



## Caracterização molecular do gene *TPO* em crianças Portuguesas com hipotiroidismo congénito causado por disormonogénese

Célia Nogueira<sup>1</sup>, Rui Vaz Osório<sup>2</sup>, Rosário Santos<sup>1</sup>, Paula Jorge<sup>1</sup>

1 - Unidade de Genética Molecular, Departamento de Genética, Centro de Genética Médica Doutor Jacinto de Magalhães; Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto

2 - Comissão Executiva do Diagnóstico Precoce, Centro de Genética Médica Doutor Jacinto de Magalhães, Porto

### Resumo

O hipotiroidismo congénito (HC) presente em cerca de 1:4000 recém-nascidos é considerado uma das principais causas, preveníveis, de atraso mental em crianças. O rastreio universal do HC realizado através do Programa Nacional de Diagnóstico Precoce, implementado em Portugal desde 1985, tem resultado num desenvolvimento normal da maioria das crianças com hipotiroidismo. Os defeitos congénitos da tiróide podem ser divididos em vários grupos que representam as alterações quer no desenvolvimento da glândula quer na síntese das hormonas da tiróide. Os defeitos hereditários da síntese hormonal causados por disormonogénese ocorrem em apenas 10% a 15% dos casos de HC. A forma mais comum resulta de um defeito na organificação causado por mutações no gene da peroxidase da tiróide, *TPO*. Apresenta-se uma revisão do espectro mutacional do gene *TPO* na população portuguesa após a investigação molecular de 69 doentes com HC permanente por disormonogénese. Este estudo que complementa o publicado em 2005 engloba a caracterização molecular de mais catorze crianças com HC e a metodologia utilizada. Foi ainda efectuada uma extensa análise *in-silico* das novas variantes identificadas bem como da putativa alteração de *splicing* anteriormente descrita. No total, as variações de sequência identificadas no gene *TPO*, incluem dez mutações distintas e 29 polimorfismos que permitiram estabelecer a etiologia molecular do HC em quinze doentes. Em conclusão, foi possível estabelecer um diagnóstico diferencial em doze famílias com HC, de forma não invasiva e sem necessidade de suspensão da medicação. Esta investigação permite ainda oferecer a estas famílias um aconselhamento genético preciso, uma adequada monitorização em futuras gravidezes, bem como perspectivar novas terapêuticas individualizadas.

**Palavras-chave:** hipotiroidismo congénito, peroxidase da tiróide, disormonogénese, gene *TPO*, espectro mutacional.

*Acta Pediatr Port* 2010;41(6):246-51

### Molecular characterization of *TPO* gene in Portuguese children with congenital hypothyroidism due to dysmorphogenesis

#### Abstract

Congenital hypothyroidism (CH) affects about 1:4000 infants and is considered one of the main causes of preventable mental retardation in children. Universal screening of CH performed through the Portuguese National Neonatal Screening Programme, implemented in Portugal in 1985, has resulted in normal development of attained children. Birth defects of the thyroid can be divided into several groups that represent either changes in the development of the gland or the consequences observed in the deficient synthesis of thyroid hormones. The defects of hormone synthesis caused by dysmorphogenesis occur in only 10% to 15% of cases of HC. Defects in the thyroid peroxidase (*TPO*) gene are reported to be one of the most frequent causes of CH due to dysmorphogenesis. The aim is to review the mutational spectrum of the *TPO* gene in the portuguese population through the molecular investigation of 69 patients with permanent CH due to dysmorphogenesis. To complement previous results, published in 2005, this work describes the molecular characterization of a further fourteen children with CH and the methodology applied. Extensive *in-silico* analysis was carried out for the newly identified sequence changes as well as the formerly published putative *splicing* variant. The sequence variations identified in the *TPO* gene comprise ten distinct mutations and 29 polymorphisms, enabling the determination of the molecular etiology of CH in fifteen patients. In conclusion, it was possible to obtain a differential diagnosis in twelve families with CH, using a non-invasive procedure and without interruption of medication. Identification of these and other mutations in the *TPO* gene can therefore contribute considerably towards diagnosis, a precise genetic counselling, adequate monitoring in future pregnancies as well as putative personalized therapies.

