

# *Hipotireoidismo Congênito: Recentes Avanços em Genética Molecular*

**atualização**

## RESUMO

O hipotireoidismo congênito (HC), detectado em recém-nascidos rastreados ao nascer, é causado por anomalias na organogênese (agenesia, tireóide ectópica, hipoplasia tireóidea) ou por defeitos específicos na hormonogênese. Mais raramente, o hipotireoidismo congênito tem origem em defeitos genéticos centrais, localizados no eixo hipotálamo-hipófise ou em mutações do gene do TSH-beta ou no receptor de TSH. Defeitos específicos da hormonogênese são causados por mutações no gene codificador para a proteína transportadora de iodeto (NIS), no gene da peroxidase (TPO), no gene traduzindo a pendrina (síndrome de Pendred), no gene da tireoglobulina, além de mutações que afetam o receptor de hormônio tireóideo (resistência genética ao HT) ou aos vários defeitos no transporte de HT na circulação periférica. Na maioria dos casos, os defeitos genéticos indicados criam condições para fenótipo com bócio e grau variável de hipotireoidismo, podendo a mutação genética ter expressão variável durante a vida adulta. (Arq Bras Endocrinol Metab 2002;46/4:391-401)

**Descritores:** Ectopia tireóidea; Hipoplasia tireóidea; Disormonogênese; Mutações; Genes tireóideos; Hipotireoidismo congênito

## ABSTRACT

### **Congenital Hypothyroidism: Recent Advances In Molecular Genetics.**

Congenital hypothyroidism (CH), as seen in the neonatal period, is predominantly caused by defects in the organogenesis (athyreosis, ectopic thyroid, thyroid hypoplasia) or by specific defects in hormonogenesis (dys hormonogenesis). Central hypothyroidism is rare, being linked to specific transcription factors involved in the maturation of the hypothalamic-pituitary axis or by mutations in the TSH-beta gene. Dys hormonogenesis may be caused by mutation coding for thyroid proteins such as the TSH receptor, the sodium-iodide symporter (NIS), the pendrin (Pendred's syndrome), thyroid peroxidase (TPO), thyroglobulin (Tg), thyroid dehalogenase, the receptor for thyroid hormone (TR-beta) or thyroid transport proteins (TBG, transthyretin). Usually, most of these defective genes will induce a phenotype with goiter and variable degree of hypothyroidism that may be present in the neonatal period or will gradually develop during post-natal life. Moreover, the genetic expression may be partial or total according to the specific mutation occurring in the involved genes. (Arq Bras Endocrinol Metab 2002;46/4:391-401)

**Keywords:** Ectopic thyroid; Thyroid hypoplasia; Dys hormonogenesis; Mutations; Thyroid genes; Congenital hypothyroidism

**O** HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO (HC) ESPORÁDICO, usualmente, é ocasionado por defeitos na formação glandular. Em regiões iodo-suficientes o HC permanente afeta cerca de 1:3000 a 1:4000 recém-nascidos (1). Disgenesia tireóidea, que compreende grupo heterogêneo de anormalidades da

*Ileana G. Sanches Rubio  
Meyer Knobel  
Antonio C. do Nascimento  
Cecília L. Santos  
Jussara V. Toniolo  
Geraldo Medeiros-Neto*

*Unidade de Tireóide e Laboratório  
de Biologia Molecular de Tireóide  
(LIM-25), Disciplina  
de Endocrinologia, Departamento  
de Clínica Médica, Faculdade  
de Medicina da Universidade  
de São Paulo, SP.*

*Recebido em 29/05/2002  
Aceito em 05/06/2002*

embriogênese tireóidea, é responsável por, aproximadamente, 80% dos casos de HC. Inclui a agenesia (ou hemiagenesia) tireóidea, tecido tireóideo ectópico, cistos do ducto tireoglossal e hipoplasia (2). Em 10 a 15% dos pacientes, o HC tem origem em um dos vários passos da síntese hormonal. Os 5% restantes resultam de hipotireoidismo materno provocado por anticorpos (3).

A síntese hormonal tireóidea é iniciada pelo transporte ativo do substrato iodeto pela membrana basolateral da célula folicular, por intermédio de um simportador de sódio e iodeto ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  ou NIS) (4). A pendrina, cambiador aniônico recentemente identificado, pode facilitar o transporte do iodeto através da membrana apical (5,6). Na face luminal desta última, a tireoperoxidase (TPO) oxida o iodeto e, subsequente-mente, introduz o iodo em resíduos tirosil da tireoglobulina (Tg) intrafolicular [incorporação de iodeto]. As iodotirosinas (MIT e DIT) são conjugadas para for-

mar T3 e T4, reação também catalisada pela TPO [conjugação].

As reações de incorporação e conjugação necessitam do agente oxidante  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gerada por um sistema dependente de flavoproteína. Recentemente, foram identificadas 2 nicotinamida-fosfato (NADPH) oxidases (Thox 1 e Thox 2) os quais participam do sistema gerador de peróxido de hidrogênio (7).

A Tg contendo T3 e T4 é internalizada na célula folicular por micro e macropinose e digerida nos lisossomos. Enquanto o T3 e T4 são secretados na corrente sanguínea, o MIT e DIT são desalogenados e reciclados.

Até o presente foram identificados vários defeitos genéticos que afetam a biossíntese hormonal tireóidea. Estas moléstias decorrem de mutações inativadoras em genes codificadores de proteínas essenciais à síntese, armazenamento, secreção ou utilização dos hormônios (tabela 1).

