 1, p. 75–81, 2003.
- NILSSON, M.; FAGMAN, H. Mechanisms of thyroid development and dysgenesis: an analysis based on developmental stages and concurrent embryonic anatomy. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 106, p. 123–170, jan. 2013.
- OLIVIERI, A. et al. A population-based study on the frequency of additional congenital malformations in infants with congenital hypothyroidism: Data from the Italian registry for congenital hypothyroidism (1991-1998). **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 2, p. 557–562, 2002.

- PARK, S. M.; CHATTERJEE, V. K. K. Genetics of congenital hypothyroidism. **Journal of Medical Genetics**, v. 42, n. 5, p. 379–389, maio 2005.
- PARLATO, R. et al. An integrated regulatory network controlling survival and migration in thyroid organogenesis. **Developmental Biology**. v. 276 p. 464–475, 2004.
- PEALL, K. J.; KURIAN, M. A. Benign Hereditary Chorea: An Update. **Tremor and other Hyperkinetic Movements**, v. 5, p. 314, 2015.
- PEARCE, M. S. et al. Increasing Incidence, but Lack of Seasonality, of Elevated TSH Levels, on Newborn Screening, in the North of England. **Journal of Thyroid Research**, v. 2010, p. 101948, 2010.
- PERRY, R. et al. Discordance of monozygotic twins for thyroid dysgenesis: Implications for screening and for molecular pathophysiology. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 9, p. 4072–4077, 2002.
- POLAK, M. et al. Molecular mechanisms of thyroid dysgenesis. **Hormone Research**, v. 62 Suppl 3, p. 14–21, jan. 2004.
- RAMALHO, R. J.; VALIDO, D. P.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Avaliação do Programa de Triagem para o Hipotireoidismo Congênito no Estado de Sergipe. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, p. 1–5, 2000.
- RAMOS, H.E. et al. Extreme phenotypic variability of thyroid dysgenesis in six new cases of congenital hypothyroidism due to PAX8 gene loss-of-function mutations. **European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, p. 1–10, 2014.
- RAMOS, H. E. et al. Clinical and Molecular Analysis of Thyroid Hypoplasia —A population based approach in Southern Brazil. **Thyroid**, v. 18, 2008.
- RAMOS, H. E.; NESI-FRANÇA, S.; MACIEL, R. M. B. Novos aspectos da genética e dos mecanismos moleculares da morfogênese da tiróide para o entendimento da disgenesia tireoidiana. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52 p. 1403-1415, 2008.
- RASTOGI, M. V; LAFRANCHI, S. H. Congenital hypothyroidism. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 5, p. 17, 2010.
- RUCHAŁA, M.; SZCZEPANEK, E.; SOWIŃSKI, J. Diagnostic value of radionuclide scanning and ultrasonography in thyroid developmental anomaly imaging. **Nuclear Medicine Review**, v. 14, p. 21–28, 2011.
- SETIAN, N. Hypothyroidism in children: diagnosis and treatment. **Jornal de Pediatria**, v. 83, p. 209–216, 12 nov. 2007.
- SUNTHORNTHAPVARAKUL, T. et al. Thyrotropin Caused By Mutations in. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 3, p. 155–160, 1995.
- SZINNAI, G. Genetics of normal and abnormal thyroid development in humans. **Best Practice and Research**, v. 28, n. 2, p. 133–150, 2014.
- TRUEBA, S. S. et al. During human development : new insights into human thyroid development and thyroid dysgenesis- associated malformations. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** v. 90, n. 1, p. 455–462, 2005.
- UEDA, D. Normal volume of the thyroid gland in children. **Journal of Clinical Ultrasound**, v. 18, p. 455–462, 1990.
- UYTTENDAELE, M. et al. Congenital Hypothyroidism: Long-Term Experience with Early

and High Levothyroxine Dosage. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 85, n. 3, p. 188–197, 2016.

VAN ENGELEN, K. et al. The ambiguous role of NKX2-5 mutations in thyroid dysgenesis. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e52685, jan. 2012.

VINCENZI, M. et al. Identification of a novel pax8 gene sequence variant in four members of the same family: from congenital hypothyroidism with thyroid hypoplasia to mild subclinical hypothyroidism. **BMC Endocrine Disorders**, v. 14, n. 1, p. 69, 2014.

WEISS, R. E.; WEINBERG, M.; REFETOFF, S. Identical mutations in unrelated families with generalized resistance to thyroid hormone occur in cytosine-guanine-rich areas of the thyroid hormone receptor beta gene. Analysis of 15 families. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 6, p. 2408–2415, jun. 1993.

XU, P. et al. Eya1 is required for the morphogenesis of mammalian thymus , parathyroid and thyroid. **Development**, v. 129, p. 3033–3044, 2002.

ZIMMERMANN, M. B. et al. New reference values for thyroid volume by ultrasound in iodine- sufficient schoolchildren : a World Health Organization / Nutrition for Health and Development Iodine Deficiency Study Group Report. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 79, p. 231-237, 2004.

## APÊNDICE 1

### METODOLOGIA

#### *Desenho de Estudo*

Estudo descritivo de corte transversal, com amostra populacional composta por 353 pacientes com HC diagnosticados e confirmados pela triagem neonatal do Estado da Bahia, realizado pela APAE/Salvador-BA. O tempo de coleta das amostras foi estabelecido durante o período de um ano (2012-2013); a coleta dos dados clínicos e laboratoriais, realizada a partir dos prontuários manuais e eletrônicos dos pacientes, aconteceu entre os anos de 2012 e 2014 utilizando-se protocolo de avaliação (Apêndice 2).