**Recebido:** 30.12.2009

**Aceite:** 03.12.2010

#### Correspondência:

Paula Jorge

Unidade de Genética Molecular, Departamento de Genética  
Centro de Genética Médica Doutor Jacinto de Magalhães (CJM)  
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSARJ)  
Praça Pedro Nunes, 88 - 4099-028 Porto  
paula.jorge@insa.min-saude.pt; jorgpaula@gmail.com

**Key-words:** congenital hypothyroidism, thyroid peroxidase, dyshormonogenesis, *TPO* gene, mutational spectrum.

*Acta Pediatr Port 2010;41(6):246-51*

### Introdução

O hipotireoidismo congénito (HC) primário é uma doença metabólica que pode ser causada por defeitos na ontogenia da tiróide ou na hormonogénese. A nível global, em regiões iodo-suficientes, o HC afecta cerca de 1/3000 a 1/4000 recém-nascidos (RN), sendo uma das principais causas de atraso mental em crianças se não forem sujeitas a tratamento<sup>1</sup>.

O HC primário ocorre quando a tiróide é lesada ou incapaz de produzir uma quantidade normal das hormonas triiodotironina (T<sub>3</sub>) e tetraiodotironina (tiroxina ou T<sub>4</sub>). Cerca de 85 a 90% do HC primário permanente é devido a defeitos na formação glandular durante a embriogénese e designa-se de disgenesia da tiróide (incluindo tiróides eutópicas, ectópicas e hemi-tiróides)<sup>2</sup>. As causas da agenesia da tiróide continuam por esclarecer existindo, no entanto, evidências de associação com mutações no gene *GNAS* e nos genes que codificam os factores de transcrição TTF1, TTF2 e PAX8, em casos de HC sindrómico<sup>3</sup>. Os defeitos hereditários da síntese hormonal (disormonogénese) ocorrem em 10 a 15% dos casos de HC, apresentando a maioria alterações no gene da peroxidase da tiróide (*TPO*)<sup>4</sup>. O HC secundário ou central, resulta da ausência de estímulo pela hormona estimuladora da tiróide (TSH) na glândula tiróide originando disfunções hipofisárias ou hipotalâmicas (HC hipotalâmico-pituitário)<sup>5</sup>. Têm sido associadas a este tipo de HC mutações nos genes *POU1F1*, *PROPI*, *LHX3* e *HESX1*, que codificam factores de transcrição hipofisários e mutações no gene que codifica a subunidade β da TSH<sup>6</sup>.

Os recém-nascidos com HC são detectados no rastreio neonatal e normalmente apresentam sintomatologia rara e não específica. O aparecimento de um quadro clínico severo é raro, podendo incluir hipotonia, icterícia prolongada, atraso psicomotor e de crescimento, dificuldades na alimentação, macroglossia, choro rouco, sonolência, dificuldades respiratórias, hérnia umbilical, mixedema e fontanelas posteriores alargadas, atraso na maturação óssea e bócio. Estão descritos alguns casos de HC em RN com sintomatologia logo após o nascimento mas nos quais o diagnóstico de HC só foi considerado após o resultado do rastreio neonatal<sup>7</sup>. A ausência de tratamento ou o diagnóstico tardio conduz a atraso mental grave e a alterações neurológicas irreversíveis, com prognóstico dependente da idade de início da terapêutica. A terapia do HC é independente da etiologia e consiste na substituição com T<sub>4</sub> sintética (Levotiroxina ou L-tiroxina). Este tratamento permite um desenvolvimento psicomotor normal das crianças desde que os valores séricos da tiroxina se mantenham normais, e evita também a formação de bócio, característico dos doentes com HC por disormonogénese (HCdis)<sup>6</sup>.

Para diagnosticar o HCdis recorre-se à ecografia cervical neonatal e à cintilografia da tiróide, que permitem observar a localização e o desenvolvimento desta glândula<sup>8</sup>. Para a realização da cintilografia da tiróide é necessário interromper a

terapêutica durante quatro semanas, pelo que só se realiza quando a criança atinge os três anos de idade, por essa interrupção já não afectar o desenvolvimento cerebral da criança. No HCdis a tiróide apresenta a localização normal, sendo por isso necessários estudos bioquímicos posteriores, tais como o teste: i) da captação do radioiodo <sup>123</sup>I; ii) da descarga do perclorato; iii) do doseamento dos níveis séricos de tiroglobulina (Tg); iv) da determinação de iodopeptídeos na urina, para se distinguir qual o passo da hormonogénese que se encontra comprometido<sup>9</sup>.