**Tabela 1.** Defeitos genéticos que resultam em desenvolvimento glandular anormal ou disormonogênese tireóidea\*.

Defeito	Observações	Gene	Herança	Cromossomo
<b>Disgenesia tireóidea</b>				
Agenesia		TTF2	AR	3q22
Hemiagenesia		PAX8	AD	2q12-q14
Ectopia		Não identificado		
<b>Disormonogênese</b>				
<b>Eixo hipotálamo-pituitário</b>				
Deficiência pituitária combinada (CPHD)	Diminuição ou ligeiro aumento de TSH sérico, combina deficiência hormonal pituitária, displasia do septo ótico, ectopia da pituitária posterior, hipoplasia pituitária	PROP1 POU1F1 LHX3 HESX1	AR AR,AD AR AR,AD	5q 3p11 9q34.3 3p221.2-p21.1
TRH		Outro gene ou mutação não identificada		
Receptor de TRH	TSH sérico normal, ausência de resposta PRL após TRH	TRH	AR AR	3p 8p23
Sub-unidade TSH $\beta$	TSH sérico baixo ou inativo	sub-unidade TSH $\beta$	AR	1p13
<b>Célula folicular tireóidea</b>				
Receptor de TSH	Mutações provocando ganho ou perda de função	TSHR		14q31
G $\text{S}\alpha$		GNAS1		20q13.2
Outros defeitos pós-receptores		Outro gene não identificado	AR,AD	
Simportador de sódio/iodeto		NIS	AR	19p12-13.2
Tireoperoxidase	Ausência parcial ou completa da TPO	TPO	AR	2p25
Geração de $\text{H}_2\text{O}_2$		Thox1, Thox2 ou outro gene não identificado	AR	15q15.3
Tireoglobulina	Incorporação de iodeto prejudicada por defeitos qualitativos ou quantitativos	Tg	AR, (AD?)	8q24
Desalogenase		gene/enzima não identificada	AR?	
Síndrome de Pendred	hipotireoidismo subclínico ou não; bócio, surdez neurosensorial	PDS	AR	7q31
Haploinsuficiência para o TTF1	disfunção tireóidea e sofrimento respiratório.	TTF1	Haplo insuficiência	14q13

\*Adaptado de Medeiros-Neto, Knobel e De Groot (8) e Guillam e Kopp (9).

No presente artigo pretendemos apresentar alguns resultados de trabalhos sobre o assunto realizados pela Unidade de Tireóide do HC-FMUSP e já divulgados na literatura.

### Fator de Transcrição PAX8

O PAX8 pertence a uma família de fatores de transcrição essenciais à embriogênese (10). O PAX8 se expressa no divertículo tireóideo, cérebro e rim (11). Na tireóide, este fator está envolvido no desenvolvimento glandular e expressão dos genes da Tg e TPO (12).

Foram identificadas em 2 pacientes esporádicos e em um indivíduo pertencente a uma família com hipotireoidismo familiar (13). Naqueles 2 primeiros afetados portadores de disgenesia tireóidea, o HC foi atribuído a mutações diferentes na região codificadora do gene PAX-8. As crianças exibiam níveis elevados de TSH; em uma (heterozigótica), com ectopia tireóidea, o T4 encontrava-se no limite inferior da normalidade e na outra (heterozigótica), com hipoplasia tireóidea, era subnormal. O pai, aparentemente, não era afetado. Muito recentemente, Congdon e cols. (14) estudaram 4 meninas naquela situação, portadoras de hipoplasia glandular. Concluíram que uma delas apresentava mutação heterozigótica no PAX-8. A mãe, embora com tireóide de tamanho normal, exibia igualmente, transverso cromossômica heterozigótica no gene. Análises funcionais da seqüência codificadora defeituosa mostraram comprometimento do elemento de resposta, assim como ausência de transativação do promotor da TPO. Estes achados confirmam a relação do PAX-8 com o desenvolvimento tireóideo, e indicam que as mutações exibem penetrância ou expressividade variável. O estudo de Vilain e cols. (15) confirma aquela observação feita por Macchia e cols. (13) e Congdon e cols. (14), que mutações no PAX8 podem ser transmitidas por herança autossômica dominante. Estudos funcionais da mutação evidenciaram ausência de ligação do mutante ao elemento de resposta e abolição ou redução da atividade transcricional. Não está esclarecido porque a mutação monoalélica do

PAX8 provoca HC em humanos, pois camundongos portadores de mutação heterozigótica no mesmo gene não exibem o fenótipo patológico (11). Admite-se que o mecanismo molecular causador da disgenesia tireóidea inclui: mutação monoalélica ou redução na expressão da proteína normal, resultando em produção hormonal insuficiente por fenômeno denominado haploinsuficiência.

### Receptor de TSH

A participação do TSHR na diferenciação, função e crescimento foi inicialmente sugerida em camundongos da linhagem *hyt* (16), modelo experimental para HC autossômico recessivo. Estes roedores exibem mutação no 4º segmento transmembranoso do receptor, que abole a resposta do AMPc ao TSH (17).

A resistência ou insensibilidade ao TSH é definida como resposta reduzida ou ausente ao hormônio, biologicamente, ativo. É causada por alterações no receptor ou em nível pós-receptor. As mutações causadoras do defeito comprometem os dois alelos e o fenótipo caracteriza-se por concentrações circulantes elevadas de TSH e níveis normais ou baixos de HT (tabela 2).

A primeira mutação descrita no TSHR em paciente portador de HC foi descrita em 1995 (18). Trabalhos ulteriores registraram outros casos em indivíduos com hipoplasia glandular originários de, pelo menos, mais 13 famílias (19-24).

A base molecular do distúrbio foi esclarecida em estudos utilizando-se de células transfectadas exprimindo o TSHR mutante em comparação ao normal (24). Na família estudada, três irmãs euti-reóideas, com níveis séricos normais de HT, mas valores muito elevados de TSH (hipotireoidismo compensado), exibiam captação normal de iodeto em glândulas eutópicas morfológicamente normais. Duas mutações diferentes foram identificadas na seqüência extracelular aminoterminal do receptor (cada um dos alelos comprometidos provinha de um dos pais – por isso denominados heterozigóticos

**Tabela 2.** Fenótipos clínicos da resistência ao TSH.

Diagnóstico molecular	Apresentação clínica
Mutações inativadoras no gene do receptor de TSH	TSH elevado (bioatividade normal) <b>Defeito parcial:</b> T4 normal, tireóide normal ou aumentada; captação de RAI normal, tireoglobulina sérica normal; <b>Defeito completo:</b> T4 baixo, tireóide hipoplásica, captação de RAI ausente, tireoglobulina sérica normal ou alta.
Ausência de mutações no gene do receptor de TSH (defeito pós-receptor?)	TSH elevado (bioatividade normal), T4 baixo, tireóide normal, tireoglobulina sérica normal ou alta.

compostos - portadores assintomáticos), provocando redução da sua afinidade ao TSH.

