



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOQUÍMICA

VICTOR HENRIQUE BOTELHO LOURENÇO

Existe uma relação entre as frequências dos polimorfismos do gene *TSHR* e os marcadores de ancestralidade genética em pacientes com Hipotireoidismo Congênito Primário?

BELÉM-PA

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOQUÍMICA

Existe uma relação entre as frequências dos polimorfismos do gene *TSHR* e os marcadores de ancestralidade genética em pacientes com Hipotireoidismo Congênito Primário?

Autor: Victor Henrique Botelho Lourenço

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva

Coorientador: Erik Artur Cortinhas Alves

Documento de Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Bioquímica.

BELÉM-PA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

B748e Botelho Lourenço, Victor Henrique.
Existe uma relação entre as frequências dos
polimorfismos do gene TSHR e os marcadores de
ancestralidade genética em pacientes com Hipotireoidismo
Congênito Primário? / Victor Henrique Botelho Lourenço. —
2024.

V,38 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva
Coorientador(a): Prof. Dr. Erik Artur Cortinhas Alves
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
graduação em Farmacologia e Bioquímica, Belém, 2024.

1. Marcadores informativos de ancestralidade. 2.
Hipotireoidismo Congênito Primário. 3. TSHR. 4.
Polimorfismos. 5. Ancestralidade genética . I. Título.

CDD 599.935

AGRADECIMENTOS

Aos Meus pais, José e Paula Lourenço, pelo apoio e carinho durante a minha jornada acadêmica.

Aos meus familiares, especialmente as minhas tias Rosa e Celeste Lourenço, por todo o apoio.

Ao meu orientador Luiz Santana e coorientador Erik Alves por toda a ajuda para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos da época de colégio, Eduardo Raphael, Fernanda Genú, Flavio Genú, Enzo Salgado, Ademir Barros, Leonardo Lair e Yuji Kubo por todo o companheirismo durante todos esses anos.

Aos meus colegas do LEIM, especialmente a Marcella Montenegro, Beatriz Pinheiro, Rafaela Sousa, Rosany Lisboa e Andreza Moreira, pela amizade.

A Leticia Barbosa e seus familiares pelo carinho e acolhimento que recebi.

RESUMO

A literatura mostra uma correlação entre etnias e as variantes patogênicas do gene do Receptor do Hormônio Estimulante da Tireoide (*TSHR*). Alguns desses polimorfismos podem ser fatores de risco para o desenvolvimento de Hipotireoidismo Congênito Primário (HCP). Neste estudo, foi investigada a relação entre as frequências dos polimorfismos do gene *TSHR* e a influência genética de marcadores informativos de ancestralidade africana, ameríndia e europeia em pacientes diagnosticados com HCP em uma população amazônica no Brasil. A identificação de Marcadores Informativos de Ancestralidade (MIA) foi realizada usando um painel de 48 marcadores, e os resultados foram comparados com populações parentais ameríndias, europeias ocidentais e africanas subsaarianas usando o software Structure v2.3.4. A distribuição dos marcadores de ancestralidade testados entre 106 pacientes indicou uma diferença significativa nas porcentagens de ancestralidade ameríndia (32,2%), europeia (41,8%) e africana (25,9%). Foram identificadas quatro alterações de nucleotídeos entre 49 pacientes. A análise de regressão logística não mostrou associação significativa entre os polimorfismos rs2075179 e rs1991517 e a ancestralidade genética. Este estudo não encontrou evidências de uma relação entre as variantes do gene *TSHR* e os marcadores de ancestralidade genética em pacientes com HCP.