Todos os participantes e/ou responsável assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 3 e 4), estando o projeto aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Edgar Santos – HUPES (parecer N°125/2011) (Anexo 1) e pelo Núcleo de Pesquisa Científica NUPEC - APAE/Salvador-BA (N°22/2011) (Anexo 2). O Anexo 3 trata-se do Termo de Compromisso para o Uso de Prontuário. O presente projeto obteve fomento das instituições: Fapesb (Edital N°12/2012) e CNPq (Edital N° 14/2012).

#### *Caracterização Clínica*

Para composição da amostra populacional, foi adquirida previamente, uma lista contendo os nomes dos pacientes nascidos até o ano de 2008. Foram incluídos no estudo indivíduos de ambos os sexos, nascidos até o ano de 2008, com diagnóstico confirmado de HC, através do teste de privação. A confirmação do diagnóstico da doença só acontece quando a criança atinge os três anos de idade, a partir da observação dos níveis de TSH, após suspensão por 4 semanas do tratamento com L-T<sub>4</sub>. Cabe ressaltar que alguns pacientes não necessitaram do teste de privação pois já apresentavam concentrações de TSH muito elevados devido a ausência da glândula tireoide, subtratamento ou má aderência a reposição hormonal. Na APAE/Salvador, investigação etiológica do HC com ultrasonografia, cintilografia e teste do perclorato, não é realizada de rotina. Durante o atendimento de rotina, após leitura do TCLE, os pacientes elegíveis foram convidados a participar do estudo, quando os pais e/ou responsáveis aceitavam, além de assinarem o TCLE, foram coletados 5ml de sangue para extração de DNA e dosagem de tireoglobulina (TG).

Coleta de dados: foram coletados os seguintes dados a partir dos prontuários médicos:

a) peso/talhe; b) sinais e sintomas neonatais de hipotireoidismo e cardiopatias; c) valores de

TSH e  $T_4/T_4l$  no rastreio neonatal; d) valores confirmatórios de TSH e  $T_4/T_4l$ ; e) valores de tireoglobulina e anticorpos (anti-peroxidase, anti-tireoglobulina e anti-receptor do TSH) quando disponíveis; f) idade de início do tratamento com L- $T_4$  e dose inicial; g) evolução clínica, aderência ao tratamento; h) presença de outras malformações ou dismorfias; i) resultados de exames cardiovasculares (ECG e Ecocardiograma) prévios; j) características sócio-econômicas; k) presença de doenças tireoidianas e cardiovasculares nos familiares. Os pacientes com HC também foram classificados em relação à gravidade da doença ( $T_4$  inicial  $>$  ou  $<$  que 2,5  $\mu\text{g/dL}$ ).

Os dados clínicos coletados foram inseridos no banco de dados criado no Microsoft Office Access 2007 e em planilha Excel.

Dosagens laboratoriais: Os valores das dosagens do TSH e  $T_4$  da triagem neonatal, foram obtidos retrospectivamente através de dados do prontuário. As dosagens para TSH e  $T_4$  foram realizadas a partir de sangue coletado em papel filtro pelo método de imunofluorimetria, utilizando o kit NeoMAP@ TSH- $T_4$ , equipamentos: AutoDELFLIA PERKINELMER® e LUMINEX100®, respectivamente, seguindo o protocolo da triagem neonatal do SRTN– APAE/Salvador -BA. Os valores de referência para o TSH:  $\leq$  9,0  $\mu\text{g/dL}$  em neonatos.

Durante as consultas de rotina os pacientes têm o sangue coletado para dosagem hormonal de **TSH** (valor de referência: 0-12m = 1,36 a 8,8; 1a 6anos=0,85 - 6,5; 7 a 12a: 0,28 - 4,3uIU/ ML),  **$T_4$ total** (valor de referência: 4,6- 12,0 mcg/dl) e  **$T_4$ livre** (valor de referência: 0-12m = 1,1 a 2,0; 1a 6anos=0,9- 1,7 ; 7 a 12a: 1,1 a 1,7 ng/dl), através do soro plasmático, sendo possível a dosagem de Tireoglobulina - **Tg** (valor de referência: 2,0 a 60,0 ng/mL) pelo método de eletroquimioluminescência, de acordo com o método do SRTN-APAE/Salvador-BA, para os pacientes participantes do estudo, uma vez que o exame não é realizado rotineiramente na instituição.

Ultrassonografia da tireoide: Avaliação ultrassonográfica da tireoide foi efetuada e interpretada pelo mesmo profissional radiologista qualificado, através de transdutor eletrônico de matriz linear 9-12Mhz em aparelho GE - P5 (General Eletrics) ou 7-10Mhz em aparelho Mindray portátil DP-4900 (Mindray), tanto em modo B dinâmico quanto por Power Doppler colorido e pulsado. O paciente permaneceu na posição de supino, com o pescoço estendido e em leve hiperlordose, para exposição da região cervical anterior. Foram registrados: diâmetros

