

Universidade do Minho. Escola de Ciências. Departamento de Biologia

**Rastreio molecular do gene da peroxidase da tiróide em doentes com
hipotiroidismo congénito**

Carina de Fátima Rodrigues

Braga 2004

Universidade do Minho. Escola de Ciências. Departamento de Biologia

**Rastreio molecular do gene da peroxidase da tiróide em doentes com
hipotiroidismo congénito**

Dissertação apresentada à Escola de Ciências da Universidade do Minho para a prestação de
provas de Mestrado em Genética Molecular.

Carina de Fátima Rodrigues

Braga 2004

O trabalho apresentado nesta tese foi realizado na Unidade de Genética Molecular do Instituto de Genética Médica Doutor Jacinto de Magalhães, sob a orientação da Dra. Maria do Rosário Santos.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Rosário por me ter possibilitado a realização desta tese, pela orientação prestada, pelos conhecimentos científicos que me transmitiu ao longo destes anos de trabalho no laboratório e pela amizade, o meu profundo agradecimento.

À Prof. Doutora Cândida Lucas pela disponibilidade ao longo do curso de mestrado, pelo incentivo e exemplo de rigor com que coordenou este curso, muito obrigada.

A todos os professores do curso de mestrado pelos ensinamentos e estímulo à investigação.

Ao Dr. Pires Soares pelo apoio científico prestado.

À Doutora Paula pelas sugestões formuladas durante a realização deste trabalho e por toda a amizade e apoio, o meu reconhecido agradecimento.

Às amigas do laboratório: Luísa, Manela, Sandra Brás, Sandra Pereira, D^a Fátima e Cristina agradeço a amizade, carinho, conselhos e todos os bons momentos que passamos juntas.

À minha amiga Emília pela ajuda incondicional, amizade e compreensão.

A todos os colegas de mestrado pelos agradáveis momentos e conhecimentos partilhados. Ao colega Jorge agradeço, em especial, o apoio que me dispensou na área da bioinformática.

Aos meus sogros e cunhados pela quotidiana e incansável ajuda e carinho. Muito obrigada.

Aos meus pais pela força, exemplo de dedicação ao trabalho e incentivo na concretização dos objectivos, a minha eterna gratidão.

Ao meu marido, quero agradecer todo o carinho, cumplicidade e sacrifício. A ele e aos nossos filhos, Margarida e David, dedico este trabalho.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Fisiologia da tiróide – aspectos gerais	2
1.1.1 Biossíntese das hormonas da tiróide	3
1.1.2 Controlo da síntese e secreção das hormonas da tiróide.	5
1.1.3 Metabolismo periférico das hormonas da tiróide	6
1.2 O hipotiroidismo congénito	8
1.2.1 Classificação	8
1.2.2 Manifestações clínicas	9
1.2.3 Etiologia - defeitos genéticos	11
1.3 A peroxidase da tiróide e o HC por disormonogénese.....	14
1.3.1 Bioquímica.....	14
1.3.2 Biologia molecular e estrutura da proteína	19
1.3.3 Defeitos na TPO.....	24
1.4. Diagnóstico e tratamento	26
1.4.1 Rastreo Neonatal.....	26
1.4.2 Diagnóstico do HC por disormonogénese.....	26
1.4.3 Tratamento	28
2. OBJECTIVOS	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. Doentes	32
3.2 Análise molecular	32
3.2.1 Material biológico.....	32
3.2.2 Análise conformacional das cadeias simples (SSCA).....	32
3.2.2.1 Sistema manual de geis	34
3.2.2.2 <i>PhastSystem</i>	35

3.2.3 Sequenciação	35
3.2.3.1 Purificação e quantificação do produto de PCR.....	35
3.2.3.2 Reacções de sequenciação	35
3.2.3.3 Purificação dos produtos de sequenciação	36
3.2.3.4 Electroforese capilar	36
3.2.4 Análise de restrição.....	37
3.2.5 Análise automática de fragmentos	37
3.3. Bioinformática	38
4. RESULTADOS	40
4.1 Rastreo de mutações	40
4.1.1 Polimorfismos	40
4.1.2 Mutações causais	42
4.1.2.1 Mutações já descritas na literatura	42
4.1.2.2 Mutações novas.....	44
4.1.2.3 Estudos de co-segregação.	44
4.1.3 Efeito deletério das mutações novas	53
4.2. Haplotipagem.....	56
5. DISCUSSÃO	59
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	66
7. BIBLIOGRAFIA	68
8. ANEXOS	84

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1. Estrutura das hormonas da tiróide e dos seus precursores.....	2
1.2. Esquema representativo dos principais passos da biossíntese das hormonas da tiróide.....	4
1.3. Regulação da síntese e secreção da hormona da tiróide.....	6
1.4. Estrutura das duas formas do composto I.....	15
1.5. Formação do composto I na TPO e LPO.....	16
1.6. Esquema geral de reacção das heme peroxidases.....	16
1.7. Esquema proposto para o mecanismo de ligação para a formação da T ₄ na molécula de tiroglobulina assumindo tratar-se de um mecanismo radical.....	18
1.8. Representação esquemática da sequência de cDNA e da sequência linear de aminoácidos da TPO humana e seus domínios.....	20
1.9. Mutações descritas no gene da TPO.....	24
4.1. Variante polimórfica, identificada no intrão 3 do gene da TPO (c.180-47A>C).....	41
4.2. Árvores geneológicas das famílias onde foram detectadas mutações causais.....	45
4.3. Mutação c.1978C>G (p.Q660E).....	46
4.4. Mutação c.1183_1186dupGGCC (p.396fsX76).....	46
4.5. Mutação c.1274A>G (p.N425S).....	47
4.6. Mutação c.1477G>A (p.G493S).....	48
4.7. Mutação c.2512T>A (p.C838S).....	49
4.8. Mutação c.2422delT (p.C808fsX23).....	50
4.9. Mutação c.391T>C (p.S131P).....	51
4.10. Mutação c.2748G>A.. (p.Q916/ <i>spl?</i>).....	52
4.11. Representação parcial do alinhamento da hTPO com outras peroxidases	53
4.12. Representação parcial da sequência aminoacídica da hTPO com os locais de glicosilação.....	54
4.13. Representação parcial da matriz de parâmetros do programa GENSCAN.....	55
4.14. Análise do marcador HumTPO.....	56
4.15. Haplotipagem das famílias onde foram identificadas as duas mutações mais frequentes c.1978C>G e c.1183_1186dupGGCC.....	57

ÍNDICE DE TABELAS

1.1. Classificação do hipotiroidismo congénito.....	10
3.1. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação das 18 regiões exónicas da TPO.....	33
3.2. Soluções utilizadas para as diferentes concentrações e tamanhos dos geis do sistema manual.....	35
3.3 Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do microsatélite HumTPO.....	37
4.1. Descrição das alterações polimórficas encontradas no rastreio molecular do gene da TPO	40
4.2. Dados clínicos, bioquímicos e moleculares dos doentes onde foram encontradas mutações no gene da TPO.....	43
4.3. Mutações causais identificadas em 13 doentes com HC no rastreio molecular do gene da TPO.....	44

RESUMO

O Hipotiroidismo congénito (HC) primário afecta cerca de 1:3000 a 1:4000 recém-nascidos e pode ser causado por defeitos na ontogenia da tiróide ou na hormonogénese. Nas duas últimas décadas houve grandes avanços na genética molecular, o que levou à caracterização de genes que são essenciais para o normal desenvolvimento e produção de hormonas do eixo hipotálamo-pituitária-tiróide e para a biossíntese da hormona da tiróide. Mutações identificadas nestes genes permitiram explicar a patogénese molecular de algumas formas de HC esporádicas e familiares.

Defeitos no gene da peroxidase da tiróide (TPO) têm sido descritos como causa de HC por deficiência na biossíntese da hormona tiróidea (disormonogénese). Pretendeu-se com este estudo determinar a frequência e natureza das mutações no gene da TPO em doentes com HC, com valores elevados da hormona do crescimento (TSH) e com localização normal da tiróide, identificados no Programa Nacional de Diagnóstico Precoce.

O estudo incidiu sobre 55 doentes, de 52 famílias não relacionadas, que frequentam as consultas programadas de endocrinologia dos centros de tratamento do Porto e Lisboa. O rastreio molecular do gene da TPO foi realizado recorrendo à técnica de SSCA (*Single Strand Conformational Analysis*) seguida de sequenciação dos fragmentos que apresentavam alterações no padrão de migração. Foram identificadas 8 mutações causais e 15 variantes polimórficas em 13 dos doentes rastreados (7 homocigotos, 6 heterocigotos compostos). Foram identificadas 4 mutações novas, 3 do tipo missense, c.391T>C (p.S131P), c.1274A>G (p.N425S), c.2512T>A (p.C838S) e uma com possível alteração *splicing*, c.2748G>A. Foi ainda detectada uma variante polimórfica no intrão 3, c.180-47A>C, ainda não descrita na literatura.

Das mutações detectadas as mais frequentes foram c.1978C>G (p.Q660E) e c.1183_1186dupGGCC (p.R396fsX76). No sentido de inferir sobre a origem destas duas mutações mais frequentes foi realizada a haplotipagem dos doentes e familiares utilizando os polimorfismos intragénicos. Os resultados sugerem uma origem comum para cada uma delas.

Este é o primeiro estudo molecular realizado em doentes Portugueses com HC para estabelecer a etiologia da doença devido a um defeito na hormonogénese. A proporção de doentes onde foram identificadas mutações no gene da TPO (aproximadamente 24% da nossa amostra) justifica a implementação do rastreio molecular.

ABSTRACT

Congenital primary hypothyroidism (CH) affects about 1:3000 to 1:4000 infants and may be caused by defects in thyroidal ontogeny or hormone synthesis. In the past two decades, there were impressive advances in molecular genetics that lead to characterization of numerous genes that are essential for normal development and hormone production of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and for normal thyroid hormone synthesis. Mutations identified in these genes allowed the molecular characterization of several sporadic and familial HC forms.

Defects in the thyroid peroxidase (TPO) gene are reported to be one of the causes of congenital hypothyroidism (CH) due to thyroid hormone biosynthesis defect (thyroid dysmorphogenesis). The aim of the present study was to determine the nature and frequency of TPO gene mutations in patients with CH, characterized by elevated thyroid stimulating hormone (TSH) levels and orthopedic thyroid gland, identified in the Portuguese National Neonatal Screening Programme.

The sample comprised 55 patients, from 52 unrelated families, with follow-up in the endocrinology clinics of the treatment centres of Porto and Lisbon. Mutation screening in the TPO gene (exons 1-17) was performed by single-strand conformational analysis (SSCA) followed by sequencing of fragments with abnormal migration patterns.

Eight different mutations were detected in 13 patients (7 homozygotes, 6 compound heterozygotes). Novel mutations included 3 missense mutations namely c.391T>C (p.S131P), c.1274A>G (p.N425S), c.2512T>A (p.C838S) as well as the predictable splice mutation c.2748G>A. The undocumented polymorphism c.180-47A>C, was also detected.

The two most frequent mutations were c.1978C>G (p.Q660E) and c.1183_1186dupGGCC (p.R396fsX76). In order to establish the genetic background associated to these two most frequent mutations, haplotype analysis was done in patients and relatives using intragenic markers. The results suggested a common origin for each of these mutations.

This is the first molecular study ever performed in Portuguese CH patients to establish the aetiology of CH due to a hormonogenic defect. The large proportion of patients found to have TPO mutations (approximately 24% of our sample) justifies the implementation of routine molecular testing.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

a.v.h	volts acumulados / hora
CCP	Proteína de controlo complementar
CcP	Citocromo <i>c</i> oxidase
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar ao mRNA
cm	centímetros
DIT	Diiidotirosina
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Factor de crescimento epidermal
EPO	Peroxidase eosinófila
HC	hipotiroidismo congénito
HTs	Hormonas da tiróide
hTPO	Peroxidase da tiróide humana
LPO	Lactoperoxidase
MIT	Monoiodotirosina
min	minuto
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NIS	Transportador sódio -iodo, Na ⁺ /I ⁻ Simporte
dNTP	Trifosfato desoxinucleotídeo
PCR	Reacção em cadeia da polimerase
r.c.f	Força centrífuga do rotor
rT ₃	Triiodotironina reversa
s	segundo
SNPs	Polimorfismos de variação de um único nucleotídeo
SPO	Peroxidase salivar
SSCA	Análise de polimorfismos de conformação em cadeia simples
T ₃	Triiodotironina
T ₄	Tetraiodotironina ou Tiroxina
Tg	Tiroglobulina
TG	Gene da tiroglobulina
TGB	Globulina ligadora da tiroxina
TPO	Peroxidase da tiróide
TRH	Hormona libertadora da tirotropina
TSH	Hormona estimuladora da tiróide (tirotropina ou hormona do crescimento)

Os aminoácidos serão citados pelo código de uma letra

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fisiologia da tiróide – aspectos gerais

A principal função da glândula da tiróide é a produção de hormonas essenciais para a regulação do consumo energético, crescimento, desenvolvimento e maturação de vários órgãos. Para que haja uma produção normal de hormonas é necessário um desenvolvimento normal da glândula, funcionamento e regulação adequados do mecanismo da sua biossíntese e um normal aporte de iodo, principal constituinte destas hormonas e regulador da sua função.

A estrutura microscópica desta glândula é bastante distinta. Apresenta uma camada externa de células epiteliais que rodeia um material amorfo denominado colóide. Estas estruturas constituem os folículos, a unidade funcional da tiróide e encontram-se em estreito contacto com vasos sanguíneos, vasos linfáticos e terminações nervosas adrenérgicas. O colóide é composto principalmente de tiroglobulina (Tg) e uma pequena parte de tiroalbumina iodada. A tiroglobulina é uma grande glicoproteína homodimérica de 660 kDa que é sintetizada pelas células da tiróide e secretada para o lúmen do folículo (Delangue, 1990). A principal função das células foliculares é a síntese e secreção das hormonas da tiróide (HTs), a 3,5,3',5'tetraiodotironina (tiroxina ou T₄) e a 3,5,3' triiodotironina (T₃). O iodo liga-se aos anéis fenólicos dos resíduos de tirosina da Tg para dar origem a iodotirosinas, a monoiodotirosina (MIT) e a diiodotirosina (DIT), que são precursoras das HTs (figura 1.1).

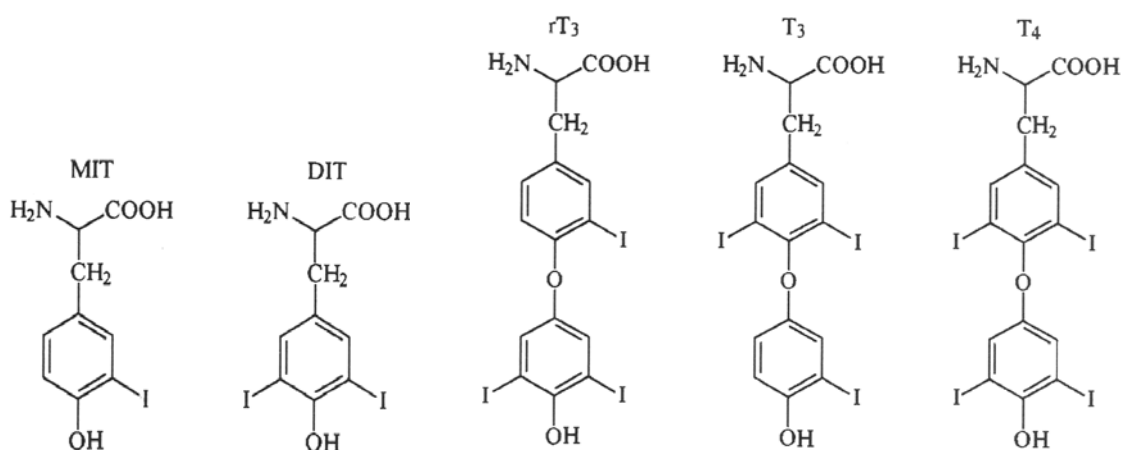


Figura 1.1 Estrutura das hormonas da tiróide e dos seus precursores. MIT, 3-Monoiodotirosina; DIT, 3,5-Diiodotirosina; rT₃, 3,3',5'triiodotironina inactiva ou T₃ reverso; T₃, 3,5,3'triiodotironina; T₄, 3,5,3',5'tetraiodotironina (adaptado de Whitley *et al*, 1996).

1.1.1 Biossíntese das hormonas da tiróide

Segundo Taurog, (2000), a biossíntese das hormonas da tiróide compreende seis passos distintos: transporte activo de iodeto (I^-) para dentro das células foliculares; iodização dos resíduos de tirosina na Tg; ligação das moléculas de iodotirosina na Tg; clivagem proteolítica da Tg para libertação das iodotirosinas e iodotironinas; desiodação das iodotirosinas na tiróide com a reutilização do iodeto libertado; desiodação da T_4 e T_3 pelas desiodases tipo I e tipo II presentes na tiróide (figura 1.2).

No tracto gastrointestinal o iodo (I_2) ingerido é transformado em iodeto (I^-) que é rapidamente absorvido pela corrente sanguínea. O transporte de I^- para dentro das células foliculares é o primeiro passo para a biossíntese das HTs. É realizado através de um transporte activo onde intervém uma proteína transportadora do tipo simporte Na^+/I^- (NIS; Levi *et al*, 1997). A concentração de iodeto no interior das células da tiróide, pode aumentar 20 a 40 vezes em relação à sua concentração no plasma (De La Vieja *et al*, 2000), constituindo um mecanismo de adaptação que permite manter a produção normal de HTs mesmo quando o aporte de iodo na dieta é baixo. Além da tiróide outros órgãos concentram o iodeto (glândulas salivares, mucosa gástrica, glandulas mamárias, plexus coroideus e a placenta) mas não são capazes de o organificar (Delangue, 1990).

A biossíntese das HTs inicia-se com a oxidação do iodeto seguida da iodização dos resíduos de Tg dando origem às iodotirosinas (MIT e DIT). Uma molécula de DIT e uma de MIT ligam-se para formar T_3 e duas de DIT ligam-se para formar T_4 (ligação ou *coupling*). Estas reacções são catalizadas por uma enzima, a peroxidase da tiróide (TPO; DeGroot e Niepomniszcze, 1977), na presença de H_2O_2 . A TPO é a enzima chave da hormonogénese e o seu papel neste processo será abordado mais à frente, com mais pormenor.

Após a iodização e ligação das iodotirosinas estas permanecem ligadas à Tg. Para se libertarem da molécula de Tg terá que ocorrer, previamente, uma reabsorção de colóide pela célula através de um mecanismo de endocitose mediado (Dunn e Dunn, 2001). Pequenas gotículas de colóide, contendo Tg, formam-se na superfície apical da célula folicular. Estas gotículas entram na célula e fundem-se com lisossomas formando fagolisossomas. As proteases que intervêm neste processo são as catepsinas B e L, e com menor relevância a catepsina D (Dunn, 1991). Quebram-se as ligações peptídicas entre os aminoácidos iodizados e a Tg formando-se T_3 , T_4 , MIT e DIT que são libertados para a célula. As hormonas T_3 e T_4 difundem-se na circulação sistémica. Apenas 20% de T_3 circulante é secretada pela tiróide a

restante é produzida por desiodação da T_4 em tecidos periféricos. A desiodação das iodotironinas é levada a cabo por enzimas da família das selenoproteínas: a desiodase tipo I (Berry *et al*, 1991), a desiodase tipo II (Croteau *et al*, 1996) e a desiodase tipo III (Croteau *et al*, 1995). MIT e DIT permanecem nas células foliculares onde são desiodadas pelas

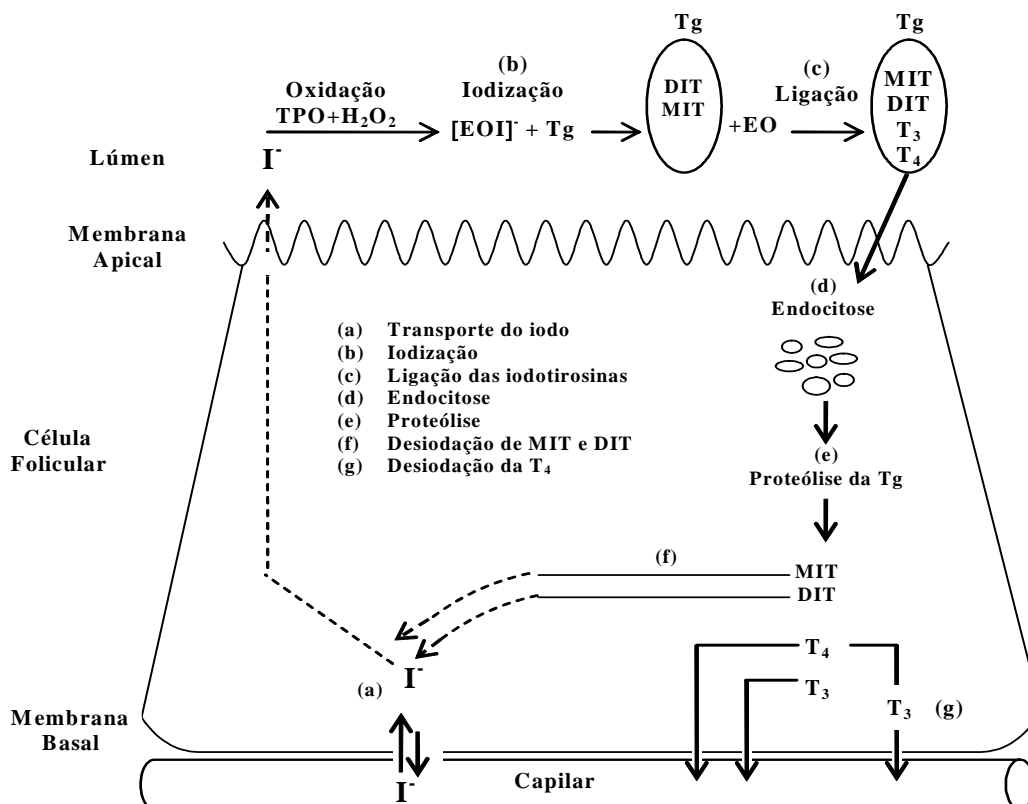


Figura 1.2 Esquema representativo dos principais passos da biossíntese das hormonas da tiróide. EO: produto de reacção da enzima nativa com o H_2O_2 - composto I (adaptado de Taurog, 2000).

desiodases específicas para as iodotirosinas e o iodeto libertado constitui uma importante fonte para a produção de mais HTs (Rosemberg e Goswami, 1979). No interior das células da tiróide, uma fracção indeterminada de T_4 também é desiodada a T_3 por desiodases 5' (tipo I e tipo II) semelhantes às encontradas nos tecidos periféricos (Chanoine *et al*, 1993).

1.1.2 Controlo da síntese e secreção das hormonas da tiróide.

A síntese e a secreção das HTs são reguladas principalmente pela hormona estimuladora da tiróide (TSH ou tirotropina) e pela concentração de iodeto no soro (Whitley *et al*, 1996). A TSH é uma hormona produzida pela glândula pituitária. Esta glândula recebe sinais do hipotálamo que estimulam a libertação de hormonas que afectam grande parte das funções do organismo. A TSH apresenta receptores nas células epiteliais da tiróide e estimula a glândula a produzir e secretar as HTs, aumentando tamanho e número de células foliculares e alterando o metabolismo intratiroidal (Taurog, 2000; Dunn, 2001). Os efeitos da TSH incluem: aumento da transcrição dos genes da tiroglobulina (*TG*), da peroxidase da tiróide (*TPO*) e do transportador Na^+/I^- (*NIS*), através da estimulação dos factores de transcrição; aumento da produção de peróxido de hidrogénio; alteração da distribuição da TPO; aumento dos níveis de T_3 relativamente à T_4 ; alteração da distribuição da T_4 nos resíduos de tirosina da Tg; clivagem das ligações peptídicas associadas ao iodo; formação de gotículas de colóide; activação das catepsinas B e L nos lisossomas. A síntese e secreção da TSH é, por sua vez, estimulada pela hormona libertadora da tirotropina (TRH) um tripeptídeo que é secretado pelos neurónios hipotalâmicos e que apresenta receptores nas células da pituitária anterior (figura 1.3). A produção das hormonas TSH e TRH é controlada pelos níveis de T_3 e T_4 no sangue por um mecanismo retroactivo negativo clássico (*feedback negativo*). Quando os níveis de T_3 e T_4 no sangue aumentam inibem a produção de TSH e TRH que assim deixam de estimular as células epiteliais da tiróide diminuindo a síntese e secreção das HTs. Quando os níveis de T_3 e T_4 no sangue decaem, o controlo retroactivo deixa de ter efeito na produção de TSH e TRH, voltando a existir estimulação das células epiteliais. A este mecanismo de controlo destas hormonas dá-se o nome de eixo hipotalâmico-hipofisiário-tiroideu (Greenspan, 2004).

A disponibilidade de iodo é outro factor importante na regulação da síntese das HTs, alterando a sensibilidade da tiróide à TSH num processo que é designado por “autorregulação da tiróide” (Cavalieri, 1997). O excesso de iodo exerce geralmente um efeito inibitório, levando a um bloqueio do mecanismo de iodização, através da diminuição de produção de H_2O_2 (efeito Wolff-Chaikoff), inibindo a síntese de hormonas. Baixos níveis de iodo levam a um incremento da estimulação pela TSH, aumentam o transporte de iodo para dentro da célula, aceleram o *turnover* do iodo e estimulam a produção de T_3 em detrimento da T_4 .