A resistência pode resultar ainda de defeitos em outro local, que não o receptor. A base molecular dessa forma de resistência ao TSH, predominantemente herdada, não está esclarecida. Os possíveis candidatos são fatores localizados em nível pós-receptor ou outros genes com influência sobre o desenvolvimento da tireóide (25). Esta possibilidade foi demonstrada em crianças sem grau de parentesco, portadoras de HC. Não foi possível relacionar a ocorrência de tireóide tóxica hipoplásica a mutações no gene de TSHR e nem ao gene do TSH (26,27), denotando sua heterogeneidade genética.

### Disormonogênese Tireóidea

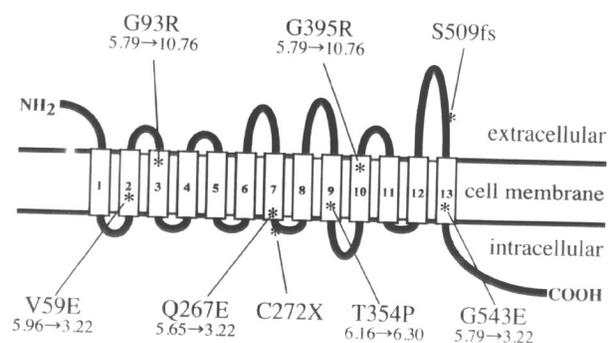
#### Defeito no transporte ativo de iodeto

É causa rara de hipotireoidismo com bócio congênito. O padrão de transmissão genética parece ser autossômico recessivo. A acumulação ativa do íon na glândula é mediada por um simportador (carreador) protéico transmembranoso intrínseco  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  (conhecido sob o epônimo NIS) (3,28). Após a clonagem do gene do NIS (28), foram descritas várias mutações homozigóticas ou heterozigóticas compostas em indivíduos portadores de defeito no transporte ativo de iodeto. A maioria dos afetados exibe bócio difuso ou nodular, pouca ou nenhuma captação glandular de radioiodo. Em crianças, a tireóide, inicialmente, pode se apresentar com tamanho normal e aumentar com o transcorrer do tempo. Em nível molecular, mutações inativadoras homozigóticas puderam ser identificadas como responsáveis pela captação comprometida de iodeto em alguns indivíduos (29,30). Em nosso meio estudamos um paciente adulto com volumoso bócio e hipotireoidismo, apresentando captação de radioiodo ao redor de 1%, na presença de TSH elevado. A ausência de sistema captador de iodo foi confirmada na tireóide, nas glândulas salivares e na mucosa gástrica. A administração de iodo (Lugol) corrigiu o hipotireoidismo e diminuiu o tamanho da tireóide. Análises *in vitro* com tecido tireóideo obtido pós-cirurgia indicaram incapacidade da célula tireóidea de aproveitar ativamente o iodeto. O seqüenciamento do gene do simportador revelou substituição homozigótica da citosina 1163 por adenina, resultando em sinal de parada no códon 272. Esta mutação sem sentido produz uma proteína NIS truncada, que não exibe atividade funcional quando transfectada em células COS (30). Em outro caso, o afetado parecia ser heterozigótico composto para duas diferentes

mutações. O alelo aberrante, derivado do pai, apresentava comprometimento codificando proteína inativa, enquanto o alelo materno exibia mutação que originava o NIS incompleto (31). No Japão, foram descritas várias outras famílias (figura 1) e duas novas mutações, que alteravam aminoácidos na proteína comprometendo sua habilidade em transportar iodeto (32,33). Curiosamente, a mesma alteração genética (mutação T354P) resulta em heterogeneidade fenotípica clínica, indicando que outros fatores podem atuar como moduladores do efeito da mutação (34). Por outro lado, foram registradas alterações funcionais provocadas por duas outras mutações (Q267E, S515X), onde as proteínas mutantes não conseguiam atingir a membrana plasmática, provocando sua retenção intracelular (35).

#### Síndrome de Pendred

Esta síndrome é caracterizada por surdez neurosensorial congênita e bócio (36). O bócio, de caráter multinodular, encontrado nos portadores, usualmente está associado a eutireoidismo ou hipotireoidismo compensado de grau leve. Os hormônios tireóideos estão, em geral, normais com exceção do TSH sérico, que pode estar discretamente aumentado, enquanto a Tg sérica encontra-se, muitas vezes, elevada. A condição *sine qua non* é a ocorrência de descarga de radioiodo de, pelo menos, 15%, após administração oral de tiocianato ou perclorato. A audição encontra-se comprometida devido a ocorrência de deformidade coclear do tipo Mondini (37,38), onde os indivíduos afetados apresentam aumento dos aquedutos vestibulares e sistema endolinfático (37,38). O padrão de



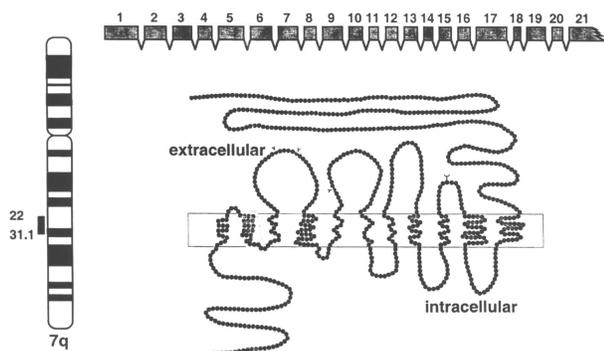
**Figura 1.** A localização das mutações descritas na literatura no gene codificador do NIS (simportador de sódio e iodeto). A mutação T354P é extremamente freqüente no Japão e pode estar presente associada a outra mutação como a V59E. Os números abaixo das mutações indicam a mudança do ponto isoeletrico das proteínas mutantes. A expressão do gene alterado resulta em mínima captação de iodeto pela célula folicular (Adaptado de Medeiros-Neto, Knobel e De Groot (8)).

hereditariedade da síndrome é autossômico recessivo. Sua patogênese está vinculada à mutações no gene PDS (figura 2), que codifica para uma proteína transmembranosa denominada pendrina, relacionada aos carregadores de sulfato (39), embora capaz de atuar como transportadora de cloreto e iodeto (40). Expressa-se predominantemente nas células foliculares tireóideas, no ouvido interno e rim. Nos tireócitos, localiza-se na membrana apical onde atua como carreador de iodeto para o lúmen folicular (41). No rim, parece atuar como trocador de cloreto por hidróxido ou bicarbonato (42). No ouvido interno, a pendrina, essencial na sua embriogênese, pode funcionar como transportador aniônico.