longitudinal, transverso e ântero-posterior (em milímetros). O volume glandular será determinado utilizando-se da fórmula para estruturas elipsóides, onde se calcula o produto dos três eixos multiplicado por  $\pi$  (pi), dividido por seis. O volume total da glândula será obtido com a soma dos lobos (O volume será calculado a partir da fórmula: eixo longitudinal x eixo anteroposterior x 0,52 de cada um dos lobos) e comparada com valores de referência para a idade (UEDA, 1990; ZIMMERMANN et al., 2004). Para avaliação mais exata do volume glandular, consideramos que os valores normais das dimensões da glândula tireoide variam relativamente de acordo com as regiões analisadas, mas principalmente com a idade, peso e superfície corporal do paciente, sobretudo na faixa pediátrica. No nosso estudo, a superfície corporal dos indivíduos analisados será calculada por meio da fórmula:  $SC(m^2) = peso(kg)^{0,425} \times altura(cm)^{0,725} \times 71,84 \times 10^{-4}$  e os valores de referência utilizados na população pediátrica serão aqueles publicados em estudos brasileiros. Caso a tireoide não fosse visualizada em sua posição ortotópica, era efetuada busca sistematizada por tecido ectópico, examinando-se todo trajeto de migração da tireoide, desde a base da língua à cartilagem tireoide. Foi avaliada a ecogenicidade da tireoide, quantificada por análise visual de escala de cinza, classificando-a em normal, leve, moderada ou acentuadamente hipoecoica e hiperecoica, comparando-se o parênquima tireoidiano com a glândula submandibular e os músculos cervicais adjacentes. A ecotextura foi classificada como: normal, heterogênea e anormal (quando evidenciado nódulos e cistos). Adicionalmente, foram descritos eventuais achados ultrassonográficos, exemplificando: a) anormalidade de posicionamento glandular; b) hemigenesia; d) presença de lobo piramidal; d) alteração de volume glandular (hipoplasia ou bócio); e) presença de lesões nodulares ou cistos rudimentares; g) persistência do ducto tireoglosso.

Cintilografia da tireoide: Cintilografia com pertecnetato-Tc99m foi realizada nos pacientes confirmados para HC e com diagnóstico de agenesia tireoidiana na ultrassonografia. Pacientes realizaram dieta restrita em iodo 15 dias antes do exame e suspenderam a levotiroxina com 30 dias de antecedência. Estes pacientes foram classificados como: a) captação normal em área ortotópica; b) captação reduzida em área ortotópica; c) captação em região ectópica; d) ausência de captação. Caracterização final dos subtipos de DT foi realizada individualmente para cada paciente, com base na avaliação retrospectiva dos dados laboratoriais e radiológicos, e consenso entre o radiologista e endocrinologista envolvidos no estudo.

Eletrocardiograma e Ecocardiograma: Pacientes com HC confirmados e relatos anteriores de alteração cardíaca realizaram eletrocardiograma cuja análise foi efetuada por dois



pesquisadores baseando-se na Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Análise e Emissão de Laudos Eletrocardiográficos (2009) com laudo descritivo: Análise do ritmo e quantificação da FC, análise da duração, amplitude e morfologia da onda P e duração do intervalo PR, determinação do eixo elétrico de P e QRS, análise da duração, amplitude e morfologia do QRS, análise da repolarização ventricular, descrições das alterações do ST-T, QT e U quando presentes, além de laudo conclusivo com a síntese dos diagnósticos listados. Ecocardiograma com doppler e mapeamento de fluxo em cores foram realizados nos pacientes incluídos no estudo, por dois ecocardiografistas experientes em patologia cardíaca congênita. Foi descrito anatomia, função ventricular (pelos métodos de Teicholz e/ou Simpson) e estimativa de pressão pulmonar utilizando parâmetros hemodinâmicos como: Tempo de aceleração do fluxo pulmonar (TAC); Tempo de ejeção da curva do fluxo pulmonar (TEJ); Velocidade do fluxo pulmonar e aórtico; Integral de tempo/velocidade (VTI) aórtica e pulmonar; Pressão média (PMAP) e pressão diastólica da artéria pulmonar (PDAP) além da estimativa das relações de fluxo pulmonar e sistêmico (QP/QS).

Ultrassonografia renal: além da ultrassonografia da tireoide, foi realizada usg renal dos pacientes. O paciente é deitado em decúbito lateral, em mesa de exame sendo aplicado um gel na região lombar para que possa facilitar a condução do ultrassom, utilizando-se o aparelho Mindray portátil DP-4900 (Mindray). Como este procedimento será apenas para observar a presença/ausência de ambos os rins, e não para avaliar estrutura renal, não é necessário que os pacientes ingiram água.

### *Rastreio Molecular*

#### Extração do DNA

Para a realização do estudo molecular foi coletado de cada indivíduo 5ml de sangue venoso, em tubo Vacutainer® contendo anticoagulante EDTA. A extração do DNA de células mononucleares foi realizada através de Kit específico (*Axygen Biotechnology®*, *Biosciences, China*). Posteriormente, o DNA foi armazenado a - 20°C e estocado no Laboratório de Estudo da Tireoide do Instituto de Ciências da Saúde na Universidade Federal da Bahia – ICS/UFBA.

#### Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A investigação molecular, em fase de padronização, será realizada através das técnicas de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Os genes que serão estudados estão implicados na ontogênese tireoidiana: *NKX2-1*; *PAX8*; *FOXE1*; *NKX2.5*; *TSH-R* e *HES1*. Os

*primers* utilizados para cada gene estão descritos no Quadro 1, e, as condições utilizadas para padronização da PCR foram: tampão de reação 10X (10mM tris-HCl pH 8,5, 50mM KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub> 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. O último ciclo seguiu-se de uma extensão final de 5 minutos a 72°C e resfriamento a 4°C.

Quadro 1: *Primers* utilizados para amplificação dos genes *PAX8*, *NKX2.5*, *TSH-R* e *HES1*, temperatura de anelamento e tamanho do fragmento correspondente.