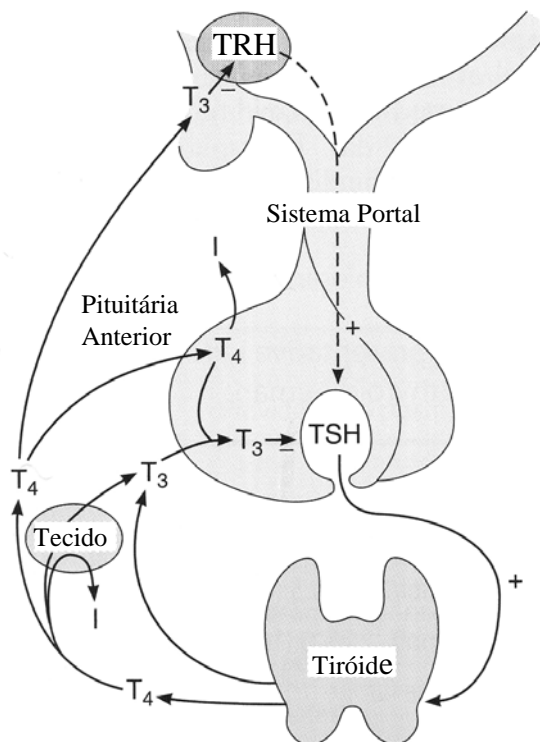


Figura 1.3 Regulação da síntese e secreção das hormonas da tiróide - Eixo hipotálamico-hipofisiário-tiroideu. (adaptado de Greenspan, 2004).

Suzuki *et al*, (1998) sugerem que a Tg pode, selectivamente, alterar a expressão dos factores de transcrição como *TTF-1* (factor de transcrição da tiróide-1), *TTF-2* (factor de transcrição da tiróide-2) e *Pax-8* (*paired box transcription factor*) suprimindo a expressão génica de *NIS*, *TPO*, *TG* e o receptor da TSH. A Tg poderá assim influenciar a iodização e a formação das hormonas através da regulação da sua própria síntese e a síntese de outras proteínas que intervêm na iodização.

1.1.3 Metabolismo periférico das hormonas da tiróide

Uma vez libertadas, as HTs vão estar no soro ligadas a proteínas plasmáticas transportadoras (LaFranchi, 2000). Por exemplo, cerca de 70% da T₄ circulante está ligada a globulina ligadora da tiroxina (TBG). Com menor importância a nível de transporte, está a pré-albumina ligadora da tiroxina (transtirretina) e a albumina. Apenas 0.03% da T₄ não está ligada a estas proteínas designa-se por T₄ livre. A importância biológica deste transporte por

parte das proteínas ligadoras ainda não é conhecida, no entanto, a possibilidade de algumas intervirem no transporte das hormonas para determinadas regiões do corpo ainda não foi excluída (Dunn e Dunn, 2001).

São as hormonas livres que vão entrar na célula, atravessando a membrana e o citosol, através de um transportador específico ou por difusão passiva, para se ligarem a um receptor no núcleo. Após a entrada na célula a T_4 é desiodada a T_3 e é a concentração intracelular de T_3 que determina o grau de ligação aos receptores nucleares regulando assim a resposta biológica às HTs (Brent, 1994). Estes receptores ligam-se a locais de elementos de resposta no DNA (*response element*) localizadas a jusante do início da transcrição em promotores de genes específicos. A ligação da T_3 a estes receptores pode resultar na estimulação ou inibição da transcrição destes genes.

A função primária das HTs é a regulação do consumo energético e são indispensáveis para o crescimento, desenvolvimento e maturação dos mamíferos. Entre outras funções destas hormonas incluem-se o estímulo da frequência e força da contracção cardíaca, estímulo da síntese proteica e do metabolismo glicídico, aumento de síntese e degradação do colesterol e triglicérides aumento das necessidades vitamínicas e potencialização da sensibilidade dos receptores β -adrenérgicos às catecolaminas (Whitley *et al*, 1996).

Todos estes aspectos da fisiologia da tiróide são importantes para a compreensão da produção e regulação hormonal. Defeitos num destes mecanismos poderão traduzir-se em alterações da sua função.

1.2 O hipotiroidismo congénito

O hipotiroidismo congénito (HC) primário é das doenças metabólicas mais comuns na infância. Caracteriza-se por uma perturbação da função tiroideia devido a uma deficiente produção da hormona da tiróide (HT) ou de uma deficiente actividade receptora hormonal. Um défice de HT num estágio inicial do desenvolvimento, resulta não só num hipometabolismo generalizado como também em danos cerebrais que a nível clínico se manifestam na forma de atraso mental irreversível (Andersen, 1961). Assim, durante muito tempo, o termo cretinismo foi utilizado como sinónimo de HC.

Tendo-se verificado que quanto mais cedo se estabelecesse o diagnóstico e a terapia de substituição do HC, maiores seriam as probabilidades de evitar danos a nível neurológico nas crianças afectadas (Klein, 1972), muitos países introduziram o rastreio neonatal de HC tão cedo quanto possível. Em Portugal, o Programa Nacional de Diagnóstico Precoce teve início em finais de 1979 com o rastreio da fenilcetonúria e em 1981 passou a incluir também o rastreio de HC. O programa, comumente chamado de “Teste do Pezinho”, decorre até hoje no Instituto de Genética Médica Doutor Jacinto de Magalhães (IGMJM) e é de extrema importância uma vez que permite o diagnóstico e tratamento precoce das duas doenças. Para além de beneficiarem os doentes e suas famílias, estes programas permitiram, ao longo do tempo, a produção de informação no domínio da epidemiologia, patofisiologia, diagnóstico e tratamento destas doenças.

A incidência do HC primário a nível global, em regiões em que o iodo é suficiente, é de 1/3.000 a 1/4.000 nascimentos mas existe uma variação maior em algumas populações. Por exemplo, em populações Afro-americanas a incidência é apenas de 1/10 000 (Roberts *et al*, 1997). É também mais frequente no sexo feminino. Em Portugal, a incidência é cerca de 1/3.200 e a taxa de cobertura de rastreio, a nível nacional, ronda os 95,5% (Relatório de actividades - IGMJM, 2003).

1.2.1 Classificação

Foley (2000) classifica o HC em 4 grupos principais: hipotiroidismo permanente esporádico, hipotiroidismo permanente primário, hipotiroidismo permanente hipotalâmico-pituitário e hipotiroidismo transitório (tabela 1.1). O HC é permanente quando a deficiência na produção das hormonas da tiróide persiste durante toda a vida do doente, e transitório

quando é detectado no momento do rastreio e espontaneamente desaparece. O HC é primário quando a tiróide é lesada ou incapaz de produzir uma quantidade normal de T_3 e T_4 . Pode ocorrer em condições hereditárias, nas quais a síntese das hormonas é insuficiente ou por remoção ou destruição de tecido tiroideu por cirurgia ou tratamento com iodo radioactivo (Foley, 2000). O HC secundário resulta de doenças hipofisiárias ou hipotalâmicas (hipotiridismo hipotalâmico-pituitário).

A causa mais comum para o HC, em todo o mundo, é a falta de iodo. Classifica-se como hipotiridismo transitório porque uma vez restabelecida a quantidade de iodo necessária na dieta a produção de hormonas da tiróide normaliza. O HC transitório pode dever-se, também, à exposição materna ou neonatal ao iodo, à utilização de terapias com iodo radioactivo na gravidez e a uma disormonogénese transitória que só é detectada quando a criança é sujeita a uma interrupção da terapia (Delangue, 1990). O HC transitório pode também resultar da passagem, através da placenta, de anticorpos maternos que inibem a ligação da TSH ao seu receptor, no feto. Deve ser averiguado se a mãe apresenta historial de doença autoimune (LaFranchi, 2000). Doenças como a síndrome de Down e nefrose congénita são exemplos de patologias que, transitoriamente, poderão originar o aparecimento de HC.

Em regiões em que a quantidade de iodo é suficiente, a disgenesia (anomalia no desenvolvimento da glândula da tiróide) é a causa mais comum de HC. A disgenesia da tiróide inclui: agenesia (ausência da glândula), ectopia (localização ectópica da glândula) e hipoplasia. Está incluída no hipotiridismo congénito permanente esporádico porque, exceptuando os casos raros onde se conhece o defeito na embriogénese da tiróide, as causas não são conhecidas. Compreende cerca de 80% dos casos, e nos restantes o HC é causado por deficiência hereditária num dos passos da hormonogénese (disormonogénese) ou devido a alterações na glândula pituitária e/ou hipotálamo (Krude *et al*, 2000).

1.2.2 Manifestações clínicas

Qualquer que seja a causa do HC é clinicamente difícil de o reconhecer no período neonatal uma vez que existe a transferência de T_4 mãe-feto ao nível da placenta. Esta transferência, faz com que a redução das HTs seja, nalguma extensão, mitigada e os sintomas

Tabela 1.1. Classificação do Hipotiroidismo Congénito (adaptado de Foley, 2000).**Hipotiroidismo permanente esporádico**

Disgenesia da tiróide
Agenesia
Ectopia
Hipoplasia
Exposição materna ao iodo radioactivo
Toxoplasmose congénita
Defeitos genéticos na embriogénese

Hipotiroidismo permanente primário

Perda de função do receptor da TSH (resistência à TSH)
Hormonogénese
Defeito no transporte do iodo
Defeito na peroxidase da tiróide
Defeito na síntese da Tg
Defeito na desidases das iodotirosinas

Hipotiroidismo permanente hipotalâmico-pituitário

Múltiplas deficiências nas hormonas hipotalâmicas
Idiopático
Familiar
Associado a defeitos anatómicos do Sistema Nervoso Central
Deficiência na TRH
Deficiência na TSH
Mutação na subunidade β da TSH com perda de função

Hipotiroidismo transitório

Falta de iodo
Exposição materna ou neonatal ao iodo
Terapia materna com drogas antitiroideias
Anticorpos maternos bloqueadores do receptor da TSH
Disormonogénese transitória
Defeito oxidativo
Nefrose congénita
Concentração elevada de TSH idiopática
Isolado
Síndrome de *Down*
Hipotiroidismo primário idiopático

se façam sentir mais tarde. Estima-se que a concentração de HTs no feto seja 33% do valor normal (LaFranchi, 2000). Este valor é suficiente para manter o equilíbrio hormonal, no entanto, é suficientemente baixo para provocar o aumento dos níveis de TSH (devido ao mecanismo de *feedback* negativo), permitindo a detecção da maior parte dos casos de HC nos rastreios neonatais.

A sintomatologia de um recém-nascido com HC é rara e não específica (Delangue e Czernichow, 1990). A severidade da doença vai depender do tempo que a criança esteve sujeita a um estado hipofunção tiroideia. Um quadro clínico de HC severo pode incluir: hipotonia, mixedema, distensão abdominal, bradicardia, dificuldade em se alimentarem; choro rouco; macroglossia; icterícia prolongada; septo nasal incompleto, fontanelas posteriores alargadas, obstipação, hipotermia, atraso na maturação óssea e hérnia umbilical (Andersen *et al*, 1961; Foley *et al*, 1983). Trata-se, normalmente, de crianças que receberam grandes quantidades de anticorpos bloqueadores dos receptores da TSH durante a gestação ou apresentam agenesia da tiróide ou defeito completo na hormonogénese. É possível que estes doentes possam evidenciar mais tarde alterações no desenvolvimento neurológico (De Vijlder e Vulsma, 2000). A presença de bócio é rara e sugere defeito na biossíntese da hormona da tiróide (Delangue e Czernichow, 1990). No entanto, a maior parte dos indivíduos com HC são detectados no rastreio neonatal e apresentam poucos ou nenhuns sinais de hipotiroidismo. As manifestações clínicas só seriam evidentes após 2 a 3 meses de idade, caso a terapia de substituição não fosse introduzida.

1.2.3 Etiologia - defeitos genéticos

O diagnóstico precoce do HC, ainda antes de qualquer manifestação clínica da doença, aumentou a necessidade de uma classificação etiológica e neste aspecto a biologia molecular tem vindo a contribuir para a classificação de algumas formas hereditárias.

Defeitos no hipotalâmo e pituitária

O HC hipotalâmico-pituitário pode ser causado por defeitos no desenvolvimento do sistema regulador da tiróide ou falha na síntese de TSH devido a mutações em genes estruturais ou reguladores (De Vijlder *et al*, 2003). Defeitos genéticos na ontogenia da glândula pituitária podem resultar em várias combinações de deficiências de hormonas

incluindo a TSH. Existem factores de transcrição, *POU1F1*, *PROP1*, *LHX3*, *HEX1*, que estão envolvidos no desenvolvimento da glândula pituitária. Mutações nos genes que codificam para estes factores podem provocar alterações da secreção da TSH. Defeitos no receptor da TRH (hormona libertadora da TSH) também podem originar HC. Foi descrito um caso de HC em que havia completa ausência de resposta da prolactina e TSH à TRH (Collu *et al*, 1997). Mutações identificadas na subunidade β da TSH foram descritas em doentes com HC. Esta deficiência isolada da TSH é transmitida de forma autossómica recessiva (De Vijlder *et al*, 2003).

Defeitos na organogénese da tiróide

O espectro de defeitos no desenvolvimento da tiróide, agenesia, ectopia e hipoplasia, não eram considerados como defeitos hereditários. No entanto, algumas famílias com múltiplas ocorrências de disgenesia foram descritas e estima-se que representem 2% do total de casos (Castanet *et al*, 2001). O facto da prevalência desta doença apresentar grandes variações nos diferentes grupos populacionais, maior prevalência no sexo feminino e muitas vezes malformações associadas sugere a presença de factores genéticos na patogénese da doença (Devos *et al*, 1999).

Os maiores avanços na compreensão dos mecanismos patogénicos da disgenesia da tiróide advêm da descoberta dos genes que codificam para factores de transcrição que regulam a normal indução, migração, diferenciação e expressão de genes específicos da tiróide como sendo o *TTF-1* (Guazzi *et al*, 1990), *TTF-2* (Zanini *et al*, 1997) e *Pax-8* (Plachov *et al*, 1990).

Foram identificadas mutações no gene *TTF-1* que resultam em HC, com grau de severidade variável, e outras alterações como por exemplo hipotonia muscular e problemas pulmonares (Devriendt *et al*, 1998; Krude *et al*, 2000). No gene *TTF-2*, foram descritas mutações do tipo *missense* associadas a agenesia da tiróide e outras malformações (Clifton-Bligh *et al*, 1998). No gene *Pax-8* todas as mutações são monoalélicas e associadas a uma variável expressão fenotípica, ectopia ou hipoplasia com HC mais ou menos severo (Congdon *et al*, 2001).

Defeitos na biossíntese das hormonas da tiróide

Defeitos em qualquer uma das proteínas intervenientes na biossíntese das hormonas da tiróide podem estar na origem de HC. São vários os genes candidatos, no entanto, estudos de análise de ligação génica (Manglabruks *et al*, 1991) e o grande número de mutações identificadas em doentes com HC mostraram que defeitos na peroxidase da tiróide (TPO) são a causa mais comum no HC por disormonogénese.

As reacções de iodização e ligação estão dependentes da presença do peróxido de hidrogénio que funciona como cofactor essencial da TPO. Duas NADPH oxidases, *THOX 1* e *THOX2*, que poderão fazer parte do sistema gerador de H₂O₂, foram clonadas (De Deken *et al*, 2000). Alterações na sequência do gene *THOX2* foram descritas em vários doentes com defeito total na organificação do iodo (Moreno *et al*, 2002).

Defeitos no transporte do iodo podem ser devidos a mutações no gene do transportador Na⁺/I (*NIS*) ou no gene da pendrina (*SCL26A4* ou *PDS*, que codifica para uma proteína envolvida no efluxo de iodo através da membrana apical). Foi provado que mutações identificadas no gene *NIS*, em doentes com HC, eram a causa da doença (De La Viedja *et al*, 2000). Mutações no gene *PDS* são responsáveis pela síndrome de Pendred (surdez neurosensorial). Alguns destes doentes apresentam também HC (Everett *et al*, 1997).

Neste grupo de defeitos da hormonogénese temos também a resistência à TSH que resulta de alterações da via reguladora da TSH. Na origem podem estar mutações no gene do receptor da TSH ou proteínas que estejam envolvidas na via de sinalização, como a proteína G, a adenil ciclase e outras cinases (Xie *et al*, 1997).

A Tg é uma proteína muito importante na síntese e armazenamento das hormonas da tiróide. Mutações no gene da Tg têm sido descritas em doentes com HC (Medeiros-Neto, 1993).

Para que as hormonas sejam libertadas na corrente sanguínea a Tg entra na célula folicular e é hidrolizada libertando T₄, T₃ e as iodotirosinas MIT e DIT que são desiodadas sendo o iodo reciclado para a formação de mais hormonas. Apesar de ainda não estarem molecularmente caracterizados, pensa-se que defeitos nas desiodases estarão também na origem de HC por disormonogénese.

1.3 A peroxidase da tiróide no HC por disormonogénese

1.3.1 Bioquímica

A peroxidase da tiróide (TPO; MIM#606765) é uma proteína glicosilada, com um grupo prostético heme, ligada à membrana. É sintetizada no retículo endoplasmático rugoso da célula folicular e é transferida para a membrana apical através de elementos do complexo de Golgi e vesículas exocíticas onde catalisa duas reacções importantes na hormonogénese, a iodização dos resíduos de tirosina na tiroglobulina e a ligação das tirosinas iodizadas (*coupling*) para a formação das hormonas T₄ e T₃ (DeGroot e Niepomnische *et al*, 1977).

Na hormonogénese o iodeto (I⁻), a forma com que o iodo entra na glândula da tiróide, tem que ser primeiro oxidado para um estado de oxidação mais elevado antes que consiga actuar como um agente iodizante. Dos agentes oxidantes biológicos, suficientemente fortes, que se conhecem, apenas o H₂O₂ e o O₂ são suficientemente potentes para oxidar o iodo. Cedo se percebeu que este passo envolveria uma peroxidase (Taurog, 1964). A maior parte dos estudos de mecanismos de acção das peroxidases têm sido realizadas em plantas e fungos. A peroxidase de rábano e a citocromo *c* oxidase de levedura têm sido os exemplos mais utilizados nestas experiências.

Mecanismo de iodização

O grupo prostético heme consiste num átomo de ferro coordenado no centro de um sistema de pirrol conhecido por protoporfirina. Este grupo prostético é fundamental para a sua actividade catalítica. No caso da TPO e LPO, o ferro do grupo heme apresenta-se na forma férrica (Fe^{III}; Taurog, 2000). O produto de reacção da enzima nativa com o H₂O₂ é designado por composto I em que há oxidação envolvendo dois electrões (R-Fe^{IV}.⁺ = 0). O produto da redução de um electrão do composto I é conhecido por composto II (R-Fe^{IV} = 0; Taurog, 2000).

Baseados em estudos estruturais da citocromo *c* oxidase, Poulos (1988) propôs um mecanismo geral para formação deste composto I que envolve dois resíduos de histidina da proteína localizados em dois pólos opostos do grupo heme. Temos a histidina proximal, que se apresenta ligada ao ferro do grupo heme e histidina distal que se localiza junto da ligação do grupo heme à proteína. A histidina distal, conjuntamente com um resíduo de

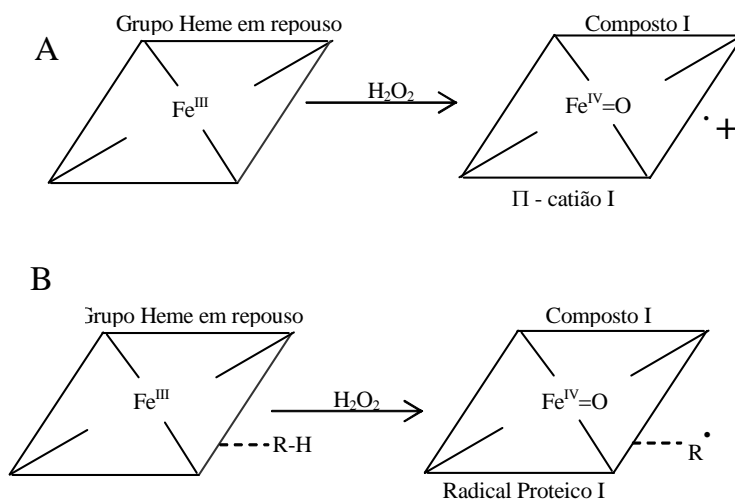


Figura 1.4 Estrutura das duas formas do composto I. (A) forma de radical π -catião porfirina oxoferril; o composto I da peroxidase de rábano existe exclusivamente nesta forma. (B) forma radical oxoferril proteico; a forma do composto I na citocromo *c* oxidase existe exclusivamente nesta forma e, neste caso, o segundo electrão é doado por um resíduo (R) de triptofano (adaptado de Taurog *et al*, 1996).

arginina, participa na clivagem da ligação O-O do grupo heme. Esta funciona também como catalisador ácido-base. O composto I pode existir sob duas formas diferentes: radical π -catião porfirina oxoferril (ou π -catião I) e radical oxoferril proteico (Taurog *et al*, 1996).

Na primeira forma do composto I um dos electrões é retirado do ferro formando o grupo oxoferril e o segundo electrão é removido do anel de porfirina ($\cdot+$). O composto I da peroxidase de rábano existe exclusivamente nesta forma de π -catião I. Na segunda forma do composto I, o segundo electrão é doado por um resíduo, que no caso da citocromo *c* oxidase é um resíduo de triptofano que se localiza próximo do composto I (figura 1.4).

A figura 1.5 mostra a formação do composto I na TPO e LPO (lactoperoxidase). A adição de H_2O_2 à enzima em repouso leva à formação do composto I na forma de π -catião I (Ohtaki *et al*, 1981). Nestas enzimas, o composto I é bastante instável quando não tem substrato disponível isomeriza e dá origem à forma de radical proteico (Courtin *et al*, 1982).

Iodização da tiroglobulina

A Tg humana contém 132 resíduos de tirosina, mas nem todos são igualmente susceptíveis à iodização. Sabe-se que existem sequências consenso que favorecem a iodização como sendo: Asp-Glu-Tyr, Ser/Thr-Tyr-Ser e Glu-X-Tyr. Na Tg humana, os principais resíduos hormonogénicos são o nº 5, 130, 685, 847, 1447 e 2554 (Dunn e Dunn, 2001). O local onde se dá a iodização da tiroglobulina terá que ter quatro elementos em grande proximidade, a TPO, H₂O₂, o Iodo e a Tg. No final da reacção de iodização vamos obter monoiodotirosinas (MIT) e diiodotirosinas (DIT) ligadas à molécula de tiroglobulina. Evidências de estudos autorradiográficos obtidas a partir de microscopia óptica e electrónica indicam que a iodização da Tg ocorre na interface célula-colóide junto a membrana apical (Ekholm e Wollman 1975; Ekholm e Björkman, 1984). Resultados obtidos com técnicas histoquímicas (Tice *et al*, 1974) e de imunofluorescência (utilizando um anticorpo monoclonal; Kotani e Othaki, 1987) para localização da TPO nas células foliculares da tiróide também sugerem que a iodização tem lugar na interface célula-colóide.

Mecanismo de ligação – coupling

Uma vez formadas DIT e MIT, dois resíduos de DIT associam-se para formar T₄, e um resíduo de MIT e outro de DIT associam-se para formar T₃. O mecanismo de ligação (ou *coupling*) tem sido assunto controverso e à semelhança da iodização foi também proposto um mecanismo iónico (Gavaret *et al*, 1981) e um por radical (Gavaret *et al*, 1981; Taurog *et al*, 1994). Têm sido apresentadas algumas linhas de evidência que apontam para um mecanismo por radical (Doerge *et al*, 1994). Na figura 1.7 está representado um esquema hipotético compatível com resultados obtidos com um sistema modelo da TPO (Taurog, 2000). Segundo este esquema, a através da acção da TPO mais H₂O₂, há primeiro a formação radicais livres de DIT na matriz proteica da Tg. Numa fase posterior, e num mecanismo não enzimático, dois radicais DIT ligam-se para formar um intermediário de éster de quinol. A cisão deste intermediário para dar origem ao resíduo de T₄ poderá originar a formação de um resíduo de dehidrolanina ou de serina. Enquanto que a iodização dos resíduos de tirosina é uma reacção de substituição electrófila a ligação das iodotirosinas para formar as hormonas da tiróide é um tipo de condensação fenólica (Taurog *et al*, 1996).

Estudos realizados em sistemas modelo da TPO e LPO para a iodização e ligação

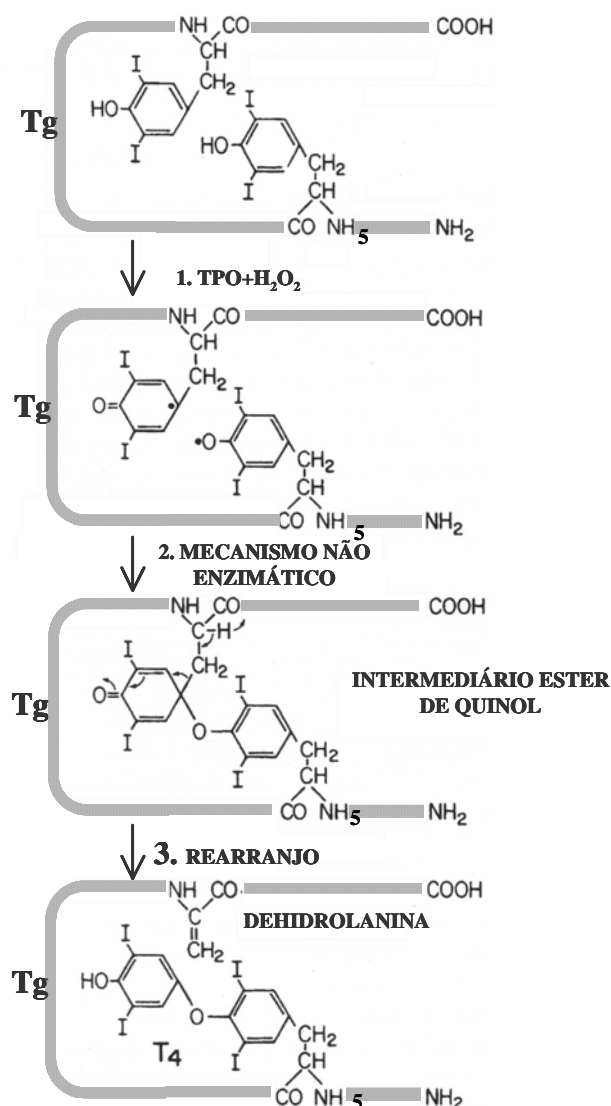


Figura 1.7 Esquema proposto para o mecanismo de ligação para a formação da T₄ na molécula de tiroglobulina, assumindo tratar-se de um mecanismo radical. Com número 5 está representado um dos principais resíduos de tirosina hormonogênicos da Tg (adaptado de Taurog, 2000).

mostraram que estes dois mecanismos ocorrem simultaneamente e que ambos são mediados pela forma de π - catião I de porfirina do composto I (Taurog *et al*, 1996).