Examinamos as características da síndrome de Pendred em 41 indivíduos pertencentes a uma família nordestina com elevado grau de endogamia. A nova mutação encontrada afetou o 1º domínio transmembranoso (43) gerando uma pendrina incompleta, enquanto outras mutações registradas anteriormente alteraram o 9º ou 10º domínio transmembranoso ou região da terminação carboxiterminal (39). Em outro estudo detalhando as análises moleculares em 4 pacientes mexicanos, originários de 3 famílias não relacionadas, realizado em colaboração com a Unidade de Tireóide do HC-FMUSP, identificamos 3 novas mutações, uma delas bastante complexa, expandindo o espectro de mutações no gene PDS e enfatizando a ocorrência de marcante heterogeneidade alélica (44).

### Tireoperoxidase

Os defeitos da TPO são os mais frequentes entre os erros inatos da síntese hormonal tireóidea. Com a



**Figura 2.** O gene PDS e a respectiva proteína traduzida, denominada pendrina. Está localizado no cromossomo 7q31 e se expande por 21 exons. O cDNA tem 2343 pares de bases e codifica proteína com 780 aminoácidos, a qual é altamente hidrofóbica. Funcionalmente, a pendrina se localiza na membrana apical da célula folicular e promove o fluxo de iodeto em direção ao colóide.

incorporação de iodeto comprometida, os pacientes, tipicamente, exibem perda de iodeto radioativo intratireóideo após administração de perclorato.

Têm sido registradas na literatura, mutações no gene da TPO em várias famílias onde o defeito ocorre de forma parcial ou total (45-48).

A classificação apresentada a seguir (tabela 3) poderá auxiliar o entendimento da natureza do defeito bioquímico.

Existe grande heterogeneidade clínica e bioquímica nos portadores do defeito. Pacientes com DTII podem apresentar algum grau de deficiência física ou mental, bócios volumosos e hipotireoidismo. Em outros casos há uma compensação do defeito de incorporação de iodeto com o aumento do tamanho da glândula, formando grandes bócios capazes de manter eutiroidismo limite, geralmente com elevados níveis de T3 e normais ou baixos níveis de T4. A resposta do TSH ao THR é exacerbada em pacientes eutiroides ou hipotireóides. Em estudos de famílias se observa que o defeito aparece em ambos sexos e em irmandades. Os pais não afetados são frequentemente consangüíneos, sugerindo uma herança autossômica recessiva (49).

Várias mutações inativadoras, comprometendo ambos os alelos do gene da TPO, foram identificadas em pacientes com HC devido a DTII (tabela 4) (46,50-53), a maioria localizada nos exons 8,9 e10, que contêm os resíduos de histidina de ligação heme, distais e proximais, que correspondem à região catalítica da enzima. Alterações de seqüências nestes importantes sítios podem, provavelmente, levar a inatividade da TPO. Nos achados de estudos moleculares descritos por Bakker e cols. (52), em estudo realizado na Holanda em 45 pacientes com DTII (tabela 4), trinta e cinco entre os 45 estavam disponíveis para as análises moleculares; 13/45 eram homozigotos e 16/35 eram heterozigotos compostos para as mutações afetando os exons ou limites intron-exons do gene da TPO. Em 4 de 35 famílias foi detectado somente um alelo afetado; em uma não foi identificada nenhuma mutação. Um paciente apresentou isodissomia parcial materna do cromossomo 2p, resultando em homozigotidade para mutação inativadora do gene da TPO (54).

**Tabela 3.** Defeitos na incorporação de iodeto.

1. Defeito total (DTII)
2. Defeito parcial (DPII)
3. Inibidores da atividade da TPO
4. Deficiência na geração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

No Brasil, Santos e cols. (47) vêm realizando análise genética sistemática de famílias com DTII. Até o momento o estudo tem mostrado elevada ocorrência de heterozigiosidade composta, tendo sido detectada uma nova mutação (no exon 11) ainda não descrita por outros autores. A descrição

das mutações identificadas está exposta na tabela seguinte (tabela 5).

Até o presente não foram ainda descritas na literatura mutações no gene da TPO associadas com defeitos parciais de incorporação de iodeto (DPII). O estudo recente de 5 famílias com DPII, feito no Brasil

**Tabela 4.** Resumo de mutações do gene da TPO registradas nos últimos 5 anos na literatura em pacientes com DTII.

Grupo Nº	Exon	Mutação	Posição	Efeito da mutação na síntese protéica	Referência
<b>A</b>					
1	2	ins 20bp	141	Mudança de quadro de leitura, com sinal de terminação no exon 3.	52
2	8	ins GGCC	1277	Mudança de quadro de leitura, com sinal de terminação no exon 9.	
3	8	del C	1425	Mudança de quadro de leitura, com sinal de terminação no exon 9.	
4	12	del TT	2243/2244	Mudança de quadro de leitura, sinal de terminação imediato.	
5	14	ins C	2505/2511	Mudança de quadro de leitura, com sinal de terminação no exon 16.	
6	14	del T	2512	Mudança de quadro de leitura, com sinal de terminação no exon 3	
<b>B</b>					
1	8	G→A	1066	Ala 326 Thr	52
2	9	A→T	1429	Ile 447 Phe	
3	9	T→G	1447	Tyr 453 Asp	
4	9	G→T	1671	Trp 527 Cys	
5	12	C→T	2167	Arg 693 Trp	
6	14	G→A	2485	Glu 799 Lys	
<b>C</b>					
1	4	G→C	439	GG/gt GC/gt (splicing alternativo) AG/gt (splicing alternativo) AG/at (splicing alternativo)	52
2	10	G→A	1858		
3	10	G→A	+1 intron 10		
<b>D</b>					
1	10	C→T	1708	Arg 540 codon de terminação	52
<b>E</b>					
1	7	sem sentido		Heterozigose composta E1/A5: TPO de tamanho similar, porém sem atividade	51
<b>F</b>					
	11	C→T	2083	Localização celular anormal da TPO	55
	13				
	9	G→A	1477	Gly 493 Ser	53
	13	G→T	2386	Asp 796 Thy ou (splicing alternativo)	53
	9	T→C	1463	Leu458Pro	48
<b>G</b>					
	13	ins T	2268		48
	14	del C	843		
	8	del C	2413		
<b>E</b>					
	8	ins GGCC	1277	Mudança de quadro de leitura com sinal de terminação no exon 9	47
		ins GGCC	1277		
	11	C→G	2008	Mudança de quadro de leitura, com sinal de terminação no exon 9	47
		C→T	2083		
	14	ins C	2505/2511	Gln669Glu	
				Localização anormal da TPO na célula	
				Mudança de quadro de leitura, com sinal de terminação no exon 14	

**Tabela 5.** Alterações de seqüência nucleotídica identificados em análises moleculares realizadas em 7 famílias de pacientes portadores de defeito total de incorporação de iodeto\*.