Gene	<i>Primer</i>	T.A. (°C)	T.F.(pb)
PAX8PF	5'-GTGACAATTTTGTAGCCTG-3'	54	581
PAX8PR	5'-CGGTTTTATCCCGCTGAGG-3'		
PAX81F	5'-CTGAGTCCACTCAGCCATGTC-3'	56	468
PAX81R	5'-CAACCTCAGCCTAGCCTA-3'		
PAX83F	5'-CATAGCTAATCCCCACCCAAA-3'	54	314
PAX83R	5'-GCCTGCGGTGAATTTTCGT-3'		
PAX84F	5'-ATTGGGTAAATCTTTGGGATT-3'	53	242
PAX84R	5'-CCAGGCCTTTCTTGTCTCTT-3'		
PAX85F	5'-AGGGGTGTCAAAAAGGCGACTG-3'	62	255
PAX85R	5'-TGGGTATGCTGAAGGGGAGGTG-3'		
PAX86F	5'-TCTCCCTCTCCCCACTG-3'	57	305
PAX86R	5'-GCAGAGCCCCTACAAAGTCC-3'		
PAX87F	5'-GAGCATGAATAGTAGGTCCC-3'	54	232
PAX87R	5'-CACAGGCTCATTGGAGAAT-3'		
PAX88F	5'-GTCTCTGTGCGCTGACTTCT-3'	54	290
PAX88R	5'-CACACCTTCCGCCTGAC-3'		
PAX89F	5'-CCTCCCCGCCATCTCACACC-3'	60	300
PAX89R	5'-TCCCACCCGCCGCATAG-3'		
PAX810F	5'-GCCCCCATGGTCCAACACTGAC-3'	61	225
PAX810R	5'-TGCCTCTTGCTCCTTGTGTCCCAC-3'		
PAX811F	5'-TGCATTGATGCCCTTCACCTCA-3'	61	219
PAX811R	5'-AGGTAACCTTTGACCCACCCTT-3'		
PAX812F	5'-AAAGGTCAGCAGATGCAGGGAA-3'	62	286
PAX812R	5'-CGCAATGCTGGACTTTGTGGTTA-3'		
NKX2.51AF	5'-CGGCACCATGCAGGGAAG-3'	57	304
NKX2.51AR	5'-GGGTCCTTGGCTGGGTCGG-3'		
NKX2.51BF	5'-CCTAAACCTGGAACAGCAGC-3'	57	350
NKX2.51BR	5'-TCCTGGCCCTGAGTTTCTTG-3'		
NKX2.52AF	5'-GCGCTCCGTAGGTCAAGC-3'	54	469
NKX2.52AR	5'-TAGGGATTGAGGCCACG-3'		
NKX2.52BF	5'-CAGACTCTGGAGCTGGTGG-3'	51	440
NKX2.52BR	5'-CCCGAGAGTCAGGGA-3'		
TSH-R1F	5'-GAGGATGGAGAAATAGCCCCGAG-3'	54	302
TSH-R1R	5'-CACTACTTCGGGCTGTTATTGAG-3'		
TSH-R2F	5'-CAGCCAACATATTGTGAAAAGT-3'	52	297
TSH-R2R	5'-CTGCCATTGATTTATGCAAGT-3'		
TSH-R3F	5'-GGGAAGCGCATAACAAAAG-3'	57	242

TSH-R3R	5'-TGGAGCCCCAAGATTATGAG-3'		
TSH-R4F	5'-ACCTGTGGCGTAAATGCATAT-3'		
TSH-R4R	5'-CCCGACCCAGGCTATACACCATT-3'	54	329
TSH-R5F	5'-GGAAGGTGTTGGGAGTTTGA-3'		
TSH-R5R	5'-CAAACAAAATATTGTCAAACATGG-3'	56	250
TSH-R6F	5'-TATTGTGTCCTGTTATTTAAGTGCATA-3'		
TSH-R6R	5'-GTACTCTATAGAGTATATATGATAAGG-3'	54	293
TSH-R7F	5'-GGGATACATATGTGGGAGCTG-3'		
TSH-R7R	5'-CCCTTGACTTACACAGCATCC-3'	56	204
TSH-R8F	5'-TGGTCACATTTTATTCTGATATTTGT-3'		
TSH-R8R	5'-ATATTCTTTTGTATGTCTTACTC-3'	54	198
TSH-R9F	5'-CCATCCCTCTTAGACCAGA-3'		
TSH-R9R	5'-TCCACCAAGGTCTTTTGTCA-3'	57	394
TSH-R10AF	5'-TGGCACTGACTCTTTTCTGT-3'		
TSH-R10AR	5'-GTCCATGGGCAGGCAGATAC-3'	66	868
TSH-R10BF	5'-ACTGTCTTTGCAAGCGAGTT-3'		
TSH-R10BR	5'-GTGTCATGGGATTGGAATGC-3'	64	876
HES1.1F	5'-CGCGTGCAGTCCCAGATA-3'		
HES1.1R	5'-TTAATTTTGGAGGGGCTGCAAAG-3'	66	434
HES1.2F	5'-TTTGCAGCCCCTCAAATTA-3'		
HES1.2R	5'-AGTAGCTGAGAAAGTGTTTGTT-3'	51	269
HES1.3F	5'-GCACTCTGAAGCAGCTGACA-3'		
HES1.3R	5'-CTGAATGCCTCTCACAACCAC-3'	58	239
HES1.4AF	5'-TCGGTGACCCGTCTGTCTC-3'		
HES1.4AR	5'-GCTGGTGTAGACGGGGATGA-3'	58	248
HES1.4BF	5'-GGCCAGTTTGCTTTCCTCAT-3'		
HES1.4BR	5'-GGAAGAATCAGTTCGAAGACATA-3'	57	565

**T.A.:** Temperatura de Anelamento. **T.F.:** Tamanho do Fragmento em pares de base.

### Sequenciamento direto

Realizado através de Sequenciador Automático ABI3100 utilizando o kit *BigDye<sup>TM</sup> Terminator Sequencing Standard (Applied Biosystems)*. Os resultados foram analisados por comparação da sequência obtida com a disponível em banco de dados para cada gene especificamente ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)) utilizando-se o programa BioEdit Sequence Alignment Editor, Versão 7.2.5.0.