Palavras-chave: Marcadores informativos de ancestralidade; Hipotireoidismo Congênito Primário; gene *TSHR*, Polimorfismos; Ancestralidade genética

ABSTRACT

Literature shows a correlation between ethnicities and pathogenic variants of the receptor TSH hormone gene (*TSHR*). Some of these polymorphisms can be as risk factors for the development of Primary Congenital Hypothyroidism (PCH). In this study, we investigate the relationship between the frequencies of *TSHR* gene polymorphisms with the genetic influence of African, Amerindian, and European ancestry informative markers in patients diagnosed with PCH in an Amazonian population in Brazil. The study was conducted on samples of 106 patients diagnosed with PCH. Genomic DNA was isolated from peripheral blood samples, and 10 exons from the *TSHR* were automatically sequenced. Ancestry-Informative Marker identification was performed using a panel of 48 markers, and the results were compared with parental Amerindian, Western European, and Sub-Saharan African populations using Structure v2.3.4 software. Four nucleotide alterations were identified among 49 patients. The distribution of tested ancestry markers among the 106 patients indicated a significant difference in the percentages of Amerindian (32.2%), European (41.80%), and African (25.9%) ancestry. A logistic regression analysis revealed no significant association between the rs2075179 and rs1991517 polymorphisms and genetic ancestry. This study found no evidence of a relationship between polymorphic *TSHR* gene variants and genetic ancestry markers in patients with PCH.

Keywords: Ancestry informative markers; Primary Congenital Hypothyroidism; *TSHR* gene, Polymorphisms; Genetic ancestry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: **A.** O *boxplot* compara as contribuições dos marcadores Ameríndio (Amr), Africano (Afr) e Europeu (Eur) em pacientes com hipotireoidismo congênito primário (PCH). **B.** Estimativas da miscigenação genética dos pacientes.

Figura 2: Distribuição das três ancestralidades e polimorfismos analisados neste estudo, abrangendo homozigoto do tipo selvagem (0), heterozigoto (1) e homozigoto mutante (2). A. Polimorfismo P52T; B. Polimorfismo N187N; C. Polimorfismo A459A; D. Polimorfismo D527E.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: *Primers* para a amplificação dos éxons do gene *TSHR*.

Tabela 2: Frequências de polimorfismos em pacientes com Hipotireoidismo Congênito Primário.

Tabela 3: Frequências dos marcadores informativos de ancestralidade em pacientes com hipotireoidismo congênito primário.

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

HC: Hipotireoidismo Congênito

HCP: Hipotireoidismo Congênito Primário

INDEL: Polimorfismos de Inserção/Deleção

MIA: Marcadores Informativos de Ancestralidade

TSHR: Receptor do hormônio estimulante da tireoide

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

TSH: Hormônio Estimulante da Tireoide

T4: Tiroxina

IC: Intervalos de confiança

DP: Desvios Padrão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Hipotireoidismo congênito e suas Classificações clínicas	2
1.1.1. Hipotireoidismo Congênito Primário.....	2
1.1.2. Hipotireoidismo Congênito Secundário.....	3
1.1.3. Resistência Periférica	3
1.2. Características clínicas	4
1.3. Epidemiologia	4
1.4. Triage Neonatal e Diagnóstico para hipotireoidismo congênito	5
1.5. Fisiologia e sinalização no Hipotireoidismo congênito	5
1.5.1. Síntese, liberação e sinalização dos hormônios tireoidianos	5
1.5.2. Fisiopatologia do hipotireoidismo congênito primário.....	7
1.6. Genes associados ao Hipotireoidismo Congênito Primário	8
1.6.1. Genes associados a disormogênese tireoidiana.....	8
1.6.2. Genes associados a disgenesia tireoidiana	9
1.7. INDEL e aplicabilidade clínica	11
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. População do Estudo	13
3.2. Critérios de Inclusão e exclusão.....	13
3.3. Amplificação e Genotipagem	13
3.4. Análise de ancestralidade - Marcadores INDEL.....	15
3.5. Análise Estatística	16
3.6. Comitê de Ética	17
4. RESULTADOS	18
5. DISCUSSÃO	14
6. CONCLUSÕES	19
7. REFERÊNCIAS	20

1. INTRODUÇÃO

O Hipotireoidismo Congênito (HC) faz parte da maioria dos programas de triagem neonatal em todo o mundo. O diagnóstico confirmatório desta endocrinopatia aponta na maioria dos casos para o Hipotireoidismo Congênito Primário (HCP) (WASSNER, 2018; LAU; JOSEPH; AW, 2020). Vários estudos epidemiológicos têm sido realizados e os principais achados demonstraram uma relação entre as variações étnicas e a suscetibilidade ao desenvolvimento de HCP e tireopatias (STOPPA-VAUCHER; VAN VLIET; DELADOËY, 2011; GARMENDIA MADARIAGA et al., 2014; OLMOS et al., 2015; TAYLOR et al., 2018). No entanto, uma limitação destes estudos se fundamenta no fato de que não são consideradas as informações das contribuições étnico-raciais baseadas em estudos de ancestralidade genética (por exemplo, polimorfismos de Inserção/Deleção (INDEL)).

