



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA**

RAISSA COELHO ANDRADE

**INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS D36H, P52T E N187N NOS
ÉXONS 1 E 7 DO GENE *TSHR* EM PACIENTES COM
HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO NO ESTADO DO PARÁ.**

**Belém - Pará
2009**

RAISSA COELHO ANDRADE

**INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS D36H, P52T E N187N NOS
ÉXONS 1 E 7 DO GENE *TSHR* EM PACIENTES COM
HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO NO ESTADO DO PARÁ.**

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado junto ao
curso de Biomedicina da
Universidade Federal do Pará,
como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel.

Orientador: Prof. Dr. LUIZ CARLOS SANTANA DA SILVA

Co-orientador: Prof. Msc. ERIK ARTUR CORTINHAS ALVES

**Belém - Pará
2009**

RAISSA COELHO ANDRADE

**INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS D36H, P52T E N187N NOS
ÉXONS 1 E 7 DO GENE TSHR EM PACIENTES COM
HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO NO ESTADO DO PARÁ.**

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado junto ao
curso de Biomedicina da
Universidade Federal do
Pará, como requisito parcial
à obtenção do título de
Bacharel.

Belém (PA), _____ de _____ de 2009

Banca Avaliadora:

Profa. Dra. Rita de Cássia Mousinho
Instituto de Ciências Biológicas

Profa. Dra. Gilmara Nazareth Tavares Bastos
Instituto de Ciências Biológicas

Prof. Dr Sidney Emanuel Batista dos Santos - Suplente
Instituto de Ciências Biológicas

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelos valores ensinados, apoio e dedicação em todos os momentos;

Ao Professor Dr. Luiz Carlos Santana da Silva, por me acolher no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, pela orientação e amizade;

Ao Professor MsC. Erik Artur Cortinhas Alves, pela interminável paciência, pelos ensinamentos, conselhos, e acima de tudo, pela amizade;

Aos amigos do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, em especial: Clebson Pantoja, Cléber Cruz, Carlos Eduardo Amaral, pelas brincadeiras e pelo apoio na realização deste trabalho;

A todos os amigos de classe, com quem dividi momentos únicos ao longo desta caminhada, em especial: Alessandra Gorayeb, André Ricardo, Livia do Vale, Marcus Oliveira, Nathalia Lima, Nilton Barreto, Patrick Lopes e Priscila Santana.

Aos demais amigos, testemunhas da minha vida, sempre tão presentes e tão importantes.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE GRÁFICOS, FIGURAS E TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A TIREÓIDE	1
Anatomia e Histologia da Glândula Tireóide	1
Embriologia da Tireóide	2
Síntese e Secreção dos Hormônios Tireoidianos	3
Função dos Hormônios da Tireóide	5
Regulação da Glândula Tireóide	5
1.2. HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO	6
Etiologia	6
Diagnóstico e Tratamento	8
Aspectos Clínicos	9
1.3. Receptor do Hormônio Estimulante da Tireóide	9
Aspectos Bioquímicos e Moleculares do TSHR	9
O <i>TSHR</i> e o Hipotireoidismo Congênito	10
Polimorfismos dos Éxons 1 e 7	11
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVOS	14
Objetivo Geral	14
Objetivos Específicos	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15

4.1. MATERIAIS	15
a) Caracterização da Amostra	15
b) Aspectos Éticos	15
4.2. MÉTODOS	16
a) Critérios Clínicos e Bioquímicos de Inclusão	16
b) Coleta e Armazenamento das Amostras	16
c) Extração de DNA	16
d) Amplificação dos Éxons 1 e 7 do Gene <i>TSHR</i> por Reação em Cadeia da Polimerase	18
e) Identificação de Alterações	20
f) Análise Estatística	20
5. RESULTADOS	22
5.1. Análise Molecular dos Éxons 1 e 7 do Gene <i>TSHR</i>	22
a) Éxon 1: Polimorfismo c.154 C>A (P52T)	22
b) Éxon 7: Polimorfismo c.561 T>C (N187N)	23
5.2. Descrição Clínica e Bioquímica dos Pacientes com Alterações Nucleotídicas	24
6. DISCUSSÃO	26
6.1. Análise Molecular	26
6.2. Análise Clínica e Bioquímica	30
7. CONCLUSÕES	31
8. REFERÊNCIAS	32
ANEXOS	39
Anexo I	39
Anexo II	40

LISTA DE ABREVIATURAS

DG: Doença de Graves

DIT: Diiodotirosina

HC: Hipotireoidismo Congênito

MIT: Monoiodotirosina

NIS: Co-Transportador Na^+/I^-

T_3 : Triiodotironina

T_4 : Tiroxina

TG: Tireoglobulina

TPO: Tireoperoxidase

TSH: Hormônio Estimulante da Tireóide

TSHR: Receptor de Hormônio Estimulante da Tireóide

TTF-1: Fator de Transcrição da Tireóide 1

TTF-2: Fator de Transcrição da Tireóide 2

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELA.

FIGURAS

Figura 01 – Localização da Glândula Tireóide	pág.: 2
Figura 02 – Folículo Tireoidiano	pág.: 2
Figura 03 – Síntese e Liberação dos Hormônios no Tireócito	pág.: 4
Figura 04 – Regulação da Tireóide pelo Eixo Hipotálamo-Hipofisário	pág.: 6
Figura 05 – Estrutura do Receptor de Tireotrofina	pág.: 10
Figura 06 – Polimorfismo c. 154 C>A (P52T)	pág.: 14
Figura 07 – Polimorfismo c. 561 T>C (N187N)	pág.: 14

QUADROS

Quadro 01 – Sequências dos Éxons 1 e 7 do gene TSHR	pág.: 18
Quadro 02 – Iniciadores para amplificação dos Éxon 1 e 7 do gene TSHR	pág.: 19
Quadro 03 – Condições de amplificação do Éxon 1 do gene TSHR	pág.: 19
Quadro 04 – Condições de amplificação do Éxon 7 do gene TSHR	pág.: 20

TABELA

Tabela 01 – Polimorfismos e Principais Achados Clínicos dos Pacientes com Alterações Nucleotídicas	pág.: 25
--	----------

Resumo

O hipotireoidismo congênito (HC) é o distúrbio endócrino mais freqüente em neonatos (1:4000 nascimentos). Trata-se de uma doença metabólica grave, que corresponde à causa mais comum de deficiência mental prevenível. Em áreas iodo suficientes, a maior parte dos casos é permanente, causada por fatores genéticos. O gene do receptor de TSH (*TSHR*) é um importante alvo de mutações relacionadas ao HC. Diversos polimorfismos já foram descritos neste gene, e pouco se sabe sobre sua influência nas disfunções tireoidianas. Neste trabalho, realizou-se a análise molecular dos éxons 1 e 7 do gene *TSHR*, investigando a presença dos polimorfismos c. 106 G>C (D36H), c.154 C>A (P52T) e c. 561 T>C (N187N), em 105 pacientes com HC no estado do Pará, tratados na Unidade de Referência Especializada Materno-Infantil e Adolescente (UREMIA). O polimorfismo D36H não foi encontrado no grupo analisado. O P52T foi encontrado em heterozigose (freqüência genotípica: 3,8%), com freqüência alélica de 1,9%. O N187N foi encontrado em heterozigose (freqüência genotípica: 31%) e em homozigose (freqüência genotípica: 5%), com freqüência alélica de 20,5%. A população estudada encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$). Nenhuma alteração adicional foi encontrada nos éxons investigados. Os indivíduos que apresentaram as alterações exibiam os mesmos sinais clínicos e bioquímicos clássicos de pacientes com HC descritos na literatura. Os trabalhos realizados até o momento não apontam uma conclusão definitiva acerca da relação entre os polimorfismos investigados e as disfunções tireoidianas, o que torna importante a realização de estudos adicionais, contribuindo com a elucidação da base molecular das doenças da tireóide.

Abstract

Congenital hypothyroidism (CH) is the most frequent endocrine disorder in newborns (1:4000 births). CH is a serious metabolic disorder, which is the most common cause of preventable mental retardation. In iodine sufficient areas, the majority of cases are permanent, caused by genetic factors. The TSH receptor gene (*TSHR*) is a major target for mutations related to HC. Several polymorphisms have been described in this gene, and little is known about their influence over thyroid dysfunctions. In this work, molecular analysis of exons 1 and 7 of the *TSHR* gene was carried out, for the investigation of the polymorphisms c. 106 G>C (D36H), c.154 C>A (P52T) and c. 561 T>C (N187N) in 105 patients with CH in the state of Pará, treated at the Unidade de Referência Materno-Infantil e Adolescente (UREMIA). The D36H polymorphism was not found in the investigated group. The P52T was found in heterozygous form (genotype frequency: 3.8%), with allele frequency of 1.9%. The N187N was found in heterozygous (genotype frequency: 31%) and homozygous form (genotype frequency: 5%), with allele frequency of 20.5%. The population studied was in Hardy-Weinberg equilibrium ($p < 0.05$). No additional changes were found at the investigated exons. The individuals who presented allelic variants showed the same clinical and biochemical classical symptoms of patients with CH described by other authors. The works done so far do not lead to a definitive conclusion about the relationship between the investigated polymorphisms and thyroid dysfunctions, making it important that additional studies are conducted, contributing to the elucidation of thyroid diseases molecular basis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A TIREÓIDE

1.1.1. Anatomia e Histologia da Glândula Tireóide

A glândula tireóide tem seu nome derivado do grego *thyreos*, que significa escudo. Entretanto, numa visão anterior, lembra o formato de uma borboleta. Esta glândula localiza-se abaixo da laringe, anteriormente à junção das cartilagens tireóide e cricóide (Figura 1). Seu peso, em um recém-nascido, é de aproximadamente 1,5 gramas, e no homem adulto, entre 15 e 25 gramas (Berne & Levy, 2000).