Nº de famílias	Exon	Mutação	Posição	Efeito da mutação na síntese protéica	
2	8	Ins GGCC	1277	Mudança de quadro de leitura, com sinal de terminação no exon 9	
2	8	Ins GGCC heterozigótica	1277	Mudança de quadro de leitura, com sinal de terminação no exon 9	
1	11	C→G heterozigótica	2008	Gln669Glu	
1	11	C→T heterozigótica	2083	Localização anormal da TPO na célula	
1	14	Ins C heterozigótica	2505/251	Mudança de quadro de leitura, com sinal de terminação no exon 14	

\*Adaptada de Santos e cols. (47).

por Nascimento em 2002 (56) identificou as mutações descritas na tabelas 6 e 7. As alterações encontradas nos pacientes portadores de DPII (tabela 6) não estavam presentes naqueles pacientes com DTII (tabela 7) pertencentes a 3 outras famílias, não relacionadas às 5 primeiras. Em um único caso foi possível compor teoricamente a heterozigose com novas mutações no exon 8 (posição 1242) e no exon 10 (posição 1780). Todavia, é necessário realizar estudo de atividade protéica para confirmar que mutações pontuais encontradas no gene da TPO, talvez, modificando parcialmente a atividade da enzima, sejam responsáveis pelos DPII.

### Tireoglobulina

A Tg é elemento chave na síntese hormonal e no armazenamento de iodo e hormônios tireóideos.

Têm sido descritos defeitos na sua síntese em vários animais e em seres humanos (57) causadores de HC. Geralmente são transmitidos por herança autossômica recessiva, embora tenha sido registrada em uma família transmissão autossômica dominante.

Concentração baixa ou limítrofe de Tg pode indicar defeito quantitativo, enquanto pacientes com defeito qualitativo exibem níveis normais ou elevados. Em outros casos, a alteração genética provoca retenção intracelular ou modificações secundárias. Alguns indivíduos com Tg estruturalmente alterada exibem conjugação prejudicada das iodotirosinas onde a maioria do iodo incorporado encontra-se na forma de MIT e DIT. A situação metabólica oscila entre o eutireoidismo, hipotireoidismo subclínico e hipotireoidismo franco. Quando não tratados, os

**Tabela 6.** Alterações de seqüência nucleotídica identificadas em 5 pacientes de famílias não relacionadas portadores de defeito parcial de incorporação de iodeto.

Alteração de seqüência e efeito na síntese protéica	
Família A	Exon 8: variantes polimórficas nas posições 1207 e 1283 com trocas de alanina por serina e serina por treonina, respectivamente (já descrita).  Exon 11: Troca G por A, posição 2084, heterozigótica com troca de arginina por glutamina na posição 665 da TPO (nova mutação)
Família B	Exon 8: variantes polimórficas nas posições 1207 e 1283 com trocas de alanina por serina e serina por treonina, respectivamente (já descrita)  Exon 10: Troca C por A, posição 1780, heterozigótica com troca de leucina por isoleucina na posição 564 da TPO (nova mutação)
Família C	Exon 8: Troca G por T, posição 1242, com troca de glutamina por ácido aspártico na posição 384 da TPO (nova mutação)  Variante polimórfica na posição 1207 com troca de alanina por serina (já descrita)  Exon 10: Troca C por A, posição 1780, heterozigótica com troca de leucina por isoleucina na posição 564 da TPO (nova mutação?)
Família D	Exon 8: variantes polimórficas nas posições 1207 e 1283 com trocas de alanina por serina e serina por treonina, respectivamente (já descrita)
Família E	Borda exon/intron 9: troca AG/gt por AT/gt afetando provavelmente o splicing (nova mutação)

**Tabela 7.** Alterações de seqüência nucleotídica identificadas em 3 pacientes de famílias não relacionadas, portadores de defeito total de incorporação de iodo.

Alteração de seqüência e efeito na síntese protéica	
Família 1	Exon 8: inserção GGCC na posição 1277, homozigótica com sinal de terminação precoce no exon 9
Família 2	Exon 8: inserção GGCC na posição 1277, heterozigótica com sinal de terminação precoce no exon 9 Exon 11: troca C por G na posição 2068, heterozigótica com troca de glutamina por ácido glutâmico na posição 660 da TPO
Família 3	Exon 11: troca C por G na posição 2068, heterozigótica com troca de glutamina por ácido glutâmico na posição 660 da TPO Exon 14: inserção de C entre as posições 2505 e 2511, gerando um sinal de terminação precoce no exon 16

pacientes, tipicamente, se apresentam com bócio desde a infância.

Ao contrário do hipotireoidismo com bócio presente em alguns roedores e em seres humanos, os camundongos nanicos recessivos rdw/rdw exibem HC sem bócio (58). Nestes animais a Tg alterada fica retida no retículo endoplasmático, mas por razão ainda não esclarecida, não ostentam bócio. A importância da identificação de mutação no gene da Tg como causa de hipotireoidismo sem bócio nos camundongos rdw/rdw, está na contestação da generalização prévia de que o HC sem bócio em humanos é provocado por disgenesia ou defeitos no TSHR. Este achado sugere que alguns pacientes com disormonogênese poderão se apresentar com HC, mas não acompanhado de aumento do volume tireóideo.

O primeiro relato de mutação associada à expressão anormal de Tg foi descrita por Ieiri e cols. em 1991 (59). Estudos de seqüenciamento mostraram a perda do exon 4 do gene da Tg, que levava à síntese de uma glicoproteína anormal, isto é, sem um segmento peptídico de 68 aminoácidos. A troca de citosina por timidina no gene da Tg foi identificada

em dois irmãos portadores de hipotireoidismo congênito, levando ao aparecimento de sítio de terminação na posição 1510 (60). Em outra família com dois irmãos portadores de hipotireoidismo congênito com bócio foi detectada a deleção em homozigose de um fragmento de 138 nucleotídeos na região central do mRNA da Tg, embora a consequência funcional desta deleção não esteja muito clara (61) podendo estar associada à degradação prematura, baixa concentração no colóide e consequente diminuição dos hormônios tireóideos.