Nesse contexto, os polimorfismos INDEL quando utilizados como Marcadores Informativos de Ancestralidade (MIA) são ferramentas valiosas para descrever ou confirmar a formação histórica de uma população (SALOUM DE NEVES MANTA et al., 2013). Utilizados como alternativa à autodeclaração étnico-racial, esses marcadores são mais precisos na avaliação das contribuições de raça e/ou etnia na população, especialmente em populações miscigenadas, como a população brasileira (SANTOS et al., 2010; RAMOS et al., 2016).

Além disso, a incidência de certas variantes polimórficas encontradas no gene do Receptor do Hormônio Estimulante da Tireoide (*TSHR*) associadas à ocorrência de HCP foram observadas em diferentes populações e grupos étnicos (DA et al., 2021). Adicionalmente, estudos identificaram uma relação entre etnias e as variantes patogênicas do gene *TSHR* (NARUMI et al., 2009; CHANG et al., 2012; DA et al., 2021).

Considerando a complexidade da composição genética de populações miscigenadas e a importância das variantes genéticas na predisposição a doenças (DA SILVA et al., 2017; LEAL et al., 2020), este estudo procurou identificar como as variações nas diferentes contribuições étnicas podem influenciar nas frequências dos polimorfismos do gene *TSHR*. Neste estudo, foram avaliadas a contribuição genética de MIAs Africanos, Ameríndios e Europeus (polimorfismos INDEL) e a associação dessas contribuições com diferentes frequências dos polimorfismos do gene *TSHR* em uma população de pacientes diagnosticados com HCP na Amazônia Brasileira.

1.1 Hipotireoidismo congênito e suas Classificações clínicas

O Hipotireoidismo Congênito (HC) é definido pela incapacidade da glândula tireoide do recém-nascido em produzir quantidades adequadas de hormônios tireoidianos, tri-iodotironina (T3) e tiroxina (T4), podendo ser ocasionado por alterações no desenvolvimento da glândula tireoide, na síntese, na secreção e ação dos hormônios, ou pelo mal funcionamento de outras glândulas que compõem o eixo Hipotálamo-Hipófise-Tireoide (RASTOGI; LAFRANCHI, 2010; WASSNER, 2017).

O HC pode ser classificado em transitório ou permanente. O HC transitório é uma deficiência temporária do hormônio tireoidiano, diagnosticado nos primeiros dias de vida, com a retomada da produção normal ocorrendo nos primeiros meses ou anos de vida da criança. Já o HC permanente, acomete a criança ao longo de sua vida, podendo ser classificado em relação a sua origem, como Primário, Secundário e Resistência Periférica (RASTOGI; LAFRANCHI, 2010; WASSNER, 2018).

1.1.1. Hipotireoidismo Congênito Primário

O HCP é caracterizado por alterações na glândula tireoide, podendo ser ocasionado por defeitos no desenvolvimento da glândula, deficiências na produção de hormônios tireoidianos, e, defeitos na sinalização e/ou transdução da sinalização do Hormônio Estimulante da Tireoide (TSH) (Wassner, 2017, 2018).

Estima-se que o HCP é responsável pela maioria dos casos de HC, podendo ser classificado quanto ao tipo de alteração da glândula em: disgenesia tireoidiana, ectopia e disormonogênese (MACIEL et al., 2013; WASSNER, 2017, 2018).

As principais causas de HCP são originadas da disgenesia tireoidiana com ectopia, correspondendo a cerca de 85% dos casos, e, os outros 15% ocorrem por disormoniogênese tireoidiana, devido a mutações que causam falhas na síntese hormonal (LAFRANCHI, 1999; BROWN; DEMMER, 2002; RASTOGI; LAFRANCHI, 2010).