1.3.2 Biologia molecular e estrutura da proteína

A TPO foi a primeira peroxidase animal cuja sequência aminoacídica completa foi determinada. O isolamento e caracterização por sequenciação nucleotídica de um clone de cDNA, representando parte da sequência do cDNA total da TPO de porco, foi pela primeira vez descrito por Magnusson *et al.*, (1986). Em 1987, três grupos de investigadores (Kimura *et al.*, 1987; Magnusson *et al.*, 1987; Libert *et al.*, 1987a) descrevem a sequência nucleotídica do cDNA da TPO humana (hTPO). O mRNA (*GeneBank Accession number*: NM_000547) compreende cerca de 3.1 Kb que codifica para uma proteína de 933 aminoácidos, aproximadamente 105 kDa. Mais tarde foram descritas as sequências de aminoácidos de outras peroxidases de mamíferos tais como a mieloperoxidase (MPO; Johnson, *et al.*, 1987), lactoperoxidase (LPO; Dull *et al.*, 1990), peroxidase salivar (SPO; Kiser *et al.*, 1990) e a peroxidase eosinófila (EPO; Sakamaki *et al.*, 1989).

Kimura e colaboradores (1989a), caracterizam a estrutura do gene da TPO incluindo a sequência nucleotídica, todas as junções exão-intrão e 32 kb de sequências intrónicas na região flanqueadora 5'. O gene da hTPO (*GeneBank Accession number*: NT_033000) compreende 17 exões e 16 intrões que se estendem por uma região de aproximadamente 150 kb. O mapeamento do gene no cromossoma 2 foi realizado por Kimura *et al.*, (1987). Através da técnica hibridização *in situ* Endo *et al.*, (1995) localizou o gene na região 2p25.

Libert e colaboradores (1987b), estudaram a homologia evolucionária entre a hTPO e a hMPO (mieloperoxidase humana). Estas duas proteínas apresentam elevada homologia nos primeiros 740 aminoácidos (cerca de 42% de identidade), o que corresponde a grande parte da região extracelular da proteína. A TPO apresenta, no entanto, mais 197 resíduos no terminal carboxílico. Estes resíduos codificam para três domínios distintos que se encontram justapostos (figura 1.8). Do resíduo 741 ao 848, ainda na região extracelular da proteína, a sequência apresenta significativa similaridade com a família de genes da proteína complemento de controlo (CCP ou domínios *Sushi*; sequências consenso com cerca de 60 resíduos e apresenta um arranjo em *beta-sandwich*) e com o domínio de ligação ao cálcio do factor de crescimento epidermal (*EGF-like potential calcium binding domain*; Libert *et al.*, 1987b) que são codificados pelos exões 13 e 14 respectivamente. Segue-se um domínio tipicamente transmembranar (exão 15) e uma pequena cauda com cerca de 60 aminoácidos na região intracelular. Dos resíduos 510-567 verifica-se uma certa homologia com a subunidade I da citocromo *c* oxidase (CcP; compreende parte do exão 9 e do exão 10; Kimura *et al.*,

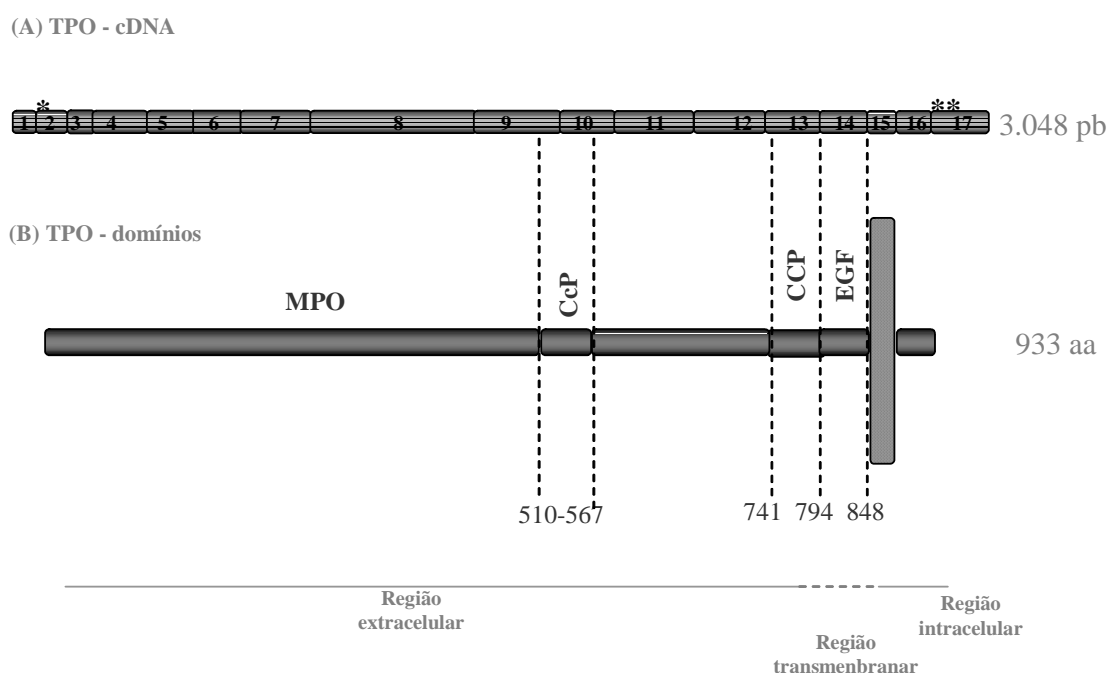


Figura 1.8 Representação esquemática da sequência de cDNA (A) e da sequência linear de aminoácidos da hTPO e seus domínios (B). A TPO apresenta homologia com: a mieloperoxidase (MPO; do resíduo 1 ao 740); a subunidade I da Citocromo *c* oxidase (CcP; resíduos 510-567) a proteína de controlo complementar (CCP, do resíduos 741-794); o factor de crescimento epidermal (EGF, do resíduos 795-848); o domínio transmembranar; uma pequena cauda de 60 resíduos na região intracelular. (*) Codão de iniciação; (**) codão *stop*.

1989a), polipéptideo codificado pelo genoma mitocondrial. Baseados nestas observações Libert e colaboradores (1987b) consideraram a TPO uma proteína mosaico. O facto de a TPO e MPO apresentarem elevada homologia, leva a crer que estas enzimas são membros da mesma família de genes e que, provavelmente, apresentam um gene ancestral comum (Kimura *et al*, 1989a). Os autores sugerem a existência de uma fusão entre os genes que codificam para os diferentes domínios e o gene ancestral dando origem ao gene da TPO.

O alinhamento de 6 sequências de peroxidases de mamíferos e 5 de invertebrados (Taurog, 1999) mostrou uma completa conservação dos resíduos considerados importantes na formação do composto I. Assim, poderemos falar, de uma forma mais abrangente, em peroxidases de animais em vez de peroxidases de mamíferos. Este grupo de peroxidases animais difere consideravelmente na estrutura secundária e terciária das peroxidases de plantas, fungos e bactérias mas com quem partilham uma função comum. Este poderá ser um exemplo de evolução convergente, uma vez que os genes destes dois grupos de peroxidases pertencem a famílias de genes diferentes mas que a dada altura, na evolução, convergiram para um mecanismo enzimático comum.

Estrutura da proteína

Para determinar a estrutura secundária e terciária de uma proteína é necessário ter quantidades na ordem dos miligramas de proteína purificada. Até ao momento, não foi possível obter proteína suficiente das glândulas da tiróide humana para proceder aos estudos estruturais. A determinação da estrutura cristalográfica da MPO (Zeng e Fenna, 1992) revelou que regiões importantes da proteína como o centro catalítico, 12 resíduos de cisteína e o domínio de ligação ao cálcio estão conservados em todas estas peroxidases de mamíferos. Estas observações sugeriram que a estrutura tridimensional destas proteínas era similar e a MPO poderia servir como modelo.

Baseada na posição bem definida para a histidina proximal e distal da MPO e através do alinhamento das sequências foi possível determinar os resíduos correspondentes na TPO (Taurog, 1999). Assim, para a H95 (distal) e H336 (proximal) da MPO têm como resíduos correspondentes na TPO H239 e H494 respectivamente. Desta forma, a posição dos outros resíduos importantes na TPO foi determinada: o R396, que se pensa estar envolvido no mecanismo catalítico que leva a formação do composto I; o N579, que é responsável pela estabilização da ligação de hidrogénio na histidina proximal; o D238 e Q399 que estarão envolvidos na ligação covalente da proteína ao grupo heme; 12 resíduos de cisteína (C142-C158; C259-269; C263-C286; C375-389; C598-C655; C696-C721) formando ligações intrapeptídicas dissulfido; os resíduos de ligação ao cálcio (D240; T321; D325; S327).

No domínio do EGF, presente na região terminal carboxílica da TPO, temos seis cisteínas que também intervêm em ligações dissulfido (C800-C814, C808-C823 e C825-C838).

Os locais de glicosilação foram determinados e caracterizados apenas para a TPO de porco (Rawitch *et al*, 1992). Dos 5 potenciais locais 4 estavam mesmo glicosilados (N129; N307; N342; N569; Fayadat *et al*, 1998).

Banga e colaboradores, (1990) combinando métodos de previsão da estrutura secundária, espectroscopia diacrónica circular (aplicada a MPO e extrapolada para a TPO) e o alinhamento das sequências chegaram à conclusão que a estrutura da TPO é principalmente organizada em α -hélice com pequena parte em folhas β e organizada em domínios distintos.

Baker *et al*, (1994), Nishikawa *et al*, (1994) propuseram que a TPO se apresentaria como um dímero, tal como a MPO, no entanto, as observações de Cetani *et al*, (1995) indicam que a TPO não se apresenta desta forma. Não existe consenso em relação a este aspecto da sua estrutura.

Regulação da expressão génica nas células da tiróide

Estudos efectuados em células de rato demonstraram que a actividade da TPO era estimulada na presença de TSH (Nagataki *et al*, 1974). Em várias preparações de células da tiróide, verificou-se que a TSH aumenta os níveis de mRNA da TPO. Esta estimulação era mimetizada pela adenosina monofosfato cíclica (cAMP) e por agentes que aumentam os níveis intracelulares do cAMP.

Foram identificados elementos de activação da expressão génica específicos da tiróide nas regiões 5' flanqueadoras do gene da hTPO, localizados a cerca de 5.5 kb a montante do local de iniciação da transcrição (Kikkawa *et al* 1990). Como já foi referido, sabe-se que os factores de transcrição *TTF-1*, *TTF-2* e *Pax-8* regulam o controlo da expressão génica da TPO, da Tg e do receptor da TSH.

Heterogeneidade da peroxidase da tiróide purificada a partir de tiróide humana

Verificou-se que variadas espécies de mRNA que codificam para as isoformas da hTPO estão presentes em tecido normal da tiróide. O primeiro transcrito a ser detectado com tamanho diferente do transcrito normal (que codifica para um polipeptídico com 933 aminoácidos; TPO1) foi o TPO2, cujo o exão 10 se encontra delectado dando origem a uma proteína com 876 aminoácidos (Kimura *et al*, 1987). Zanelli e colaboradores (1990) descrevem outro transcrito (TPOzanelli ou TPO3) que apresenta a deleção de 130 nucleótidos no exão 16, o que alterando a grelha de leitura dá origem a uma variante de hTPO de 929 aminoácidos.

Outras duas espécies de mRNA, TPOI e TPOII, de menor tamanho, foram também descritas em tecido normal de tiróide (Nagayama *et al*, 1990). TPOI apresenta apenas a porção correspondente do exão 1 ao 6, seguido de uma região terminal 5' do intrão 6. O transcrito TPOII contém apenas os exões do 1 ao 5 seguidos de uma sequência de 558 pb na região terminal 3' (sequência presumivelmente intrónica). O transcrito TPOI codifica para uma proteína com 225 aminoácidos e TPOII para uma com apenas 174 aminoácidos.

Mais recentemente, foram detectados novos transcritos, TPO4 e TPO5, que apresentam o exão 14 e 8 delectados, respectivamente (Ferrand *et al*, 2003). O transcrito TPO4 dá origem a uma proteína de 889 enquanto que TPO5 dá origem a uma variante com 760 aminoácidos. Foram ainda detectadas as variantes com múltiplas deleções, TPO2/3 (exões 10 e 16 delectados), TPO 2/4 (exões 10 e 14 delectados) e a TPO6 (exões 10 o 12, 13, 14 e 16 delectados) e foi colocada pelos autores a hipótese de existirem mais espécies com

múltiplas deleções. De todas estas variantes sabe-se que apenas a TPO3 e a TPO4 são enzimaticamente activas, no entanto, apresentam um tempo médio de vida mais curto do que aquele observado para a proteína normal, TPO1 (Ferrand *et al*, 2003). Estudos realizados com a TPO2 demonstraram que ela é rapidamente degradada após a sua síntese, não conseguindo atingir a superfície da célula. Espera-se pois, que todas as espécies com multideleções, que incluam a deleção do exão 10, sejam também enzimaticamente inactivas. A isoforma TPO5 apresenta deleção do exão 8 que codifica parte do centro catalítico da enzima (compreendida entre os exões 8-10) o que sugere que esta seja também enzimaticamente inactiva.

Para além do TPO1, o significado fisiológico e patofisiológico de qualquer um destes transcritos é desconhecido. O facto de todos eles estarem presentes em tecido normal da tiróide reduz a possibilidade de estarem associados a alguma doença. Mais estudos serão necessários para esclarecer o papel destas isoformas na hormonogénese.

TPO humana recombinante

A disponibilidade de grandes quantidades de TPO purificadas é essencial para o estudo da sua função enzimática a nível molecular. Antes da clonagem molecular da TPO, a única fonte para obter enzima purificada era o tecido da tiróide. Inicialmente o método de purificação a partir de tecido da tiróide incluía o tratamento com detergente e digestão proteolítica. Esta metodologia permitia a obtenção de um grande fragmento com actividade catalítica (Ykoyama e Taurog, 1988). Posteriormente foi também utilizada a cromatografia de afinidade utilizando um anticorpo monoclonal (Othaki *et al*, 1986). Para estas técnicas são necessárias grandes quantidades de tecido e a obtenção de tecido de tiróide humana é, no entanto, limitado.

A clonagem molecular veio possibilitar a obtenção de proteína enzimaticamente activa em diferentes sistemas de replicação *in vitro*. A hTPO foi, estavelmente, introduzida no genoma de células CHO (*chinese hamster ovary cells*; Kaufman *et al*, 1989) onde é expressa à superfície e também nos seus microssomas constituindo uma fonte ilimitada e uniforme de proteína activa. Elevados níveis de expressão foram também verificados em células, Hep G2 (Kimura 1989b) e células de insecto (Jones *et al*, 1996).

1.3.3 Defeitos na TPO

Mutações no gene da TPO têm sido descritas em numerosas famílias como causa de HC primário por defeito na biossíntese da hormona da tiróide (MIM#274500). Este tipo de HC é caracterizado pela incapacidade da glândula organificar o iodo. É concebível que mutações que ocorram na TPO possam afectar a ligação das iodotironinas (*coupling*) sem afectar a organificação do iodo. No entanto, na literatura não estão descritas mutações no gene da TPO em que se tenha provado a sua relação com este defeito enzimático. Será mais plausível pensar em defeitos de ligação envolvendo mutações na Tg. A ruptura da estrutura nativa da Tg poderá afectar a ligação sem que contudo afecte a organificação (Taurog, 2000).

Na literatura estão descritas mutações no gene da TPO, praticamente ao longo de todo o gene o que demonstra a grande heterogeneidade nos defeitos desta proteína. (figura 1.9).

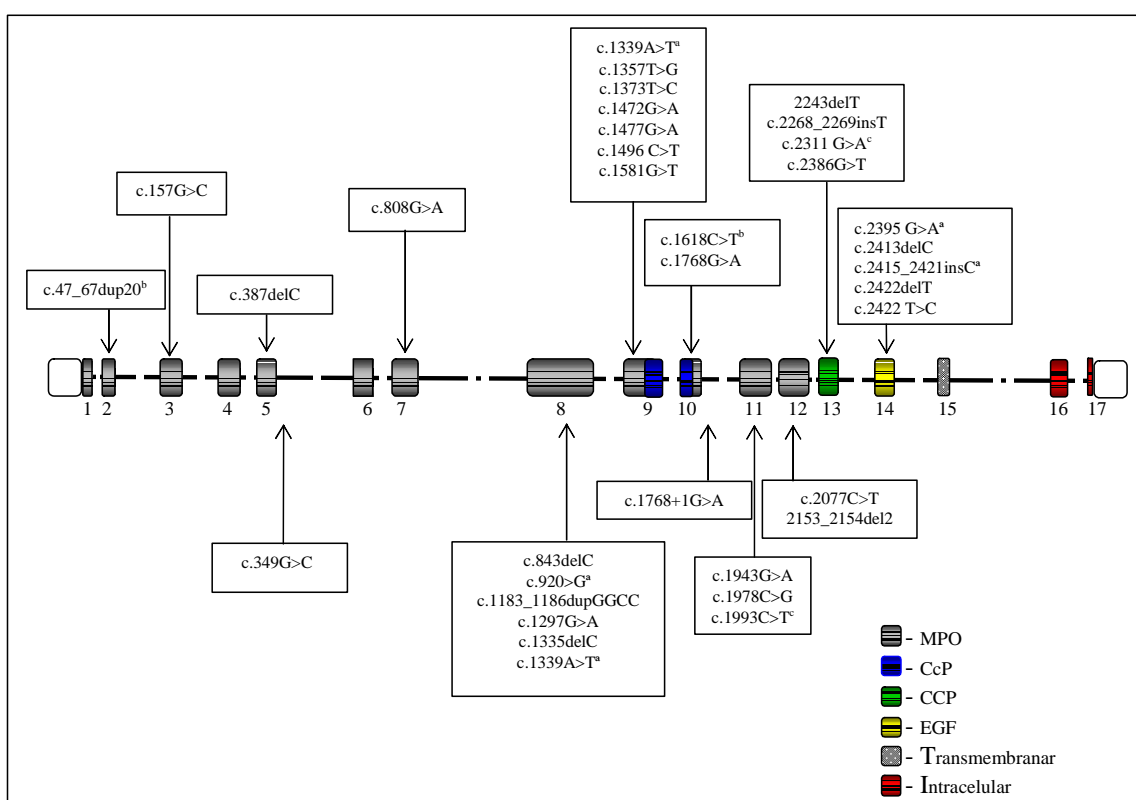


Figura 1.9 Mutações descritas no gene da TPO. As diferentes cores indicam os domínios codificados por determinado exão. A nomenclatura das alterações encontradas está de acordo com as regras definidas pela HGVS (*Human Genome Variation Society*) e considerando o primeiro A do códon de iniciação como posição +1. A numeração das posições nucleotídicas exónicas está de acordo com a sequência de referência do mRNA da TPO (*GeneBank Accession number: NM_000547*). ^a TPO inactiva num sistema de expressão *in vitro*. ^b TPO inactiva no tecido do doente. ^c TPO com perda da localização membranar.

Muitas destas mutações foram identificadas num só indivíduo e nalguns casos em heterozigotia (em anexo encontram-se as mutações descritas com as respectivas alterações a nível da proteína e referências).

Apesar do número considerável de mutações descritas poucas são aquelas que estão caracterizadas a nível da expressão e função da proteína mutada. Bikker *et al*, (1997) descreve a análise molecular da proteína mutada detectada em doentes com defeito total na organificação do iodo. A a TPO humana recombinante foi expressa em células CHO-K1 num sistema de expressão baseado na replicação do vírus pSFV (*pSemliki Forest Virus 1*). A expressão da TPO normal e da proteína mutada foram comparadas através de *western blotting* e a actividade enzimática foi determinada através dos ensaios enzimáticos do guaicol e do I_3^- . A expressão da TPO foi visualizada por imunofluorescência usando um anticorpo policlonal. Uma abordagem similar foi utilizada por Kotani *et al*, (1999) e Umeki *et al*, (2002). Para algumas mutações foram também realizados estudos de mRNA e da proteína em tecido de doentes (Bikker *et al*, 1994; Bikker *et al*, 1996). Os resultados apontam para a perda da actividade enzimática de algumas proteínas mutadas. A ausência de actividade enzimática prova que os resíduos em causa estão localizados em regiões cruciais da proteína para esta função como, por exemplo, a região de ligação ao grupo prostético heme e formação do composto I ou a região de ligação ao iodeto como substrato. A alteração da sua localização a nível celular, mesmo observando-se actividade enzimática, parece ser outro dos efeitos deletérios das mutações na proteína, o que a impede “fisicamente” de participar na hormonogénese.

1.4. Diagnóstico e tratamento

1.4.1 Rastreio Neonatal

O rastreio neonatal pode ser efectuado através das medições das concentrações de TSH e/ou T₄ no sangue. O rastreio baseado na determinação da concentração de TSH em primeiro lugar constitui um índice mais sensível na determinação do HC primário (Delangue e Czernichow, 1990). No entanto, perdem-se os casos de HC hipotalâmico-pituitário pois estes caracterizam-se por apresentarem níveis TSH dentro do normal e T₄ baixos. Quando o rastreio é baseado na determinação da concentração de T₄ em primeiro lugar tem o inconveniente de apresentar muitos falsos positivos (De Vijlder *et al*, 2003). No Programa Nacional de Diagnóstico Precoce o rastreio é baseado na determinação da TSH. As amostras de sangue são colhidas aos recém-nascidos, nos Centros de Saúde da área de residência, entre o 4º e o 7º dia de vida, utilizando como suporte de colheita e envio da amostra, as fichas de papel de filtro.

O rastreio do HC iniciou-se com uma técnica de radioimunoensaio (RIA), esta utilizava um anticorpo policlonal que foi posteriormente substituído por um policlonal anti-TSH marcado com ¹²⁵I. Em 1988 este método foi substituído por um fluorimétrico, (*DELFIA*[®] *Time-resolved Fluoroimmunoassay*, Finland) o qual continua a ser utilizado.

1.4.2 Diagnóstico do HC por disormonogénese

Como já foi referido, grande parte dos casos de HC rastreados apresentam malformações na tiróide. Para uma avaliação diagnóstica, deverá recorrer-se a técnicas de imagiologia, ecografia cervical neonatal e cintigrafia da tiróide, com os radionuclídeos ¹²⁴INa ou ^{99m}Tc – *tecnecium*, que permitam informar relativamente à localização e desenvolvimento da glândula e, conseqüentemente, à etiologia e prognóstico da doença (Delangue e Czernichow, 1990). A cintigrafia da tiróide só é efectuada quando a criança atinge os 3 anos de idade, para não atrasar o início da terapêutica, uma vez que para a realização do exame é necessária suspender o tratamento durante 4 semanas. Nesta idade, a suspensão do tratamento já não vai afectar o seu desenvolvimento cerebral. Na presença de tiróide sem malformações e localizada no local habitual, independentemente do tamanho, suspeita-se de HC por defeito num dos passos da hormonogénese (HC por disormonogénese). Estudos posteriores com radioiodo (¹²³I)

serão necessários para dar informações à cerca do metabolismo do iodo. Temos o teste de captação do ^{123}I que consiste na injeção intravenosa do radioiodo e a medição do seu aporte para a glândula durante determinados intervalos de tempo. Em geral, o aporte radioiodo para a glândula é função da quantidade de tecido existente e do nível de estimulação pela TSH (De Vijlder e Vulsma, 2000). Baixos valores de captação do radioiodo podem também apontar para um problema no transporte do iodo. Defeitos nas proteínas de transporte, NIS (Pholenz *et al*, 1998) ou pendrina (Everett *et al*, 1997), podem estar na origem da doença. No caso de defeitos no transportador NIS, os doentes apresentam uma razão de [I] saliva/plasma muito baixa que funciona como diagnóstico diferencial. Um aporte rápido do radioiodo é observado em defeitos de oxidação e iodização (TPO; Taurog 2000), no sistema gerador de H_2O_2 (THOX1 e THOX2; Moreno *et al*, 2002), defeitos na síntese Tg e reciclagem do iodo (De Vijlder e Vulsma, 2000). A inibição do transporte do radioiodo é conseguida pela administração de aniões de peso e carga molecular semelhante, como o perclorato ou tiocianato, que permitem detectar o nível de refluxo do ^{123}I acumulado pela glândula e que não foi oxidado. Este processo denomina-se de descarga do perclorato, e permite ter uma ideia sobre o processo de oxidação e organificação em determinado doente. A redução da radioactividade, presente na glândula, pelo perclorato após 2 horas de ter sido injectado o radioiodo é superior a 10% em doentes que apresentem defeito parcial na organificação do iodo. Em doentes com defeito total, a redução da radioactividade é superior a 90%, após uma hora de ter sido injectado o radioiodo (De Vijlder *et al*, 2003). Este defeito bioquímico poderá resultar de mutações no gene da TPO, no *THOX1* e *THOX2* ou no gene da pendrina, *PDS*.

A determinação dos níveis séricos de Tg e de iodopeptídeos na urina são importantes testes bioquímicos na classificação do HC. Por exemplo, doentes em que se suspeite de defeitos na síntese de Tg apresentam, normalmente, baixos níveis de Tg em relação aos níveis de TSH e que não sobem mesmo com a injeção intravenosa de TSH (Medeiros-Neto *et al*, 1985). Nos defeitos de reciclagem de iodo (defeito nas desidases) o diagnóstico só pode ser estabelecido baseado na presença de iodotironinas na urina. A perda de iodo através da excreção urinária de tirosinas iodadas diminui a disponibilidade deste para a formação de mais hormonas.

Os resultados dos estudos bioquímicos e de imagiologia são extremamente importantes porque podem direccionar os estudos moleculares que determinam definitivamente a causa subjacente a cada tipo de HC. Para tal é necessário identificar a mutação responsável e provar

que esta origina uma proteína alterada e que, de alguma forma, diminui a síntese e secreção das hormonas da tiróide.