Em estudo em andamento, não publicado, envolvendo 4 famílias com 5 descendentes portadores de defeito de síntese de Tg, foram localizadas mutações no cDNA da Tg no tecido tireóideo, decorrentes de alterações nucleotídicas descritas na tabela 8.

Para a análise da seqüência gênica da Tg foi necessário analisar a seqüência do seu mRNA, de 8,4Kb, dado que o gene da Tg possui mais de 250Kb (48 exons e os respectivos introns) (57,62,63). Os trabalhos, então, foram iniciados com a extração de

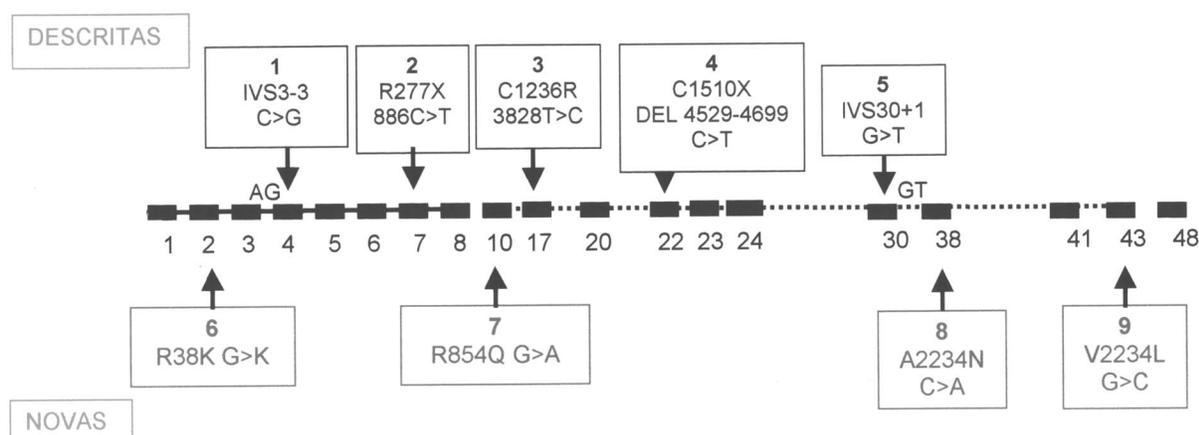
**Tabela 8.** Alterações na seqüência nucleotídica do cDNA de Tg em 5 pacientes pertencentes a 4 famílias não relacionadas.

Exon	Posição	Troca de base	Troca de aa ou tipo de mutação	Família/Pacientes (Iniciais)				
				RO/Ade	RO/Dil	UZ/Em	ALX/Fab	SE/Jai
2	113	G por A	Arg por Lys	(+)	(+)	-	-	-
9	1269	C por T	Silenciosa	+	+	-	-	-
10	2200	T por G	Ser por Ala	+	+	+	+	+
	2334	T por C	Silenciosa	+	+	+	+	+
	2561	G por A	Arg por Glt	(+)	(+)	-	-	-
	3082	A por G	Met por Val	-	-	-	-	-
16	3474	T por C	Silenciosa	+	+	+	+	+
17	3753	A por G	Silenciosa	+	+	+	+	+
18	3935	G por A	Gly por Ser	+	+	+	-	-
21	4506	C por T	Silenciosa	+	+	+	+	+
	5512	A por G	Asn por Asp	+	+	+	+	+
	5995	C por T	Arg por Trp	-	-	+	+	+
38	6701	C por A	Arg por Apn	-	-	(+)	(+)	(+)
43	7408	C por T	Silenciosa	-	-	+	+	+
	7414	G por C	Val por Leu	(+)	(+)	-	-	-
	7501	T por C	Trp/Arg	+	+	+	+	+
46	7920	T por C	Silenciosa	+	+	-	-	-

+ alteração da seqüência nucleotídica já descrita na literatura.

(+) alteração nucleotídica nova.

- ausência de alteração da seqüência nucleotídica.



**Figura 3.** Mutações no gene da Tg descritas em humanos e registradas na literatura.

1 - Ieiri e cols. (59); 2 - van der Graaf e cols. (64); 3 - Hishinuma e cols. (65); 4 - Targovnik e cols. (61); 5 - Targovnik e cols. (62); 6, 7, 8 e 9 - Novas mutações identificadas neste trabalho.

mRNA de tecido tireóideo, síntese de cDNA e posterior seqüenciamento.

Este estudo permitiu a identificação de quatro novas mutações, nos exons 2, 10, 30 e 43, ainda não descritas na literatura (figura 3).

Na família RO, verificou-se que ambos afetados (primos em primeiro grau) possuem as mesmas alterações nucleotídicas no gene da Tg, sendo que três delas são novas. Estas foram localizadas no exon 2, posição 113 (com troca de arginina por lisina), no exon 10, posição 2561 (com troca de arginina por ácido glutâmico) e no exon 43, posição 7414 (com troca de valina por leucina).

Nas famílias UZ, ALX e SE foi identificada a mesma alteração de seqüência, mas diferente da encontrada na família RO. Esta última ocorreu na posição 6701 e provocou troca nucleotídica originando a substituição de arginina por asparagina (tabela 8). Estudo funcional da Tg permitirá verificar o caráter inativante destas mutações.

Adicionalmente, foram identificadas nestes 5 pacientes afetados outras alterações de seqüência nucleotídica, que causaram mutações silenciosas (sem efeito na atividade da proteína) ou polimorfismos (tabela 8).