A tireóide é constituída, geralmente, por dois lobos, direito e esquerdo, unidos por um istmo. No entanto, algumas pessoas apresentam um terceiro lobo, denominado de lobo piramidal, o qual representa um remanescente embrionário da porção inferior do ducto tireoglossos, um canal ligado ao primórdio tireoidiano (Guyton, 2002).

A tireóide é composta por cerca de 3 milhões de folículos tireoidianos, os quais representam as unidades funcionais da glândula. Os folículos possuem formato esférico, com diâmetro entre 0,2 e 0,9 mm. Esses folículos são formados por uma camada de epitélio simples cúbico, os tireócitos, que delimitam um espaço interno chamado lúmen folicular (Figura 2) (Aires, 1991; Junqueira, 1999).

O lúmen folicular é preenchido pelo colóide, cujo principal constituinte é a glicoproteína iodada tireoglobulina, a qual contém cerca de 115 resíduos de tirosina. O espaço interfolicular é ocupado por capilares e tecido conjuntivo. O ápice das células foliculares está voltado para o lúmen, e a base, adjacente ao tecido conjuntivo (Junqueira, 1999).

Outro tipo de célula encontrada na tireóide é a célula parafolicular, também denominada de célula C. As células C encontram-se fazendo parte do epitélio folicular, ou formando grupamentos isolados entre os folículos tireoidianos. A principal função das células C é a produção do hormônio

calcitonina. Este hormônio tem como efeito principal diminuir o nível de cálcio do plasma através da estimulação da absorção pelos ossos (Aires, 1991).

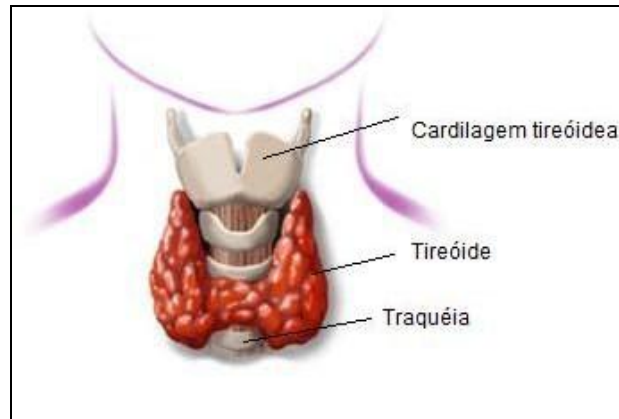


Figura 1: Localização da Glândula Tireóide.

Adaptado de: <http://www.armourthyroid.com/hypothyroidism/images/illustrations/thyroid.jpg>

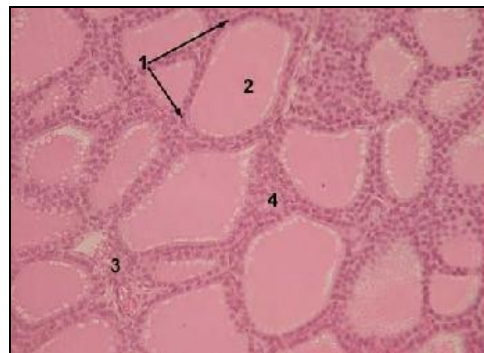


Figura 2: Folículos Tireoidianos. 1. Tireócitos. 2. Lúmen preenchido por colóide. 3. Capilares. 4. Células parafoliculares. Fonte: <http://www.histol.chuvashia.com/atlas-en/endocrine-02-en.htm>

1.1.2. Embriologia da Tireóide

A tireóide é de origem endodérmica, e se desenvolve precocemente na porção cefálica do tubo digestivo, como um divertículo na faringe primitiva. É a primeira glândula endócrina a se desenvolver no embrião, por volta da terceira semana de vida intra-uterina (Guyton, 2002).

A diferenciação para a formação dos folículos tireoidianos ocorre na 10^a semana, e está intimamente ligada ao início das funções específicas do órgão, que ocorre por volta da 12^a semana. No entanto, quantidades significativas dos

hormônios tireoidianos só serão detectadas no soro fetal por volta da 20^a semana de vida intra-uterina (Berne & Levy, 2000).

Esse processo de formação envolve a expressão das proteínas TTF-1 (*thyroid-specific transcriptional factor 1*), que regula o desenvolvimento e migração da glândula, TTF-2, um agente estimulador de transcrição gênica da tireoglobulina e peroxidase, e a proteína Pax-8, envolvida no processo de diferenciação celular da tireóide (Aires, 1991).

1.1.3. Síntese e Secreção dos Hormônios Tireoidianos

Os principais produtos da secreção da glândula tireóide são os hormônios tetraiodotironina (T_4), também conhecido como tiroxina, e triiodotironina (T_3). A produção desses hormônios requer, primeiramente, a captação de iodeto (I^-) do sangue. A ingestão média de iodo é cerca de 200 a 500 mg/dia, advindos principalmente de derivados do leite e frutos do mar, e sal de cozinha (Aires, 1991). O iodeto é absorvido do sangue e transportado via proteína NIS para a célula folicular (processo denominado de seqüestro de iodo), e desta para o colóide, através da proteína transmembrana Pendrina (Berne & Levy, 2000).

No interior dos folículos o iodeto é inserido, através de ligação covalente pela tireoperoxidase (TPO), nos resíduos de tirosina da tireoglobulina (TG), processo denominado de organificação do iodo (Eskandari *et al.*, 1997). A cadeia lateral de tirosina a qual o iodeto se liga possui dois sítios que podem ser oxidados para receber os íons. Se apenas um deles for iodado, dá-se ao composto o nome de monoiodotirosina (MIT); caso os dois sítios sejam iodados, o composto é denominado diiodotirosina (DIT). Quase simultaneamente a esse processo, ocorre o acoplamento de duas iodotirosinas, dando origem a uma iodotironina. Esse acoplamento também é catalisado pela peroxidase (Vaisman *et al.*, 2004).

O acoplamento de duas DIT dá origem a uma tiroxina; enquanto que, o acoplamento de uma DIT a uma MIT dá origem a uma triiodotironina. O que determina a síntese de T_4 ou T_3 é a relação MIT/DIT da TG. Dessa forma, o

predomínio de MIT favorece a produção de T_3 ; e o predomínio de DIT, a formação de T_4 (Aires, 1991; Vaisman *et al.*, 2004).

No momento da secreção hormonal, microvilosidades presentes na membrana apical reabsorvem pequenas gotículas de colóide, que ficam armazenadas em vacúolos. Esses vacúolos se fundem com lisossomos, que, através de suas enzimas, degradam totalmente a TG em aminoácidos, liberando os hormônios para o citosol, de onde são difundidos para a circulação (figura 3). Uma parte desses hormônios pode se ligar a dois tipos de proteína, a albumina e proteína ligadora dos hormônios da tireóide, ou ser transportada na forma livre, no plasma (Berne & Levy, 2000).

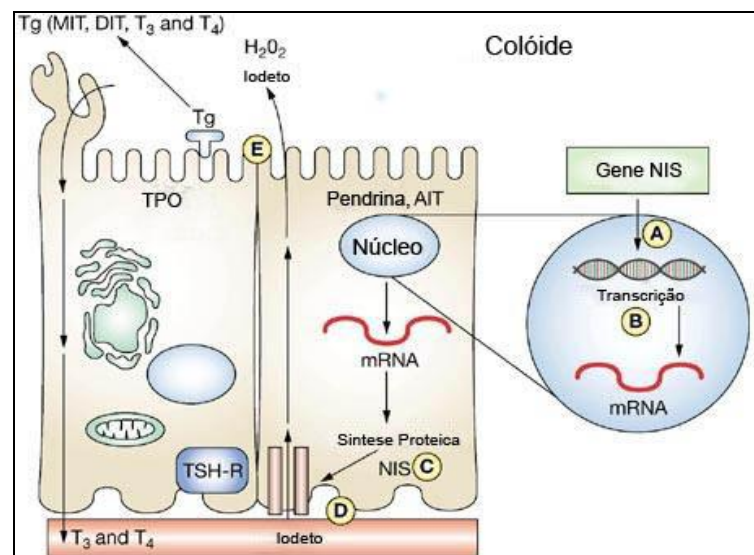


Figura 3: Síntese e Liberação dos Hormônios Tireoidianos no Tireócito.

Adaptado de: <http://www.nature.com/nrendo/journal/v3/n3/images/ncpendmet0449-f1.jpg>

As iodotirosinas que não sofreram acoplamento são desiodadas, liberando iodeto, que pode ser reutilizado para iodinação de outras moléculas de TG. Em média, são liberados diariamente, 100 mg de T_4 , e 20 mg de T_3 (Aires, 1991).

1.1.4. Função dos Hormônios da Tireóide

Os hormônios T_3 e T_4 têm livre acesso às células através da membrana plasmática, por difusão. O T_4 atua como pró-hormônio, enquanto o T_3 é o hormônio biologicamente ativo. As células dos tecidos periféricos estão equipadas com um complexo enzimático capaz de transformar 40% do T_4 secretado diariamente em T_3 (Berne & Levy, 2000). À medida que entram nas células, eles interagem com receptores nucleares de hormônios tireoidianos, modificando a expressão de genes específicos. Esse processo culmina com a codificação de diversas proteínas que atuam no aumento generalizado do metabolismo celular. (Jinsong & Mitchell, 2000).

Os efeitos dos hormônios tireoidianos T_3 e T_4 são, essencialmente, promoção do crescimento nos jovens, diferenciação celular, estimulação da atividade das glândulas endócrinas e dos processos envolvidos no metabolismo energético (Gartner, 2007).

É através dos hormônios tireoidianos da mãe, no período inicial de gravidez, e do feto, a partir da 12^a semana de vida intra-uterina, que todas as transformações relacionadas ao desenvolvimento do cérebro serão influenciadas, desde o crescimento até a migração das células neuronais e gliais (Pniewska, 2006).