Os doentes com defeito na organificação total do iodo apresentam frequentemente mutações no gene da peroxidase da tiróide (*TPO*), que codifica uma enzima chave no processo da biossíntese das hormonas da tiróide, pelo que os defeitos nesta enzima constituem a causa mais comum do HCdis (MIM#274500). Este gene está localizado no cromossoma dois, em 2p25<sup>10</sup>, é constituído por 17 exões, abrange uma região de aproximadamente 150 kb e o respectivo mRNA (*GeneBank accession number* NM\_000547) tem 3 kb. A peroxidase da tiróide (*TPO*) é uma glicoproteína transmembranar composta por 933 aminoácidos, que cataliza a iodização dos resíduos de tirosina da tiroglobulina durante o processo de síntese das hormonas da tiróide<sup>11</sup>. Esta enzima é constituída por vários domínios funcionais importantes intra e extracelulares<sup>12</sup>. Os diversos rastreios moleculares do gene *TPO*, revelaram que existe uma grande heterogeneidade de defeitos ao nível desta proteína, uma vez que estão descritas na literatura mutações ao longo de todo o gene, que compreendem mutações do tipo *missense*, *nonsense*, de *frameshift* e de *splicing*<sup>13-20</sup>.

A nível nacional, no período entre 1981 e 2006 foram rastreados mais de 2.6 milhões de recém-nascidos, dos quais 846 casos foram diagnosticados com HC, correspondendo a uma prevalência de 1:3148 e a uma taxa de cobertura de 99,8% (dados obtidos através do Programa Nacional de Diagnóstico Precoce, PNNDP). De entre a totalidade de casos diagnosticados com HC neste período, 69 apresentavam suspeita clínica de disormonogénese. Com este estudo apresenta-se uma revisão do espectro mutacional do gene *TPO* nestes 69 doentes. Excluindo as variações publicadas anteriormente pelo nosso grupo<sup>21</sup>, foram caracterizados três polimorfismos e duas mutações ainda não descritas na literatura. Os doentes um e três revelaram heterozigotia para as mutações c.[1465G>A]+[2512T>A] e c.[1409A>G (+) 1978C>G] respectivamente. No total foram identificadas 58 variações de sequência no gene *TPO* das quais 29 mutações patogénicas (10 distintas) e 29 polimorfismos. Assim, após o rastreio molecular foi possível estabelecer a etiologia molecular do hipotireoidismo congénito por disormonogénese em doze famílias portuguesas (quinze doentes).

### Doentes e métodos

A caracterização molecular do gene *TPO* foi realizada num grupo de 66 famílias portuguesas, não relacionadas, com hipotireoidismo congénito (HC) permanente, cujos casos índice (n = 69), foram rastreados pelo PNNDP. Não há registo de história familiar prévia de HC, nem de consanguinidade. Neste estudo, serão descritos a metodologia utilizada e os resultados obtidos na caracterização molecular de um subgrupo de

caroze crianças com HC, complementando o estudo já publicado pelo nosso grupo em 2005<sup>21</sup>.

### Doentes

As catorze crianças incluídas neste estudo (Quadro I), seis do sexo feminino e oito do sexo masculino, apresentavam idades compreendidas entre os um e oito anos (média 3,9 anos). Todos os doentes foram seleccionados por apresentarem formas de hipotireoidismo com desenvolvimento e localização da glândula tiroide normal, bócio e valores de tiroxina (T<sub>4</sub>) inferiores a 6,5 µg/dl, de tirotropina (TSH) e de tiroglobulina (Tg) superiores a 20 µU/ml e a 52 ng/ml, respectivamente. Foram também estudados os pais do doente um. Os estudos populacionais foram efectuados em 100 amostras provenientes de indivíduos controlo. Todas as amostras foram colhidas após obtenção de consentimento informado dos doentes ou respectivos responsáveis legais.