## REFERÊNCIAS

- Chiovato L, Di Lauro R, Lapi P, et al. Recent insights in the pathogenesis of neonatal hypothyroidism. In: Pinchera A, Mann K, Hostalek U, editors. **Thyroid and Age**, Schattauer; **1998**;91-108.
- Kaplan EL, Shukla M, Hara H, et al. Developmental abnormalities of the thyroid. In: DeGroot LJ, editor. **Endocrinology**. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; **1994**;893-9.
- La Franchi S. Recent developments in pediatric thyroidology. **Thyroid Today** **1998**;21:1-13.
- De La Vieja, Dohan O, Levy O, et al. Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. **Physiol Rev** **2000**;80:1083-105.
- Everett LA, Green ED. A family of mammalian anion transporters and their involvement in human genetic diseases. **Hum Mol Genet** **1999**;8:1883-91.
- Kopp P. Pendred's syndrome and genetic defects in thyroid hormone synthesis. **Rev Endocrinol Metab Dis** **2000**;1/2:109-21.
- De Deken X, Wang D, Many MC, et al. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. **J Biol Chem** **2000**;275:23227-33.
- Medeiros-Neto GA, Knobel M, De Groot LJ. Genetic disorders of the thyroid hormone system. In: Baxter JD, Melmed S, New MI, eds. **Genetics in Endocrinology**. Lip-pincott Williams & Wilkins, **2002**;375-402.
- Guillam MP, Kopp P. Genetic regulation of thyroid development. **Curr Opin Pediatr** **2001**;13:358-63.
- Mansouri A, Hallonet M, Gruss P. Pax genes and their roles in cell differentiation and development. **Curr Opin Cell Biol** **1996**;8:851-7.
- Mansouri A, Chowdury K, Gruss P. Follicular cells of the thyroid gland require PAX8 gene function. **Nature Genet** **1998**;19:87-90.
- Zannini M, Francis-Lang H, Plachov D, et al. Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters. **EMBO J** **1992**;12:4230-41.
- Macchia PE, Lapi P, Krude H, et al. PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid agenesis. **Nature Genet** **1998**;19:83-6.
- Congdon T, Nguyen LQ, Nogueira CR, et al. A novel mutation (Q4OP) in PAX8 associated with congenital hypothyroidism and thyroid hypoplasia: evidence for phenotypic variability in mother and child. **J Clin Endocrinol Metab** **2001**;86:3962-7.

15. Vilain C, Rydlevski C, Duprez L, et al. Autosomal dominant transmission of congenital thyroid hypoplasia due to loss-of-function mutation of PAX8. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86:234-8.
16. Beamer WJ, Eicher EM, Malfais LJ, et al. Inherent primary hypothyroidism in mice. **Science** 1981;212:61-3.
17. Stein SA, Oates EL, Hall CR, et al. Identification of a point mutation in the thyrotropin receptor of the *hyt/hyt* hypothyroidism mouse. **Mol Endocrinol** 1994;8:129-38.
18. Sunthornthepvarakul T, Gottschalk ME, Hayashi Y, et al. Resistance to thyrotropin caused by mutations in the thyrotropin-receptor gene. **N Engl J Med** 1995;332:155-60.
19. De Roux N, Misrahi M, Brauner R, et al. Four families with loss of function mutations of the thyrotropin receptor. **J Clin Endocrinol Metab** 1996;81:4229-35.
20. Clifton-Bligh RJ, Gregory JW, Ludgate M, et al. Two novel mutations in the thyrotropin (TSH) receptor gene in a child with resistance to TSH. **J Clin Endocrinol Metab** 1997;82:1094-100.
21. Abramowicz MJ, Duprez L, Parma J, et al. Familial congenital hypothyroidism due to inactivating mutation of the thyrotropin receptor causing a profound hypoplasia of the thyroid gland. **J Clin Invest** 1997;99:3018-24.
22. Biebermann H, Schöneberg T, Krude H, et al. Mutations of the human thyrotropin receptor gene causing thyroid hypoplasia and persistent congenital hypothyroidism. **J Clin Endocrinol Metab** 1997;82:3471-80.
23. Gagné N, Parma J, Deal C, et al. Apparent congenital athyreosis contrasting with normal plasma thyroglobulin levels and associated with inactivating mutations in the thyrotropin receptor gene: are athyreosis and ectopic thyroid distinct entities? **J Clin Endocrinol Metab** 1998;83:1771-5.
24. Nogueira CR, Nguyen LQ, Coelho-Neto JR, et al. Structural analysis of the thyrotropin receptor in four patients with congenital hypothyroidism due to thyroid hypoplasia. **Thyroid** 1999;9:523-9.
25. Takeshita A, Nagayama Y, Yamashita S, et al. Sequence analysis of the TSH receptor gene in congenital primary hypothyroidism associated with TSH unresponsiveness. **Thyroid** 1994;4:255-9.
26. Xie J, Pannain S, Pohlenz J, et al. Resistance to thyrotropin (TSH) in three families is not associated with mutations in the TSH receptor or TSH. **J Clin Endocrinol Metab** 1997;82:3933-40.
27. Ahlbom BD, Yaqoob M, Larsson A, et al. Genetic and linkage analysis of familial congenital hypothyroidism: exclusion of linkage to the TSH receptor. **Hum Genet** 1997;99:186-90.
28. Daif G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. **Nature** 1996;379:458-60.
29. Fujiwara H, Tatsumi K, Miki K, et al. Congenital hypothyroidism caused by a missense mutation in the  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  symporter. **Nature Genet** 1997;17:122.
30. Pohlenz J, Medeiros-Neto G, Gross JL, et al. Hypothyroidism in a Brazilian kindred due to iodide trapping defect caused by homozygous mutation in the sodium/iodide symporter gene. **Biochem Biophys Res Commun** 1997;240:488-91.
31. Pohlenz J, Rosenthal IM, Weiss RE, et al. Congenital hypothyroidism due to mutations in the sodium/iodide symporter. Identification of a nonsense mutation producing a downstream cryptic 3' splice site. **J Clin Invest** 1998;101:1028-35.
32. Matsuda A, Kosugi S. A homozygous missense mutation of the sodium/iodide symporter gene causing iodide transport defect. **J Clin Endocrinol Metab** 1997;82:3966-71.
33. Kosugi S, et al. Novel, missense mutation and loss-of-function mutations in the sodium/iodide symporter gene causing iodide transport defect in three Japanese patients. **J Clin Endocrinol Metab** 1998;83:3373-6.
34. Kosugi S, et al. High prevalence of T354P sodium/iodide symporter gene mutation in Japanese patients with iodide transport defect who have heterogenous clinical pictures. **J Clin Endocrinol Metab** 1998;83:4123-9.
35. Pohlenz J, Duprez L, Weiss RE, et al. Failure of membrane targeting causes the functional defect of two mutant sodium iodide symporters. **J Clin Endocrinol Metab** 2000;85:2366-9.
36. Kopp P. Pendred's syndrome: clinical characteristics and molecular basis. **Curr Opin Endocrinol Diab** 1999;6:261-9.
37. Reardon W, O'Mahoney CF, Trembath R, et al. Enlarged vestibular aqueduct: a radiological marker of Pendred syndrome, and mutation of the PDS gene. **QJM** 2000;93:99-104.
38. Everett LA, Belyantseva IA, Noben-Trauth K, et al. Targeted disruption of mouse PDS provides insight about the inner-ear defects encountered in Pendred syndrome. **Hum Mol Genet** 2001;10:153-61.
39. Everett LA, Glaser B, Beck JC, et al. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). **Nature Genet** 1997;17:411-22.
40. Scott DA, Wang R, Kreman TM, et al. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. **Nature Genet** 1999;21:440-3.
41. Royoux IE, Suzuki K, Mori A, et al. Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS) is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. **Endocrinology** 2000;141:839-45.
42. Soleimani M, Greeley T, Petrovic S, et al. Pendrin, an apical  $\text{Cl}^-/\text{OH}^-/\text{HCO}_3^-$ -exchanger in the kidney cortex. **Am J Physiol Renal Physiol** 2001;280:F356-F364.
43. Kopp P, Arseven K, Sabacan L. Phenocopies for deafness and goiter development in a large inbred Brazilian kindred with Pendred's syndrome associated with a novel mutation in the PDS gene. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84:336-41.
44. Trevino OG, Arseven OK, Ceballos CJ, et al. Clinical and molecular analysis of three Mexican families with Pendred's syndrome. **Eur J Endocrinol** 2001;144:585-93.
45. Abramowicz MJ, Targovnik HM, Varela V, et al. Identification of a mutation in coding sequence of the human thyroid peroxidase gene causing congenital goiter. **J Clin Invest** 1992;90:1200-4.
46. Pannain S, Weiss RE, Jackson CE, et al. Two different mutations in the thyroid peroxidase gene of a large