## APÊNDICE 2

### PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO

#### Identificação:

Nome: \_\_\_\_\_

RG-HC: \_\_\_\_\_ Sexo:  Masc.  Fem.

Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Etnia:  Caucasiano  Negro  Oriental  Outros

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

#### Heredograma:

#### Dados do Diagnóstico:

Data do primeiro atendimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_. Idade no primeiro atendimento: \_\_\_\_\_

Screening: T4 inicial: \_\_\_\_\_

TSH inicial: \_\_\_\_\_

Idade no Screening: \_\_\_\_\_

Dosagens confirmatórias: \_\_\_\_\_

T4 Inicial:  > 2,5 ug/dL  < 2,5 ug/dL

TSH Inicial :  < 10 µU/mL  > 10 µU/mL.

Idade de Início do tratamento: \_\_\_\_\_

< 30 dias.  > 30 dias.

#### Antecedentes Maternos:

Pré-Natal:  SIM  NÃO

Doença Gestacional :  SIM  NÃO Qual: \_\_\_\_\_

Drogas na Gestação:  Iodo  Contraste Iodado  Antitireoidiano  Lítio

Outros: \_\_\_\_\_

#### Antecedentes RN:

Idade Gestacional: \_\_\_\_\_ Mais que 42 semanas:  SIM  NÃO

Parto: \_\_\_\_\_

Apgar: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_ Talhe: \_\_\_\_\_ P.Cef. \_\_\_\_\_

Intercorrências: \_\_\_\_\_

Icterícia:  SIM  NÃO Dificuldade de Sucção:  SIM  NÃO

Obstipação:  SIM  NÃO Sono Excessivo:  SIM  NÃO

Dificuldade/ Stress Respiratório:  SIM  NÃO

Fontanela posterior aumentada ( > 1 cm de diâmetro ) :  SIM  NÃO

Mixedema:  SIM  NÃO Pele Seca:  SIM  NÃO

Extremidades Frias:  SIM  NÃO Macroglossia:  SIM  NÃO

Voz /choro rouco:  SIM  NÃO Bradicardia:  SIM  NÃO

Hérnia Umbilical:  SIM  NÃO Bócio:  SIM  NÃO

Fáscies cretinoide:  SIM  NÃO Hipotonia:  SIM  NÃO

Livedo reticularis:  SIM  NÃO Hipoatividade:  SIM  NÃO

Suspeita de Hipotireoidismo:  SIM  NÃO

### **Evolução:**

#### **Clínica ( Algum Dado Positivo de Consultas Subsequentes ):**

---



---



---



---



---

### **Outras Informações Importantes:**

História de Stress Respiratório ao Nascer:  SIM  NÃO

História de Malformação Pulmonar:  SIM  NÃO

História de Malformação Cerebral :  SIM  NÃO

História de Acometimento Neurológico:  SIM  NÃO

Coreoatetose  Hipotonia Muscular  Retardo Mental  Outro

História de Malformação Via Aérea Superior :  SIM  NÃO

Fenda Palatina  Atresia de Coanas  Epiglote Bífida  Outro

História de Malformação de Hipófise :  SIM  NÃO

História de Malformação Renal :  SIM  NÃO

História de Malformação Cardíaca :  SIM  NÃO

CIV  CIA  Estenose Pulmonar  Tetralogia  Outras

Alterações no ECG : \_\_\_\_\_



Idade									
Peso									
AATs/TG									

### CINTILOGRAFIA

**Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Idade:** \_\_\_\_\_

**Laudo:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Captação Positiva :  Tópica  Ectópica

Captação Negativa

### ECOGRAFIA DE TIREOIDE

Não Realizada  Realizada ( Data: \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_ )

**Laudo:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Ausência de Tireoide

Tireoide Normal ou Aumentada de Tamanho ( Posição Tópica )

Tireoide Reduzida de Tamanho - Hipoplasia ( Posição Tópica )

### CLASSIFICAÇÃO CINTILO + ECO

DISGENESIA

Agenesia ( Ausência da Tireoide na ECO e Cintilo )

Ectopia ( Ausência de Tireoide na ECO e Cintilo Positiva Ectópica )

Hemiafgenesia ( Lobo Único na ECO )

Hipoplasia ( Tireoide Reduzida na ECO e Cintilo Positiva Tópica ou Negativa )

Glândula Morfologicamente Normal / Tópica

Captação Normal  Captação Alterada

**IMPRESSÃO DIAGNÓSTICA / Avaliação Molecular :**

Disgenesia

TSH-R ( Resistência ao TSH )

Parcial ( Tireoide Normal ou Aumentada, TSH alto, T3/T4 Normal,  
– Eutireoide Hipertiroxinemia ).

Total ( Tireoide Tópica Hipoplásica, Cintilo pode ser negativa, ECO positiva  
TG variável ou baixa ).





### APÊNDICE 3

#### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos Pais**

**Nome do Projeto: Rastreamento de mutações em genes implicados na ontogênese tireoidiana em coorte de pacientes com hipotireoidismo congênito.**

#### **Pesquisador Responsável:**

**Helton Estrela Ramos:** Coordenador do Projeto – Professor Adjunto do Departamento de Bio-regulação do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Pesquisador colaborador do CPqGM – FIOCRUZ-BA.

**Angelina Xavier Acosta:** Coordenadora do Projeto - Professora Adjunta do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia. Pesquisadora colaboradora do CPqGM - FIOCRUZ-BA

**Em caso de dúvida entrar em Contato:** e-mail: ramoshelton@hotmail.com; e-mail: axacosta@hotmail.com.

**Telefones:** (71) 3283-8868 Ramal: 227

#### **Propósito e Revisão Geral**

Seu filho (a) tem um tipo de doença chamada Hipotireoidismo Congênito, que consiste num defeito de formação ou funcionamento da glândula tireoide, e você está sendo convidado a participar, como voluntário, de um projeto de pesquisa intitulado: Rastreamento de mutações em genes implicados na ontogênese tireoidiana em coorte de pacientes com hipotireoidismo congênito.