1.1.5. Regulação da Glândula Tireóide

A regulação da Tireóide envolve o eixo hipotálamo-hipofisário. O hipotálamo secreta o hormônio liberador da tireotrofina (TRH), que estimula, na adeno-hipófise, a liberação da tireotrofina, ou hormônio estimulante da tireóide (TSH). Esse hormônio glicoprotéico de 28 kDa, chega à tireóide e se liga ao receptor de TSH (TSHR) na membrana basal das células foliculares, estimulando todas as etapas do processo de produção e liberação de T_3 e T_4 , incluindo a ativação da expressão dos genes que codificam o NIS, a peroxidase, e a TG (Figura 4) (Aires, 1991).

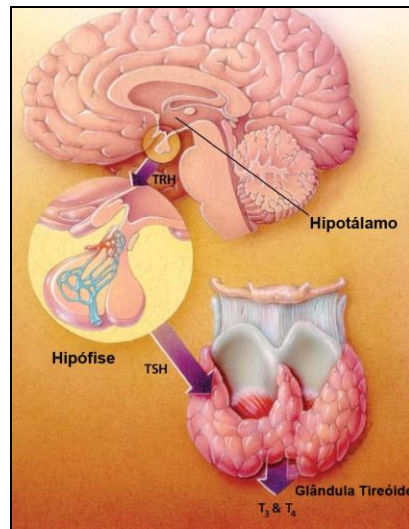


Figura 4: Regulação da Tireóide pelo Eixo Hipotálamo-Hipofisário.

Fonte: <http://www.ehponline.org/members/2003/111-12/prodchart.jpg>

Quando a produção dos hormônios atinge o nível adequado, eles exercem um feedback negativo sobre o eixo hipotálamo-hipofisário, diminuindo a produção de TRH e TSH. Em contraste, quando a concentração sérica dos hormônios atinge valores reduzidos, a produção de TRH será novamente estimulada, reiniciando o ciclo (Berne & Levy, 2000).

1.2. HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO

1.2.1. Etiologia

O Hipotireoidismo congênito (HC) é uma doença grave, que ocorre em cerca de 1:4000 nascimentos, sendo o distúrbio endócrino congênito mais freqüente durante o período neonatal (Gillam & Koop, 2001). A doença é caracterizada por uma diminuição nos níveis séricos de hormônios tireoidianos, o que acarreta na redução de diversos processos metabólicos. Essa redução é acompanhada de elevação nos níveis séricos de TSH, mecanismo de compensação na tentativa de restaurar os níveis normais dos hormônios tireoidianos (Setian, 2007).

O HC é mais prevalente em mulheres, com uma razão aproximada de 1:2,3; o que é atribuído à agenesia e ectopia mais freqüente em mulheres (Jordan *et al.*, 2003, SBEM-projeto diretrizes, 2005). Existe também variabilidade de prevalência entre grupos étnicos. É consideravelmente menos prevalente entre os negros americanos (1:17.000, na Georgia; 1:10.000, no Texas), e mais prevalente entre os hispânicos (1:2.700). Há ainda uma prevalência muito maior entre recém-nascidos com Síndrome de Down (cerca e 1:141 nascidos vivos) (SBEM-projeto diretrizes, 2005).

Essa doença é a causa mais comum de deficiência mental prevenível, podendo ser transitória ou permanente. A forma transitória ocorre em cerca de 2% dos casos, e é conseqüência, principalmente, da presença de anticorpos bloqueadores da tireóide, da mãe, que atravessam a placenta. O HC transitório pode também ser induzido por drogas; ou quando a mãe foi tratada com irradiação (Jordan *et al.*, 2003; Setian, 2007).

O hipotireoidismo congênito pode ainda ser ocasionado por uma deficiência em iodo, sendo denominado cretinismo endêmico, com freqüências variáveis entre as populações (SBEM-projeto diretrizes, 2005).

Entretanto, em áreas iodo suficientes, na grande maioria dos casos, o HC é permanente, sendo ocasionado por fatores genéticos, e requer tratamento por toda a vida (Jordan *et al.*, 2003). O HC permanente pode ser classificado em primário, quando o distúrbio está relacionado ao desenvolvimento da tireóide e à síntese de seus hormônios; secundário, quando o distúrbio ocorre no eixo hipotálamo-hipofisário; ou ainda, terciário, quando a falha ocorre na resposta dos tecidos periféricos aos hormônios tireoidianos (Gillam & Koop, 2001).

As prevalências dos diferentes tipos de HC, de acordo com Setian, 2007, são:

- Disgenesia Tireoidiana (Agenesia, Hipogenesia, Ectopia): 1:4.000
- Disormonogênese (Ausência de resposta ao TSH; defeito no transporte ou captação de iodeto; defeito na organificação; defeito de síntese da tireoglobulina; defeito da desiodinase): 1:30.000

- Hipotálamo-Hipofisário (Anomalia hipotálamo-hipofisária; Pan-hipopituitarismo; Deficiência isolada de TSH, Resistência aos hormônios tireoidianos): 1:100.000
- Hipotireoidismo transitório (Induzido por drogas; Induzido por anticorpos maternos; Gestantes tratadas com drogas antitireoidianas ou irradiação; Idiopático): 1:40.000.

1.2.2. Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico do HC é feito através da triagem neonatal, consistindo na dosagem do TSH e/ou T₄ livre em amostras de sangue seco em papel filtro, retiradas do calcanhar do recém-nascido. Valores de TSH acima de 15mUL/mL determinam a solicitação de uma nova amostra. Se o exame confirmatório estiver acima de 15 mUL/mL, a criança é diagnosticada com HC. O T₄ livre é normalmente usado somente como exame complementar, com valores de referência de 0,8 a 1,33 ng/DI (NUPAD,1999).

O exame pode ser seguido, em caso positivo, pelos exames de ultrassonografia da tireóide, para verificar o tamanho e a posição da glândula, e de cintilografia com captação de iodo radioativo, para verificar a capacidade de captação de iodo pela tireóide (Jordan *et al.*, 2003).

O tratamento do HC é feito basicamente pela reposição de levo-tiroxina, o L-T₄, único isômero reconhecido pelos receptores nas células humanas. O tratamento é eficaz e elimina todos os sintomas, evitando as seqüelas relacionadas à doença. Entretanto, os pacientes devem receber aconselhamento genético, pela possibilidade de transmitir as mutações ligadas à doença a seus descendentes (SBEM-projeto diretrizes, 2005).

1.2.3. Aspectos clínicos

As crianças não diagnosticadas precocemente poderão apresentar fácies grosseiras características, com alargamento da base do nariz (nariz em

sela); cabelos escassos; língua protusa; pele seca, fria e marmórea; hérnia umbilical; fontanela posterior ampla; engasgos freqüentes; macroglossia; obstrução intestinal; hipoatividade; choro rouco; hipotonia; bócio; e icterícia neonatal prolongada, sendo este último o sintoma mais precoce (Franco *et al.*, 2002).

Os sintomas clínicos do HC em geral não são detectados ao nascimento, pois os hormônios tireoidianos da mãe protegem a criança dos efeitos deletérios da doença até o fim da gestação, permitindo seu desenvolvimento normal. Entretanto, a persistência da condição sem o tratamento adequado ocasionará, além destes sintomas, atraso no crescimento somático e no desenvolvimento neuromotor, além de deficiência mental em graus variados. (Refetoff *et al.*, 2001; SBEM-projeto diretrizes, 2005)

1.3. RECEPTOR DO HORMÔNIO ESTIMULANTE DA TIREÓIDE (TSHR)

1.3.1. Aspectos Bioquímicos e Moleculares do TSHR

O TSHR é o maior dos receptores hormonais glicoprotéicos. Tem um peso molecular de 84 kDa em sua forma não glicosilada, chegando a 95-100 kDa, em sua forma glicosilada (Davies *et al.*, 2002).

Através da sinalização via AMPc, o receptor pode induzir tanto o sistema de transdução de sinal da fosfolipase C quanto o da proteína cinase A. A expressão do gene do *TSHR* é regulada pelos níveis de TSH, em uma relação inversamente proporcional (Duprez *et al.*, 1998).

O TSHR é dividido em duas subunidades, α e β , por meio de uma proteólise pós-traducional, as quais são ligadas uma à outra por ligações dissulfídicas. O gene do *TSHR*, clonado pela primeira vez em 1989, localiza-se no cromossomo 14q31, possui 10 éxons, e codifica uma glicoproteína da família das proteínas acopladas à proteína G (Duprez *et al.*, 1998).

A proteína é subdividida em: domínio extracelular (segmento amino-terminal mais três *loops* extracelulares); porção transmembrana, que possui sete segmentos alfa-hélice; e um domínio intracitoplasmático (três *loops* mais o segmento carboxil-terminal). Os éxons 1 a 9 codificam a maior parte da região extracelular do receptor, e o éxon 10, toda a região intracelular, a região transmembrana e uma pequena parte da região extracelular. O THSR é caracterizado por um segmento amino-terminal particularmente longo, que é responsável pela alta afinidade de ligação do TSH (Figura 5) (Davies *et al.*, 2002).