1.4.3 Tratamento

Qualquer que seja a etiologia do HC o tratamento é igual e consiste na terapia de substituição com T₄ sintética (levotiroxina ou L-tiroxina). O tratamento, que consiste na manutenção dos níveis séricos da tiroxina em valores normais altos, permite um desenvolvimento psicomotor normal das crianças com HC (Osório *et al*, 1999). No caso do HC por disormonogénese manutenção de níveis altos de tiroxina no soro permitirá prevenir a formação de bócio, que é comum neste grupo de doentes. Os níveis de T₄ e TSH devem ser monitorizados em intervalos recomendados para manter os valores normais para a idade.

O ajuste da dosagem é importante. Uma terapia com L-tiroxina em excesso deve ser evitada para prevenir possíveis problemas comportamentais adversos na infância e adolescência.

Verifica-se que em casos mais graves de HC a introdução da terapia de substituição, logo após o resultado do rastreio, é insuficiente para impedir que o desenvolvimento neurológico seja afectado. O estabelecimento da etiologia, nos casos familiares, revela-se aqui importante uma vez que se pode oferecer aconselhamento genético às famílias caracterizadas e a descendência poderá beneficiar de tratamento imediatamente após o nascimento ou mesmo na vida intra-uterina (De Vidjler e Vulsma, 2000).

2. OBJECTIVOS

Nos doentes com HC com localização normal da tiróide assume-se que apresentem defeitos autossómicos recessivos da biossíntese da hormona da tiróide. Mutações no gene da TPO têm sido descritas como uma das principais causas para o HC por disormonogénese.

No trabalho que se apresenta o objectivo principal foi estabelecer um diagnóstico etiológico preciso em doentes com hipotiroidismo congénito permanente com a glândula da tiróide em posição normal, detectadas no Programa Nacional de Diagnóstico Precoce. Num grupo de 55 doentes, pretendeu-se:

- rastrear o gene da TPO para identificar e caracterizar as mutações mais frequentes na nossa população recorrendo à análise sistemática dos 17 exões do gene, pela técnica de SSCA (*single strand conformational analysis*) seguida de sequenciação automática nos fragmentos que apresentaram migração anormal;
- na vertente de estudos populacionais, determinar qual o fundo genético associado às diferentes mutações, com o objectivo de identificar haplótipos de risco e detectar um possível efeito fundador.

O estabelecimento do diagnóstico etiológico é importante uma vez que se trata de uma forma hereditária de transmissão autossómica recessiva, e portanto passível de aconselhamento genético.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Doentes

Para o estudo foram utilizadas 55 amostras de sangue de doentes cuja avaliação clínica sugeria a presença de HC por disormonogénese. Estes doentes, ao contrário da maior parte dos doentes com HC, apresentam a glândula da tiróide com desenvolvimento e localização normal. A nível bioquímico caracterizam-se por apresentarem valores de tirotropina (TSH) e de tiroglobulina (Tg) muito elevados e T₄ baixos. A presença de bócio é, normalmente, indicativo de que se trata de HC por disormonogénese. Todos os doentes deste estudo foram caracterizados a nível bioquímico e clínico pelo Programa Nacional de Diagnóstico Precoce.

As amostras colhidas aquando das consultas programadas de endocrinologia foram provenientes dos dois centros de tratamento existentes no país. Dos 55 doentes estudados, 48 frequentam as consultas programadas de endocrinologia no IGMJM (Porto) e 7 as do Hospital de Santa Maria (Lisboa). Todas as análises foram realizadas com consentimento dos pais ou do próprio e nos casos onde foram detectadas mutações foram também estudados 21 familiares dos doentes. Para os rastreios populacionais das alterações novas foram utilizadas amostras de DNA de 100 indivíduos controlo e para estabelecer a frequência das variantes polimórficas na nossa população foram utilizados 50 destas amostras.

3.2 Análise molecular

3.2.1 Material biológico

A análise molecular foi efectuada em DNA genómico obtido de sangue periférico e extraído pelo método convencional da solução saturada de NaCl (Miller *et al*, 1989).

3.2.2 Análise conformacional das cadeias simples (SSCA)

Os 17 exões e junções exão-intrão adjacentes do gene TPO (exão 8 foi subdividido em 2 fragmentos, 8A e 8B), foram analisados pela técnica de PCR-SSCA, (reacção em cadeia da polimerase seguida de análise conformacional de cadeias simples; Orita *et al*, 1989).

Para amplificação dos segmentos foram utilizados os iniciadores oligonucleotídios descritos por Bikker *et al* (1995; tabela 3.1). A mistura de reacção utilizada foi a PCR

Tabela 3.1 Oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos 17 exões (18 regiões exónicas) da TPO.

Exão	Sequência (5'→3')	Tamanho do fragmento (bp)
1(F):	tct ccc tct tgt ata att ttt ccc c	
1(R):	cag ctt tgc tga tga gag acg c	460
2(F):	tcc cat gg c ctt gtc agt	
2(R):	cag gag cta cca tta tgc cc	237
3(F):	gaa ctg tca ttg cgc ttt ga	
3(R):	tct gca att gcg aaa atc ag	222
4(F):	gtg cct gtc aca ttg tct gg	
4(R):	tgc aca aag tca agg tgt cc	361
5(F):	tca tgg ttt cct att ttt cac a	
5(R):	cat gtt cag atc caa ctt tca c	216
6(F):	act gct tct gtg ttc ttc tcc c	
6(R):	aag gct att tcc ctc cct ca	258
7(F):	ggg cat ctt tct gct acc ac	
7(R):	ctg cta ccc ctg gga ata gg	391
8A(F):	tga cct tga act ccc ctt tg	
*8A(R):	AGC CGG AGC AGC CCT TCG GC	263
*8B(F):	ATG AAC GGG TTG ACC TCG TT	
8B(R):	ggagag aga agc cac gat gc	480
9(F):	gaa gat gct ctt cca cac tgc	
9(R):	aga gtt cat ggg gac cag c	373
10(F):	ctg agc caa gag ctg tcc tt	
10(R):	cag ctg cat gag gtg tgc	252
11(F):	agt tct gtg aga gaa acc ctg c	
11(R):	gaa cgt gaa gga aga cgc tc	313
12(F):	ctg tgg gca gct ggt ctt	
12(R):	aat cag ctc ctg ggg aag at	369
13(F):	aca ggg acg ttg gtg tgt g	
13(R):	ttt cag aag cac ctt ttg gc	346
14(F):	cct ccc cag aga gaa gca c	
14(R):	aga tgg tga ttg aca gtt gcc	316
15(F):	tgg cca gga cag ggt atg c	
15(R):	acc tgt gtt agc tcc ggg aa	300
16(F):	cta ccc tcc aca gtc acg gt	
16(R):	cca gat cct gtc caa cca ct	250
17(F):	aat gtt tgt tct gca ttt ttg c	
17(R):	gac agg agg att gca aga gtg	382

*Todos os oligonucleotídeos são intrónicos (letra minúscula) com a excepção do 8A(R) e 8B(F) que se localizam dentro do exão 8 (letra maiúscula).

MasteMix (Promega). A 25 µl desta mistura (*DNA Taq polimerase*; dNTPs; MgCl₂) foram adicionados 1 µl de cada par de oligonucleotídeos (a 50 pmol/µl), 1 µl de DNA genómico (com concentração inferior a 250 ng) e água perfazendo um volume final de 50 µl. Nos fragmentos 8A e 8B foi também adicionado 10 % (v/v) de DMSO.

O programa da PCR incluiu uma desnaturação inicial de 10 min a 95°C seguida de 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 57°C e 1 min a 72°C e extensão final de 10 min a 72°C, num termociclador *GeneAmp PCR System 9600* (Applied Biosystems).

Para a análise conformacional de cadeia simples foram testados dois sistemas de geis, um manual e um automatizado. Para cada exão optou-se pelas condições electroforéticas que permitiram uma melhor separação dos fragmentos. Dada a dificuldade na separação electroforética dos fragmentos correspondentes aos exões 8 (8A e 8B) e 11, estes foram sequenciados sistematicamente em todos os doentes (em anexo estão descritas as condições electroforéticas estabelecidas para cada exão).

3.2.2.1 Sistema manual de geis

Para o SSCA os produtos da amplificação (~5 µl) foram primeiro diluídos (1:1) num tampão de aplicação, desnaturados a 95 °C durante 4 min. As amostras foram posteriormente aplicadas em geis de acrilamida não desnaturante MDETM (BMA Products) num sistema manual de geis verticais, de tamanho variável, *Techware*, (Sigma-Aldrich) em que o tampão utilizado foi 0.6x TBE. Neste sistema manual foram testadas diferentes concentrações e altura dos geis (de acordo com a tabela 3.2) e condições de temperatura (4°C e à temperatura ambiente) no sentido de obter a melhor separação possível. A electroforese decorreu a uma voltagem que variou entre 180 a 240 volts num intervalo de tempo entre 18 e 22 horas. Estes parâmetros foram alterados de acordo com o tamanho dos fragmentos a separar e a temperatura a que decorria a electroforese. Para a revelação dos geis foi utilizado o método convencional de coloração pelo nitrato de prata (Budowle *et al*, 1991).

Tampão de aplicação: 20 mM EDTA (pH8.0); 0.05% de azul de bromofenol; 0.05% de xilenocianol; 10% (v/v) de glicerol; 95% de formamida.

Tabela 3.2 Soluções utilizadas para as diferentes concentrações e tamanhos dos geis do sistema manual.

Composição dos geis e altura do sistema de electroforese / Reagentes	0.5 x /MDE TM (22 cm)	0.5x/MDE TM (28 cm)	1x/MDE TM (22 cm)	1x/MDE TM (28 cm)
ddH ₂ O	17.2 ml	27.4ml	10.95 ml	17.4 ml
10x TBE	1.5 ml	2.4 ml	1.5 ml	2.4 ml
MDE TM	6.25 ml	10 ml	12.5 ml	20 ml
APS (10% p/v))	125 µl	200 µl	125 µl	200 µl
TEMED	12.5 µl	20 µl	12.5 µl	20 µl
Volume final	(25 ml)	(40 ml)	(25 ml)	(4 ml)

ddH₂O: água bi-destilada; MDETM: gel de acrilamida não desnaturante; APS: persulfato de amónia; TEMED: N, N, N', N'- Tetrametil-etilenodiamina.

3.2.2.2 PhastSystem

Para a análise de SSCA foi também testado o sistema semi-automatizado *PhastSystem* (Amersham Pharmacia Biotech) com temperatura controlada. A separação electroforética bem como a coloração pelo nitrato de prata decorreram de acordo com as instruções do fabricante. Os geis utilizados, de acrilamida, foram o *PhastGel Homogeneous 12.5%* e *20%* (referente à sua concentração de acrilamida), o tampão utilizado foi o *PhastGel Native Buffer Strips* e os geis foram corados com *PhastGel Silver kit*. Como tampão de aplicação foi utilizado o mesmo do sistema manual. A voltagem foi medida em volts acumulados/hora (a.v.h).

3.2.3 Sequenciação.

Os fragmentos que apresentaram um padrão de migração anormal no SSCA foram sujeitos a sequenciação automática.

3.2.3.1 Purificação e quantificação do produto de PCR

Antes da reacção de sequenciação os produtos de PCR foram separados num gel de agarose a 2% /1xTAE (p/v) para eliminar os oligonucleotídeos não incorporados. As bandas correspondentes foram cortadas e a sua purificação incluiu uma centrifugação em colunas de separação spin-X[®] (COSTAR) durante 15 min à rotação de 20.800 rcf a 4°C.

Tampão TBE: 100mM Tris; 100 mM ácido bórico; 1mM EDTA.

Determinou-se a concentração do produto por comparação com um marcador de peso molecular (*DNA mass ladder*, Invitrogen) num gel de agarose 1%/1xTAE (p/v). A quantidade de produto usada em cada reacção de sequenciação foi de, aproximadamente, 1 a 3 ng por cada 100bp.

3.2.3.2 Reacções de sequenciação

As reacções de sequenciação foram preparadas segundo o protocolo do *kit Big Dye Terminator v.2* (*Applied Biosystems*). A reacção com um volume final de 20 µl incluiu 4 µl de *Big Dye terminator v2* (que contém MgCl₂; dNTPs; dNTPs terminadores marcados com fluorocromos; *AmpliTaq DNA polimerase*), 1.5 µl de um dos oligonucleotídeos (1pmol/ul), produto de PCR purificado e água destilada perfazendo 14.5 µl. As reacções de sequenciação decorreram no *GeneAmp PCR System 9600*. Após uma desnaturação inicial de 6 min a 94°C as amostras foram sujeitas a um programa de 25 ciclos de 10 s a 96°C, 5 s a 50°C, 4 s a 60°C e extensão final de 10 min a 60°C.

3.2.3.3 Purificação dos produtos de sequenciação

Por forma a eliminar os dNTPs não incorporados e sais que podiam interferir com a electroforese, os produtos de sequenciação foram purificados através da precipitação com etanol e MgCl₂. Ao produto de reacção (20 µl) adicionou-se 20 µl de MgCl₂ a 2 mM e 55 µl de etanol absoluto e centrifugou-se a mistura a 20.800 rcf (4 °C) durante 20 min. Após a remoção do sobrenadante, ao *pellet* obtido foi adicionado 300 µl de etanol a 70% e novamente centrifugado nas mesmas condições.

3.2.3.4 Electroforese capilar

Os produtos purificados foram ressuspensos em 30 µl de formamida por agitação no *vortex* durante 10 s. A separação dos fragmentos no sequenciador automático ABI 310 (*Applied Biosystems*) foi realizada por electroforese capilar utilizando como matriz de separação o polímero POP4TM. Os resultados foram analisados no programa *Sequence Analysis v3.7*.

Tampão TAE: 20 mM Tris; 5,71% ácido acético glacial; 1mM de EDTA.

3.2.4 Análise de Restrição.

Sempre que se detectou alterações da sequência do gene procurou-se utilizar os ensaios de restrição como uma segunda forma de confirmar a alteração e efectuar os rastreios populacionais. Foi possível a análise de restrição no polimorfismo identificado no intrão 3, que cria um novo local de corte para a enzima *AluI* (Amersham Biosciences) e na mutação nova detectada no exão 8 (fragmento 8B) que cria um local de corte para a enzima *DdeI* (New England BioLabs). Após a amplificação do fragmento dos exões correspondentes, os produtos foram digeridos na presença do tampão da respectiva enzima, num volume final de 10 µl, a 37°C durante a noite. Os fragmentos resultantes das digestões foram analisados, respectivamente, em geis de 10% de acrilamida a 29:1/1x TBE (BioRad) e de agarose a 2% / 1xTAE (p/v).

3.2.5 Análise automática de fragmentos

Nos doentes e familiares portadores das duas mutações mais frequentes identificadas neste estudo foi também realizada a haplotipagem com o polimorfismo tetranucleotídeo HumTPO, [AATG]_n. Este STR localiza-se no intrão 10 do gene da TPO (Anker *et al*, 1992) e sua frequência foi determinada na população Portuguesa por Santos *et al* (1996). A análise deste microsatélite e das 15 variantes polimórficas de um único nucleotídeo (SNPs), identificadas no rastreio do gene, permitem estabelecer haplótipos específicos associados às mutações mais frequentes e inferir à cerca da sua origem.

Os fragmentos analisados foram amplificados com os oligonucleotídeos descritos na tabela 3.3.

Tabela 3.3 Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do microsatélite HumTPO.

Sequência (5'→3')	
(F)	CACTAGCACCCAGAACCGGTC*
(R)	CCTTGTCAGCGTTTATTGCC

*Oligonucleotídeo marcado com fluorocromo na extremidade 5' (NED).

Após a amplificação, 1 µl do produto foi adicionado a 15 µl de formamida e 0.2 µl de padrão interno (ROXTM-500 *Size Standard*; Applied Biosystems). A separação dos fragmentos foi realizada no sequenciador automático ABI 310 utilizando o polímero POP4TM.

A análise dos resultados foi feita através do programa *GeneScan v3*.

3.3. Bioinformática

A comparação da homologia da sequência aminoacídica da TPO com outras sequências foi efectuada recorrendo ao programa BLAST do NCBI, *protein-protein Blast*, (<http://www.ncbi.nlm.gov/Blast>). O alinhamento das sequências seleccionadas foi realizado no programa CLUSTAL (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

O programa GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) é baseado num modelo probabilístico para estrutura de sequencias genómicas humanas que incorpora dados de sinais de transcrição, tradução e de *splicing* e outras características destas sequencias (Burge *et al*, 1998). Este programa foi utilizado no sentido de prever uma alteração do *splicing* introduzida por uma mutação nova identificada neste estudo.

4. RESULTADOS

4.1 Rastreo de mutações

Nos 55 doentes estudados, o rastreo molecular do gene da TPO efectuado por SSCA, seguido de sequenciação, permitiu identificar 8 mutações causais (em 13 doentes, 10 famílias) e 15 variantes polimórficas. Destas alterações, 4 mutações e 1 variante polimórfica ainda não estão descritas na literatura.

4.1.2 Polimorfismos

Os 15 polimorfismos identificados no rastreo do gene da TPO (tabela 4.1) estão todos descritos na literatura com a excepção da transversão A>C na posição -47 do intrão 3 (c.180-47A>C; figura 4.1).

Tabela 4.1 Descrição das alterações polimórficas encontradas no rastreo molecular do gene da TPO nos 55 doentes estudados e a frequência com que foi detectada na população portuguesa.

Localização	Alteração nucleotídica	Alteração ao nível da proteína	*Frequência em 100 alelos (%)	Referência
(Promotor)	c.1-185G>T	-	G(98); T(2)	Umeki <i>et al</i> , 2002
(Promotor)	c.1-125A>G	-	A(46); G (54)	Bikker <i>et al</i> , 1995
(5'-UTR)	c.1-79G>A	-	G(50); A(50)	Bikker <i>et al</i> , 1995
2	c.12C>G	p.L4L	C(65); G(35)	Pannain <i>et al</i> , 1999
IVS3	c.180-47A>C	-	A(81); C(19)	Este estudo
IVS4	c.349+31T>C	-	T(46); C(54)	Bikker <i>et al</i> , 1995
7	c.769 G>T	p.A257S	G(62); T(38)	Bikker <i>et al</i> , 1995
8	c.1117G>T	p.A373S	G(55);T(45)	Abramowicz <i>et al</i> , 1992
8	c.1193 G>C	p.S399T	G(29); C(71)	Abramowicz <i>et al</i> , 1992
11	c.1998C>T	p.D666D	C(63); T(37)	Bikker <i>et al</i> , 1995
12	c.2145C>T	p.P715P	C(62); T(38)	Bikker <i>et al</i> , 1995
12	c.2173A>C	p.T725P	A(64), C(36)	Bikker <i>et al</i> , 1995
15	c.2540T>C	p.V847A	T(45); C(55)	Pannain <i>et al</i> , 1999
17 (3'-UTR)	c.2883G>C	-	G(55); C(45)	Bikker <i>et al</i> , 1995
17 (3'-UTR)	c.2917G>T	-	G(85); T(15)	Bikker <i>et al</i> , 1995

*A frequência destes polimorfismos foi determinada, neste estudo, em 50 indivíduos controlo da população portuguesa. A nomenclatura das alterações encontradas está de acordo com as regras definidas pela HGVS (*Human Genome Variation Society*) e considerando o primeiro A do códon de iniciação como posição +1. A numeração das posições nucleotídicas exónicas está de acordo com a sequência de referência do mRNA da TPO (*GeneBank Accession number*: NM_000547).

Na região do promotor do gene foram encontrados dois polimorfismos, c.1-185G>T e c.1-125A>G. Na região 5' UTR (fora da região promotora) encontra-se a substituição nucleotídica c.1-79G>A e na região 3' UTR encontram-se as substituições c.2883G>C e c.2917G>T. Nas regiões intrónicas encontram-se os polimorfismos c.180-47A>C e c.349+31T>C. As restantes alterações polimórficas, também substituições nucleotídicas, estão localizadas em regiões traduzidas do gene. No entanto, ou são neutras, não modificando o aminoácido correspondente, ou resultam na substituição de um aminoácido por outro do mesmo grupo. A frequência com que as alterações polimórficas referidas surgem na população Portuguesa foi determinada em 50 indivíduos controlo (100 alelos; tabela 4.1). No caso do polimorfismo novo foi determinada a frequência em 200 alelos.

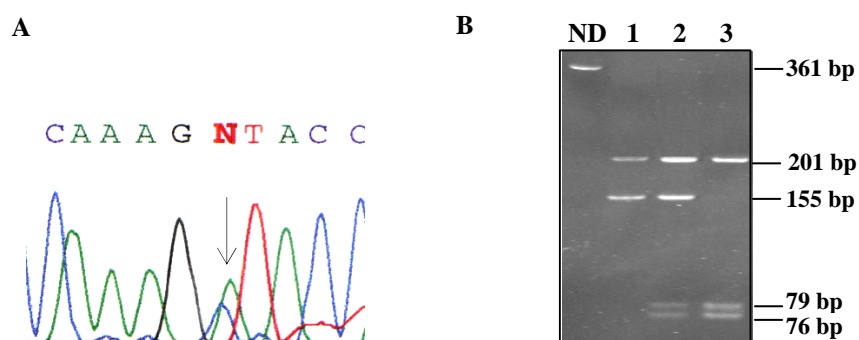


Figura 4.1 Variante polimórfica, identificada no intrão 3 do gene da TPO, (c.180-47A>C). (A) Representação parcial da sequenciação do intrão 3 de um indivíduo heterozigoto para esta alteração. (B) A restrição deste fragmento (361bp) com a enzima *AluI* (linha 1) origina 3 fragmentos (6, 155 e 201 bp; linha 1) e a alteração c.180-47A>C cria um novo local de corte originando 4 fragmentos (6, 76, 79 e 201 bp). Na linha 2 está representado um indivíduo heterozigoto e na linha 3 está representado um indivíduo homozigoto; ND-controlo não digerido.

Verificou-se que a nova variante c.180-47A>C, não co-segrega com esta forma de HC e o facto de surgir na população controlo com uma frequência de 19% corrobora a natureza polimórfica desta alteração.

4.1.2 Mutações causais

Foram identificadas 8 mutações causais no gene da TPO em 13 dos 55 doentes rastreados. Dos 13 doentes (pertencentes a 10 famílias) 7 são homozigotos e 6 são heterozigotos compostos.

Os seus dados clinicopatológicos estão resumidos na tabela 4.2. Para além de apresentarem elevados valores de TSH e baixos valores de T₄, nos doentes em que foram efectuados os doseamentos da Tg verificou-se a presença de elevados níveis desta proteína. Isto é consequência dos elevados níveis de TSH que estimulam a produção de Tg nas células epeteliais da tiróide. Valores baixos de Tg podem indicar um defeito na sua síntese ou secreção, o que estaria fora do âmbito deste estudo. Estes doentes podem apresentar bócio (hiperplasia da tiróide), mesmo depois de submetidos à terapia de substituição com tiroxina sintética. A presença de bócio foi detectada em todos os doentes excepto nas duas irmãs da família 10. Os valores de TSH apresentados na tabela 4.2 são os determinados durante o rastreio neonatal. No caso da doente 10b a confirmação do resultado revelou valores superiores àqueles apresentados na tabela 4.2. Uma vez que os doentes foram detectados no rastreio, excepto o 3a que nasceu antes do programa ser implementado, todos receberam o tratamento de substituição com tiroxina sintética logo nos primeiros dias de vida, o que lhes permitiu um desenvolvimento psicomotor normal. A doente 3a não recebeu este tratamento e é severamente afectada, apresentando atraso mental e de crescimento.

4.1.2.1 Mutações já descritas na literatura

Mutações já descritas na literatura incluem duas que alteram a grelha de leitura do gene e duas mutações pontuais do tipo *missense*. As duas primeiras correspondem à duplicação do tetranucleotídeo GGCC no exão 8 (c.1183_1186dupGGCC; Abramowicz *et al*, 1992), que origina um codão *stop* prematuro no exão 9 (p.R396fsX76) e a deleção de um T no exão 14, na posição 2422 (c.2422delT; Bakker *et al*, 2000), que origina um codão *stop* prematuro também no exão 14 (p.C808fsX23). Das 2 mutações do tipo *missense*, uma foi identificada no exão 9, a transversão nucleotídica c.1477G>A (Wu *et al*, 2002) que origina substituição de um resíduo de glicina por um de serina no codão 493 (p.G493S) e a outra no exão 11, a transversão c.1978C>G (Santos *et al*, 1999) que origina a troca de um resíduo de glutamina por um de ácido glutâmico no codão 660 (p.Q660E).

Tabela 4.2 Dados clínicos, bioquímicos e moleculares dos doentes onde foram encontradas mutações no gene da TPO.

Família/ Doente	Sexo	Idade	Tiróide	TSH* µU/ml	T ₄ * µg/dl	Tg ng/ml	Mutações identificadas
1/a	F	7	bócio	215	0.7	299	[c.1183_1186dupGGCC] + [c.1183_1186dupGGCC]
2/a	F	2	bócio	195	2.9	955	[c.1183_1186dupGGCC] + [c.1183_1186dupGGCC]
3/a	F	-	bócio	ND	ND	ND	[c.1183_1186dupGGCC] + [c.1978C>G]
3/b	F	13	bócio	235	1.9	79.7	[c.1183_1186dupGGCC] + [c.1978C>G]
4/a	F	19	bócio	81	3.6	ND	[c.1274A>G] + [c.1978C>G]
5/a	M	11	bócio	109.6	1.2	1344	[c.1477G>A] + [c.1477G>A]
6/a	F	5	bócio	285	2.8	731	[c.1978C>G] + [c.1978C>G]
7/a	F	18	bócio	192	06	ND	[c.2422delT] + [c.2422delT]
8/a	M	3	bócio	258	0.5	416	[c.2422delT] + [c.391T>C]
9/a	M	5	bócio	328	2.9	2356	[c.2512T>A] + [c.2512T>A]
9/b	M	3	bócio	378	1.8	1758	[c.2512T>A] + [c.2512T>A]
10/a	F	7	volume normal	288	0.7	640	[c.1978C>G] + [c.2748G>A]
10/b	F	3	volume normal	35,8	3.7	ND	[c.1978C>G] + [c.2748G>A]
Valores de Referência				<20	6,5-17	3-52	

*Níveis de T₄ e TSH determinados entre o 4º e 7º dia de vida no Programa Nacional de Diagnóstico Precoce. A nomenclatura das alterações encontradas está de acordo com as regras definidas pela HGVS (*Human Genome Variation Society*) e considerando o primeiro A do códon de iniciação como posição +1. A numeração das posições nucleotídicas exónicas está de acordo com a sequência de referência do mRNA da TPO (*GeneBank Accession number*: NM_000547); ND: não determinado.