**Quadro I** – Dados clínicos e bioquímicos das 14 crianças deste estudo.

Doente	Sexo	Idade (anos)	Localização da tiroide	TSH µU/ml	T <sub>4</sub> µg/dl	Tg ng/ml
1	M	8	Normal	—	—	—
2	M	6	Normal	25.7	2.6	271
3	M	4	Bócio	409	3.4	192
4	M	4	Bócio	234	1.2	1219
5	F	6	Normal	324	<20	3
6	F	5	Normal	31	—	—
7	M	4	Bócio	65.7	5.6	1000
8	F	5	Volume normal	867	9.9	1316
9	M	3	Normal	385	2.1	0.1
10	F	3	Normal	417	49	1690
11	M	1	Normal	43	9	—
12	F	3	Bócio	210	6.8	852
13	F	1	Normal	52.3	87	113
14	M	1	Normal	56.1	56	2640
VALORES DE REFERÊNCIA				< 20	6.5-17	3-52

\*Valores determinados entre o 4º e o 7º dia de vida no âmbito do Programa Nacional de Diagnóstico Precoce;

— Informação não disponível; M – masculino; F – feminino; TSH – hormona estimuladora da tiroide; T<sub>4</sub> – tiroxina; Tg – tiroglobulina.

### Métodos

A investigação molecular do gene da TPO foi efectuada em DNA genómico (gDNA) obtido a partir de sangue periférico pelo método convencional da solução saturada de NaCl<sup>22</sup>, recorrendo às técnicas de *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Analysis (PCR - RFLA)*, *Single-Strand Conformation Analysis (PCR - SSCA)* e sequenciação directa dos produtos de PCR. A estratégia utilizada englobou o estudo das mutações mais frequentes previamente identificadas na população portuguesa<sup>21</sup>, seguindo-se a pesquisa de outras variações na totalidade das regiões codificantes.

Para a caracterização molecular do gene TPO foi utilizada a sequência de referência NM\_000547 e todas as variações identificadas foram descritas de acordo com as normas de

nomenclatura da Human Genome Variation Society (HGVS)<sup>23</sup>. A nomenclatura e os símbolos dos genes referidos neste artigo obedecem às normas descritas pela HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)<sup>24</sup>. Os aminoácidos estão referidos de acordo com o código das 3 letras.

#### a) PCR-RFLA

Nas reacções de amplificação realizadas em termocicladores 9800 Fast (*Applied Biosystems*), foram utilizados 10 l de uma mistura de polimerase, *ImmoMix (Bioline)*, com a seguinte composição: DNA Taq polimerase, dNTPs e MgCl<sub>2</sub>, à qual foram adicionados 5 pmol de cada *primer*, 200 ng de gDNA, e dH<sub>2</sub>O perfazendo um volume final de 20 µl. As condições de amplificação incluem uma desnaturação inicial a 98°C durante 2 minutos e 38 ciclos de 45 segundos a 95°C, 30 segundos a 57°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C, e uma extensão final a 72°C durante 5 minutos. Foram pesquisadas por PCR - RFLA as mutações mais frequentes na população portuguesa: c.391T>C (*ScrFI*); c.1183\_1186dupGGCC (*NaeI*); c.1274A>G (*DdeI*); c.1477G>A (*HaeIII*) e c.2422delT (*FauI*). Os fragmentos amplificados foram digeridos pela respectiva enzima de restrição durante 2 h a 37°C, submetidos a electroforese horizontal em géis *Poly(Nat)* a 12% / 0.75xTAE(v/v) (*ElchromScientific*), durante 2 horas a 10 volt/cm e visualizados após coloração com brometo de etídeo (0,3 µg/ml) / 0.75xTAE (v/v).

#### b) PCR - SSCA

Foram pesquisadas por PCR-SSCA as mutações mais comuns na população portuguesa, para as quais não foi possível encontrar uma enzima de restrição diferencial, nomeadamente c.1978C>G (exão 11), c.2512T>A (exão 14) e c.2748G>A (exão 16). Os fragmentos amplificados foram aplicados em gel de acrilamida não-desnaturante, MDE™ / TBE 1x (v/v) (*BMA Products*), após desnaturação, num sistema de electroforese vertical (*Sigma*). Os fragmentos de cadeia simples foram visualizados por coloração com nitrato de prata<sup>25</sup>.

#### c) Sequenciação

A sequenciação dos diferentes fragmentos correspondentes aos exões do gene TPO foi efectuada utilizando o *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit V1.1 (Applied Biosystems)*. Após purificação dos produtos de PCR assimétrico pelo método *DyeEx96 Kit (Qiagen)*, os fragmentos foram analisados num sequenciador automático *3130xl (Applied Biosystems)*.