Este projeto irá estudar a base molecular desta doença, o hipotireoidismo congênito. Estudo molecular significa procurar esclarecer (entender) a causa genética do hipotireoidismo congênito, ou seja, esclarecer se existe alguma alteração genética que causou a doença. Para isto, será estudado um componente específico, o DNA, que está presente nas células (menor parte do corpo humano, que forma os diversos órgãos, como exemplos de órgãos 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.

O objetivo desta pesquisa é achar a causa genética (mutações, alterações, mudanças no DNA) do hipotireoidismo congênito detectados em crianças que tiveram o Teste do Pezinho positivo para a doença. A intenção é reconhecer e avaliar clinicamente os pacientes com diagnóstico de Hipotireoidismo Congênito que tenham possível alteração genética que causou

a doença. A pesquisa genética dos pais se faz necessária para o entendimento de que se trata de uma característica hereditária (transmitida, passada de pais para filhos).

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.

A sua participação ficará limitada a uma coleta de sangue (5 ml) que será utilizado nos estudos genéticos. Você, ao aceitar participar da pesquisa não precisará fazer nenhuma consulta médica.

Como em qualquer procedimento de coleta de sangue você poderá experimentar alguns desconfortos, principalmente relacionados a agulhada da coleta de sangue: dor local, mancha roxa, sensação de visão turva, queda da pressão e infecção local. Os riscos que envolvem este procedimento são mínimos e serão devidamente acompanhados pela equipe médica. Estes riscos são os citados acima.

Ao participar da pesquisa você está autorizando o armazenamento de sangue e DNA coletados para a constituição de um Biobanco e Biorepositório segundo a Resolução CNS Nº 441/2011, onde entende-se por Biobanco: coleção organizada de material biológico humano e informações associadas, coletado e armazenado para fins de pesquisa, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade e gerenciamento institucional, sem fins comerciais. E Biorepositório: coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais.

Desta forma, sua participação em estudos futuros fica sob seu critério, tendo a possibilidade de optar por: a) necessidade de novo consentimento a cada pesquisa, ou seja, em caso de novo estudo, onde seja necessário a utilização do seu material biológico o pesquisador responsável terá que lhe pedir nova autorização. Em caso de óbito (morte) ou incapacidade você deverá indicar uma ou mais pessoas que possam consentir na utilização ou descarte do seu material biológico, assim como ter acesso aos resultados obtidos e às devidas orientações; ou, b) manifestação de dispensa de novo consentimento a cada pesquisa. O material coletado será processado, analisado e estocado no Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e/ou no Serviço de Genética Médica da Universidade Federal da Bahia situado no Hospital Universitário Edgar Santos (HUPES/UFBA). Em caso de mudança de local você será informado formalmente por meio do Termo de Transferência de Material Biológico (TTMB).

Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os integrantes do estudo terão conhecimento dos dados que forem necessários para realização das atividades pertinentes ao desenvolvimento do presente trabalho. Você terá acesso a todas as informações sobre o projeto e seus dados genéticos assim como, direito de retirar o seu sangue e/ou DNA, do local onde estes se encontram armazenados a qualquer momento.

Todas as despesas necessárias para a realização do estudo (exames, testes, etc...) **não** são da sua responsabilidade.

Os benefícios esperados ao entrar na pesquisa são: o diagnóstico da causa do Hipotireoidismo Congênito pode influenciar na melhoria do tratamento e adequar o manejo dos pacientes, além de fornecer melhor explicação para o entendimento da causa da doença e do andamento do tratamento, inclusive maior ajuste da dose de levotiroxina usada no tratamento do hipotireoidismo. A avaliação genética também pode possibilitar um aconselhamento genético adequado para possíveis futuros filhos. Além disso, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a causa do hipotireoidismo congênito na Bahia, de forma que o conhecimento obtido através desta pesquisa possibilite identificar mutações associadas com o hipotireoidismo congênito na Bahia, com conseqüente estabelecimento de procedimentos que possibilitem a realização da investigação etiológica da doença por instituições de ensino e pesquisa do Estado.

Gostaríamos ainda de esclarecer que você não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar a participação no estudo, ou se aceitar participar, pode retirar o consentimento e material biológico a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção da continuidade do tratamento do seu filho (a), que está assegurado.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada (ou seja, seu nome ou do seu filho (a) não irá ser divulgado), para que a confidencialidade seja mantida. Os dados genéticos e resultados não ficarão acessíveis ou divulgados a terceiros (outras pessoas).

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. \_\_\_\_\_, responsável pelo menor \_\_\_\_\_ 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;
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.

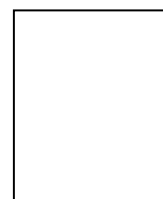
Referente ao Biobanco ou Biorepositório, eu \_\_\_\_\_ R.G. \_\_\_\_\_, opto por:

Necessidade de novo consentimento a cada nova pesquisa (estudo), e indico \_\_\_\_\_ para ser responsável pelas minhas informações em caso de invalidez ou morte;

Dispensar a necessidade de novo consentimento a cada nova pesquisa \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Participante ou Responsável Legal

\_\_\_\_\_  
Pesquisador Responsável



Polegar direito

## APÊNDICE 4

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos Filhos**

**Nome do Projeto: Rastreamento de mutações em genes implicados na ontogênese tireoidiana em coorte de pacientes com hipotireoidismo congênito.**

#### **Pesquisador Responsável:**

**Helton Estrela Ramos:** Coordenador do Projeto – Professor Adjunto do Departamento de Bio-regulação do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Pesquisador colaborador do CPqGM – FIOCRUZ-BA.