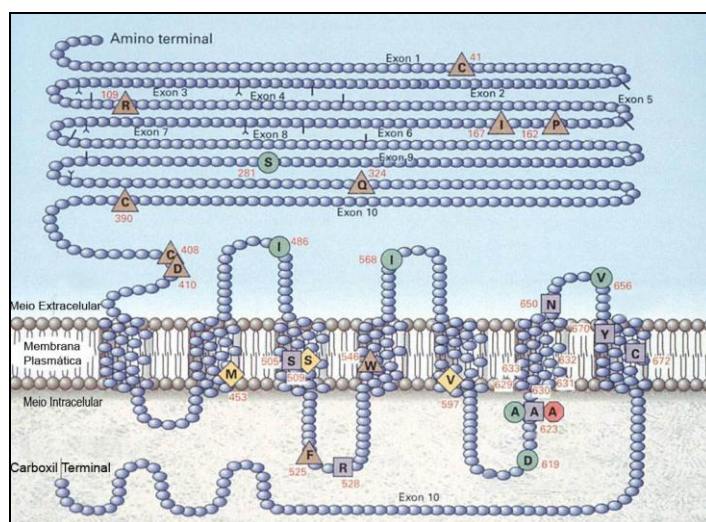


Figura 5: Estrutura do Receptor de Tireotrofina.

Adaptado de: <http://content.nejm.org/cgi/content/short/337/23/1675>

1.3.2. O TSHR e o Hipotireoidismo Congênito

O TSHR é um importante alvo de mutações relacionadas às disfunções tireoidianas. Diversas mutações de perda de função do TSHR já foram documentadas como responsáveis por uma síndrome, denominada resistência ao TSH. Esta síndrome caracteriza-se por uma hipossensibilidade à atividade biológica do TSH, e é uma das causas de hipotireoidismo congênito, com a glândula tireóide *in situ*. Essa resistência ao TSH pode se manifestar em diversos níveis: desde elevações nas taxas de TSH sem alterações nos níveis

de hormônios tireoidianos (resistência parcial), até o hipotireoidismo grave (resistência completa) (Calebiro *et al.*, 2005; Gagné *et al.*, 1998).

Diversos estudos já evidenciaram a relação entre mutações inativadoras do receptor de TSH e a resistência ao TSH. Stanbury e colaboradores, em 1968, descreveram uma criança do sexo masculino com mutação no gene *TSHR*, apresentando hipotireoidismo com deficiência mental grave, e tireóide não responsiva à administração de TSH ou aos próprios níveis séricos de TSH, que eram bastante elevados e biologicamente ativos.

Stein e colaboradores (1994) observaram a ocorrência de hipotireoidismo congênito com tireóide hipoplásica em uma linhagem de ratos denominada *hyt/hyt*, devida à herança autossômica recessiva de mutações no *TSHR*, causando ligação defeituosa do TSH ao receptor. Várias mutações similares já foram descritas no gene *TSHR*, como a mutação sem sentido R450H, descrita em casos de hipotireoidismo subclínico (Pohlenz *et al.*, 2006).

1.3.3. Polimorfismos dos Éxons 1 e 7 do gene *TSHR*

Além das mutações citadas, diversos polimorfismos do *TSHR* já foram descritos, e estudos sugerem uma relação entre a presença deles e a ocorrência de disfunções da tireóide (Tonacchera & Pinchera, 2000). Alguns dos polimorfismos mais freqüentes do *TSHR* são o c. 106 G>C (D36H), c.154 C>A (P52T) e c. 561 T>C (N187N).

O c. 106 G>C (D36H) é uma mutação pontual no éxon 1 do gene *TSHR* (troca de bases G>C), que causa uma substituição de um resíduo de ácido aspártico por um de histidina na posição 36 da porção extracelular do receptor.

Esse polimorfismo foi inicialmente descrito como resultante de uma mutação somática e possível causador de auto-imunidade da tireóide (Heldin *et al.*, 1991). Essa interpretação foi posteriormente reformulada pelos mesmos autores, pois foi descoberto que o D36H, na verdade, corresponde a um polimorfismo de linhagem germinativa, que também está presente em indivíduos saudáveis. Essa variante não causou interferência na ligação do

TSH ao receptor e na ativação da adenilato-ciclase, quando expressa em células eucarióticas (Gustavsson *et al.*, 1995).

O segundo polimorfismo, c.154 C>A (P52T), também localizado no éxon 1 do gene, (troca de base C>A), resultando na substituição de um resíduo de prolina por um de treonina, na posição 52 da porção extracelular do receptor.

Esse polimorfismo é encontrado em aproximadamente 9% dos pacientes com Doença de Graves (DG), e em 12% da população normal (Tonacchera & Pinchera, 2000). Foi relatado que o receptor variante P52T apresenta uma eficiência maior de sinalização para a geração de AMPc quando expresso em células CHO (Loos *et al.* 1995).

Em estudos posteriores, foram encontrados 2 indivíduos que apresentavam homozigose para o P52T e ainda assim, eram eutireóides e exibiam níveis normais de TSH e T₄ (Cuddihy *et al.*, 1995a). Constatou-se ainda que a atividade do THSR variante não apresentava diferença significativa em relação à atividade do tipo selvagem, quando expresso em outras células (Duprez *et al.*, 1998).

O terceiro polimorfismo, c. 561 T>C (N187N), encontrado no éxon 7 do gene, (troca de bases T>C), que não altera o aminoácido asparagina, na posição 187 da porção extracelular do receptor.

Esse polimorfismo apresentou frequência alélica de 14% em um grupo de 60 indivíduos saudáveis, na Argentina (Esperante *et. al.*, 2008). Um estudo posterior mostrou não haver relação entre a presença da alteração e a prevalência de HC na China (YAUN *et. al.*, 2008). Os trabalhos acerca desta alteração ainda são escassos, mas alguns estudos sugerem sua estreita ligação com polimorfismos intrônicos, associados ou não a disfunções tireoidianas (Ismail *et al.*, 2009; Esperante *et. al.*, 2008).

2. JUSTIFICATIVA

O *TSHR* é um importante alvo de mutações relacionadas às disfunções tireoidianas. Nos últimos anos, foram identificadas diversas mutações relacionadas tanto à perda quanto ao ganho de função do receptor, ou seja, alterações genéticas que atuam diminuindo ou aumentando a resposta ao TSH.

Apesar dos estudos acerca dos polimorfismos do *TSHR*, pouco ainda se sabe sobre sua possível influência nos níveis de hormônios tireoidianos e de TSH, e conseqüentemente sobre o HC, o que torna importante a investigação destas alterações genéticas, para o melhor entendimento de seu papel acerca do funcionamento da glândula tireóide.

As evidências de relação entre os polimorfismos do gene *TSHR* e alterações hormonais tornam importante o estudo dos mesmos. Existem poucos trabalhos com o objetivo de investigar a relação dessas alterações genéticas com a prevalência de Hipotireoidismo Congênito na população.

Portanto, torna-se importante a realização deste estudo, a fim de tentar investigar a atuação desses polimorfismos em pacientes com HC, objetivando contribuir com o melhor entendimento das disfunções tireoidianas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Investigar a presença dos principais polimorfismos no éxon 1 e 7 do gene *TSHR* em pacientes com HC diagnosticados e tratados na Unidade de Referência Especializada Materno-Infantil e Adolescente (UREMIA-PA).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os polimorfismos D36H e P52T no éxon 1 do gene *TSHR* em pacientes com HC;
- Investigar o polimorfismo N187N no éxon 7 do gene *TSHR* em pacientes com HC;
- Determinar o genótipo dos indivíduos com HC;
- Descrever os achados clínicos e bioquímicos nos pacientes com as alterações investigadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

a) Caracterização da Amostra

A amostra estudada neste trabalho é composta de 105 pacientes com HC, sendo 66 do sexo feminino e 39 do sexo masculino, na faixa etária de 3 a 15 anos, tratados na Unidade de Referência Especializada Materno-Infantil e Adolescente (UREMIA).

Os objetivos do trabalho foram explicados detalhadamente aos pais e/ou responsáveis dos pacientes, e após aceitação na participação do trabalho, foi fornecido o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I). Após esse procedimento, realizou-se a coleta de uma amostra de sangue periférico dos pacientes.

b) Aspectos Éticos

Este trabalho está de acordo com os princípios éticos básicos das diretrizes e normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos: autonomia, beneficência, não maleficência e justiça.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Hospital Santa Casa de Misericórdia do Pará (Anexo II).

Considerando o caráter analítico do estudo, os pacientes e familiares não foram expostos a nenhum risco maior. O material biológico colhido (sangue) foi obtido por um procedimento pouco invasivo (punção venosa periférica).

4.2. MÉTODOS

a) Critérios Clínicos e Bioquímicos de inclusão

O critério fundamental de inclusão dos pacientes neste trabalho foi o diagnóstico confirmado de HC primário, através de achados bioquímicos (dosagem de TSH e/ou T_4 livre) e de avaliação clínica.

Os dados bioquímicos e clínicos foram obtidos a partir de um levantamento das fichas dos pacientes da UREMIA.

b) Coleta e armazenamento das amostras

Uma amostra de sangue total (3 a 5 mL) foi obtida por punção venosa, e separada em frascos contendo 54 μ L de Ácido Etileno Diamino Tetra-acético (EDTA). Todos os frascos foram devidamente identificados (nome do paciente e data de colheita) e armazenados a -20°C para posterior extração de DNA.

c) Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método Fenol-Clorofórmio, segundo a metodologia descrita por Sambrook (1989):

1. Adicionar sangue total (no máximo 5 mL) em tubo de centrífuga de 15 mL;
2. Completar com solução salina (0,15M de NaCl) até um volume final de 14 mL;
3. Centrifugar (1800 FCR/10')
4. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 14 mL de tampão de lise de hemácias (5mM/L de $MgCl_2$, 20 mM/L de Tris-HCl, pH 7,8);

5. Centrifugar (1800 FCR/10');
6. Desprezar o sobrenadante e adicionar ao precipitado 5 mL de tampão de lise de leucócitos (0,2 mM/L de NaCl, 1 mM/L de EDTA e 10 mM/L de Tris-HCl, pH 7,8);
7. Adicionar 500 µL de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 10%, e 10 µL de proteinase K (20mg/L);
8. Agitar o material por duas horas à temperatura ambiente em agitador pendular;
9. Adicionar um volume de fenol, agitar por 10', centrifugar (1800 FCR/10') e transferir o sobrenadante para outro tubo de 15 mL;
10. Adicionar um volume de clorofórmio-isopropanol (24:1);
11. Agitar por 10', centrifugar (1800 FCR/10');
12. Transferir o sobrenadante para outro tubo de 15 mL;
13. Adicionar 2,5 vezes o volume de isopropanol e misturar por inversão até a precipitação do *pellet* de DNA;
14. Centrifugar (1800 FCR/5'); desprezar o sobrenadante e deixar o DNA secando à temperatura ambiente por algumas horas. Em seguida, adicionar água destilada para hidratar.
15. Deixar o DNA ressuspender por algumas horas, e então armazenar sob refrigeração.