#### d) Bioinformática

Foram utilizadas as ferramentas informáticas *FastPCR V3.7.7* (software livremente disponível em <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm>) e *PrimerExpress V2.0 (Applied Biosystems)*, para o desenho de *primers*. O software *SeqScape V2.5 (Applied Biosystems)* foi utilizado para a análise das sequências do gene TPO. O estudo da homologia da sequência proteica da TPO foi efectuado através do programa *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.gov/blast>), e o alinhamento das sequências com o *CLUSTALW* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). A interpretação da patogenicidade das novas variações e da putativa alteração de *splicing* foi efectuada recorrendo ao software *ALAMUT™ V1.51 (rev.33)* (<http://www.interactive-biosoftware.com>).

## Resultados

Este estudo contempla a investigação molecular do gene *TPO*, de catorze crianças portuguesas com HC causado por disormonogénese. De acordo com a publicação de Rodrigues e colaboradores em 2005<sup>21</sup>, e apesar da heterogeneidade molecular em termos do tipo e localização das mutações no gene *TPO*, foram identificadas, nos doentes portugueses, oito mutações que apresentavam uma frequência superior às restantes. Tendo em conta estes resultados foi elaborada uma estratégia de pesquisa destas mutações, de modo a proporcionar um rápido rastreio.

Foram pesquisadas por PCR-*RFLA*, cinco das oito mutações mais frequentes na população portuguesa<sup>21</sup>: c.391T>C, c.1183\_1186dupGGCC, c.1274A>G, c.1477G>A e c.2422delT, não tendo sido detectadas em nenhum dos catorze doentes deste estudo. Através da técnica de PCR-*SSCA* foram pesquisadas as restantes três mutações frequentes. A análise efectuada revelou a presença, em heterozigotia, das mutações c.2512T>A (exão 14) e c.1978C>G (exão 11) nos doentes um e três, respectivamente. A mutação c.2748G>A (exão 16) não foi detectada em nenhum dos doentes estudados. No doente um foi também identificada em heterozigotia a mutação c.1465G>A (p.Ala489Thr) ainda não descrita na literatura, localizada no exão nove do gene *TPO*. Foram também estudados os pais desta criança, tendo sido identificada no pai a mutação c.2512T>A (p.Cys838Ser) em heterozigotia, e na mãe a mutação c.1465G>A (p.Ala489Thr), também em heterozigotia. Uma outra nova mutação causal, foi identificada no doente três, c.1409A>G (p.Tyr470Cys), também localizada no exão nove. Esta mutação foi identificada em heterozigotia e permitiu, tal como no caso anterior, a caracterização molecular deste doente: c.[1409A>G (+) 1978C>G]. O estudo familiar não foi realizado por não ter sido possível obter gDNA dos pais.

Foram realizados estudos populacionais, não tendo sido detectada nenhuma das duas novas mutações identificadas, c.1465G>A (p.Ala489Thr) e c.1409A>G (p.Tyr470Cys), em 100 indivíduos controlo. Para os estudos *in-silico* recorreu-se ao software ALAMUT<sup>TM</sup> que se liga a várias bases de dados e servidores Web externos incluindo o PolyPhen. Estes estudos revelaram que os aminoácidos envolvidos em ambas as alterações, Ala489 e Tyr470, estão muito conservados (até catorze espécies), embora apenas os aminoácidos tirosina e cisteína, envolvidos na alteração p.Tyr470Cys, mostrem grandes diferenças quanto às propriedades físico-químicas. Para ambas as mutações foi obtida uma previsão de “presumivelmente patogénica”. A análise da alteração previamente publicada, c.2748G>A, revelou perda do local dador de *splicing* do exão 16 (-74.5%, de acordo com o programa *GeneSplicer*) o que indica que originará transcritos diferentes do normal.

Foram também detectados 14 polimorfismos, dos quais três (c.1-75A>G, c.95-30G>A e c.2006+20G>A) ainda não descritos na literatura. Estas alterações foram consideradas neutras, uma vez que foram detectadas numa frequência superior a 1% na população controlo.

## Discussão

Este estudo permitiu a caracterização molecular de 2 das 14 crianças (doentes 1 e 3) seleccionadas para este 2º estudo de

rastreio molecular do gene *TPO*. No caso do doente um foi possível confirmar o alelismo das mutações após o estudo dos pais, confirmando-se assim a heterozigotia composta c.[1465G>A]+[2512T>A]. No geral, duas das mutações identificadas não tinham sido anteriormente descritas: a c.1409A>G (p.Tyr470Cys) e a c.1465G>A (p.Ala489Thr), e localizam-se ambas no exão 9 do gene *TPO*. Devido à inexistência de tecido com expressão da *TPO*, o que implicaria uma biopsia de tecido da tiróide, não foi possível a realização de estudos funcionais.