4.1.2.2 Mutações novas

As 4 mutações causais ainda não descritas na literatura são mutações pontuais, 3 do tipo *missense* e 1 mutação que possivelmente afecta o mecanismo de *splicing*. As mutações do tipo *missense* foram identificadas no exão 5, a substituição c.391T>C que origina a troca de um resíduo de serina por uma prolina (p.S131P), no exão 8, a substituição c.1274A>G que origina a troca de um resíduo de asparagina por um de serina (p.N425S) e no exão 14, a transverso c.2512T>A que origina a troca de uma cisteína por um de uma de serina (p.C838S). A transverso G>A na posição nucleotídica 2748, (c.2748G>A; exão 16), embora não altere o aminoácido do resíduo correspondente (p.Q916Q) localiza-se na posição -1 da zona de consenso da sequência dadora de *splicing*, prevendo-se que altere o *splicing*. Na tabela 4.3 estão resumidas as características das mutações encontradas neste estudo.

Tabela 4.3 Mutações causais identificadas em 13 doentes com HC no rastreio molecular do gene da TPO.

Exão	Mutação	Efeito da mutação na síntese da proteína	Referência	*Frequência (110 alelos)
5	c.391T>C	p.S131P	Este estudo	1/110
8	c.1183_1186dupGGCC	p.R396fsX76	Abramowicz <i>et al</i> , 1992	6/110
8	c.1274A>G	p.N425S	Este estudo	1/110
9	c.1477G>A	p.G493S	Wu <i>et al</i> , 2002	2/110
11	c.1978C>G	p.Q660E	Santos <i>et al</i> , 1999	7/110
14	c.2422delT	p.C808fsX23	Bakker <i>et al</i> , 2000	3/110
14	c.2512T>A	p.C838S	Este estudo	4/110
16	c.2748G>A	<i>Spl?</i>	Este estudo	1/110

* Frequência nos 110 alelos estudados (55 doentes). A nomenclatura das alterações encontradas está de acordo com as regras definidas pela HGVS (*Human Genome Variation Society*) e considerando o primeiro A do codão de iniciação como posição +1. A numeração das posições nucleotídicas exónicas está de acordo com a sequência de referência do mRNA da TPO (*GeneBank Accession number*: NM_000547).

4.1.2.3 Estudos de co-segregação.

Foi possível efectuar estudos de co-segregação em todas as famílias excepto na 1 e 2. Foram rastreadas para os fragmentos do gene da TPO, onde se detectaram alterações nos doentes, 21 amostras de familiares (figura 4.2). Os resultados são compatíveis com a natureza causal destas alterações.

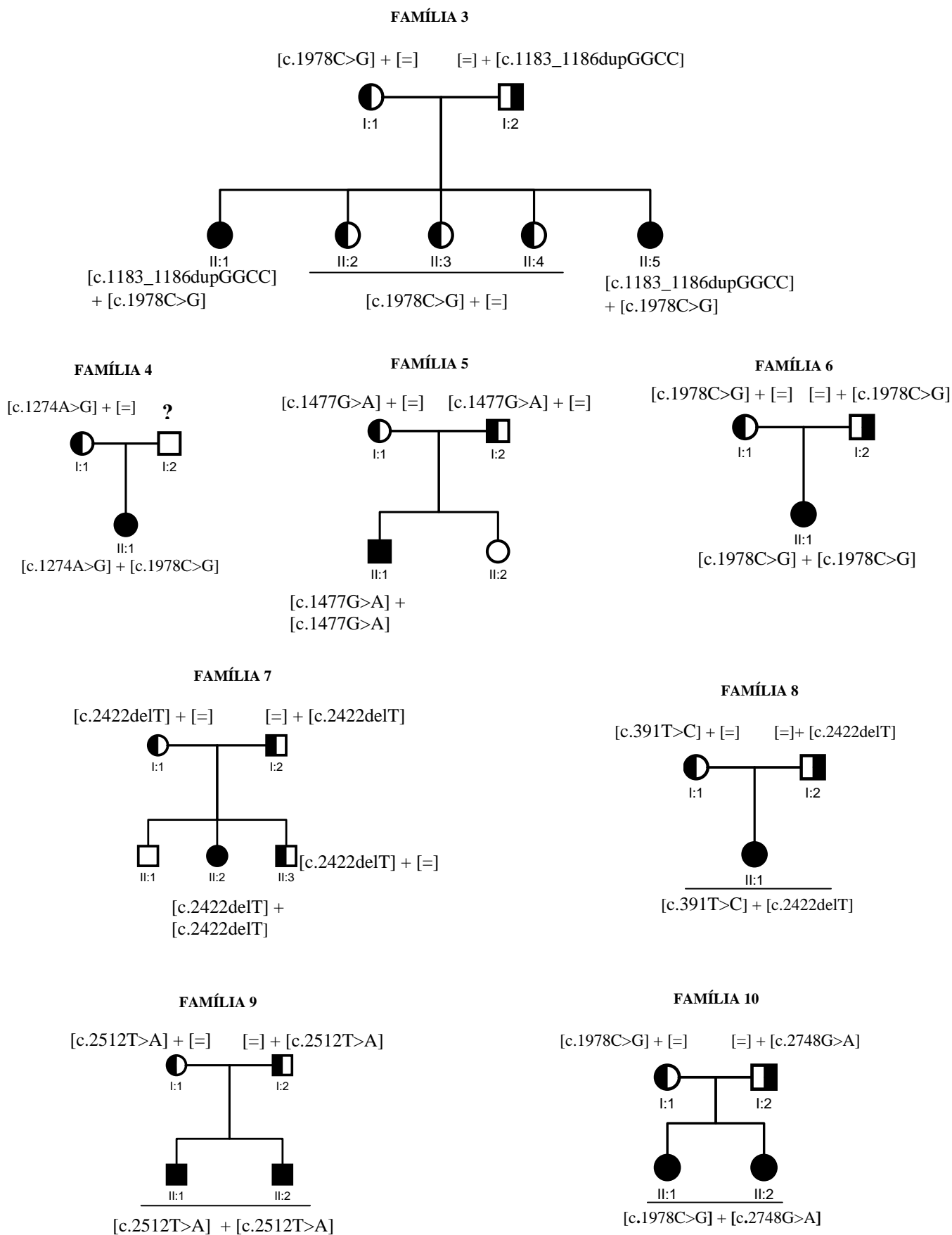


Figura 4.2 Árvores geneológicas das famílias onde foram detectadas mutações causais.

De seguida apresentam-se os resultados de SSCA e sequenciação obtidos nas mutações identificadas neste estudo nas 10 famílias. A numeração dos indivíduos está de acordo com as árvores geneológicas apresentadas na figura 4.2.

Mutação *c.1978C>G*

A substituição nucleotídica *c.1978C>G* que origina troca de um resíduo de glutamina por um de ácido glutâmico (p.Q660E) foi identificada em homozigotia na família 6 e em heterozigotia nas famílias 3, 4 e 10. Foi a mutação mais frequente identificada neste estudo; num total de 26 alelos mutados (13 doentes) foi encontrada em 7.

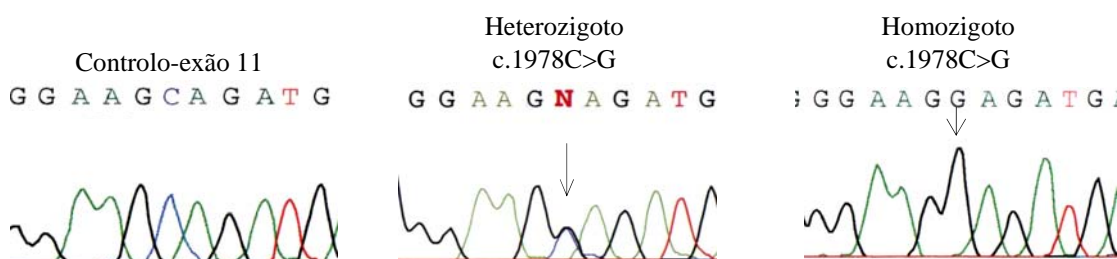


Figura 4.3 Mutação *c.1978C>G* (p.Q660E). Representação parcial da sequenciação do exão 11 evidenciando a alteração nucleotídica (controlo; heterozigoto; homozigoto).

Mutação *c.1183_1186dupGGCC*

A duplicação da sequência GGCC no exão 8 (figura 4.4) foi identificada em 4 indivíduos, em homozigotia nos doentes 1a e 2a e em heterozigotia, com a mutação *c.1978C>G*, em 2 irmãs da família 3 (3a e 3b). Nesta família o pai é heterozigoto para a duplicação da sequência GGCC no exão 8 e a mãe heterozigota para a mutação *c.1978C>G* do exão 11. Nesta família foram também estudadas 3 irmãs saudáveis, heterozigóticas para a mutação *c.1978C>G* (figura 4.2). Esta mutação foi a segunda mais frequente identificada neste estudo (6 dos 26 alelos mutados).

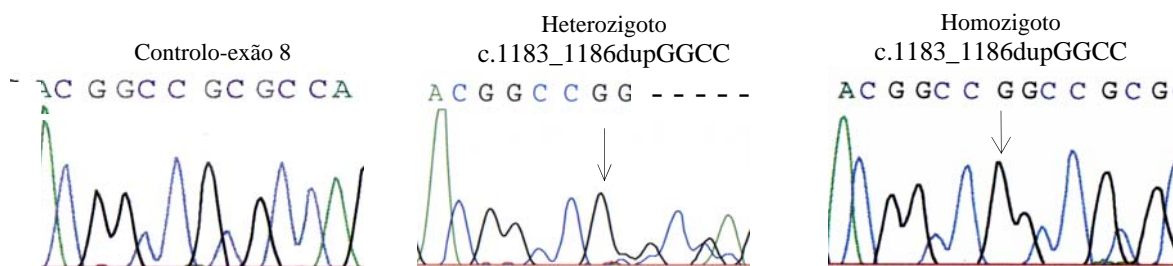


Figura 4.4 Mutação *c.1183_1186dupGGCC* (p.R396fsX76). Representação parcial da sequenciação do exão 8 (fragmento 8B). A mutação foi identificada em homozigotia nas famílias 1 e 2 em heterozigotia na família 3 (controlo; heterozigoto; homozigoto).

Mutação c.1274A>G

A mutação nova identificada no exão 8, c.1274A>G (figura 4.5) que origina a troca de um residuo de aspargina por um de serina (p.N425S) foi identificada em heterozigotia com a mutação c.1978 C>G na família 4. Só foi possível efectuar os estudos moleculares na mãe que é portadora da nova mutação. Como esta mutação cria um novo local de corte para a enzima *Dde* foi possível realizar desta forma o estudo de co-segregação (figura 4.5B) e também o rastreio populacional em 100 indivíduos controlo. O facto de não ser detectada nesta amostra populacional sugere uma natureza causal.

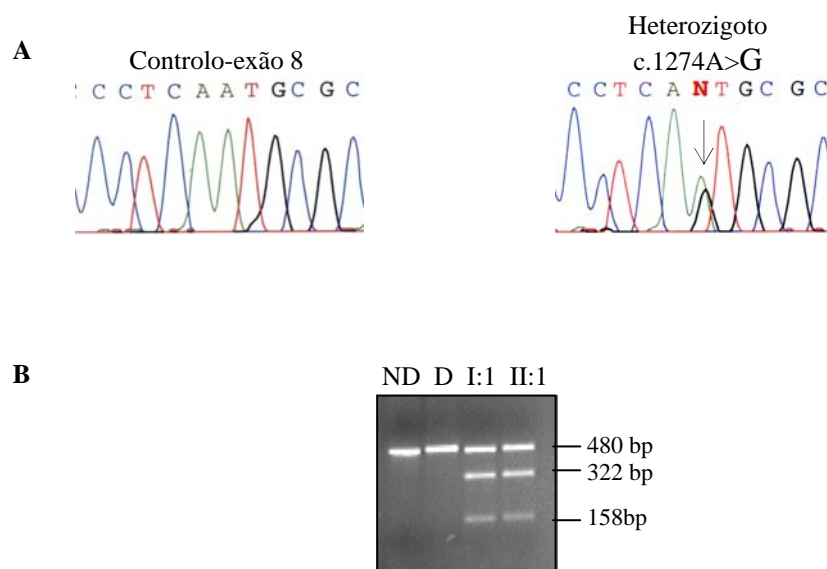


Figura 4.5 Mutação nova c.1274A>G (p.N425S). Identificada em heterozigotia do doente da família 4. (A) Representação parcial sequenciação do exão 8 evidenciando a troca de G>A na posição 1274; controlo e heterozigoto para a mutação. (B) Análise de restrição do produto de PCR do exão 8 (frgmento 8B) na família 4 com a enzima *DdeI*. A mutação cria um novo local de corte o que é demonstrado pela presença de dois fragmentos (322 e 158) bp no doente (II:1) e na mãe (I:1); ND – controlo não digerido; D – controlo digerido

Mutação c.1477G>A

A análise por SSCA do exão 9, ao contrário dos casos anteriores, revelou a presença de um fragmento com migração alterado (figura 4.6A) no doente 5a. A sequenciação do fragmento revelou a substituição nucleotídica G>A na posição c.1477 (figura 4.6B), já descrita na literatura. Os pais eram ambos heterozigotos para o mesmo fragmento com migração anormal, enquanto que uma irmã não afectada apresentou apenas o padrão normal.

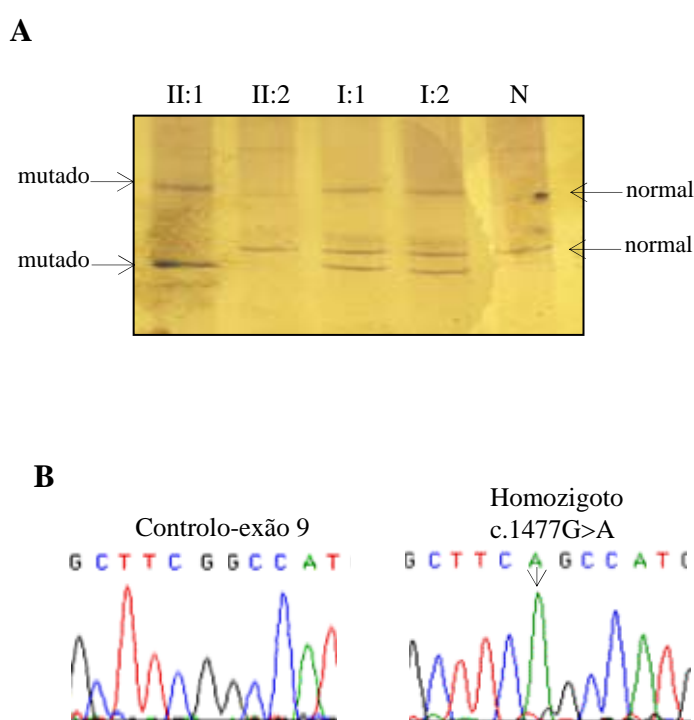


Figura 4.6 Mutação c.1477G>A (p.G493S). Identificada em homozigotia no doente 5a. (A) SSCA (*PhastSystem*) do exão 9 onde se evidencia a alteração da mobilidade deste fragmento no doente 5a (II:2; padrão homozigoto) e nos pais (I:1 e I:2; padrão heterozigoto); N controlo normal. (B) Representação parcial da sequência do exão 9 que revela a transição G>A na posição 1477 (controlo e homozigoto para a mutação).

Mutação c.2512T>A

A análise por SSCA do exão 14 revelou também alterações no padrão de migração deste fragmento (figura 4.7A). A sequenciação evidenciou a substituição c.2512T>A (figura 4.7B), que origina a troca de um aminoácido cisteína por um de serina no resíduo 838 (p.C838S). Foi identificada em homozigotia nos dois irmãos afectados da família 9. Por se tratar de uma alteração ainda não descrita na literatura efectuou-se o rastreio populacional que foi realizado por SSCA, aproveitando a alteração, introduzida pela mutação, na mobilidade electroforética.

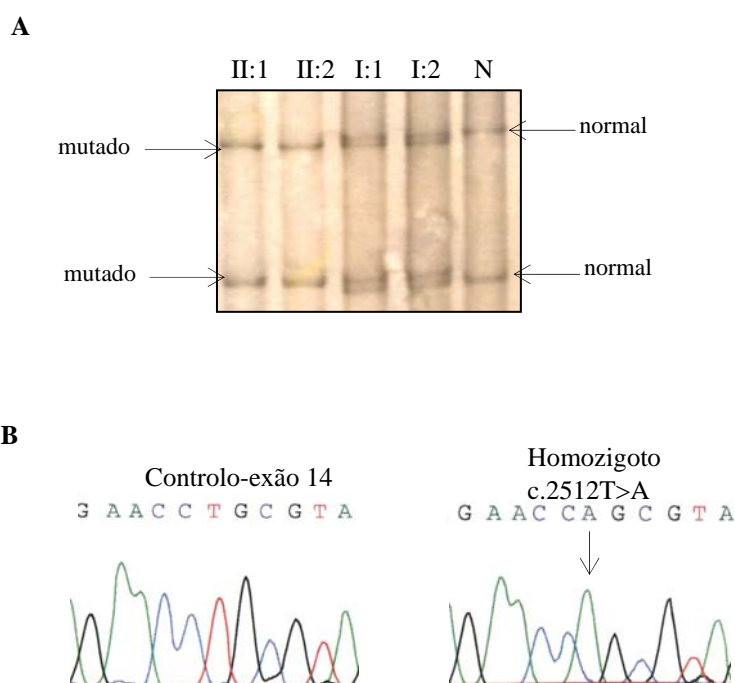


Figura 4.7 Mutação c.2512T>A (p.C838S). Identificada em homozigotia em 2 irmãos na família 9. (A) SSCA (sistema manual) do exão 14 mostra uma alteração da mobilidade electroforética deste fragmento nos dois irmãos doentes (II:1 e II:2; padrão homozigótico) e nos pais (I:1 e I:2; padrão heterozigótico); N-controlo. (B) Representação parcial da sequência do exão 14, evidencia a substituição de um T>A na posição 2512 que resulta na substituição de uma cisteína por uma serina no resíduo 838 (controlo e homozigoto para a mutação).

Mutação c.2422delT

Ainda no exão 14, a análise por SSCA seguida de sequenciação permitiu identificar uma mutação do tipo *frameshift*, c.2422delT, que origina um codão *stop* prematuro neste mesmo exão resultando numa proteína truncada (p.C808fsX23). Esta mutação, já descrita, foi identificada em homozigotia na família 7 (figura 4.8) e em heterozigotia na família 8.

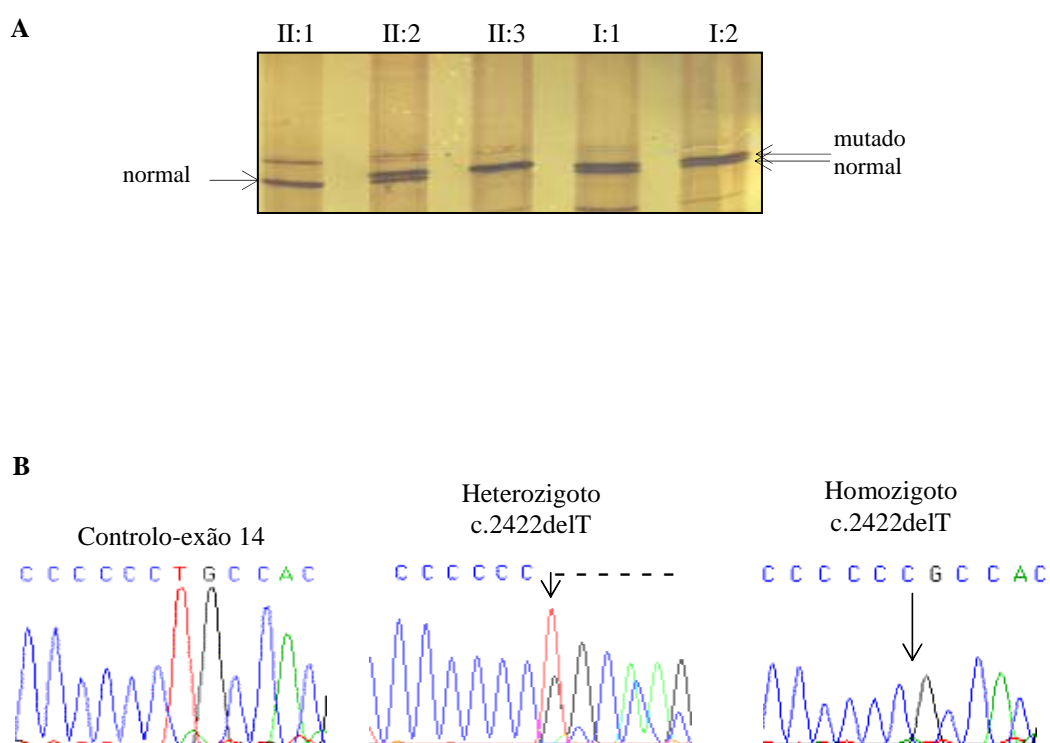


Figura 4.8 Mutação c.2422delT (p.C808fsX23). Identificada em homozigotia na família 7 e em heterozigotia na família 8. (A) SSCA (*PhastSystem*) do exão 14 revela alteração da mobilidade electroforética deste fragmento no doente da família 7 (II:2; padrão homozigótico), nos pais e num irmão saudável (I:1, I:2 e II:3; padrão heterozigótico) enquanto que outro irmão saudável apresenta o padrão normal (II:1). (C) Representação parcial da sequência do exão 14 evidencia a deleção de um T na posição 2422 (controlo, heterozigoto e homozigoto para a mutação).

Mutação *c.391T>C*

Mutação nova, *c.391T>C* (p.S131P), identificada no exão 5 no doente 8a (figura 4.9), em heterozigotia com a mutação já descrita *c.2422delT* (exão 14). A mãe é portadora desta mutação e o pai é portador da mutação *c.2422delT*. O rastreio populacional foi também efectuado por SSCA o qual sugeriu tratar-se de uma mutação causal uma vez que não foi identificada nos 200 alelos rastreados.

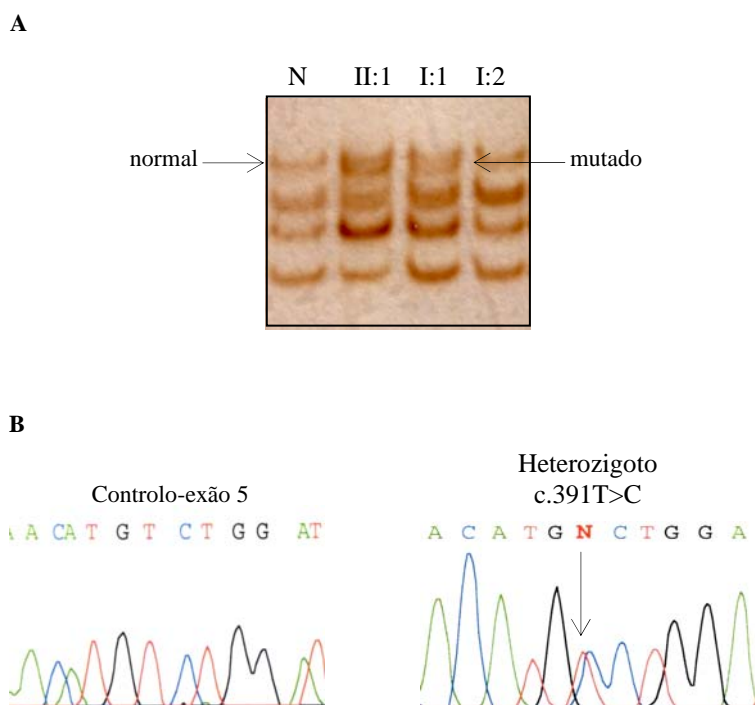


Figura 4.9 Mutação nova *c.391T>C* (p.S131P). Identificada em heterozigotia no doente 8a. (A) SSCA (sistema manual) do exão 5 evidência a alteração do padrão de migração no doente (II:1) e na mãe (I:1) da família 8 (padrão heterozigoto); N-controlo. (B) Representação parcial da sequência do exão 5 (controlo e heterozigoto para a mutação).

Mutação c.2748C>G

Foi identificada uma mutação nova, a substituição de G>A na posição 2748 do exão 16. Embora não altere o resíduo correspondente, p.Q916, localizada-se na posição -1 na região consenso da sequência dadora de *splicing*. Duas irmãs, 10a e 10b (figura 4.10) são heterozigóticas compostas para esta mutação e para a mutação presente no exão 11, c.1978C>G. O pai é portador da mutação nova e a mãe é portadora da mutação c.1978C>G. Efectuou-se o rastreio populacional por SSCA onde se confirmou a ausência da alteração.