Quadro 2 – Iniciadores para amplificação dos éxons 1 e 7 do gene *TSHR*

Iniciador	Iniciadores	Temperatura de Anelamento / Tamanho do produto de PCR
Éxon 1	CTCCCGGGTCTCCTTTGG cctgatctctcccggtact	58°C / 289 pb
Éxon 7	tgtgggacctgaaaaacctt cccttgacttacACAGCATCC	61°C / 204 pb

Quadro 3 – Condições de amplificação do éxon 1 do gene *TSHR*

Estágios		Número de Ciclos	Temperatura	Tempo
1º	Desnaturação inicial	1	94°C	1 min
2º	Desnaturação	30	94°C	1 min
	Anelamento		58°C	30 seg
	Extensão		72°C	30 seg
3º	Extensão final	1	72°C	5 min

Quadro 4 – Condições de amplificação do éxon 7 do gene *TSHR*

Estágios		Número de Ciclos	Temperatura	Tempo
1º	Desnaturação inicial	1	94°C	1 min
2º	Desnaturação	30	94°C	1 min
	Anelamento		61°C	30 seg
	Extensão		72°C	30 seg
3º	Extensão final	1	72°C	5 min

e) Identificação de Alterações

Foi utilizada a técnica de seqüenciamento automático (kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standart Version 3.1) para a análise molecular dos éxons 1 e 7 do gene *TSHR*. Os iniciadores utilizados para o seqüenciamento foram os mesmos utilizados na PCR.

f) Análise Estatística

A análise estatística dos resultados apresentados neste estudo foi realizada através do programa *Bioestat* (versão 4.0), utilizando-se o Qui-quadrado, para verificar se a população encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O número de alelos que apresentavam mutações foi dividido pelo número total de alelos pesquisados para determinação da freqüência dos

polimorfismos. O coeficiente foi multiplicado por 100, para determinação dos percentuais.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE MOLECULAR DOS ÉXONS 1 E 7 DO GENE *TSHR*:

Foram encontradas duas variantes alélicas nas seqüências dos éxons 1 e 7: o polimorfismo P52T e o N187N. O D36H não foi encontrado nos pacientes analisados.

a) Éxon 1: Polimorfismo c. 154 C>A (P52T)

O Polimorfismo P52T foi encontrado em heterozigose em 4 pacientes (figura 6a e 6b), de um total de 105 amostras seqüenciadas (frequência genotípica de 3,8%). A frequência alélica do polimorfismo foi de 1,90%. O teste do Qui-quadrado revelou que a população se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,04$; $p<0,05$). Dois dos pacientes heterozigotos para o polimorfismo P52T, no éxon 1, também apresentaram o polimorfismo N187N, no éxon 7, em heterozigose.

Figura 6: Polimorfismo c. 154 C>A (P52T)

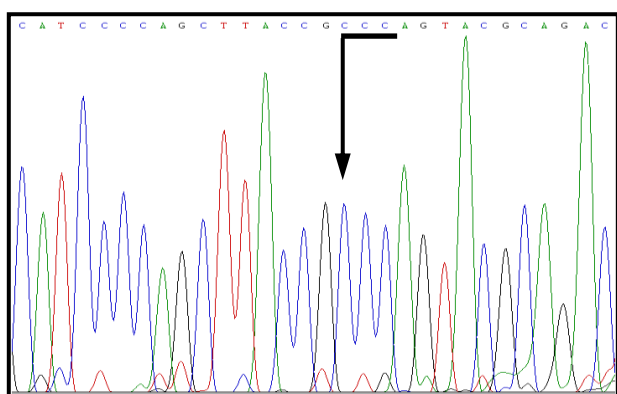


Figura 6a: Sequência Selvagem

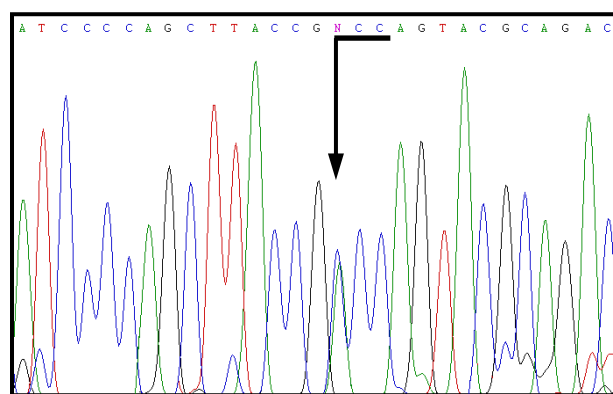


Figura 6b: Sequência Mutante - Heterozigoto

b) Éxon 7: Polimorfismo c.561 T>C (N187N)

De um total de 100 amostras seqüenciadas, o polimorfismo N187N foi encontrado em homozigose em 5 pacientes (frequência genotípica de 5,0%); e em heterozigose em 31 pacientes (frequência genotípica de 31,0%). A frequência alélica do polimorfismo foi de 20,5%. As figuras 7a, 7b e 7c mostram estes achados.

O teste do Qui-quadrado revelou que a população estudada também se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,239$; $p<0,05$).

Figura 7: Polimorfismo c. 561 T>C (N187N)

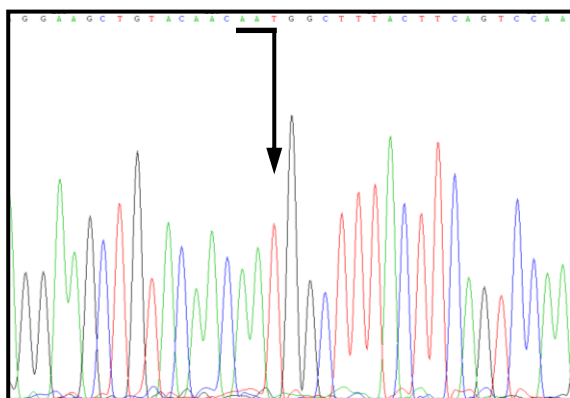


Figura 7a: Sequência Selvagem

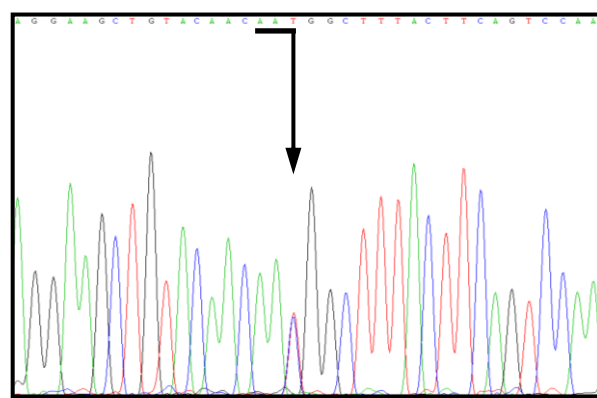


Figura 7b: Sequência Mutante - Heterozigoto

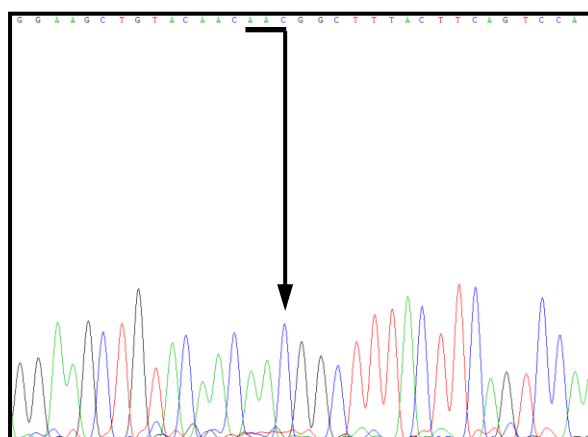


Figura 7c: Sequência Mutante - Homozigoto

5.2. DESCRIÇÃO CLÍNICA E BIOQUÍMICA DOS PACIENTES COM ALTERAÇÕES NUCLEOTÍDICAS

Foram obtidos dados clínicos de 3 dos 4 pacientes com a alteração P52T, e de 16 dos 36 pacientes com o polimorfismo N187N. As fichas dos demais pacientes não foram obtidas por dificuldade de acesso aos arquivos da UREMIA. As dosagens de TSH obtidas nas fichas correspondem às dosagens realizadas no teste do pezinho, quando foi diagnosticada a doença. A média de TSH dos pacientes com polimorfismo no éxon 1 foi de 67,15 mUL/mL (desvio padrão = $\pm 77,01$ mUL/mL); e dos pacientes com polimorfismo no éxon 7 foi de 85,15 mUL/mL (desvio padrão = $\pm 72,90$ mUL/mL).

Os heterozigotos para o polimorfismo P52T apresentaram hérnia umbilical (67%), obstrução intestinal (33%), icterícia prolongada (33%), hipoatividade (33%), pele seca (33%), bócio (33%). Dois destes pacientes realizaram o exame de cintilografia com captação de iodo radioativo. Um deles foi classificado com ectopia tireoidiana e outro com disormonogênese.