Na tentativa de provar o efeito causal das novas mutações identificadas, para além da pesquisa em 100 indivíduos controlo, foram também realizados estudos *in-silico* que revelaram que ambas as mutações são “presumivelmente patogénicas”. Por outro lado, o facto de as mutações se localizarem na área que codifica parte da região catalítica da enzima e assim possivelmente alterarem a hidrofobicidade do local de ligação ao grupo heme, são, em conjunto, factores que permitem relacionar ambas as mutações com a inexistência de *TPO* funcional e o fenótipo observado nos doentes. Relativamente à mutação c.1978C>G (p.Gln660Glu), um estudo recente revelou que os alelos mutados apresentam uma expressão normal desta proteína, sendo a diminuição da actividade da *TPO* devida ao facto do potencial electrostático da energia de ligação do grupo heme ser 6 vezes mais repulsivo na *TPO* mutada do que na normal<sup>26</sup>. Nesta mesma região têm sido descritas várias outras mutações patogénicas<sup>14,16,27</sup>.

Foi assim encontrada positividade em cerca de 14,3% dos doentes estudados, o que revela que mutações no gene *TPO* constituem uma das principais causas de HC; no estudo anterior efectuado no nosso país<sup>21</sup>, que incluiu três casos familiares, este número ascendeu a 24% (Quadro II). Ainda por identificar podem estar mutações quer na região promotora, quer nas regiões intrónicas, ou grandes deleções/duplicações não identificáveis pelos métodos utilizados. Existem também outras causas genéticas de HC por disormonogénese podendo

**Quadro II** – Mutações causais identificadas em 12 famílias no rastreio de 69 doentes com HC, em Portugal.

Localização exão	Alteração nucleotídica	Alteração ao nível da proteína	*Frequência/alelos mutados
5	c.391T>C	p.Ser131Pro	1/30
8	c.1183_1186dupGGCC	p.Asn397PfsX76	6/30
8	c.1274A>G	p.Asn425Ser	1/30
9	<b>c.1409A&gt;G</b>	<b>p.Tyr470Cys</b>	1/30
9	<b>c.1465G&gt;A</b>	<b>p.Ala489Thr</b>	1/30
9	c.1477G>A	p.Gly493Ser	2/30
11	c.1978C>G	p.Gln660Glu	8/30
14	c.2422delT	p.Cys808AfsX24	3/30
14	c.2512T>A	p.Cys838Ser	5/30
16	c.2748G>A	?	1/30

\* frequência nos 30 alelos mutados identificados (análise conjunta de Rodrigues e colaboradores 2005<sup>21</sup> e este estudo); ? – ver texto (serão necessários estudos de expressão génica e/ou proteica para comprovar a alteração prevista). A bold estão marcadas as novas mutações caracterizadas neste estudo. Foi utilizada a sequência de referência NM\_000547 e todas as variações identificadas foram descritas de acordo com as normas de nomenclatura da Human Genome Variation Society (HGVS).

salientar-se mutações no gene codificador da tiroglobulina, *TG*, ou nos genes *SLCSA5*, *DUOXA2* e *IYD* recentemente identificados<sup>28-30</sup>.

O hipotireoidismo é considerado uma das endocrinopatias mais frequentes na infância. As diversas formas de hipotireoidismo complicam a determinação da sua etiologia. Este estudo demonstra que as mutações no gene *TPO* são uma causa frequente de hipotireoidismo congénito por disormonogénese nas crianças portuguesas. Esta investigação permitiu estabelecer a etiologia molecular do HC em doentes sem alterações no desenvolvimento da glândula da tiróide, apresentando maior relevância em termos de extrapolações epidemiológicas. Assim, nos 69 doentes investigados, verificou-se que a mutação mais frequente é a c.1978C>G (p.Gln660Glu), presente em 8 dos 30 (26,7%) alelos mutados, seguindo-se as mutações c.1183\_1186dupGGCC (p.Asn397PfsX76) e c.2512T>A (p.Cys838Ser), presentes em 6/30 (20,0%) e 5/30 (16,7%) alelos, respectivamente (Quadro II).