1.1.2. Hipotireoidismo Congênito Secundário

O Hipotireoidismo Congênito Secundário (ou central), é associado aos defeitos na formação ou ligação do Hormônio Liberador de Tireotropina (TRH) e na produção de TSH. Dentre as causas podem se destacar: **a)** a deficiência isolada de TSH (mutação do gene da subunidade b do hormônio TSH; **b)** a deficiência do hormônio TRH; **c)** a Síndrome isolada de Interrupção do Pedúnculo Hipofisário (SIPH); e, **d)** lesão hipotalâmica. Em alguns casos, pode ocorrer a resistência ao TRH, devido a mutações no gene do receptor de TRH (LAFRANCHI, 1999; RASTOGI; LAFRANCHI, 2010; MACIEL et al., 2013; WASSNER, 2017, 2018).

Além disso, algumas mutações nos fatores de transcrição (genes HESX1, LHX3, LHX4, PIT1, PROP1) estão envolvidas no desenvolvimento ou função da hipófise (RASTOGI; LAFRANCHI, 2010).

1.1.3. Resistência Periférica

O hipotireoidismo causado por Resistência Periférica resulta de: defeitos no transporte dos hormônios tireoidianos; no metabolismo; ou, na resistência à ação dos hormônios tireoidianos.

A resistência aos hormônios tireoidianos está relacionada a mutações no receptor β da tireoide (RASTOGI; LAFRANCHI, 2010). Além disso, pode estar associada a algumas síndromes como Allan-Herndon-Dudley syndrome (RASTOGI; LAFRANCHI, 2010).

1.2. Características clínicas

As principais características clínicas da doença são: bócio, má alimentação, constipação, hipotermia, bradicardia, edema, fontanela grande, macroglossia, icterícia prolongada, hérnia umbilical, hipotonia muscular, dificuldades respiratórias, cianose, anemia, sonolência excessiva, livedo reticularis, choro rouco, mixedema, sopro cardíaco, atraso na dentição, retardo na maturação óssea e pele seca e sem elasticidade (MACIEL et al., 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; WASSNER, 2017).

Caso não seja diagnosticado e posteriormente tratado, o recém-nascido pode desenvolver alterações no seu crescimento e desenvolvimento neuropsicomotor. Por este motivo, o HC é considerado uma emergência pediátrica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

1.3. Epidemiologia

Os primeiros estudos epidemiológicos sobre a doença registraram que a doença afeta 1:3000 a 1:4000 recém-nascidos vivos (FISHER et al., 1979). Entretanto, o número de casos pode variar dependendo da população e valores de referência utilizados na triagem neonatal, ocorrendo uma variação na frequência da doença, podendo afetar 1:2000 a 1:3000 recém-nascidos vivos (FORD; LAFRANCHI, 2014; WASSNER; BROWN, 2015).

A epidemiologia da doença no Brasil é limitada e poucos estudos representam um panorama atual da doença. Os estudos realizados apontam para uma incidência

entre 1:1,867 e 1:2.595 nascidos vivos, cuja divergência dos dados pode estar associada com as características regionais da população e metodologias de triagem (MAGALHÃES et al., 2009; MACIEL et al., 2013; COSTA et al., 2024).

1.4. Triagem Neonatal e Diagnóstico para hipotireoidismo congênito

A Triagem Neonatal (TN) é um dos principais programas de triagem populacional existentes no mundo. A TN tem como função principal o rastreio de doenças, e após isso, a investigação para o diagnóstico precoce de doenças genéticas e infecciosas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

A triagem para HC originou-se em 1974 com o primeiro programa para TN de HC no estado de Quebec, Canadá. Inicialmente, eram utilizados os valores séricos de T4 para a triagem desses pacientes através da coleta de sangue venoso. Somente em 1990, com o advento do uso de papel-filtro para a coleta e a utilização dos valores do hormônio TSH que a triagem para HC se popularizou no mundo (DUSSAULT et al., 1975; FORD; LAFRANCHI, 2014).