Em relação aos pacientes com o polimorfismo N187N, de acordo com as informações contidas nos prontuários médicos, 10 realizaram exame de cintilografia com captação de iodo radioativo; dos quais 5 pacientes apresentaram ectopia tireoidiana, 4 apresentaram disormonogênese e 1 apresentou hipoplasia tireóidea. Os 16 pacientes apresentaram um ou mais sintomas, a saber: hérnia umbilical (62,5%), obstrução intestinal (68,8%), icterícia prolongada (43,8%), fontanelas amplas (31,3%), hipoatividade (18,8%), choro rouco (18,8%), macroglossia (18,8%), alargamento da base do nariz (18,8%), pele seca (18,8%), hipotonia (12,5%), língua protusa (6,3%), bócio (6,3%).

A tabela 1 mostra as freqüências dos polimorfismos na amostra total de pacientes e os principais achados clínicos e bioquímicos de 3 pacientes com o polimorfismo P52T e 16 com o polimorfismo N187N.

Tabela 1: Polimorfismos e Principais Achados Clínicos dos Pacientes com Alterações Nucleotídicas

Polimorfismos		Frequência alélica	Achados clínicos*	TSH no teste do pezinho
Polimorfismo	Frequência			
D36H	0/105 (0%)	0%	-	-
P52T	4/105 (3,8%)	1,90%	Hérnia umbilical (66,7%), obstrução intestinal (33,3%), icterícia prolongada (33,3%), hipoatividade (33,3%), pele seca (33,3%).	67,15 mUL/mL ± 77,01 mUL/mL
N187N	36/100 (36%)	20,5%	Hérnia umbilical (62,5%), obstrução intestinal (68,8%), icterícia prolongada (43,8%), fontanelas amplas (31,3%), hipoatividade (18,8%), choro rouco (18,8%), macroglossia (18,8%), alargamento da base do nariz (18,8%), pele seca (18,8%), hipotonia (12,5%), língua protusa (6,3%), bócio (6,3%).	85,15 mUL/mL ± 72,90 mUL/mL

* Achados clínicos e bioquímicos somente para 3 pacientes com o polimorfismo P52T e 16 com o polimorfismo N187N.

Valores de referência TSH: < 15mUL/ml

6. DISCUSSÃO

6.1. ANÁLISE MOLECULAR

Diversas mutações no gene *TSHR* já foram relatadas como sendo responsáveis por disfunções tireoidianas, sejam elas adquiridas, congênitas ou hereditárias. Essas mutações podem atuar tanto no hiperfuncionamento do receptor, sendo chamadas mutações de ganho de função, ou interferindo na ligação e diminuindo a resposta ao hormônio TSH, sendo chamadas mutações de perda de função (Park & Chatterjee, 2004).

Em ambos os casos, o *TSHR* mutante causa alteração dos níveis plasmáticos de hormônios tireoidianos, o que o torna um importante alvo de estudos na análise do funcionamento da tireóide.

Diversos polimorfismos do *TSHR* já foram relatados tanto em populações com comprometimento das funções tireoidianas, quanto na população sadia (Tonacchera & Pinchera, 2000; Cuddihy *et al.*, 1995b; Simanainen *et al.*, 1999). Dentre esses polimorfismos, alguns dos mais freqüentes encontram-se no éxon 1 (D36H e P52T) e éxon 7 (N187N) do gene *TSHR*. Com exceção do polimorfismo N187N, essas variantes alélicas resultam em troca de aminoácidos na sequência do receptor de TSH, e pouco ainda se sabe sobre sua influência na ligação e resposta ao TSH.

O polimorfismo D36H não foi encontrado em nenhum dos pacientes analisados. A posição 36 do *TSHR* está localizada nas proximidades de uma área muito específica do receptor em relação a outros receptores hormonais, pois é um dos sítios de reconhecimento do TSH. Dessa forma, sugere-se que esse locus seja crucial para a interação com várias biomoléculas, a exemplo de anticorpos anti-*TSHR* (Matsuo *et al.*, 1993; Russo *et al.*, 1995).

Entretanto, Gustavsson *et al.* (1995) determinou a atividade funcional do receptor D36H mutante e não detectou nenhuma mudança na ligação com o TSH, produção de AMPc ou capacidade de interagir com o receptor, comparados aos receptores do tipo selvagem. Outros estudos mostram que o polimorfismo D36H não está associado à Doença de Graves. Simanainen *et al.*

(1999), encontraram o alelo D36H em 7 de 160 pacientes com Doença de Graves, e em 8 de 140 indivíduos saudáveis, diferença que não se mostrou estatisticamente significativa entre os grupos. Ho e colaboradores (2003) analisaram um grupo de 164 pacientes com DG, onde não foi encontrado o alelo D36H.

No presente estudo, o polimorfismo P52T apresentou frequência alélica de 2%. Os quatro pacientes que apresentaram o polimorfismo eram heterozigotos para o alelo variante.

O polimorfismo P52T é uma alteração que resulta na substituição de um resíduo de prolina (aminoácido neutro e polar) por um resíduo de treonina (aminoácido neutro e apolar). Alguns autores sugerem que isso poderia causar uma alteração na conformação de um loop crucial da porção extracelular, podendo tornar o receptor mais propenso a estimular a formação de anticorpos ou levar à expressão e regulação anormais do *TSHR* (Bohr *et al.*, 1993).

Estudos mostraram que a P52T elevou a produção de AMPc quando expressa em células ovarianas de hamsters chineses. Dessa forma, especula-se a possibilidade do polimorfismo intensificar o hipertireoidismo em pacientes com DG (Loos *et al.*, 1995).

Alguns autores apóiam essa hipótese. Cuddihy *et al.* (1995b) encontraram uma frequência elevada do P52T em mulheres com Doença de Graves e de Hashimoto, em comparação ao grupo de mulheres saudáveis. Esta mesma relação não foi encontrada em homens. Um estudo feito na Espanha mostrou frequência de 7,5% para o polimorfismo P52T em um grupo de 62 pacientes com hipertireoidismo (Palos *et al.*, 2006).

Em Singapura, um estudo já citado realizado em um grupo de 164 pacientes com Doença de Graves mostrou uma frequência de 11.4% para o polimorfismo P52T, sendo este mais prevalente em Indianos (frequência alélica: 16,5%), e raro em Chineses (frequência alélica: 0.5%). Neste mesmo estudo, os indivíduos que apresentavam o alelo P52T exibiam níveis significativamente menores de anticorpos anti-Tireoglobulina e anti-TPO, quando comparados àqueles que não apresentaram polimorfismo (Ho *et al.*, 2003).

Entretanto, a maior parte dos estudos subsequentes não confirma esses achados: o polimorfismo foi encontrado com igual frequência tanto em pacientes com doença de graves quanto em indivíduos saudáveis (Simanainen *et al.*, 1999; Kotsa *et al.*, 1997; Kaczur *et al.*, 2000; Sunthornthepvarakul *et al.*, 1999; Allahabadia, *et al.*, 1998; Chou *et al.*, 2002). Outros estudos também mostraram indivíduos homozigotos para o alelo variante que não apresentavam quaisquer sintomas na tireóide, sendo, portanto, considerados hígidos. (Tonacchera *et al.*, 1996; Cuddihy *et al.*, 1995a).

Em um grupo de 307 indivíduos saudáveis estudados na Inglaterra, 29 apresentaram o polimorfismo em heterozigose, e 3 em homozigose. Foram obtidos dados clínicos de 2 dos indivíduos homozigotos para o alelo, e ambos não apresentavam nenhum histórico de doença tireoidiana, e níveis plasmáticos normais de TSH e T₄ livre (Cuddihy *et al.*, 1995a). Tonacchera *et al.* (1996), expressaram tanto o receptor mutante quanto o selvagem em células COS-7, e a análise por radioimunoensaio mostrou níveis equivalentes de atividade do AMPc em ambos os tipos de receptores.

Um estudo realizado nos EUA mostrou uma frequência de 12% para o receptor variante em um grupo de 60 indivíduos saudáveis, com uma frequência alélica de 5,8%. Este mesmo estudo não mostrou relação entre a presença do polimorfismo e os níveis séricos de T₄ livre e TSH (Sunthornthepvarakul *et al.*, 1994). O polimorfismo P52T foi encontrado em 1 paciente com tireóide hipoplásica, em um grupo de 35 pacientes estudados no estado do Paraná; porém esse valor é o mesmo relatado em grupos-controle de outros estudos (Ramos *et al.*, 2009).

O polimorfismo N187N apresentou alta frequência (frequência alélica de 20,5%) na população estudada. A troca de bases T>C na posição 561 do gene não altera o aminoácido asparagina na posição 187 do receptor de TSH, possivelmente não tendo relação com as disfunções tireoidianas. Um estudo realizado com 60 indivíduos caucasianos não relacionados, na Argentina, revelou a presença do polimorfismo N187N em 15 indivíduos, dos quais 2 apresentavam-se homozigotos para o alelo. A frequência do alelo variante foi de 14%. Este mesmo estudo mostrou que todos os indivíduos que

apresentavam o N187N também apresentavam os polimorfismos intrônicos g.IVS5 - 69C > T e g.IVS6 + 13A > G (Esperante *et. al.*, 2008).

Yaun e colaboradores (2008) não encontraram diferença significativa em relação à presença do polimorfismo N187N em pacientes com hipotireoidismo e no grupo controle. Foram analisados 79 pacientes com hipotireoidismo congênito e 100 indivíduos saudáveis. As frequências do alelo variante nos dois grupos foram 41,1% e 35%, respectivamente.