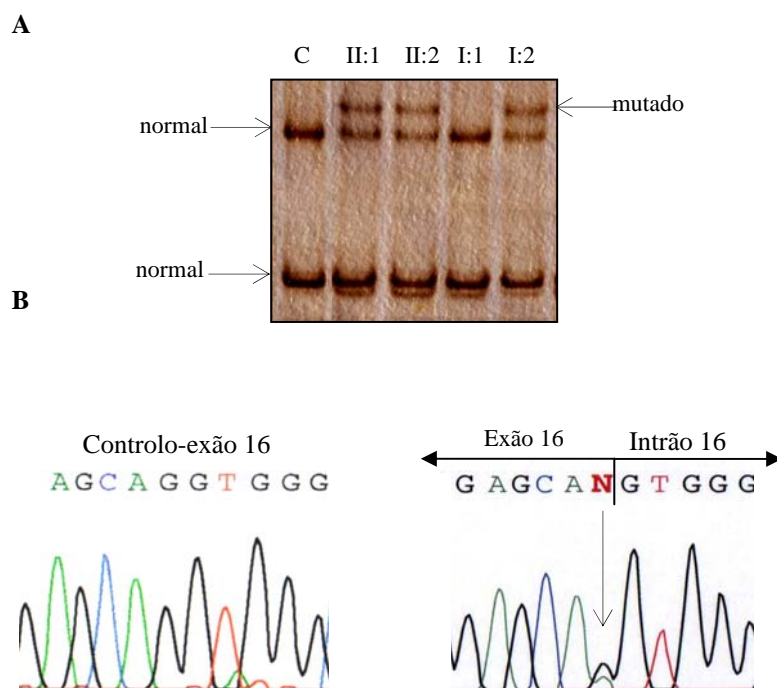


Figura 4.10 Mutação nova, c.2748G>A. Identificada em heterozigotia, na família 10. (A) SSCA do exão 16 (sistema manual) apresenta alteração da mobilidade electroforética nas duas doentes (II:1 e II:2) e no pai (I:2). (B) Representação parcial da sequência do exão 16 evidência a troca de G>A na posição 2748 que corresponde à posição -1 na região consenso da sequência dadora de *splicing* (controlo e heterozigoto para a mutação).

4.1.3 Efeito deletério das mutações novas

Alinhamento da sequência de aminoácidos da TPO com sequências de outras peroxidases

Foi comparada a sequência aminoacídica da TPO com a de outras peroxidases humanas e de mamíferos (figura 4.11) nas regiões de duas das novas mutações do tipo *missense*, c.1274A>G (p.N425S) e c.2512T>A (p.C838C).

A	↓	↓
TPO do doente	K A L S ⁴²⁵ A H W	G R T S ⁸³⁸ V D S
TPO humana	K A L N ⁴²⁵ A H W	G R T C ⁸³⁸ V D S
MPO humana	K S L N ⁴³⁴ P R W	*
EPO humana	R R L N ⁴⁰⁶ P R W	*
LPO humana	K R L N ⁴⁰¹ P Q W	*
LPO bovina	K K L N ⁴⁰¹ P H W	*
B		
TPO do doente	K A L S ⁴²⁵ A H W	G R T S ⁸³⁸ V D S
TPO humana	K A L N⁴²⁵ A H W	G R T C⁸³⁸ V D S
TPO porco	K A L N⁴²⁴ A H W	G R T C⁸³⁷ V D A
TPO ratinho	K A I N⁴¹³ K H W	G K T C⁸²⁶ I D S
TPO rato	K A I N⁴¹³ T H W	G K T C⁸²⁶ I D S

Figura 4.11 Representação parcial do alinhamento da TPO com outras peroxidases, (A) peroxidases humanas (B) peroxidases de mamíferos, na vizinhança dos resíduos alterados (N425S e C838S). O alinhamento foi efectuado utilizando o programa CLUSTAL (Os números de identificação das sequências utilizadas nestes alinhamentos e os resultados dos alinhamentos encontram-se em anexo). A negrito estão representados os resíduos conservados. * As outras peroxidases não apresentam região homóloga na região codificada pelo exões 13-17 da hTPO.

Verificou-se que os resíduos em causa, bem como muitos resíduos que se encontram na vizinhança destes, estão conservados nas várias TPOs de mamíferos. Verificou-se o mesmo no caso da mutação p.N425S quando comparada a sequência aminoacídica da TPO com as outras peroxidases humanas. Estes resultados demonstram que os resíduos em causa têm um papel importante na proteína e que provavelmente se trata de alterações patogénicas.

Alteração de resíduos importantes na proteína

A terceira mutação nova do tipo missense c.391T>C (p.S131P), identificada no exão 5 do doente da família 8, está localizada num potencial local de glicosilação da TPO, o N129. No domínio citoplasmático, orientado para o lúmen folicular, a TPO apresenta o centro catalítico e 4 potenciais locais de glicosilação (N129; N307; N342; N569; Fayadat *et al*, 1998; figura 4.12). Verificou-se que estes resíduos se encontravam conservados apenas nas TPOs de mamíferos (dados não mostrados). A sequência que precede um destes locais de ligação de unidades oligossacarídicas, N-X-S/T (sendo X qualquer aminoácido excepto a prolina) é alterada para N-X-P prevendo-se que elimine este local de glicosilação.

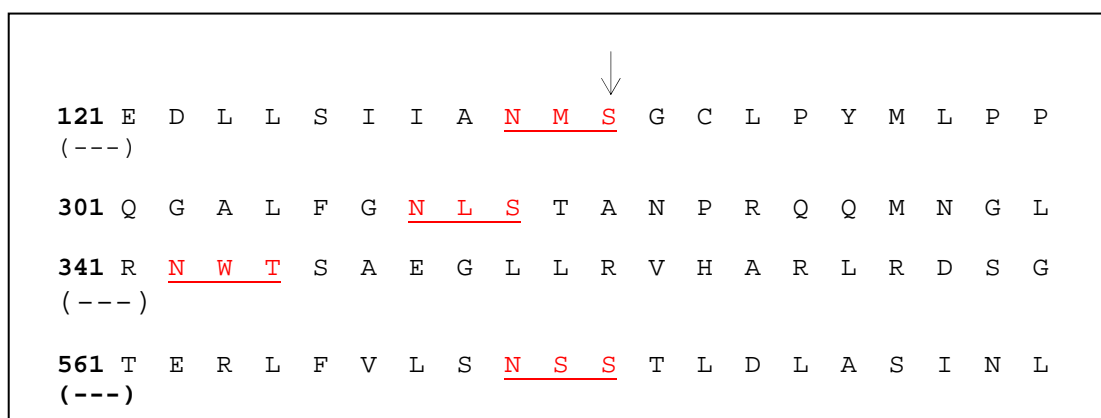


Figura 4.12 Representação parcial da sequência aminoacídica da TPO com os locais de glicosilação. Os aminoácidos sublinhados representam 4 potenciais locais de glicosilação (N129; N307; N342; N569) determinados a partir do motivo N-X-S/T (sendo X qualquer aminoácido excepto prolina). A seta indica a troca aminoacídica introduzida pela mutação c.391T>C que origina a substituição de um resíduo de serina por um de prolina na posição 131.

Mutação de splicing

A mutação identificada no exão 16 (figura 4.10) é uma mutação pontual, troca de G>A na posição 2748. Esta mutação, apesar de não alterar o resíduo (p.Q916), encontra-se na posição -1 da zona de consenso da sequência dadora 5' de *splicing*. Estão publicados para outros genes as frequências com que ocorrem estes nucleotídeos nestas posições. Em cerca de 78% dos genes, nesta posição encontra-se um G e só em 10% a posição é ocupada por um A (Shafiro e Senapathy 1987; Mount *et al*, 1982). Krawczak *et al* (1992) apresenta um valor de consenso de 97% para um G noutros genes, num mesmo contexto de sequência. A análise através do

	Gn Ex.	Typ S	Begin	End	Len	Fr	Ph	I/Ac	Do/T	CodRg	P.	Tscr..
A	3.01	Init +	105185	105267	83	1	2	83	98	-22	0.245	-1.26
	3.02	Intr +	105972	106101	130	0	1	128	80	65	0.815	10.40
	3.03	Intr +	114821	114898	78	1	0	119	119	11	0.935	7.05
B	3.01	Init +	105185	105267	83	1	2	83	98	-22	0.236	-1.26
	3.02	Intr +	105972	106144	173	0	2	128	-20	99	0.645	2.69
	3.03	Intr +	107799	107966	168	1	0	101	66	64	0.873	5.42

Figura 4.13 Representação parcial da matriz de parâmetros do programa GENSCAN (A) sequência normal. (B) sequência mutada (c.2748G>A). Gn Ex: número do gene e exão; Typ: Init - exão inicial, Intr - exão interno; S: orientação da cadeia (+ sequência fornecida); Begin e End: início e fim do exão ou sinal; Len: tamanho do fragmento; Fr: (frame – enquadramento); Ph: fase do exão; I/Ac: sinal de iniciação ou local de *splicing* 3'; Do/T: local de *splicing* 5' ou sinal de terminação; codRg: *score* para a região codificante; P: probabilidade de exão; Tscr: *score* do exão (que depende do tamanho, I/Ac, Do/T e *score* do CodRg).

programa GENSCAN, baseado num modelo probabilístico para a determinação da estrutura de um gene (Burge *et al*, 1998), sugere que a mutação origina a perda do local dador de *splicing* da sequência consenso 5'. Na figura 4.13 estão representados parte dos resultados obtidos para a sequência do gene normal e mutada obtidos através da análise deste programa. Verificou-se que o valor de *log-odds* para a previsão do local de *splicing* 5' é alterado de 80 para -20. Um valor inferior a zero, neste caso, indica que há uma forte possibilidade de haver perda do local de *splicing*.

4.2. Haplotipagem

Para inferir à cerca da origem das duas mutações mais frequentes identificadas neste estudo, c.1183_1186dupGGCC e c.1978C>G, foi também realizada a haplotipagem dos familiares dos doentes que apresentavam estas alterações. Para tal recorreu-se às variantes polimórficas de um único nucleotídeo (SNPs), identificadas no rastreio do gene (tabela 4.1), e ao marcador STR HumTPO (figura 4.14) cuja frequência está descrita na população Portuguesa (o número e a frequência dos alelos na população Portuguesa encontram-se em anexo). A frequência de cada SNP foi determinada em 50 indivíduos controlo.

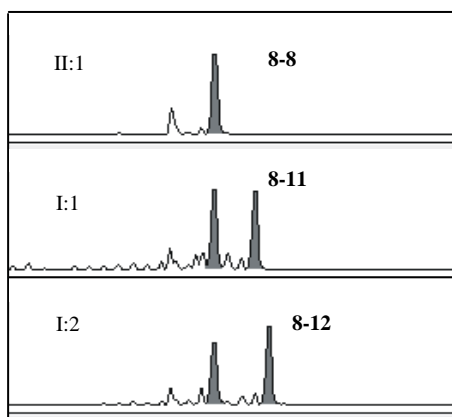


Figura 4.14 Análise do marcador STR HumTPO. Família 6, o doente apresenta a mutação c.1978C>G em homozigotia que segrega com o alelo (alelo 8) mais frequente na nossa população.

De acordo com os alelos observados foram construídos os haplótipos representados na figura 4.15. Um haplótipo específico foi identificado para todos os alelos com a mutação c.1183_1186dupGGCC e outro para todos aos alelos com a mutação c.1978 C>G. Os doentes 1a e 2a são homozigóticos para a mutação c.1183_1186dupGGCC e o doente da família 6 é homozigótico para a mutação c.1978C>G, apresentando os respectivos haplótipos em homozigotia. Não foi observada consanguinidade em nenhuma das famílias estudadas. O facto dos dois doentes da família 3 se apresentarem como heterozigotos compostos para estas duas mutações mais frequentes permitiu também evidenciar o haplótipo específico que segrega com cada um dos alelos mutados. O pai é portador da duplicação GGCC que apresenta o mesmo haplótipo em “heterozigotia”, observado para os indivíduos

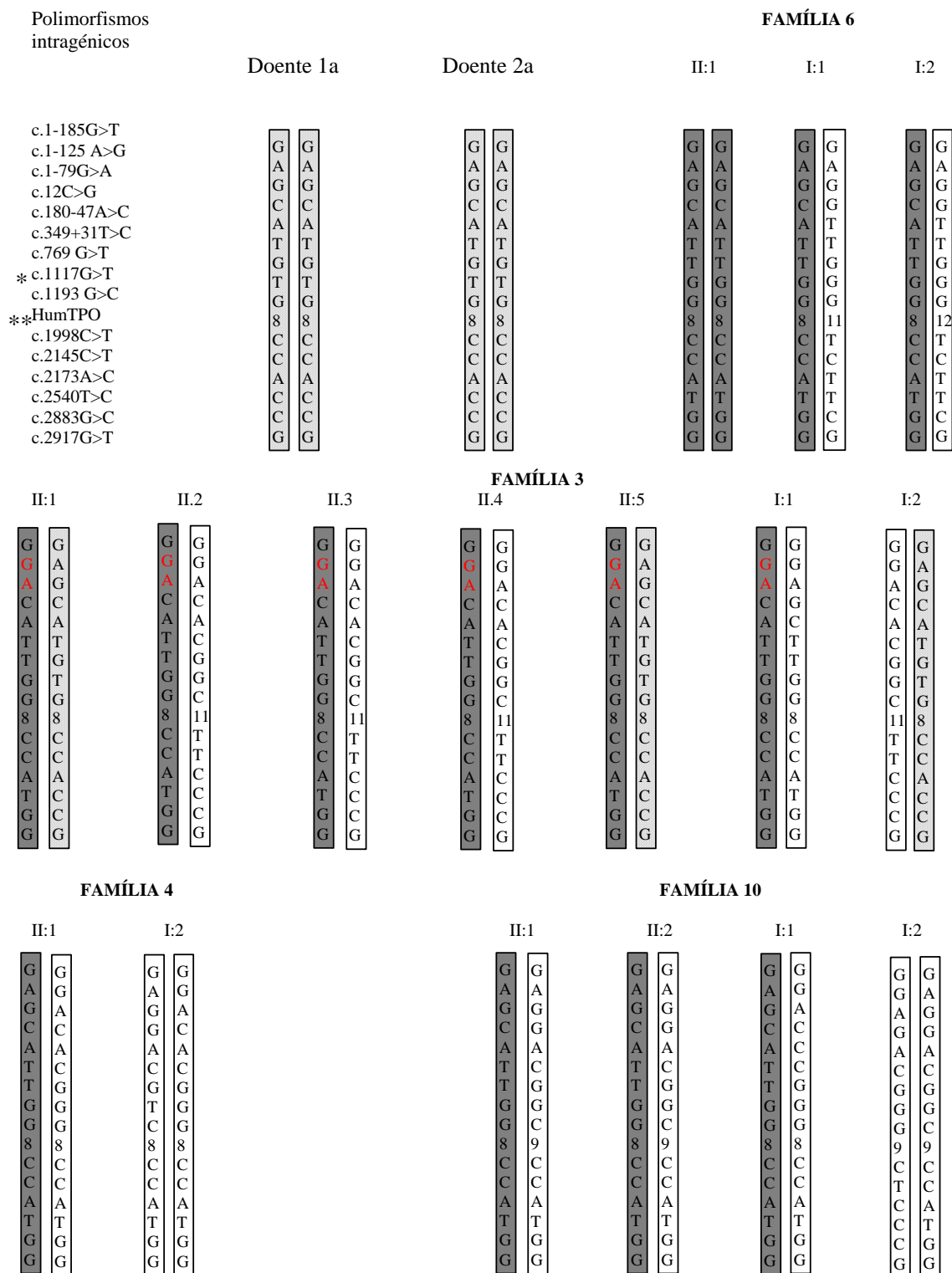


Figura 4.15 Haplótipagem das famílias onde foram identificadas as duas mutações mais frequentes *c.1183_1186dupGGCC e **c.1978C>G (* localização das mutações). Foram utilizados 15 SNPs e um marcador intragénico HumTPO que estão representados na figura. A vermelho estão assinalados os SNPs que diferem do haplótipo específico que segrega com a mutação c.1978C>G.

■ Haplótipo que co-segrega com a mutação c.1978C>G.

▨ Haplótipo que co-segrega com a mutação c.1183_1186dupGGCC.

1a e 2a e a mãe é portadora da c.1978C>G que apresenta um haplótipo que difere apenas em dois polimorfismos contíguos, c. -125A>G e c.1-79 G>A, na extremidade oposta ao local da mutação, podendo tratar-se de um evento de recombinação génica. Nos doentes das famílias 4 e 10 que apresentam a mutação c.1978C>G em heterozigotia, tornou-se mais difícil confirmar se o haplótipo que segrega com esta mutação é o mesmo que o identificado para o doente homozigótico 6a, principalmente na família 4 em que a amostra do pai não estava disponível para estudo. Estes haplótipos específicos não foram encontrados, em homozigotia, nos restantes doentes.

Os resultados apontam para uma origem comum para cada uma destas mutações.

5. DISCUSSÃO

A análise por SSCA das regiões exónicas do gene da TPO e a posterior sequenciação dos fragmentos em que o padrão de migração se revelou alterado, confirmou a natureza polimórfica da maior parte das alterações. Nos 55 doentes estudados foram encontradas 8 mutações causais e 15 variantes polimórficas.

Como grande parte dos exões apresentam variantes polimórficas foi possível comparar a sensibilidade dos dois sistemas utilizados na detecção dos polimorfismos conformacionais. A maior parte das alterações encontradas foi detectada no rastreio do gene da TPO efectuado por SSCA utilizando o sistema manual. Esta diferença poderá ser explicada pelas diferenças de amplitude de separação dos geis utilizados (os geis do *PhastSystem* têm um comprimento de 4 cm enquanto que os do sistema manual apresentam entre 22 e 28 cm). Embora a matriz de separação apresente uma composição diferente, adaptada a cada sistema, um tão pequeno espaço para a separação dos fragmentos poderá revelar-se crítico no estabelecimento das condições de detecção dos polimorfismos conformacionais. Contudo, no sistema automatizado, uma vez estabelecidas as condições electroforéticas que permitiam a detecção de determinada alteração tinha a vantagem de ser um método muito mais rápido.

Como não foi possível obter tecido da glândula dos doentes para realizar estudos ao nível do mRNA recorreu-se a outras estratégias para inferir sobre a patogencidade das mutações novas. Como não se encontram descritos estudos cristalográficos completos da TPO humana, muitas vezes faz-se a extrapolação dos resultados obtidos da mieloperoxidase (MPO) para a TPO como forma de inferir sobre o possível efeito das mutações na estrutura e função da proteína.

Em duas das mutações novas do tipo *missense* c.1274A>G (p.N425S) e c.2512T>A (p.C838S), as sequências de resíduos que abrangiam o codão alterado foram comparadas com os de outras peroxidases humanas e com as peroxidases de outros mamíferos, revelando que os resíduos em causa se encontravam conservados. Isto sugere que estes resíduos são importantes para a estrutura e/ou função da proteína e que estas mutações serão, provavelmente, responsáveis pelo fenótipo observado. A mutação c.1274A>G que origina a substituição de uma asparagina, aminoácido básico, por uma serina, aminoácido neutro, foi identificada em heterozigotia no caso *index* da família 4, que apresenta a mutação c.1978C>G no outro alelo. Esta mutação nova localiza-se na região que codifica parte do

centro catalítico da proteína, codificado pelos exões 8, 9 e 10, prevendo-se que possa influenciar a actividade catalítica da mesma. Outras mutações têm sido descritas nesta região da proteína (Bikker *et al*, 1995; Bikker *et al*, 1996; Bikker *et al*, 1997; Bakker *et al*, 2000; Ambrugger *et al*, 2001; Wu *et al*, 2002).

A terceira mutação nova, do tipo *missense*, identificada no exão 5, c.391T>C (p.S131P), prevê-se que elimine um potencial local de glicosilação ligado ao resíduo de asparagina N129 (N-glicanos). Esta região da proteína, apesar de não apresentar homologia com as outras peroxidases humanas, encontra-se conservada nas várias TPOs de mamíferos e verifica-se o mesmo para os restantes locais de glicosilação. Nas glicoproteínas, estes carboidratos estão implicados em várias funções tais como a manutenção da conformação e solubilidade da proteína, protecção contra a proteólise, transporte e mediação de actividades biológicas (Wang *et al*, 1996). Estudos realizados sobre o transporte intracelular da TPO sintetizada de novo, do retículo endoplasmático rugoso para a membrana celular, revelaram que só uma pequena parte da proteína sintetizada apresenta uma conformação correcta e atinge a superfície da célula. Verificou-se que os N-glicanos têm um papel importante neste processo e intervêm ainda na própria actividade da enzima (Fayadat *et al*, 1998). O facto da proteína mutada perder este local de glicosilação poderá alterar a sua conformação e promover a sua degradação assim como perturbar o seu transporte até à membrana.

A mutação nova no exão 14, c.2512T>A (p.C838S), identificada em homozigotia em dois irmãos (9a e 9b), localiza-se no terminal carboxílico da proteína. Esta região da TPO não apresenta homologia com as outras peroxidases humanas. Para além de servir como âncora à membrana pouco se sabe sobre outras eventuais funções. As regiões codificadas pelos exões 13, 14 e 15, apresentam grande similaridade com a proteína de controlo complementar (CCP), com o domínio de ligação ao cálcio do factor de crescimento epidermal (*EGF-like potential calcium-binding domain*) e com um domínio transmembranar, respectivamente. No módulo EGF existem 3 ligações dissulfido (C800-C814, C808-C823 e C825-C838), envolvendo uma delas o resíduo da cisteína em causa, C838. A substituição do aminoácido cisteína por um aminoácido neutro, a serina, elimina esta ligação o que pode promover a alteração da estrutura terciária da proteína. Nesta região estão também descritas outras mutações causais (Bikker *et al*, 1995; Bikker *et al*, 1996; Bikker *et al*, 1997; Kotani *et al*, 1999; Bakker *et al*, 2001; Wu *et al*, 2002; Umeki *et al*, 2002; Niu *et al*, 2002; Rivolta *et al*, 2003).

A mutação identificada no exão 16, c.2748G>A, não altera o codão correspondente na proteína, mas encontra-se na posição -1 da zona de consenso da sequência (dadora) 5' de

splicing. Como não foi possível obter tecido do doente para a análise do mRNA para confirmar uma possível alteração do *splicing*, foi utilizado o programa GENSCAN, desenhado para prever estruturas genómicas. Os resultados sugerem a perda deste local de *splicing*. O exão poderá ser eliminado na totalidade (*skipping* do exão) ou, alternativamente, poderá haver a utilização de um local de *splicing* *críptico* originando ou um transcrito em que lhe falta parte da região codificante ou um com uma sequência adicional de origem intrónica. O facto de terem sido observados para outros genes, num mesmo contexto de sequência, o valor de consenso de 97%, reforça a ideia de que esta mutação pode introduzir uma alteração no *splicing* (Krawczak *et al*, 1992). A região da proteína que é codificada por este exão localiza-se junto à zona de inserção na membrana celular. Uma alteração no *splicing* poderá perturbar a sua localização nas células foliculares da tiróide e conseqüentemente alterar a sua actividade catalítica ou ainda haver uma alteração do *turnover* da proteína.

O estudo das mutações novas foi também acompanhado de rastreios populacionais (100 amostras de indivíduos saudáveis não aparentados) e estudos de co-segregação, quando se obteve material dos familiares. Os resultados corroboram a ideia de que se trata de mutações causais e não de polimorfismos associados. Não foi possível efectuar estudos de co-segregação nas famílias 1 e 2, no entanto, por se tratar de uma mutação já descrita na literatura e sendo uma das mais frequentes em doentes com HC por disormonogénese, não parece suscitar dúvidas quanto à sua natureza causal. O mesmo não foi verificado para a nova variante c.180-47A>C que, para além de não co-segregar com esta forma de HC, surge na população controlo com uma frequência de 19%, confirmando a sua natureza polimórfica.

As mutações já descritas na literatura, identificadas neste estudo, nomeadamente c.1183_1186dupGGCC, c.1477G>A, c.1978C>G e c.2422delT, também não foram caracterizadas a nível da expressão e função da proteína mutada. A duplicação GGCC origina um codão *stop* prematuro no exão 9 perdendo a proteína parte do centro catalítico. A deleção de um T na posição 2422 origina um codão *stop* prematuro no exão 14, pelo que a proteína resultante não apresenta a região de inserção na membrana. Quer pela perda da actividade enzimática quer pela perda da localização membranar não é difícil estabelecer a patogenecidade destas duas alterações. No caso da mutação do tipo missense c.1477G>A (p.G493S) a substituição da glicina adjacente à histidina proximal (H494) poderá ser suficiente para alterar a hidrofobicidade do local de ligação ao grupo heme e influenciar a transferência dos electrões no centro catalítico e conseqüentemente a sua funcionalidade. Na substituição c.1978C>G (p.Q660E) verificou-se que o resíduo glutamina, substituído por um

de ácido glutâmico, estava localizado numa região conservada nas diferentes peroxidases humanas e peroxidases de outros mamíferos (Santos *et al*, 1999). Esta observação aliada ao facto de estudos familiares e populacionais indicarem que co-segrega com a doença tudo leva a crer que se trata de uma mutação causal.

O rastreio de mutações no gene da TPO em doentes com HC em várias populações, nomeadamente na holandesa (Bakker *et al*, 2000), Alemã (Gruters *et al*, 1996), Brasileira (Santos *et al*, 1999), Argentina (Rivolta, *et al*, 2003), Japonesa (Kotani *et al*, 1999), *Amish* (Pannain *et al*, 1999) e Chinesa (Niu *et al*, 2002 e Wu *et al*, 2002) demonstra uma certa heterogeneidade nas mutações do gene da TPO entre grupos populacionais. No presente trabalho, a mutação com maior prevalência é a c.1978C>G no exão 11, identificada pela primeira vez num doente Brasileiro (Santos *et al*, 1999), foi detectada em heterozigotia, nos nossos doentes 3a, 3b, 4a, 10a e 10b e em homozigotia no doente 6a. Na família 3 os indivíduos afectados apresentam esta mutação em heterozigotia com a duplicação GGCC no exão 8, a segunda mutação mais prevalente neste estudo e referida como a mais prevalente na população Holandesa (Bakker *et al*, 2000). Uma das mutações detectadas neste estudo, c.1477G>A (p.G493S; família 5) foi também identificada em heterozigotia na população Chinesa (Wu *et al*, 2002), que se pensava ter um grupo de mutações “privadas”, diferentes daquelas encontradas nas populações caucasianas. Os nossos dados contrariam, de certa forma, essa ideia de marcada heterogeneidade inter-populacional.

A determinação dos haplótipos associados às duas mutações mais prevalentes parecem indicar uma origem comum para cada uma delas. Uma vez que temos poucas famílias para cada uma das mutações não foi aplicada nenhuma análise estatística posterior. Noutras populações onde foram detectadas estas duas mutações não existem estudos populacionais que nos permitam comparar os resultados.