**Angelina Xavier Acosta:** Coordenadora do Projeto - Professora Adjunta do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia. Pesquisadora colaboradora do CPqGM - FIOCRUZ-BA

**Em caso de dúvida entrar em Contato:** e-mail: ramoshelton@hotmail.com; e-mail: axacosta@hotmail.com.

**Telefones:** (71) 3283-8868 Ramal: 227

#### **Propósito e Revisão Geral**

Você tem uma doença chamada Hipotireoidismo Congênito, que consiste num defeito de formação ou funcionamento da glândula tireoide, e você está sendo convidado a participar, como voluntário, de um projeto de pesquisa intitulado: Rastreamento de mutações em genes implicados na ontogênese tireoidiana em coorte de pacientes com hipotireoidismo congênito.

Este projeto irá estudar a base molecular desta doença, o hipotireoidismo congênito. Estudo molecular significa procurar esclarecer (entender) a causa genética do hipotireoidismo congênito, ou seja, esclarecer se existe alguma alteração genética que causou a doença. Para isto, será estudado um componente específico, o DNA, que está presente nas células (menor parte do corpo humano, que forma os diversos órgãos, como exemplos de órgãos 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.

O objetivo desta pesquisa é achar a causa genética (mutações, alterações, mudanças no DNA) do hipotireoidismo congênito detectados em crianças que tiveram o Teste do Pezinho positivo para a doença. A intenção é reconhecer e avaliar clinicamente os pacientes com diagnóstico de Hipotireoidismo Congênito que tenham possível alteração genética que causou a doença. A pesquisa genética dos pais se faz necessária para o entendimento de que se trata de uma característica hereditária (transmitida, passada de pais para filhos).

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.

A sua participação ficará limitada uma coleta de sangue (5 ml) que será utilizado nos estudos genéticos. Seu filho(a), ao participar da pesquisa não precisará fazer nenhuma consulta médica.

Como em qualquer procedimento de coleta de sangue seu filho(a) poderá experimentar alguns desconfortos, principalmente relacionados a agulhada da coleta de sangue: dor local, mancha roxa, sensação de visão turva, queda da pressão e infecção local. Os riscos que envolvem este procedimento são mínimos e serão devidamente acompanhados pela equipe médica. Estes riscos são os citados acima.

Ao participar da pesquisa você está autorizando o armazenamento de sangue e DNA coletados do seu filho(a) para a constituição de um Biobanco e Biorepositório segundo a Resolução CNS Nº 441/2011, onde entende-se por Biobanco: coleção organizada de material biológico humano e informações associadas, coletado e armazenado para fins de pesquisa, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade e gerenciamento institucional, sem fins comerciais. E Biorepositório: coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais.

Desta forma, a participação do seu filho(a) em estudos futuros fica sob seu critério a possibilidade de optar por: a) necessidade de novo consentimento a cada pesquisa, ou seja, em caso de novo estudo, onde seja necessário a utilização do seu material biológico o pesquisador responsável terá que lhe pedir nova autorização. Em caso de óbito (morte) ou incapacidade você deverá indicar uma ou mais pessoas que possam consentir na utilização ou descarte do seu material biológico, assim como ter acesso aos resultados obtidos e às devidas orientações; ou, b) manifestação de dispensa de novo consentimento a cada pesquisa. O material coletado será processado, analisado e estocado no Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e/ou no Serviço de Genética Médica da Universidade Federal da Bahia situado no Hospital Universitário Edgar Santos (HUPES/UFBA). Em caso de mudança de local você será informado formalmente por meio do Termo de Transferência de Material Biológico (TTMB).

Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os integrantes do estudo terão conhecimento dos dados que forem necessários para realização das atividades pertinentes ao desenvolvimento do presente trabalho. Você terá acesso a todas as informações sobre o projeto e aos dados genéticos assim como, direito de retirar o sangue e/ou DNA, e do seu filho(a), do local onde estes se encontram armazenados a qualquer momento. Durante o estudo o seu filho (a) ainda poderá ser submetido, quando entre 2 (dois) e 3 (três) anos de idade, Ecografia da tireoide. A Ecografia é um exame de imagem que permite visualizar, localizar e medir o tamanho da glândula. Estes exames são realizados normalmente na rotina de investigação clínica e ajudam a estabelecer o tipo de problema com a glândula (malformação ou mal-funcionamento) sem causar dor ou sofrimento a criança. Todas as despesas necessárias para a realização do estudo (exames, testes, etc...) **não** são da sua responsabilidade.

Os benefícios esperados ao entrar na pesquisa são: o diagnóstico da causa do Hipotireoidismo Congênito pode influenciar na melhoria do tratamento e adequar o manejo dos pacientes, além de fornecer melhor explicação para o entendimento da causa da doença e do andamento do tratamento, inclusive maior ajuste da dose de levotiroxina usada no tratamento do hipotireoidismo. A avaliação genética também pode possibilitar um aconselhamento genético adequado para possíveis futuros filhos. Além disso, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a causa do hipotireoidismo congênito na Bahia, de forma que o conhecimento obtido através desta pesquisa possibilite identificar mutações associadas com o hipotireoidismo congênito na Bahia, com conseqüente estabelecimento de procedimentos que possibilitem a realização da investigação etiológica da doença por instituições de ensino e pesquisa do Estado.