- inbred Amish kindred: power and limits of homozygosity mapping. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84:1061-71.
47. Santos CL, Bikker H, Rego KG, et al. A novel mutation in the TPO gene in goitrous hypothyroidism patients with iodide organification defect. **Clin Endocrinol** 1999;51:165-72.
48. Ambrugger P, Stoeva I, Biebermann H, et al. Novel mutations of the thyroid peroxidase gene in patients with permanent congenital hypothyroidism. **Eur J Endocrinol** 2001;51:165-72.
49. Medeiros-Neto GA, Billerbeck AEC, Wajchenberg BL, et al. Defective organification of iodide causing hereditary goitrous hypothyroidism. **Thyroid** 1993;3:143-59.
50. Bikker H, Baas F, De Vijder JJ. Molecular analysis of mutated thyroid peroxidase detected in patients with total iodide organification defects. **J Clin Endocrinol Metab** 1997;82:649-53.
51. Kotani T, Umeki K, Yamamoto I, et al. A novel mutation in the human thyroid peroxidase gene resulting in a total iodide organification defect. **J Endocrinol** 1999;160:267-73.
52. Bakker B, Bikker H, Vulsma T, et al. Two decades of screening for congenital hypothyroidism in the Netherlands: TPO gene mutations in total iodide organification defects (an update). **J Clin Endocrinol Metab** 2000;85:3708-12.
53. Wu JY, Shu SG, Yang CF, et al. Mutation analysis of thyroid peroxidase gene in Chinese patients with total iodide organification defect: identification of five novel mutations. **J Endocrinol** 2002;172:627-35.
54. Bakker B, Bikker H, Hennekam RCM, et al. Maternal isodisomy for chromosome 2p causing severe congenital hypothyroidism. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86:1164-8.
55. Umeki K, Kotani T, Kawano JJ, et al. Two novel missense mutations in the thyroid peroxidase gene (R665W and G771R) result in a localization defect and cause congenital hypothyroidism. 2002; (submitted)
56. Nascimento AC. Análise molecular de mutações no gene da tireoperoxidase em pacientes com defeito de incorporação de iodeto. São Paulo, **Tese de Doutorado**, FMUSP; 2002;USP/FM/SBD 338/01.
57. Medeiros-Neto GA, Targovnik HM, Vassart G. Defective thyroglobulin synthesis and secretion causing goiter and hypothyroidism. **Endocr Rev** 1993;14:165-83.
58. Hishinuma A, Furudate S, Oh-Ishi M, et al. A novel missense mutation (G2320R) in thyroglobulin causes hypothyroidism in rdw rats. **Endocrinology** 2000;141:4050-5.
59. Ieiri T, Emoto T, Kuruda H, et al. A 3' spliced site mutation in the thyroglobulin gene responsible for congenital goiter with hypothyroidism. **J Clin Invest** 1991;88:1901-5.
60. Targovnik H, Medeiros-Neto G, Varela V, et al. A nonsense mutation causes human hereditary congenital goiter with preferential production of a 171nt thyroglobulin RNA messenger. **J Clin Endocrinol Metab** 1992;77:210-5.
61. Targovnik H, Rivolta CM, Mendive FM, et al. 138 nucleotide deletion in the thyroglobulin ribonucleotide acid gene. **J Clin Endocrinol Metab** 1995;80:3385-8.
62. Targovnik H, Rivolta CM, Mendive FM, et al. Congenital goiter with hypothyroidism caused by a 5' splice mutation in the thyroglobulin gene. **Thyroid** 2001;11:685-90.
63. Mendive FM, Rivolta CM, Moya CM, et al. Genomic organization of the human thyroglobulin gene: the complete intron-exon structure. **Eur J Endocrinol** 2001;145:485-96.
64. van de Graaf SA, Ris-Stalpers C, Veenboer GJ, et al. Premature stopcodon in thyroglobulin messenger RNA results in familial goiter and moderate hypothyroidism. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84(7):2537-42.
65. Hishinuma A, Takamatsu J, Ohyama Y, et al. Two novel cysteine substitutions (C1263R and C1995S) of thyroglobulin cause a defect in intracellular transport of thyroglobulin in patients with congenital goiter and the variant type of adenomatous goiter. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84(4):1438-44.

**Endereço para correspondência:**

Geraldo Medeiros-Neto  
Unidade de Tireóide, Hospital das Clínicas - FMUSP  
Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar 255 - 8º. andar, bloco 3  
05403-903 São Paulo, SP  
Fax: (011) 3031-5194  
e.mail: medneto@uol.com.br