A nível da localização das mutações no gene da TPO, embora os resultados dos diversos estudos apontem para regiões *hot spot*, como por exemplo a zona correspondente ao centro catalítico da enzima (exões 8, 9 e 10) o rastreio do gene não pode ser limitado a estas regiões uma vez que estão caracterizadas mutações praticamente ao longo de todo o gene. Neste trabalho foi identificada uma mutação no exão 16, região onde não havia mutações descritas.

O facto de não terem sido detectadas mutações nos restantes doentes rastreados poderá ter vários motivos. Sabe-se que a metodologia utilizada no rastreio (PCR-SSCA) apresenta uma sensibilidade inferior a 100% na detecção dos polimorfismos conformacionais (Orita *et al*, 1989). Podem existir mutações que não foram detectadas por estarem localizadas

na região promotora, nas regiões não traduzidas (5'-UTR e 3'-UTR) ou ainda em regiões intrónicas não abrangidas neste rastreio. Podem ainda existir grandes deleções no gene, envolvendo a totalidade de um ou mais exões, que não são detectadas através de SSCA ou sequenciação. Como foi verificado na revisão bibliográfica, outros genes podem estar envolvidos nesta forma de HC. Uma vez que não dispusemos de qualquer estudo bioquímico diferencial, a patologia nos doentes rastreados poderá dever-se a defeitos noutros passos da hormonogénese.

Apesar da TPO ser uma enzima chave na hormonogénese, os casos de HC com defeitos no gene desta proteína, em comparação com a totalidade dos casos de HC, são considerados raros. O facto de se tratar de uma forma autossómica recessiva e tendo em conta o menor sucesso reprodutivo dos indivíduos afectados, que não foram abrangidos pelo rastreio e tratamento precoce, explica a raridade desta forma de HC. A “nova geração” de doentes não vai sofrer este tipo de selecção uma vez que estes apresentam um desenvolvimento normal. A caracterização destas formas ganha assim importância uma vez que no futuro a sua frequência tenderá a aumentar.

O facto de terem sido descritos um caso de carcinoma folicular (Medeiros-Neto *et al*, 1998) e adenoma da tiróide (Kotani *et al*, 1999) com mutações no gene da TPO, foca também a importância de um diagnóstico ao nível molecular dos doentes com HC por disormonogénese. Fará todo o sentido repensar o acompanhamento clínico dos doentes para permitir a detecção precoce da doença. A genotipagem de mais doentes pode ajudar a compreender o papel das mutações no desenvolvimento destas doenças.

O trabalho apresentado permitiu um diagnóstico diferencial preciso, não invasivo e sem necessidade de recorrer a uma suspensão da medicação. A identificação das mutações nestes doentes (24 % dos rastreados) vai permitir direccionar posteriores estudos moleculares com vista ao aconselhamento genético e onde a futura descendência poderá beneficiar de um tratamento diferenciado e sem ter de esperar pelo resultado do rastreio neonatal.

É o primeiro trabalho realizado em Portugal com o objectivo de estabelecer a etiologia molecular do HC em doentes sem alterações no desenvolvimento da glândula da tiróide. Uma vez que ainda existem poucos estudos realizados noutros países, esta amostra terá uma maior relevância em termos de extrapolações epidemiológicas.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Abordagem dos casos “negativos”

Nos doentes onde não foram identificadas mutações no gene da TPO deverá proceder-se à sequenciação directa dos exões, pelo menos naqueles com maior número de mutações descritas. O facto de estarem a ser implementadas novas técnicas no tratamento de amostras para sequenciar, que reduzem consideravelmente os custos e tempo despendidos na sua preparação, justifica a sequenciação directa das regiões exónicas, para estes doentes e outros que possam vir a ser incluídos no estudo. No caso de nenhuma alteração ser encontrada, uma vez que o HC por disormonogénese compreende um conjunto tão heterogéneo de defeitos, será de todo conveniente que futuros trabalhos se iniciem por uma triagem clínica dos doentes através de um diagnóstico bioquímico que permita direccionar os estudos moleculares. Na presença de famílias informativas a análise de ligação génica poderá também ser uma estratégia a considerar como ponto de partida na orientação destes estudos.

O aprofundar do conhecimento no domínio dos mecanismos da hormonogénese vai, com certeza, permitir a identificação de novos genes envolvidos neste processo e explicar um grande número de casos de HC, que ao nível molecular, estão classificados como “idiopáticos”. A utilização da tecnologia dos *microarrays* para a análise de expressão génica em tecido da tiróide permitirá identificar mais genes específicos deste tecido que poderão estar envolvidos na potogénese do HC.

Abordagem dos casos “positivos”

O gene da TPO é expresso apenas nos tecidos da tiróide, o que implica a realização de uma biópsia ao doente para estudos do mRNA ou da proteína. O efeito deletério das mutações identificadas neste estudo será definitivamente estabelecido recorrendo a estudos de mRNA ou testando a actividade da proteína alterada num sistema de expressão *in vitro*. Estes estudos permitirão também compreender melhor a relação estrutura-função da proteína. No caso do estudo da mutação em mRNA, obtido a partir de tecido da tiróide de doentes, é necessário ter em conta a variabilidade de transcritos que existem, naturalmente, e que poderão vir a dificultar a análise.

No que se refere aos estudos populacionais, as duas mutações mais frequentes parecem apresentar uma origem comum para cada uma delas. Será interessante comparar a

haplotipagem dos nossos doentes com a de doentes de outras populações para esclarecer se estas mutações tiveram origem apenas num evento ou em mais eventos mutagénicos.

O rastreio molecular

A proporção de doentes onde foram detectadas mutações no gene da TPO (24% da nossa amostra), justifica a implementação do rastreio molecular em novos doentes com HC sem anomalias no desenvolvimento da tiróide. Uma vez que detectamos duas mutações com maior prevalência na nossa população, c.1183_1186dupGGCC e c.1978C>G, a caracterização molecular deveria iniciar-se pelo rastreio dos respectivos exões (8 e 11). No caso da mutação c.1183_1186dupGGCC, há a possibilidade de se efectuar o rastreio por restrição enzimática, já que esta alteração introduz um novo local de corte para a enzima *NaeI*, permitindo uma detecção rápida. Para o rastreio da mutação no exão 11 é possível realizar o seu rastreio através de um PCR alelo-específico ou por sequenciação directa. Se não forem identificadas estas mutações o estudo deverá incluir a sequenciação directa dos exões 8-14 em primeiro lugar, uma vez que nesta região do gene estão localizadas 85% do total de mutações descritas até à data. Só depois deverão ser rastreadas as restantes regiões exónicas. Esta abordagem permitirá reduzir custos e tempo despendidos no rastreio molecular destes doentes.

A biologia molecular tem dado um importante contributo para a classificação do hipotiroidismo congénito. Da revisão bibliográfica efectuada perspectiva-se um crescente interesse nesta área e, apesar do generalizado consenso que existe nos principais passos da hormonogénese, existe a possibilidade de se abrirem novas linhas de investigação em áreas muito específicas, que irão permitir um melhor entendimento de todo o processo. A continuação do estudo de outros doentes Portugueses, quer pela caracterização de mutações adicionais no gene *TPO*, quer pelo rastreio de outros genes, contribuirá certamente nesse sentido.

7. BIBLIOGRAFIA

Abramowicz MJ, Tarkovnik HM, Varela V. Identification of a mutation in the coding sequence of the human thyroid peroxidase gene causing congenital goiter. *J Clin Invest* 1992 **90** 1200-1204.

Abramowicz MJ, Duprez L, Parma J, Vassart G, Heinrichs C. Familial congenital hypothyroidism due to inactivating mutation of the thyrotropin receptor causing profound hypoplasia of the thyroid gland. *J Clin Invest* 1997 **99** 3018-3024.

Ambrugger P, Stoeva I, Bieberman H, Torresani T, Leitner C, Gruters A. Novel mutations of the thyroid peroxidase gene in patients with permanent congenital hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* 2001 **145** 19-24.

Andersen HJ. Studies of hypothyroidism in children. *Acta Paediatr Suppl* 1961 **50** 1-150.

Anker R, Steinbrueck T, Donis-Keller H. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human thyroid peroxidase (hTPO) locus. *Hum Mol Genet* 1992 **1** 137.

Baker JR, Arscott P, Johnson J. An analysis of the structure and antigenicity of different forms of human thyroid peroxidase. *Thyroid* 1994 **4** 173-176.

Bakker B, Bikker H, Vulsma T, De Randamie JS, Wiedijk B, De Vijlder JJM. Two decades of screening for congenital hypothyroidism in the Netherlands: TPO gene mutations in total iodide organification defects. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 **85** 3708-3712.

Banga JP, Mahadevan D, Barton GJ, Sutton BJ, Saldanha JW, Odell E, McGregor AM. Prediction of domain organization and secondary structure of thyroid peroxidases, a human autoantigen involved in destructive thyroiditis. *FEBS* 1990 **266** 133-141.

Berry MJ, Banu L, Larsen PR. Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature* 1991 **349** 438-440.

Biebermann H, Liesenkötter KP, Emeis M, Oblanden M, Grüters A. Severe congenital hypothyroidism due to a homozygous mutation of the beta TSH gene. *Pediatr Res* 1999 **46** 170-173.

Bikker H, den Hartog M T, Vulsma T, Baas F, De Vijlder JM. A 20-basepair duplication in the human thyroid peroxidase gene results in a total iodide organification defect and congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 **79** 248-252.

Bikker H, Vulsma T, Baas F, De Vijlder J M. Identification of five novel inactivating mutation in the human thyroid peroxidase gene by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Mutat* 1995 **6** 9-16.

Bikker H, Waelkens JJJ, Bravenboer B, de Vijlder JJM. Congenital hypothyroidism caused by a premature termination signal in exon 10 of the human thyroid peroxidase gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1996 **81** 2076-2079.

Bikker H, Baas F, De Vijlder JJM. Molecular analysis of mutated thyroid peroxidase detected in patients with total iodide organification defects. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 **82** (2) 649-653.

Brent GA. The Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. *N Engl J Med.* 1994 **331** 847-853.

Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM. Analysis of the VNTR locus DIS80 by PCR followed by High-Resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 1991 **48** 137-144.

Burge CB. Modeling dependencies in pre-mRNA splicing signals. In: *Computational Methods in Molecular Biology*, pp 127-163. Eds S Salzberg, D Searls, & S Kasif. Amsterdam: Elsevier Science, 1998.

Castanet M, Polak M, Bonaiti-Pellie C, Lyonnet S, Czernishow P, Leger J. Nineteen years of national screening for congenital hypothyroidism: familial cases suggest the involvement of genetic factors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 **86** 2009-2014.

Cavalieri RR. Iodine metabolism and thyroid physiology: current concepts. *Thyroid* 1997 **7** 177-181.

Cetani F, Costagliola S, Tonacchera M. The thyroperoxidase doublet is not produced by alternative splicing. *Mol Cell Endocrinol* 1995 **115** 125-129.

Chanoine JP, Braverman LE, Farwell AP, Safran M, Alex S, Dubord S, Leonard JL. The thyroid gland is the major source of circulating T₃ in the Rat. *J Clin Invest* 1993 **91** 2709-2713.

Clifton-Bligh RJ, Wentworth JM, Heins P, Crisp MS, John R, Lazarus JH, Ludgate M, Chatterjee VK. Mutation of the gene encoding human *TTF-2* associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nat Genet* 1998 **19** 399-401.

Collu R, Tang J, Castagne J, Lagace G, Masson N, Huot C, Deal C, Delvin E, Faccenda E, Eidne KA, Van Vliet G. A novel mechanism for isolated central hypothyroidism: Inactivating mutations in the thyrotropin-releasing hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 **82** 561-565.

Congdon T, Nguyen LQ, Nogueira CR, Habiby RL, Medeiros-Neto G, Koop P. A novel mutation (Q40P) in Pax8 associated with congenital hypothyroidism and thyroid hypoplasia: evidence for phenotypic variability in mother and child. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 **86** 3962-3967.

Courtin F, Dème D, Virion A, Michot JL, Pommier J, Nunez. The role of lactoperoxidase-H₂O₂ compounds in the catalysis of thyroglobulin iodination and thyroid hormone synthesis. *Eur J Biochem* 1982 **124** 603-609.

Croteau W, Whittemore SL, Schneider MJ, St. Germain DL. Cloning and Expression of a cDNA for a Mammalian Type III Iodothyronine Deiodinase. *J Clin Invest* 1995 **28** 16569-16575.

Croteau W, Davey JC, Galton VA, St. German DL. Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase: a selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues. *J Clin Invest* 1996 **98** 405-417.

Coyle B, Reardon W, Herbrik JA, Tsui LC, Gausden E, Lee J. Molecular analysis of *PDS* in Pendred syndrome. *Hum Molec Genet* 1998 **7** 1105-1112.

De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, Dumond JE, Miot F. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem* 2000 **275** 23227-23233.

DeGroot LJ, Niepomniszcze H. Biosynthesis of thyroid hormone: basic and clinical aspects. *Metabolism* 1977 **26** 665.

Delangue F. Biochemistry and Physiology. In: *Principles and practice of endocrinology and metabolism*, edn 3, ch 17, pp 242-251. Eds LK Becker, JP Bilezikian, WH Bremner. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 1990.

Delangue F, Czernishow P. Hypothyroidism. In: *Principles and practice of endocrinology and metabolism*, edn 3, ch 18, pp 252-263. Eds LK Becker, JP Bilezikian, WH, Bremner, W Hung. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 1990.

De La Vieja A, Dohan O, Levy O, Carrasco N. Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Physiol Rev* 2000 **80** 1083-1105.

Derwahl M, Seto P, Rapoport B. Complete nucleotide sequence of the cDNA for thyroid peroxidase in FRTL5 rat thyroid cells. *Nucleic Acids Res* 1989 **17** 8380.

De Vijlder JJM, Vulsma T. Hereditary metabolic disorders causing hypothyroidism. In: *Werner and Ingbar's The Thyroid*, edn 8, part 1, ch 54, pp 733-742. Eds LE Braverman & RD Utiger, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

De Vijlder JJM, Vulsma T, Ris-Stalpers C. Genetic defects in thyroid hormone supply. In: *Thyroid Manager*, electronic edition. Eds LJ DeGroot & G Henneman. www.thyroidmanager.org. 2003.

Devriendt K, Vanhole C, Matthijs G, De Zegher F. Deletion of thyroid transcription factor-1 gene in an infant with neonatal thyroid dysfunction and respiratory failure. *N Engl J Med* 1998 **338** 1317-1318.

Devos H, Rodd C, Gagne N, Laframboise R, Van Vliet G. A search for a possible molecular mechanisms of thyroid digenesis: sex ratios and associated malformations. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 **84** 2502-2506.

Doerge DR, Taurog A, Dorris M. Evidence for a radical mechanism in peroxidase-catalized coupling: II single turnover experiments with horseradish peroxidase. *Arch Biochem Biophys* 1994 **315** 82-89.

Dull T, Vyeda C, Strosberg D, Vedwin G, Seilhamer J. Molecular cloning of cDNA encoding bovine and human lactoperoxidase. *DNA Cell Biol* 1990 **1** 499-509.

Dumond JE, Vassart G, Rettoff S. Thyroid disorders. In: *Metabolic Basis of Inherited Disease*, edn 6, pp 1843-1879. Eds Scriver CR, Beaudt AL, Sly WS & Valle D. New York: McGraw-Hill, 1989.

Dunn AD, Crutchfield HE, Dunn JT. Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. Major sites of cleavage by cathepsins B, D, and L. *J Biol Chem* 1991 **266** 20198-20204.

Dunn JT, Dunn A. Update on intrathyroidal iodine metabolism. *Thyroid* 2001 **5** 407-414.

Ekholm R, Wollman SH. Site of iodination in the rat thyroid gland deduced from electron microscopic autoradiographs. *Endocrinology* 1975 **97** 1432-1444.

Ekholm R, Björkman U. Localization of iodine binding in the thyroid gland in vitro. *Endocrinology* 1984 **115** 1558-1567.

Endo Y, Onogi S, Umeki K, Yammamoto I, Kotani T, Ohtaki S. Regional localization of the gene for thyroid peroxidase to human chromosome 2p25 and mouse chromosome 12C. *Genomics* 1995 **25** 760-761.

Everett LA, Glaser B, Beck JC, Idol JR, Buchs A, Heyman M, Adawi F, Hazani E, Baxevanis AD, Sheffield VC, Green ED. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (*PDS*). *Nat Genet* 1997 **17** 411-422.

Fayadat L, Niccoli-Sire P, Lanet J, Franc JL. Human thyroid peroxidases is largely retained and rapidly degraded in the endoplasmic reticulum. Its N-glycans are required for folding and intracellular trafficking. *Endocrinology* 1998 **139** 4277-4285.

Ferrand M, Fourn VL, Franc J-L. Increasing Diversity of Human thyroperoxidase generated by alternative splicing: characterization by molecular cloning of new transcripts with single and multispliced mRNAs. *J Biol Chem* 2003 **63** 793-3800.

Foley TP. Sporadic congenital hypothyroidism. In: *Congenital hypothyroidism*, pp 231-259. Eds JH Dussolt & P Walker, New York: Marcel Dekker, 1983.

Foley TP. Congenital hypothyroidism. In: *Werner and Ingbar's The Thyroid*, edn 8, part 1, ch 4, pp 977-983. Eds LE Braverman & RD Utiger, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

Fujiwara H, Tatsumi K, Miki K, Harada T, Miyai K Takai S. Congenital hypothyroidism caused by a mutation in the Na⁺/I⁻ symporter. *Nat Genet* 1997 **16** 124-125.

Gavaret J, Cahnman HJ, Nunes J. Thyroid hormone synthesis in thyroglobulin: the mechanism of the couple reaction. *J Biol Chem* 1981 **256** 9167-9173.

Greenspan FS. The thyroid gland. In: *Basic & Clinical endocrinology*, edn 7, ch7, pp 215-294. Eds FS Greenspan & DV Gardner, San Francisco: Lange Medical books/Mc. Graw Hill, 2004.

Guazzi S, Price M, De Felice M, Damante G, Mattei M-G, Di Lauro R. Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity. *EMBO J* 1990 **9** 3631-3639.

Johnson KR, Nauseef WM, Care A, Wheelock MJ, Shane S, Herdson. Characterization of cDNA clones of human myeloperoxidase: predicted amino acid sequence and evidence for multiple mRNA species. *Nucleic Acids Res* 1987 **15** 2013-2028.

Jones FG, Woltenholme A, Fowler S. High-level expression of recombinant immunoreactive thyroid peroxidase in the high five insect line. *J Mol Endocrinol* 1996 **17** 165.

Kaufman KD, Rapoport B, Seto P. Generation of recombinant, enzymatically-active human thyroid peroxidase and its recognition by antibodies in the sera of patients with Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Invest* 1989 **84** 394403.

Kimura S, Kotani T, McBride OW, Umeki K, Hirai K, Nakayama T Othaki S. Human thyroid peroxidases: complete cDNA and protein sequence, chromosome mapping, and identification of two alternative spliced mRNAs. *Proc Natl Acad Sci* 1987 **84** 5555-5559.

Kimura S, Hong Y-S, Kotani T, Othaki S, Kikkawa F. Structure of the human thyroid peroxidase gene: comparison and relationship to the human myeloperoxidase gene. *Biochemistry* 1989a **28** 4481-4489.

Kimura S, Kotani T, Othaki S. cDNA-directed expression of human thyroid peroxidase. *FEBS lett* 1989b **250** 377.

Kiser C, Caterina CK, Engler JA. Cloning and sequence analysis of the human salivary peroxidase-encoding cDNA. *Gene* 1996 **173** 261-269.

Klein A, Meltzer S, Kenny F. Improved prognosis in congenital hypothyroidism treated before age three months. *J Pediatr* 1972 **81** 912-913.

Kikkawa F, Gonzales FJ, Kimura S. Characterization of a thyroid- specific enhancer located 5.5 kilobase pairs upstream of the human thyroid peroxidase gene. *Moll Cell Biol* 1990 **10** 6216-6224.

Kotani T, Ohtaki S. Characterization of thyroid follicular cell apical plasma membrane peroxidase using monoclonal antibody. *Endocrinology* 1987 **34** 407-413.

Kotani T, Umeki K, Yamamoto I, Takeuchi M, Tachemy S, Nakayama T. Nucleotide sequence of the cDNA encoding mouse thyroid peroxidase. *Gene* 1993 **123** 289-290.

Kotani T, Umeki K, Yamamoto I, Maesaka H, Tachibana K, Ohtaki S. A novel mutation in human thyroid peroxidase gene resulting in total organification defect. *J Endocrinol* 1999 **160** 267-273.

Krawczak M, Reiss J, Cooper D. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splices junctions of human genes: causes and consequences. *Human Genet* 1992 **90** 41-54.

Krude H, Biebermann H, Schnabel D, Ambrugger P, Gruters A. Molecular pathogenesis of neonatal hypothyroidism. *Horm Res* 2000 **53** 12-18.

LaFranchi S. Disorders of the thyroid gland. In: *Nelson textbook of pediatrics*, edn 8 section 2, ch 573-574, 1696-1703. Eds, RE Behrman, R Lliegman & HB Jenson, USA: W.B Saunders, 2000.

Levi O, Dai G, Riedel C, Gienter CS, Paul EM, Lebowitz NA, Carrasco N: Characterization of the thyroid Na⁺/I symporter with an anti-COOH terminus antibody. *Proc Natl Acad Sci* 1997 **94** 5568-5573.

Libert F, Ruel J, Ludgate M, Swillens S, Alexander N, Vassart G, Dinsart C. Complete nucleotide sequence of the human thyroperoxidase-microsomal antigen cDNA. *Nucleic Acid Res* 1987a **15** 6735.

Libert F, Ruel J, Ludgate M, Swillens S, Alexander N, Vassart G, Dinsart C. Thyroperoxidase: an autoantigen with mosaic structure made of nuclear and mitochondrial gene modules. *EMBO J* 1987b **6** 4193-4196.

Magnusson R, Gestantas J, Taurog A, Rapoport B. Molecular cloning of the structural gene for porcine thyroid peroxidase. *J Biol Chem* 1986 **262** 13885-13888.

Mount SM. A catalogue of splice junction sequence. *Nucleic Acid Research* **10** 459-472.

Mangklabruks A, Billerbeck C, Wajchenberg B. Genetic linkage studies of thyroid peroxidase (TPO) gene families with TPO deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1991 **72** 471-476.

Medeiros-Neto GA, Marcondes JA, Cavaliere H, Wajchenberg BL, Knobel M. Serum thyroglobulin (Tg) stimulation with bovine TSH: a useful test for diagnosis for congenital goitrous hypothyroidism due to a defective Tg synthesis. *Acta Endocrinol* 1985 **110** 61-65.

Medeiros-Neto GA, Billerbeck AEC, Wajchenberg BL, Targovnik HM. Defective organification of iodide causing hereditary goitros-hypothyroidism. *Thyroid* 1993 **3** 143-159.

Medeiros-Neto GA, Herodotou DT, Rajan S, Kommareddi S, de Lacerda L, Sandrini R, Boguszewski MC, Hollenberg AN, Radovick S, Wondisford FE: A circulating, biologically inactive thyrotropin caused by a mutation in the beta subunit gene. *J Clin Invest* 1996 **97** 1250-1256.

Medeiros-Neto GA, Gil-da-Costa MJ, Santos CLS, Medina AM, Costa e Silva J, Tsou RM, Sobrinho-Simões M. Metastatic thyroid carcinoma arising from congenital goiter due to mutation in thyroidperoxidase gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 **83** 4162-4165.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1989 **16** 1215.

Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, Trotseburg P, Baas F, De Vijlder JJM. Inactivation mutations in gene for thyroid oxidase 2 (*THOX2*) and Congenital Hypothyroidism. *N Engl J Med* 2002 **347** 95-102.

Nagayama Y, Yamashita S, Hirayu H, Izumi M, Uga T, Ishikawa N, Ito K, Nagataki S. Regulation of thyroid peroxidase and thyroglobulin gene expression by thyrotropin in cultured human thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1989 **68** 1155-1159.

Nagayama Y, Seto P, Rapoport B. Characterization, by molecular cloning, of smaller forms of thyroid peroxidase messenger ribonucleic acid in human thyroid cells as alternatively spliced transcripts. *J Clin Endocrinol Metab* 1990 **71** 384-390.

Nagataki S, Uchimura H, Masuyama Y, Nakao K. Thyrotropin and thyroid peroxidase activity. *Endocrinology* 1974 **92** 363-371.

Nakamura Y, Ohaki S, Makino R, Tanaka T, Ishimura Y. Superoxide anion is the initial product in the hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in porcine. *J Biol Chem* 1989 **264** 4759-4761.

Nishikawa T, Rapoport B, McLachlan SM. Exclusion of two major areas of thyroid peroxidase from the immunodominant region containing the conformational epitopes recognized by human autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 **79** 1648-1654.

Niu DM, Hwang B, Chu YK, Liao CJ, Wang PL, Lin CY. High prevalence of a novel mutation (2268insT) of the thyroid peroxidase gene in Taiwanese patients with total iodide organification defect, evidence for a founder effect. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 **87** 4208-4212.

O' Neill B, Magnolato D, Semenza G. The electrogenic Na⁺- dependent I⁻ transport system in plasma membrane vesicles from thyroid glands. *Biochim Biophys Acta* 1987 **896** 263-274.

Orita M, Suzuki Y, Sekiya TE, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989 **5** 874-879.

Osório RV, Vilarinho L, Soares PJ. Programa Nacional de Diagnóstico Precoce: 20 anos de rastreio neonatal. *Arqui Med* 1999 **13** 163-168.

Othaki S, Nakagawa H, Kimura S, Yamazaki I. Analysis of catalytic intermediates of hog thyroid peroxidase during iodination reaction. *J Biol Chem* 1981 **256** 805-810.

Othaki S, Kotani T, Nakamura Y. Characterization of human thyroid peroxidase purified by monoclonal antibody-assisted chromatography. *J Clin Endocrinol Metab* 1986 **63** 570.

Pannain S, Weiss RE, Jackson CE, Dian D, Beck JC, Sheffield VC, Cox N, Refetoff S. Two different mutations in thyroid peroxidase of a large inbred Amish kindred: power and limits of homozygosity mapping. *J Clin Endocrinol Metab* 1999 **84** 1061-1071.