Entretanto, outros achados servem de base para que os estudos acerca dessa variante sejam aprofundados. Olsmail *et al.* (2009) analisaram duas gerações (n=13) de uma família com 5 casos de hipertireoidismo não auto-imune (4 irmãos e uma tia paterna). O seqüenciamento dos 10 éxons do gene *TSHR* mostrou a combinação de duas variantes genômicas em todos os indivíduos afetados, no pai (não afetado) e em mais dois irmãos com hipertireoidismo subclínico. As duas variantes encontradas foram o polimorfismo N187N e a variante intrônica IVS7+68T>G. Ambas foram encontradas apenas em heterozigose. Essas alterações não se apresentaram nos demais membros não afetados da família (mãe e outros 4 irmãos) (Ismail *et. al.*, 2009).

Em um estudo feito nos EUA, Lonn e colaboradores (2007) observaram uma diminuição sugestiva do risco de desenvolvimento de carcinoma papilar da tireóide em indivíduos que apresentavam o polimorfismo N187N. Foram analisados 167 pacientes, e 491 indivíduos saudáveis. O odds ratio encontrado foi de 1.0, nos homozigotos para o alelo selvagem; 0.7, nos indivíduos heterozigotos para o polimorfismo e 0.6 para os homozigotos para o N187N ($p=0.11$).

Não foram encontradas outras alterações nos dois éxons investigados neste trabalho. Dessa forma, é recomendável a análise dos demais éxons do gene *TSHR*, bem como de outros genes envolvidos no desenvolvimento e função da tireóide, como o PAX8, TTF1 e TTF2, para aprofundar a investigação acerca da participação desses genes no HC. Em relação aos polimorfismos encontrados, não existem trabalhos suficientes que comprovem associação ou ausência de associação dessas alterações com disfunções tireoidianas, sejam elas relacionadas ao hiper ou hipotireoidismo.

Dessa forma, é necessário que demais estudos sejam realizados para que se conheça melhor a atuação desses polimorfismos. Faz-se importante a comparação dos dados encontrados neste trabalho com uma análise realizada em um grupo controle, para que se conheça a frequência dessas alterações em populações saudáveis do nosso meio.

6.2. ANÁLISE CLÍNICA E BIOQUÍMICA

Com a implantação do programa de triagem neonatal para HC, foi possível acumular dados a respeito dos sintomas clínicos desta doença (Kempers *et al.*, 2006).

Os pacientes que apresentaram alterações nos éxons 1 e 7 do gene *TSHR* manifestavam, antes do início do tratamento, sintomas como: hérnia umbilical, obstrução intestinal, icterícia prolongada, fontanelas amplas, hipoatividade, choro rouco, macroglossia, alargamento da base do nariz, pele seca, hipotonia, língua protusa, bócio.

Esses fenótipos clínicos, bem como as dosagens de TSH (apresentados na tabela 1) estão de acordo com os achados e sintomas clássicos de pacientes com HC (Law *et. al.*, 1998; Tahirovic & Toromanovic, 2005; SBEM-projeto diretrizes, 2005), não existindo maior frequência de determinado sintoma em relação à ocorrência dos polimorfismos estudados.

É importante ressaltar que o diagnóstico de HC não é feito por análise clínica, visto que os sintomas levam tempo para aparecer, sendo fundamental a realização da triagem neonatal, para evitar o aparecimento dos sintomas irreversíveis, como por exemplo, a deficiência mental.

7. CONCLUSÕES

- As alterações encontradas neste trabalho foram o polimorfismo P52T, presente em 3,81% dos pacientes (frequência alélica de 1,90%); e o polimorfismo N187N, presente em 36% das amostras (frequência alélica de 20,5%).
- Nenhuma alteração adicional foi encontrada nos éxons 1 e 7 do gene *TSHR* nos indivíduos analisados.
- Os trabalhos realizados até o momento a respeito destas alterações não apontam uma conclusão definitiva a respeito da atuação dos polimorfismos dos éxons 1 e 7 do *TSHR* nas funções tireoidianas, o que torna importante a realização de estudos adicionais.
- Os achados clínicos e bioquímicos encontrados nos pacientes com alterações são os mesmos achados clássicos de pacientes com HC. É importante ressaltar que o diagnóstico do HC não é clínico, sendo fundamental a realização da triagem neonatal.
- É importante a comparação dos dados encontrados neste trabalho com uma análise realizada em um grupo controle, para que se conheça a frequência dessas alterações em populações saudáveis do nosso meio.

8. REFERÊNCIAS

AIRES, MM. **Fisiologia**. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1991. Cap. 69: 813-828.

ALLAHABADIA A, HEWARD JM, MIJOVIC C, CARR-SMITH J, DAYKIN J, COCKRAM C, BARNETT AH, SHEPPARD MC, FRANKLYN JA, GOUGH SC. Lack of association between polymorphism of the thyrotropin receptor gene and Graves' disease in United Kingdom and Hong Kong Chinese patients: case control and family-based studies. **Thyroid**, **8**: 777–780. 1998.

BERNE R.M. & LEVY, M. N. **Fisiologia**. Ed. Guanabara Koogan, 4^a edição. Rio de Janeiro, 2000.

BOHR UR, BEHR M, LOOS U. A heritable point mutation in an extracellular domain of the TSH receptor involved in the interaction with Graves' immunoglobulins. **BiochimBiophys Acta**, **1216**: 504–508. 1993.

CALEBIRO D, DE FILIPPIS T, LUCCHI S, COVINO C, PANIGONE S, BECK-PECCOZ P, DUNLAP D, PERSANI L. Intracellular entrapment of wild-type TSH receptor by oligomerization with mutants linked to dominant TSH resistance. **Hum Mol Genet**, **14**: 2991-3002. 2005.

CHOU, HSIANG-TAI; YI-RU SHI, CHWEN-TZUEI CHANG AND FUU-JEN TSAI. The Polymorphisms of Codon 727 and 52 of Thyroid-Stimulating Hormone Receptor Gene are not Associated with Mitral Valve Prolapse Syndrome in Taiwan Chinese. **Japanese Heart Journal**, **43**: 655-666. 2002.

CUDDIHY RM, BRYANT WP, BAHAN R. Normal function in vivo of a homozygotic polymorphism in the human thyrotropin receptor. **Thyroid**, **4**: 255–257. 1995 (a).

CUDDIHY RM, DUTTON CM, BAHN RS. A polymorphism in the extracellular domain of the thyrotropin receptor is highly associated with autoimmune thyroid disease in females. **Thyroid**, **5**: 89–95. 1995 (b).

DAVIES, TERRY; RUSSELL MARIANS, AND RAUF LATIF. The TSH receptor reveals itself. **J Clin Invest**, **110**: 161–164. 2002.

DUPREZ L, PARMA J, VAN SANDE J, RODIEN P, DUMONT JE, VASSART G, ABRAMOWICZ M. TSH Receptor Mutations and Thyroid Disease. **Trends Endocrinol Metab**, **9**: 133-40. 1998.

ESKANDARI S, LOO DD, DAI G, LEVY O, WRIGHT EM, CARRASCO N. Thyroid Na⁺/I⁻ symporter. Mechanism, Stoichiometry, and Specificity. **J Biol Chem**, **272**: 27230-8. 1997.

ESPERANTE, SEBASTIÁN A., CARINA M. RIVOLTA, MARIELA CAPUTO, ROGELIO GONZÁLEZ-SARMIENTO AND HÉCTOR M. TARGOVNIK. Identification and characterization of new variants of three associated SNPs and a microsatellite in the TSH receptor gene which are useful for genetic studies. **Molecular and Cellular Probes**, **22**: 281-286. 2008.

FRANCO, D.B.; MARGOTTO, P.R. & ALMEIDA, R. **Hipotireoidismo Congênito. Assistência ao recém-nascido de risco**. 2ª edição. 2002.

GAGNÉ N, PARMA J, DEAL C, VASSART G, VAN VLIET G. Apparent congenital athyreosis contrasting with normal plasma thyroglobulin levels and associated with inactivating mutations in the thyrotropin receptor gene. **J Clin Endocrinol Metab**, **83**: 1771-5. 1998.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de histologia em cores**, 3ª edição: 317-321. 2007.

GILLAM, M.P. & KOOP, P. Genetic regulation of thyroid development. **Current Opinion in Pediatrics**, **13**: 358-363. 2001.

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**, **111**: 167–173. 1995.

GUYTON, A.C.; HALL, J.L. **Tratado de fisiologia médica**. 10ª edição. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2002.

HELDIN, N.-E.. GUSTAVSSON, B., WESTERMARK, K. AND WESTERMARK, B. A somatic point mutation in a putative ligand binding domain of the TSH receptor in a patient with autoimmune hyperthyroidism. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, **73**: 1374-1376. 1991.

HO SC, GOH SS, KHOO DH. HO SC, GOH SS, KHOO DH. Association of Graves' disease with intragenic polymorphism of the thyrotropin receptor gene in a cohort of Singapore patients of multi-ethnic origins. **Thyroid**, **13**: 523-8. 2003.

ISMAIL SI, MAHMOUD IS, AL-ARDAH M, ABDELNOUR A, YOUNES NA. Detection of combined genomic variants in a Jordanian family with familial non-autoimmune hyperthyroidism. **J Genet**, **88**: 233-8. 2009.

JINSONG ZHANG & MITCHELL A. LAZAR. The mechanism of action of thyroid hormones. **Annual Review of Physiology**, **62**: 439-466, 2000.

JORDAN N, WILLIAMS N, GREGORY JW, EVANS C, OWEN M, LUDGATE M. The W546X mutation of the thyrotropin receptor gene: potential major contributor to thyroid dysfunction in a Caucasian population. **J Clin Endocrinol Metab**, **88**: 1002-5. 2003.

JUNQUEIRA, L.C. **Histologia básica**, 9^a edição. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1999. Cap. 20.

KACZUR V, TAKACS M, SZALAI C, FALUS A, NAGY Z, BERENCSI G, BALAZS C. Analysis of the genetic variability of the 1st (CCC/ACC, P52T) and the 10th exons (bp 1012–1704) of the TSH receptor gene in Graves disease. **Eur J Immunogenet**, **27**: 17–23. 2000.