Gostaríamos ainda de esclarecer que você não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar a participação dele (a) no estudo, ou se aceitar que ele (a) participe, pode retirar o consentimento e material biológico a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção da continuidade do tratamento do seu filho (a), que está assegurado.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada (ou seja, seu nome ou do seu filho (a) não irá ser divulgado), para que a confidencialidade seja mantida. Os dados genéticos e resultados não ficarão acessíveis ou divulgados a terceiros (outras pessoas).

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. \_\_\_\_\_, responsável pelo menor \_\_\_\_\_ 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;
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.

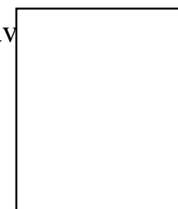
Referente ao Biobanco ou Biorepositório, eu \_\_\_\_\_ R.G. \_\_\_\_\_, opto por:

Necessidade de novo consentimento a cada nova pesquisa (estudo), e indico \_\_\_\_\_ para ser responsável pelas minhas informações em caso de invalidez ou morte;

Dispensar a necessidade de novo consentimento a cada nova pesquisa \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Participante ou Responsável Legal

\_\_\_\_\_  
Pesquisador Responsável



Polegar direito



**ANEXO 1**  
**PARECER HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROFESSOR EDGARD SANTOS -**  
**HUPES**



HOSPITAL SANTA IZABEL  
SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DA BAHIA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
PROF. DR. CELSO FIGUEIRÔA  
HOSPITAL SANTA IZABEL

Salvador, 27 de março de 2012

**PARECER Nº: 47/2011**  
**CAAE: 0033.0.057.000-11**

**1. IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA**

**TÍTULO DA PESQUISA:** *“Pesquisa de Mutações de Genes Implicados na Morfogênese Tireoideana e Cardiovascular: Estudo Clínico e Molecular em Coortes de Pacientes com Disgenesia Tireoidiana e Cardiopatia Congênita”.*

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Dra. Anabel Góes Costa  
**INSTITUIÇÃO:** Hospital Santa Izabel  
**CARGO:** Médica

**2. PARECER DO CEP**

*As respostas referentes as pendências exigidas fornecidas pelo pesquisador responsável pelo protocolo supracitado, foram avaliadas e respondem as dúvidas éticas deste CEP. O Comitê de Ética em Pesquisa Prof. Dr. Celso Figueirôa- Hospital Santa Izabel, acatando o parecer do relator designado para o referido protocolo, em uso de suas atribuições, **aprova** o Projeto de pesquisa supracitado, estando os mesmos de acordo com as Resoluções 196/96 e 251/97.*

Cordialmente,



~~Prof. Dr. Jedson dos Santos Nascimento~~  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa Prof. Dr. Celso Figueirôa  
Hospital Santa Izabel

**ANEXO 2**

**PARECER NÚCLEO DE PESQUISA CIENTÍFICA – NUPEC – APAE/Salvador**

## CARTA DE ANUÊNCIA

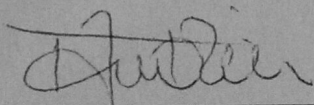
Salvador,

Ao Comitê de Ética em Pesquisa

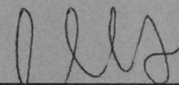
Senhor Coordenador,

Pela presente, informamos que estamos de acordo com a execução do projeto de pesquisa intitulado "**HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO E HIPOPLASIA DA TIREOIDE: *SCREENING* DE MUTAÇÕES EM GENES IMPLICADOS NA ONTOGÊNESE TIREOIDIANA**", sob a responsabilidade dos pesquisadores Taise Lima Oliveira, Helton Estrela Ramos e Angelina Xavier Acosta, a ser realizada no Centro de Diagnóstico e Pesquisa/Serviço de Referência em Triagem Neonatal, sediado na APAE Salvador. Declaramos que a APAE Salvador tem plenas condições para apoiar a realização do procedimento, após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Atenciosamente,



\_\_\_\_\_  
Tatiana Amorim  
Coordenadora do Núcleo de Pesquisa  
Científica  
APAE Salvador



\_\_\_\_\_  
Maria Inês/M. M. Fontes  
Gerente do Centro de Diagnóstico e  
Pesquisa  
APAE Salvador

### ANEXO 3



#### **Termo de Compromisso para Utilização de Dados em Prontuários de Pacientes e Bases de Dados em Projetos de Pesquisa**

##### **Título do Projeto: Rastreamento de mutações em genes implicados na ontogênese tireoidiana em coorte de pacientes com hipotireoidismo congênito.**

Os pesquisadores do presente projeto comprometem-se a manter sigilo dos dados coletados em prontuários e bases de dados, referentes à pacientes atendidos na Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) Salvador e a usar tais informações, única e exclusivamente para fins científicos, preservando, integralmente, o anonimato dos pacientes, cientes:

1. dos itens III.3i e III.3t, das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96, do CNS - Conselho Nacional de Saúde), os quais dizem, respectivamente - "prever procedimentos que assegurem a confidencialidade e a privacidade, a proteção da imagem, a não estigmatização, garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, inclusive em termos de auto-estima, de prestígio e/ou econômico-financeiro", e - "utilizar o material biológico e os dados obtidos na pesquisa exclusivamente para a finalidade prevista no seu protocolo", bem como
2. da Diretriz 12, das Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Seres Humanos - (CIOMS/93), que afirma - "O pesquisador deve estabelecer salvaguardas seguras para a confidencialidade dos dados de pesquisa. Os indivíduos participantes devem ser informados dos limites da habilidade do pesquisador em salvaguardar aconfidencialidade e das possíveis conseqüências da quebra de confidencialidade",

Salvador / 01 de Setembro de 2011

**Local/data**

**Autores do Projeto**

<b>Nome</b>	<b>Assinatura</b>
Angelina Xavier Acosta	
Helton Ramos Estrela	
Taíse Lima de Oliveira Cerqueira	