Plachov D, Chowdhury K, walther C, Simon D, Guenet JL, Gruss P. Pax-8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development* 1990 **110** 643-651.

Pholenz J, Rosenthal IM, Weiss RE, Jhiang SM, Burant C, Refetoff S. Congenital hypothyroidism duo to mutations in sodium/iodide symporter. Identification of a nonsense mutation producing a downstream cryptic 3' splice site. *J Clin Invest* 1998 **101** 1028-1035.

Poulos TL. Heme enzyme cristal structures. *Adv Inorg Biochem* 1988 **7** 1-3.

Rawitch AB, Taurog A, Chernoff SB, Dorris ML. Hog thyroid peroxidase: physical, chemical, and catalytic propertieess of the highly purified enzyme. *Arch Biochem Biophys* 1979 **194** 244-257.

Rawitch AB, Pollock G, Yang S-X. Thyroid peroxidase glycosilation: The location and nature of the *N*-linked oligosaccharide in porcine thyroid peroxidase. 1992 *Arch Biochem Biophys* 1992 **297** 3.

Relatório de Actividades em 2003, do programa Nacional de Diagnóstico Precoce. Instituto de Genética Médica Dr. Jacinto de Magalhães.

Rivolta CM, Esperante SA, Gruñeiro-Papendiek, Chiesa A, Moya CM, Domené S, Varela V, Targovnik HM. Five novel Inactivating mutations in the Thyroid peroxidase gene responsible for congenital goiter and iodide organification defect. *Mutation in Brief* 2003 Online #646.

Roberts HE, Moore AC, Fernhoff PM, Brown AL, Khoury MJ. Population Study of Congenital Hypothyroidism and Associated Birth Defects, Atlanta, 1979-1992. *Am J Med Genet* 1997 **71** (1) 29-32.

Rosenberg IN, Goswami A. Purification and characterization of a flavoprotein from bovine thyroid with iodotyrosine deiodinase activity. *J Biol Chem* 1979 **254** 12318-12325.

Sakamaki K, Tomanoga M & Tsukui K. Molecular cloning and characterization of chromosomal gene for human eosinophil peroxidase. *Biol Chem* 1989 **264** 16828.

Santos CL, Bikker H, Rego KJ, Nascimento AC, Tambascia M, De Vijlder JJM. A novel mutation in TPO gene in goitrous hypothyroid patients with iodide organification defect. *Clin Endocrinol* 1999 **51** 165-172.

Santos SMM, Budowle B, Smerick JB, Keys KM, Moretti TR. Portuguese population data on six short tandem repeat loci – CSF1PO, TPOX, TH01, D3S1358, VWA and FGA. *Forensic Sci Int* 1996 **83** 229-235.

Shapiro MB, Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* 1987 **15** 7155-7174.

Suzuki K, Lavaroni S, Mori A, Ohta JS, Pietrarelli M, Singer DS, Kimura S, Katoh R, Kawoi A, Kohn LD. Autoregulation of thyroid-specific gene transcription by thyroglobulin. *Med Sci* 1998 **14** 8251-8256.

Taurog A. The biosynthesis of thyroxine. *Mayo Clin Proc.* 1964 **39** 569.

Taurog A, Dorris ML, Doerge DR. Evidence for a radical mechanism in peroxidase-catalyzed coupling. *Arch Biochem Biophys* 1994 **315** 82-89.

Taurog A, Dorris ML, Doerge DR. Mechanism of simultaneous iodination and coupling catalyzed by thyroid peroxidase: I. Steady state experiments with various peroxidases. *Arch Biochem Biophys* 1996 **330** 24-32.

Taurog A. Hormone synthesis: thyroid iodine metabolism. In: *Werner and Ingbar's The Thyroid*, edn 8, part 1, ch 4, pp 52-85. Eds LE Braverman & RD Utiger, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

Tice LW, Wollman SH. Ultrastructural localization of peroxidase on pseudopods and other structures of the typical thyroid epithelial cell. *Endocrinology* 1974 **94** 1555-1567.

Umeki K, Kotani T, Kawano J, Suganuma T, Yamamoto I, Aratake Y. Two novel missense mutations in thyroid peroxidase gene, R665W and G771R, result in localization defect and cause congenital hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* 2002 **146** 491-498.

Vulsma T, Gons MH 1989, De Vijlder JJM. Maternal-fetal transfer of thyroxine in congenital hypothyroidism due to a total organification defect or thyroid agenesis. *N Engl J Med* 1989 **321** 13-16.

Xie J, Pannain S, Pohlens J, Weiss RE, Moltz K, Morlot M, Asteria C, Persani L, Beck-Peccoz P, Parma J, Vassart G, Refetoff S. Resistance to thyrotropin (TRH) in three families is not associated with mutations in the TSH receptor gene or TSH. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 **82** 3933-3940.

Wang C, Eufemi M, Turano C, Giartosio A. Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. *Biochemistry* 1996 **35** 7305-7307.

Whitley JR, Meikle AW, Watts NW. Thyroid function. In: *Fundamentals of clinical chemistry*, edn 4, ch 34, pp 617-628. Eds CA Burtis & ER Ashwood. Philadelphia: W. B. Sanders Company, 1996.

Wu JY, Shu SG, Yang CF, Lee CC, Tsai FJ. Mutation analysis of thyroid peroxidase gene in Chinese patients with total iodide organification defect: identification of five novel mutations. *J Endocrinol* 2002 **172** 627-635.

Ykoyama N, Taurog A. Porcine thyroid peroxidase: relationship between the native enzyme and an active, highly purified tryptic fragment. *Mol Endocrinol* 1988 **2** 838-844.

Zanelli E, Henry M, Charvet B, Malthièry Y. Evidence for an alternate splicing in the thyroperoxidase messenger from patients with Graves' disease. *Bioch Biophys Res* 1990 **68** 1155-1159.

Zannini M, Avantaggiato V, Biffali E, Arnone MI, Sato K, Pichetola M, Taylor BA, Phillips SJ, Simeone A, Di Lauro R. TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. *EMBO J* 1997 **16** 185-197.

Zeng J, Fenna RE. X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. *J Mol Biol* 1992 **226** 185-207.

8. ANEXOS

1. Sequência de cDNA e de aminoácidos da peroxidase da tiróide humana.
2. Mutações descritas no gene da peroxidase da tiróide.
3. Números de identificação das sequências aminocídicas utilizadas nos alinhamentos.
4. Alinhamento das sequências aminoacídicas das peroxidases humanas e a lactoperoxidase bovina.
5. Alinhamento das sequências aminoacídicas das peroxidases de mamíferos.
6. Alelos do polimorfismo HumTPO e a sua frequência na população portuguesa.
7. Condições de electroforese estabelecidos para os diferentes exões.

1. Sequência de cDNA e de aminoácidos da peroxidase da tiróide humana.

```

1 M R A L A V L S V T L V M A C T E A F F
1 ATGAGAGCGCTCGCTGTGCTGTCTGTCTCACGCTGGTTATGGCCTGCACAGAAGCCTTCTTC
21 P F I S R G K E L L W G K P E E S R V S
61 CCCTTCATCTCGAGAGGGAAAGAAGCTCCTTTGGGGAAAGCCTGAGGAGTCTCGTGTCTCT
41 S V L E E S K R L V D T A M Y A T M Q R
121 AGCGTCTTGGAGGAAAGCAAGCGCCTGGTGGACACCGCCATGTACGCCACGATGCAGAGA
61 N L K K R G I L S P A Q L L S F S K L P
181 AACCTCAAGAAAAGAGGAATCCTTTCTCCAGCTCAGCTTCTGTCTTTTTCCAAACTTCTCT
81 E P T S G V I A R A A E I M E T S I Q A
241 GAGCCAACAAGCGGAGTGATTGCCCGAGCAGCAGAGATAATGGAAACATCAATACAAGCG
101 M K R K V N L K T Q Q S Q H P T D A L S
301 ATGAAAAGAAAAGTCAACCTGAAAAGTCAACAATCACAGCATCCAACGGATGCTTTATCA
121 E D L L S I I A N M S G C L P Y M L P P
361 GAAGATCTGCTGAGCATCATTGCAAACATGTCTGGATGTCTCCCTTACATGCTGCCCCCA
141 K C P N T C L A N K Y R P I T G A C N N
421 AAATGCCCAAACACTTGCCTGGCGAACAATAACAGGCCCATCACAGGAGCTTGCAACAAC
161 R D H P R W G A S N T A L A R W L P P V
481 AGAGACCACCCAGATGGGGCGCCTCCAACACGGCCCTGGCAGCATCCCTCCAGTC
181 Y E D G F S Q P R G W N P G F L Y N G F
541 TATGAGGACGGCTTCAGTCAGCCCCGAGGCTGGAACCCCGGCTTCTTGTACAACGGGTTTC
201 P L P P V R E V T R H V I Q V S N E V V
601 CCACTGCCCCCGGTCCGGGAGGTGACAAGACATGTCAATTCAAGTTTCAAATGAGGTTGTC
221 T D D D R Y S D L L M A W G Q Y I D H D
661 ACAGATGATGACCGCTATTCTGACCTCCTGATGGCATGGGGACAATACATCGACCACGAC
241 I A F T P Q S T S K A A F G G G A D C Q
721 ATCGCGTTCACACCACAGAGCACCAGCAAAGCTGCCTTCGGGGGAGGGGCTGACTGCCAG
261 M T C E N Q N P C F P I Q L P E E A R P
781 ATGACTTGTGAGAACCAAACCCATGTTTTCCATACAACCTCCCGGAGGAGGCCCGGGCCG
281 A A G T A C L P F Y R S S A A C G T G D
841 GCCGCGGGCACCGCCTGTCTGCCCTTCTACCGCTCTTCGGCCGCCTGCGGCACCGGGGAC
301 Q G A L F G N L S T A N P R Q Q M N G L
901 CAAGGCGCGCTCTTTGGGAACCTGTCCACGGCCAACCCGCGGCAGCAGATGAACGGGTTG
321 T S F L D A S T V Y G S S P A L E R Q L
961 ACCTCGTTCCTGGACCGCTCCACCGTGTATGGCAGCTCCCCGGCCCTAGAGAGGCAGCTG
341 R N W T S A E G L L R V H A R L R D S G
1021 CGGAACTGGACCAGTGCCGAAGGGCTGTCCGCGTCCACGCGCGCCTCCGGGACTCCGGC
361 R A Y L P F V P P R A P A A C A P E P G
1081 CGCGCTACCTGCCCTTCGTGCCGCCACGCGCGCCTGCGGCCTGTGCGCCCGAGCCCGGC
381 I P G E T R G P C F L A G D G R A S E V
1141 ATCCCCGGAGAGACCCGCGGGCCCTGCTTCCCTGGCCGGAGACGGCCGCGCCAGCGAGGTC
401 P S L T A L H T L W L R E H N R L A A A
1201 CCCTCCCTGACGGCACTGCACACGCTGTGGCTGCGCGAGCACAACCGCCTGGCCGCGGCG
421 L K A L N A H W S A D A V Y Q E A R K V
1261 CTAAGGCCCTCAATGCGCACTGGAGCGCGGACCCGTGTACCAGGAGGCGCGCAAGGTC
441 V G A L H Q I I T L R D Y I P R I L G P
1321 GTGGGCGCTCTGCACCAGATCATCACCCTGAGGGATTACATCCCCAGGATCCTGGGACCC
461 E A F Q Q Y V G P Y E G Y D S T A N P T
1381 GAGGCCTTCCAGCAGTACGTGGGTCCCTATGAAGGCTATGACTCCACCGCCAACCCCACT
481 V S N V F S T A A F R F G H A T I H P L
1441 GTGTCCAACGTGTTCTCCACAGCCGCCTTCCGCTTCCGGCCATGCCACGATCCACCCGCTG
501 V R R L D A S F Q E H P D L P G L W L H
1501 GTGAGGAGGCTGGACGCCAGCTTCCAGGAGCACCCCGACCTGCCCCGGGCTGTGGCTGCAC

```

(... / cont.)

(cont. / ...)

521 Q A F F S P W T L L R G G G L D P L I R
 1561 CAGGCTTTCTTCAGCCCATGGACATTACTCCGTGGAGGTGGTTTGGACCCACTAATACGA
 541 G L L A R P A K L Q V Q D Q L M N E E L
 1621 GGCCTTCTTGCAAGACCAGCCAAACTGCAGGTGCAGGATCAGCTGATGAACGAGGAGCTG
 561 T E R L F V L S N S S T L D L A S I N L
 1681 ACGGAAAGGCTCTTTGTGCTGTCCAATTCCAGCACCTTGGATCTGGCGTCCATCAACCTG
 581 Q R G R D H G L P G Y N E W R E F C G L
 1741 CAGAGGGGCGGGACCACGGGCTGCCAGGTTACAATGAGTGGAGGGAGTTCTGCGGCCTG
 601 P R L E T P A D L S T A I A S R S V A D
 1801 CCTCGCCTGGAGACCCCGCTGACCTGAGCACAGCCATCGCCAGCAGGAGCGTGGCCGAC
 621 K I L D L Y K H P D N I D V W L G G L A
 1861 AAGATCCTGGACTTGTACAAGCATCCTGACAACATCGATGTCTGGCTGGGAGGCTTAGCT
 641 E N F L P R A R T G P L F A C L I G K Q
 1921 GAAAACCTCCTCCCCAGGGCTCGGACAGGGCCCCTGTTTGCCTGTCTCATTGGGAAGCAG
 661 M K A L R D G D W F W W E N S H V F T D
 1981 ATGAAGGCTCTGCGGGACGGTACTGGTTTTGGTGGGAGAACAGCCACGTCTTCACGGAT
 681 A Q R R E L E K H S L S R V I C D N T G
 2041 GCACAGAGGCGTGAGCTGGAGAAGCACTCCCTGTCTCGGGTCATCTGTGACAACACTGGC
 701 L T R V P M D A F Q V G K F P E S
 2101 CTCACCAGGGTGCCCATGGATGCCTTCCAAGTCGGCAAATTCCCCGAAGACTTTGAGTCT
 721 C D S I T G M N L E A W R E T F P Q D D
 2161 TGTGACAGCATCACTGGCATGAACCTGGAGGCCTGGAGGGAAACCTTTCCTCAAGACGAC
 741 K C G F P E S V E N G D F V H C E E S G
 2221 AAGTGTGGCTTCCCAGAGAGCGTGGAGAATGGGGACTTTGTGCACTGTGAGGAGTCTGGG
 761 R R V L V Y S C R H G Y E L Q G R E Q L
 2281 AGGCGCGTGTGGTGTATTCTGCGGCACGGGTATGAGCTCCAAGGCCGGGAGCAGCTC
 781 T C T Q E G W D F Q P P L C K D V N E C
 2341 ACTTGCACCCAGGAAGGATGGGATTTCCAGCCTCCCCTCTGCAAAGATGTGAACGAGTGT
 801 A D G A H P P C H A S A R C R N T K G G
 2401 GCAGACGGTGCCACCCCCCTGCCACGCCTCTGCGAGGTGCAGAAACACCAAAGGCGGC
 821 F Q C L C A D P Y E L G D D G R T C V D
 2461 TTCCAGTGTCTCTGCGCGGACCCCTACGAGTTAGGAGACGATGGGAGAACCTGCGTAGAC
 841 S G R L P R V T W I S M S L A A L L I G
 2521 TCCGGGAGGCTCCCTCGGGTGACTTGGATCTCCATGTGCTGGCTGCTCTGCTGATCGGA
 861 G F A G L T S T V I C R W T R T G G T K S
 2581 GGCTTCGCAGGTCTCACCTCGACGGTGATTTGCAGGTGGACACGCACTGGCACTAAATCC
 881 T L P I S E T G G G T P E L R C G K H Q
 2641 AACTGCCCATCTCGGAGACAGGCGGAGGAACCTCCGAGCTGAGATGCGGAAAGCACCAG
 901 A V G T S P Q R A A A Q D S E Q E S A G
 2701 GCCGTAGGGACCTACCGCAGCGGGCCGAGCTCAGGACTCGGAGCAGGAGAGTGCTGGG
 921 M E G R D T H R L P R A L *
 2761 ATGAAGGCCGGGATACTCACAGGCTGCCGAGAGCCCTCTGA.

2. Mutações descritas no gene da peroxidase da tiróide.

Exão / Intrão	Mutação*	Efeito na proteína	Referência
2	c.47_67dup20) ^b	p.C11fsX78	Bikker <i>et al</i> , 1994
3	c.157G>C	p.A53P	Niu <i>et al</i> , 2002
5	c.387delC	p.N129fsX79	Rivolta <i>et al</i> , 2003
IVS4 (ds)	c.349G>C	r.spl. ?	Bakker <i>et al</i> , 2000
7	c.808G>A	p.D240N	Kotani <i>et al</i> , 1999
8	c.843delC	p.A281fsX36	Wu <i>et al</i> , 2002
8	c.920>G ^a	p.N307T	Rivolta <i>et al</i> , 2003
8	c.1183_1186dupGGCC	p.R396fsX76	Abramowicz <i>et al</i> , 1992
8	c.1297G>A	p.V433M	Rivolta <i>et al</i> , 2003
8	c.1335delC	p.H445fsX5	Bakker <i>et al</i> , 2000
IVS8 (ac)	c.1339A>T ^a	p.I447F / r.spl. ?	Bikker <i>et al</i> , 1997
9	c.1357T>G	p.Y453P	Bikker <i>et al</i> , 1995
9	c.1373T>C	p.L458P	Ambrugger <i>et al</i> , 2001
9	c.1472G>A	R491H	Ambrugger <i>et al</i> , 2001
9	c.1477G>A	p.G493S	Wu <i>et al</i> , 2002
9	c.1496 C>T	p.P499L	Rivolta <i>et al</i> , 2003
9	c.1581G>T	p.W527C	Bakker <i>et al</i> , 2000
10	c.1618C>T ^b	p.R540X	Bikker <i>et al</i> , 1996
IVS10 (ds)	c.1768G>A	r.spl. ?	Bikker <i>et al</i> , 1995
IVS10 (ds)	c.1768+1G>A	r.spl. ?	Bakker <i>et al</i> , 2000
11	c.1943G>A	p.R648Q	Pannain <i>et al</i> , 1999
11	c.1978C>G	p.Q660E	Santos <i>et al</i> , 1999
11	c.1993C>T ^c	p.R665W	Umeki <i>et al</i> , 2002
12	c.2077C>T	p.R693W	Bakker <i>et al</i> , 2000
12	2153_2154del2	p.718X	Bakker <i>et al</i> , 2000
13	2243delT	V748fsX49	Niu <i>et al</i> , 2002
13	c.2268_2269insT	p.E757X	Niu <i>et al</i> , 2002
13	c.2311 G>A ^c	p.G771R	Umeki <i>et al</i> , 2002
IVS13 (ds)	c.2386G>T	p.D796Y? / r.spl. ?	Wu <i>et al</i> , 2002
14	c.2395 G>A ^a	p.E799K	Bikker <i>et al</i> , 1995
14	c.2413delC	p.H805fsX27	Wu <i>et al</i> , 2002
14	c.2415_2421insC ^a	p.C808fsX71	Bikker <i>et al</i> , 1995
14	c.2422delT	p.C808fsX23	Bakker <i>et al</i> , 2000
14	c.2422T>C	p.C808R	Rivolta <i>et al</i> , 2003

*A nomenclatura das alterações encontradas está de acordo com as regras definidas pela HGVS (Human Genome Variation Society) e considerando o primeiro A do códon de iniciação como posição +1. A numeração das posições nucleotídicas exônicas está de acordo com a sequência de referência do mRNA da TPO (GeneBank Accession number: NM_000547). (ds) local “dador” de splicing. (ac) local “aceitador” de splicing. ^a TPO inativa num sistema de expressão in vitro; ^b TPO inativa no tecido do doente; ^c TPO com perda da localização membranar.

3. Números de identificação das sequências utilizadas nos alinhamentos.

Peroxidases da tiróide	Número primário	Sequência de Referência (ID)	Referência Bibliográfica
TPO humana (hTPO)	P07202	NP_000538	Kimura <i>et al</i> , 1987a
Mieloperoxidase humana (hMPO)	P05164	NP_00024	Johnson <i>et al</i> , 1987
Peroxidase Eosinófila humana (hEPO)	-	NP_000493	Sakamaki <i>et al</i> , 1989
Lactoperoxidase/peroxidase salivar humana (hLPO)	-	NP_006142	Dull <i>et al</i> , 1990
Lactoperoxidase (<i>Bos taurus</i> ; bLPO)	P80025	NP_536345	Dull <i>et al</i> , 1990
TPO de porco (<i>Sus scrofa</i>)	P09933	-	Magnusson <i>et al</i> , 1987
TPO de “ratinho” (<i>Mus musculus</i>)	P35419	NP_033443	Kotani <i>et al</i> , 1993
TPO de rato (<i>Rattus norvegicus</i>)	P14650	NP_062226.1	Derwahl <i>et al</i> , 1989

(cont. / ...)

```

Mus      GLLARAAKLQVQGLMNEELTERLFVLSNVGTLDLASLNLQGRDHGLPDYNEWREFCGL 588
Rattus  GLLARPAKLQVQGLMNEELTERLFVLSNVGTLDLASLNLQGRDHGLPGYNEWREFCGL 588
1hTPO   GLLARPAKLQVQDQLMNEELTERLFVLSNSSTLDLASINLQGRDHGLPGYNEWREFCGL 600
Sus     GLLARPAKLQVQDQLMNEELTERLFVLSNSGTLDLASINLQGRDHGLPGYNEWREFCGL 598
      * * * * *
Mus      SRLLETPAELNKAIANRSMVNKIMDLKXHADNIDVWLGGLAEKFLPGARTGPLFACIIGKQ 648
Rattus  SRLDTGAELNKAIANRSMVNKIMELYKHADNIDVWLGGLAEKFLPGARTGPLFACIIGKQ 648
1hTPO   PRLLETPADLSTAIASRSVADKILDLYKHPDNIDVWLGGLAENFLPRARTGPLFACIIGKQ 660
Sus     SRLLETPADLSTAIASRSVADKILDLYKHPDNIDVWLGGLAESFLPGARTGPLFACIIGKQ 658
      * * * * *
Mus      MKALRDGDRFWWENTNVFTDAQRQLEKHSLSRVICDNTGLTRVPVDAFRIGKFPQDFES 708
Rattus  MKALRDGDRFWWENSHVFTDAQRQLEKHSLSRVICDNTGLTRVPVDAFRIGKFPQDFES 708
1hTPO   MKALRDGDRFWWENSHVFTDAQRRELEKHSLSRVICDNTGLTRVPMDAFQVQKFPDFES 720
Sus     MRALRDGDRFWWENPGVFTDAQRRELSRHSMSRVICDNSGLSHVPLDAFRVQWQPEFEP 718
      * * * * *
Mus      CEDIPSMDELWRETFPQDDKCVFPEEVDNGNFVHCEESGKLVLVYSCFHGYKLGQEQV 768
Rattus  CEEIPSMDLRLWRETFPQDDKCVFPEKVDNGNFVHCEESGKLVLVYSCFHGYKLGQEQV 768
1hTPO   CDSIPGMNLEAWRETFPQDDKCGFPESEVNGDFVHCEESGRRVLVYSCRHGYELQREQL 780
Sus     CASIQGMDLGAWREAPPDGDACGFPDPVEDGGFLLCEERGORVLFVSCRHGFRLRGPQAI 778
      * * * * *
Mus      TCTQKGDSEPPVCKDVNECADLTHPPCHPSAOCKNTKGSFQCVCTDPYVLGEDEKTCID 828
Rattus  TCTQNGWDEPPVCKDVNECADLTHPPCHSSAKCKNTKGSFQCVCTDPYMLGEDEKTCID 828
1hTPO   TCTQEGWDFQPPLCKDVNECADGAHPPCHASARCKNTKGGFQCLCADPYELGDDGRTCV 840
Sus     TCTPRGWDEPPPLCKDINECEDETDPPCHASARCKNTKGGVLCESDPLVLGEDGRTCV 838
      * * * * *
Mus      SGRLPRASVVSIALGALLIGGLASLWVVICRWTHADKKATLPITER-----VTQSG 881
Rattus  SGRLPRASVVSIALGALLIGGLASLWTVICRWTHADKKSTLLITER-----VTMSG 881
1hTPO   SGRLPRATWISMSLAALLIGGFAGLTSTVICRWTRTGKSTLPISETGG-----GTPELR 895
Sus     AGRLPRASVVSIALGAVLVCGLAGLAWTVVCRWTHADARPLLPGEGEGDGKSPSLPLPG 898
      * * * * *
Mus      CRKSQGRGISPHKAAAQDTGQEP-----SGSRVLLCE- 914
Rattus  FRKSQESGISPQKAEVQDAEQEP-----YGSRVLLCE- 914
1hTPO   CGKHQAVGTSPQRAAAQDEQESAGMEGRDTHRLPRAL 933
Sus     CGNRRDVGAAP-----ALEVEQDLS-----CGSRGLCE-- 926
      : : * * * : : * : : : : *
    
```

6. Alelos do polimorfismo HumTPO e a sua frequência na população Portuguesa (Santos *et al*, 1998).

Alelo		Frequência
Nº	pb	
6	106	-
7	110	0.003
8	114	0.526
9	118	0.108
10	122	0.052
11	126	0.281
12	130	0.029
13	134	-
14	138	-

A bold está representado o alelo mais frequente na nossa população.

7. Condições de electroforese estabelecidos para os diferentes exões.

Sistema manual de geis.

Exão/condições de electroforese	Gel utilizado (% MDE/cm)	Temperatura	Volts	Tempo (horas)
1, 7	0.5/ 22	4°C	240	22
2, 15	0.5/28	T. A	180	18
3, 4, 13, 16	0.5/28	T. A	220	22
5, 6, 14, 10, 12, 17	0.5/28	T. A	200	20
9	0.5/28	T. A	180	20

T.A - Temperatura ambiente

PhastSystem.

Exão/condições de electroforese	Gel utilizado (12 ou 20%)	Temperatura (°C)	Volts. acumulados/hora
1, 7	12	4	640
2	20	15	630
9	12	15	400
10	20	4	550
14	12	15	450