A inexistência de uma mutação mais comum na nossa população comprovou que a estratégia de pesquisar as mutações “mais frequentes” é restritiva. Ou seja, se este estudo se tivesse limitado à utilização da técnica de PCR – *RFLA* e PCR – *SSCA*, apenas dois alelos mutados seriam identificados, respectivamente, não sendo possível identificar nenhum caso positivo adicional. Assim, a sequenciação da totalidade da região codificante do gene *TPO* será mais vantajosa, por se tratar de um método menos moroso e mais eficaz. Esta técnica no entanto não é muito económica, pelo que está a ser testada a metodologia de *High-resolution Melting Curve Analysis* (hrMCA) que apresenta uma boa relação qualidade/preço e permite seleccionar os fragmentos a sequenciar uma vez que identifica desvios da sequência normal mesmo que envolvendo uma única base (SNV).

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os de outros grupos sendo que estão descritas cerca de 60 mutações no gene *TPO* e a maioria se localiza nos exões 8, 9, 11 e 14, que codificam os resíduos de histidina constituintes do grupo heme, domínio crucial para a actividade da *TPO*<sup>31</sup>.

Em conclusão, foi possível caracterizar mutações em 18,2% dos 66 casos índice estudados, permitindo estabelecer um diagnóstico diferencial em doze famílias com hipotireoidismo congénito, de forma não invasiva e sem necessidade de suspensão da medicação, evitando ainda a realização do teste do perclorato para confirmação do diagnóstico de HC por disormonogénese. A confirmação molecular do diagnóstico clínico permite oferecer um acompanhamento específico nomeadamente em gravidezes futuras, um aconselhamento genético preciso e uma eventual terapêutica personalizada a estas famílias.

### Agradecimentos

Aos doentes e respectivos familiares pela total disponibilidade. Aos colegas da UMO-P pela colaboração prestada. Ao impulsor deste estudo Dr. Pires Soares, e restantes clínicos responsáveis pelo envio das amostras sem a colaboração dos quais este estudo não se teria realizado.

### Referências

- Gillam MP, Kopp P. Genetic defects in thyroid hormone synthesis. *Curr Opin Pediatr* 2001;13:364-72.
- Klett M. Epidemiology of congenital hypothyroidism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997;105:19-23.
- Park SM, Chatterjee VKK. Genetics of congenital hypothyroidism. *J Med Genet* 2005;42:379-89.
- Castanet M, Polak M, Bonaiti-Pellie C, Lyonnet S, Czernichow P, Leger J. Nineteen years of national screening for congenital hypothyroidism: familial cases with thyroid dysgenesis suggest the involvement of genetic factors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2009-14.
- LaFranchi SH, Hunter MK, Mandel SH, Sesser DE, Miyabira RS, Rien L, et al. Follow-up of newborns with low thyroxine and nonelevated thyroid-stimulating hormone-screening concentrations: results of the 20-year experience in the Northwest Regional Newborn Screening Program. *J Pediatr* 1998;132:70-4.
- Kratzsch J, Pulzer F. Thyroid gland development and defects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008;22(1):57-75.
- Lenz AM, Root AW. Congenital Hypothyroidism: A Forgotten Clinical Diagnosis? *J Pediatr Endocr & Metab* 2008;21:623-4.
- Delange F. Disorders due to iodine deficiency. *Acta Clin Belg*. 1990; 45:394-411.
- Karges B, Kiess W. Congenital hypothyroidism. In: Krassa E, Rivkees S, Kiess W editors. *Diseases of the thyroid in childhood and adolescence*. 1st ed. Basel, Switzerland: S. Karger; 2007;118-27.
- Kimura S, Kotani T, McBride OW, Umeki K, Hirai K, Nakayama T, et al. Human thyroid peroxidase: complete cDNA and protein sequence, chromosome mapping, and identification of two alternatively spliced mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:5555-9.
- Endo Y, Onogi S, Umeki K, Yamamoto I, Kotani T, Ohtaki S, et al. Regional localization of the gene for thyroid peroxidase to human chromosome 2p25 and mouse chromosome 12C. *Genomics* 1995; 25:760-1.
- Guo J, McLachlan SM, Rapoport B. Localization of the thyroid peroxidase autoantibody immunodominant region to a junctional region containing portions of the domains homologous to complement control protein and myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2002;277:40189-95.
- Borgel K, Pohlenz J, Holzgreve W, Bramswig JH. Intrauterine therapy of goitrous hypothyroidism in a boy with a new compound heterozygous mutation (Y453D and C800R) in the thyroid peroxidase gene. A long-term follow-up. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193: 857-8.
- Caputo M, Rivolta CM, Esperante SA, Gruñeiro-Papendieck L, Chiesa A, Pellizas CG, et al. Congenital hypothyroidism with goitre caused by new mutations in the thyroglobulin gene. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007; 67(3):351-7.
- Kotani T, Umeki K, Yamamoto I, Maesaka H, Tachibana K, Ohtaki S. A novel mutation in the human thyroid peroxidase gene resulting in a total iodide organification defect. *J Endocrinol* 1999;160:267-73.
- Pannain S, Weiss RE, Jackson CE, Dian D, Beck JC, Sheffield VC, Cox N, Refetoff S. 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.
- Pfarr N, Musholt TJ, Musholt PB, Brzezinska R, Pohlenz J. Congenital primary hypothyroidism with subsequent adenomatous goiter in a Turkish patient caused by a homozygous 10-bp deletion in the thyroid peroxidase (*TPO*) gene. *Clin Endocrinol* 2006;64:514-8.
- Rivolta CM, Esperante SA, Gruñeiro-Papendieck L, Chiesa A, Moya CM, Domene S, et al. Five novel inactivating mutations in the thyroid peroxidase gene responsible for congenital goiter and iodide organification defect. *Hum Mutat* 2003;22:259.