KEMPERS, M. J. E.; LANTING, C. I.; VAN HEIJST, A. F. J.; VAN TROTSBURG, A. S. P.; WIEDIJK, B. M.; DE VIJLDER, J.J.M.; VULSMA, T. Neonatal Screening for Congenital Hypothyroidism based on Thyroxine, Thyrotropin, and Thyroxine-Binding Globulin Measurement: Potentials and Pitfalls. **J Clin Endocrinol Metab**, **91**: 3370-3376. 2006.

KOTSA KD, WATSON PF, WEETMAN AP. No association between a thyrotropin receptor gene polymorphism and Graves' disease in the female population. **Thyroid**, **7**: 31–33. 1997.

LAW, W.Y.; BRADLEY, D.M.; LAZARUS, J.H.; JOHN, R.; GREGORY, J.W. Congenital Hypothyroidism in Wales (1982-1993): demographic features, clinical presentation and effects on early neurondevelopment. **Clinical Endocrinol**, **48**: 201-207. 1998.

LÖNN S, BHATTI P, ALEXANDER BH, PINEDA MA, DOODY MM, STRUEWING JP, SIGURDSON AJ. Papillary Thyroid Cancer and Polymorphic Variants in *TSHR*- and *RET*-Related Genes: a Nested Case-Control Study within a Cohort of U.S. Radiologic Technologists. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, **16**: 174-7. 2007.

LOOS U, HAGNER S, BOHR UR, BOGATKEWITSCH GS, JAKOBS KH, VAN KOPPEN CJ. Enhanced cAMP accumulation by the human thyrotropin receptor variant with the Pro52Thr substitution in the extracellular domain. **Eur J Biochem**, **232**: 62– 65. 1995.

MATSUO K, FRIEDMAN E, GEJMAN PV, FAGIN JA . The thyrotropin receptor (TSH-R) is not an oncogene for thyroid tumors: structural studies of the TSH-R and the alpha-subunit of Gs in human thyroid neoplasms. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, **76**: 1446-1451. 1993.

NUPAD-UFMG. Cartilha informativa do Núcleo de Pesquisa e Apoio ao Diagnóstico da Universidade Federal de Minas Gerais. 1999.

PALOS, F; O PEREZ, V ALVAREZ-IGLESIAS, J CAMESELLE, F BARREIRO, D ARAUJO, R ARGUESO, M BOTANA, JM CABEZAS, L DOMINGUEZ, T MARTINEZ, J NUÑO, JC RUEDA & J LADO-ABEA. Study of the prevalence and mechanisms of action of TSH receptor and Gs protein alfa-subunit mutations, in toxic multinodular goiter and toxic adenoma from Galicia (Spain). **Endocrine Abstracts**, **11**: 809. 2006.

PARK, S.M. & CHATTERJEE, V.K.K. Genetics of Congenital Hypothyroidism. **J. Med. Genet**, **42**: 379-389. 2004.

PNIEWSKA-SIARK B, JEZIOROWSKA A, BOBEFF I, LEWIŃSKI A. Analysis of physical and mental development of children with aplasia, hypoplasia and ectopy of the thyroid gland. **Endocr Regul**, **40**: 7-14. 2006.

POHLENZ J, PFARR N, KRÜGER S, HESSE V. Subclinical hyperthyroidism due to a thyrotropin receptor (*TSHR*) gene mutation (S505R). **Acta Paediatr**, **95**: 1685-7. 2006.

RAMOS HE, NESI-FRANÇA S, BOLDARINE VT, PEREIRA RM, CHIAMOLERA MI, CAMACHO CP, GRAF H, DE LACERDA L, CARVALHO GA, MACIEL RM. Clinical and molecular analysis of thyroid hypoplasia: a population-based approach in southern Brazil. **Thyroid**, **19**: 61-8. 2009.

REFETOFF, S.; DUMONT, J.; VASSAT, G. Thyroid disorders. In: **Metabolic and Molecular bases of Inherited Disease**. 8ª edição, 4029 – 4075. 2001.

RUSSO D, ARTURI F, SCHLUMBERGER M, CAILLOU B, MONIER R, FILETTI S, SUÁREZ HG. Activating mutations of the TSH receptor in differentiated thyroid carcinomas. **Oncogene**, **11**: 1907-11. 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.;MANIAATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York, Cold Spring Harbor, 1-p 626. 1989.

SETIAN NS. Hypothyroidism in children: diagnosis and treatment. **J Pediatr**, **83**: 209-16. 2007.

SIMANAINEN, JAANA; AMELIE KINCH; KERSTIN WESTERMARK; BRITA WINSÄ; MATS BENGTSSON; FRANK SCHUPPERT; BENGT WESTERMARK; NILS-ERIK HELDIN. Analysis of mutations in exon 1 of the Human Thyrotropin Receptor Gene: High Frequency of the D36H and P52T Polymorphic Variants. **Thyroid**, **9**: 7-11. 1999.

SBEM - SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Hipotireoidismo Congênito. Projeto diretrizes. 2005. Disponível em: < http://www.projetodiretrizes.org.br/4_volume/18-Hipotiroid.pdf> Acesso em: 10 de setembro de 2009.

STANBURY JB, ROCMANS P, BUHLER UK, OCHI Y. Congenital hypothyroidism with impaired thyroid response to thyrotropin. **N Engl J Med**, **21**: 1132–1136. 1968.

STEIN SA, OATES EL, HALL CR, GRUMBLES RM, FERNANDEZ LM, TAYLOR NA, PUETT D, JIN SX. Identification of a point mutation in the thyrotropin receptor of the hyt/hyt hypothyroid mouse. **Mol Endocrinol**, **8**: 129–138. 1994.

SUNTHORNTHEPVARAKUL T, KITVITAYASAK S, NGOWNGARMARATANA S, KONTHONG P, DEEROCHANAWONG C, SARINNAPAKORN V, PHONGVIRATCHAI S. Lack of association between a polymorphism of human

thyrotropin receptor gene and autoimmune thyroid disease. **J Med Assoc Thai**, **82**: 1214–1219. 1999.

SUNTHORNTHEPVARAKUL, THONGKUM; YOSHITAKA HAYASHI; SAMUEL REFETOFF. Polymorphism of a Variant Human Thyrotropin Receptor (hTSHR) Gene. **Thyroid**, **4**: 147-149. 1994.

TAHIROVIC, H. & TOROMANOVIC, A. Clinical presentation of primary congenital hypothyroidism: Experience before mass screening. **Bosn J Basic Med Sci**, **4**: 26-29. 2005.

TONACCHERA M, CETANI F, COSTAGLIOLA S, VAN SANDE J, REFETOFF S, VASSART G. Functional characteristics of a variant thyrotropin receptor. **Eur J Biochem**, **238**: 490–494. 1996.

TONACCHERA, MASSIMO & PINCHERA, ALDO. Editorial: Thyrotropin Receptor Polymorphisms and Thyroid Diseases. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, **85**: 2637-2639. 2000.

VAISMAN, MÁRIO, ROSENTHAL, DORIS AND CARVALHO, DENISE P. Enzimas envolvidas na organificação tireoideana do iodo. **Arq Bras Endocrinol Metab**, **48**: 9-15. 2004.

YUAN ZF, MAO HQ, LUO YF, WU YD, SHEN Z, ZHAO ZY. Thyrotropin receptor and thyroid transcription factor-1 genes variant in Chinese children with congenital hypothyroidism. **Endocr J**, **55**: 415-23. 2008.

www.armourthyroid.com/hypothyroidism/images/illustrations/thyroid.jpg

www.histol.chuvashia.com/atlas-en/endocrine-02-en.htm

www.nature.com/nrendo/journal/v3/n3/images/ncpendmet0449-f1.jpg

www.ehponline.org/members/2003/111-12/prodchart.jpg

<http://content.nejm.org/cgi/content/short/337/23/1675>

www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas

ANEXOS

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

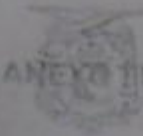
Eu manifesto meu consentimento com envolvimento no projeto de pesquisa intitulado:
**INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS D36H, P52T E N187N NOS ÉXONS 1 E 7
DO GENE *TSHR* EM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO NO
ESTADO DO PARÁ**

1. A natureza e objetivo do projeto de pesquisa foram explicadas a mim. Eu compreendo e concordo em participar.
2. Eu compreendo que não poderei ter benefício direto por participar do estudo.
3. Eu entendo os possíveis riscos e/ou efeitos adversos, desconfortos e inconveniências, como foi explicado a mim.
4. Eu compreendo que, apesar das informações obtidas no estudo poderem ser publicadas, elas serão confidenciais não serei identificado a partir delas.
5. Eu compreendo que posso me retirar do estudo em qualquer etapa.
6. Eu compreendo que não haverá pagamento para mim por participar deste estudo.
7. Eu estou ciente de que devo guardar uma cópia do Termo de Consentimento, quando completo.
8. Eu concordo que o material (sangue) coletado meu seja utilizado no projeto acima.

Ass: _____

Data:

ANEXO II

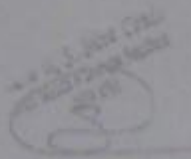

ANEXO II

GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ
FUNDAÇÃO SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DO PARÁ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

TERMO DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética em Pesquisa analisou no dia 08 de novembro de 2005 o projeto de pesquisa intitulado "ANÁLISE BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO NO ESTADO DO PARÁ", de autoria do discente ERIK ARTHUR CORTINHAS ALVES, Orientado pelo prof. Dr. LUIZ CARLOS SANTANA DA SILVA, obtendo APROVAÇÃO para a realização da pesquisa na Universidade Federal do Pará.

Belém, 13 de dezembro de 2005.


Dra. SIMONE CONDE
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da FSCMP