19. Tajima T, Tsubaki J, Fujieda K. Two novel mutations in the thyroid peroxidase gene with goitrous hypothyroidism. *Endocr J* 2005;52:643-5.
20. Rubio I, Knobel M, Nascimento A, Santos C, Toniolo J, Medeiros-Neto G. Hipotiroidismo congénito: recentes avanços em genética molecular. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002;46:391-401.
21. Rodrigues C, Jorge P, Soares JP, Santos I, Salomao R, Madeira M, Osorio RV, Santos R. Mutation screening of the thyroid peroxidase gene in a cohort of 55 Portuguese patients with congenital hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* 2005;152:193-8.
22. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1989;16:1215.
23. Human Genome Variation Society (HGVS.org). Nomenclature for the description of sequence variations. [updated 2007 Oct; cited 2007 Dec 28]. Acessível em: <http://www.hgvs.org/mutnomen/>.
24. HUGO gene Nomenclature Committee (HGNC). Nomenclature for human gene symbols and names. [updated 2007 Jul 16; cited 2009 Dec 28]. Acessível em: <http://www.genenames.org/>.
25. Budowle B, Baechtel FS. Modifications to improve the effectiveness of restriction fragment length polymorphism typing. *Appl Theor Electrophor* 1990;1:181-7.
26. Deladoëy J, Pfarr N, Vuissoz JM, Parma J, Vassart G, Biesterfeld S, et al. Pseudodominant Inheritance of Goitrous Congenital Hypothyroidism Caused by TPO Mutations: Molecular and in Silico Studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:627-33.
27. Calaciura F, Miscio G, Coco A, Leonardi D, Cisternino C, Regalbutto C, et al. Genetics of specific phenotypes of congenital hypothyroidism: a population-based approach. *Thyroid* 2002;12:945-51.
28. Caputo M, Rivolta CM, Gutnisky VJ, Gruñeiro-Papendieck L, Chiesa A, Medeiros-Neto G, et al. Recurrence of the p.R277X/p.R1511X compound heterozygous mutation in the thyroglobulin gene in unrelated families with congenital goiter and hypothyroidism: haplotype analysis using intragenic thyroglobulin polymorphisms. *J Endocrinol* 2007;195:167-77.
29. Zamproni I, Grasberger H, Cortinovic F, Vigone MC, Chiumello G, Mora S, et al. Biallelic Inactivation of the Dual Oxidase Maturation Factor 2 (DUOXA2) Gene as a Novel Cause of Congenital Hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:605-10.
30. Moreno JC, Klootwijk W, van Toor H, Pinto G, D'Alessandro M, Leger A, et al. Mutations in the iodotyrosine deiodinase gene and hypothyroidism. *New Eng J Med* 2008;358:1811-18.
31. Ris-Stalpers C, Bikker H. Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to TPO mutations. *Mol Cell Endocrinol* 2010;322:38-43.