No Brasil, a TN começou em 1976, pela Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de São Paulo (APAE-SP), mas para o HC, iniciou-se em 1986, em programas regionais (MARINI DE CARVALHO et al., 2007). A TN se popularizou no Brasil com o surgimento dos programas de Diagnóstico Precoce do Hipotireoidismo Congênito e Fenilcetonúria em 1992 e, posteriormente, o Programa Nacional de Triagem Neonatal em 2002 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1992, 2001).

1.5. Fisiologia e sinalização no Hipotireoidismo congênito

1.5.1. Síntese, liberação e sinalização dos hormônios tireoidianos

A tireoide é uma glândula endócrina que está localizada na parte anterior do pescoço, abaixo da laringe e envolto na traqueia. Ela é formada por dois grandes lobos laterais, conectados por um istmo estreito e composta por milhares de folículos

tireoidianos. Estes folículos são constituídos por um epitélio simples (células foliculares) formando um lúmen contendo uma substância gelatinosa denominada colóide (NILSSON; FAGMAN, 2017a).

O coloide é a região onde ocorre a produção e o armazenamento dos hormônios tri-iodotironina (T3) e a tiroxina (T4) na glândula tireoide. É caracterizado pela sua composição rica em proteínas, especialmente a Tireoglobulina (TG), proteína precursora dos hormônios tireoidianos e iodeto (NILSSON; FAGMAN, 2017a).

O iodeto é captado da corrente sanguínea e transportado ativamente para as células foliculares através dos canais Transportadores de Sódio-Iodeto (NIS), localizados na membrana das células foliculares e posteriormente liberado para o coloide através dos canais de transmembranas denominados Pendrina. No coloide, o iodeto sofre a ação da Enzima Tireoperoxidase (TPO), em um processo denominado organificação do iodo (CARVALHO; DUPUY, 2017; NILSSON; FAGMAN, 2017b).

A TG é uma proteína formada por resíduos de tirosina, sendo produzida no citoplasma das células foliculares e posteriormente depositada no coloide. Os resíduos da tirosina que compõem a TG são iodados pela ação da enzima TPO formando moniodotirosinas e diiodotirosina. A combinação de uma moniodotirosina com uma diiodotirosina forma o T3, enquanto a combinação de duas diiodotirosinas, formam o T4. Neste estágio, os hormônios tireoidianos são armazenados até a sinalização do hormônio TSH (CARVALHO; DUPUY, 2017).

O TSH é o principal hormônio pela regulação e produção dos hormônios tireoidianos. O hormônio TSH ao se ligar ao seu receptor presente na superfície das células foliculares, desencadeia uma cascata de reações através da ativação do

adenilato ciclase, formando o Monofosfato Cíclico de Adenosina (AMPc) nas células foliculares (CARVALHO; DUPUY, 2017).

O AMPc é responsável por uma cadeia de fosforilação de proteínas presentes nas células foliculares, possibilitando a fagocitose da TG iodada pela célula folicular. O fagossomo por sua vez degrada a TG iodada, formando os hormônios T3 e T4, os quais são liberados na corrente sanguínea por difusão simples, através das membranas das células foliculares. Nos tecidos periféricos o T4 é convertido em T3 na grande parte dos tecidos (PARMENTIER et al., 1989; CARVALHO; DUPUY, 2017).

Os hormônios T3 e T4 exercem seus principais efeitos nos receptores nucleares. O hormônio T4 é o principal produto da glândula tireoide. O T3 é o mais ativo no organismo, agindo nos receptores dos núcleos celulares dos tecidos periféricos e regulando a transcrição gênica, tendo um grande impacto no metabolismo de um modo geral (CARVALHO; DUPUY, 2017).

1.5.2. Fisiopatologia do hipotireoidismo congênito primário

A secreção dos hormônios tireoidianos é controlada, principalmente, pelo nível plasmático de TSH, o qual é produzido e secretado pela hipófise anterior sendo regulada pela relação entre o hipotálamo e a hipófise anterior através de um mecanismo de retroalimentação. Os hormônios tireoidianos T3 e T4 possuem a função inibitória quando se ligam aos receptores no hipotálamo que é o responsável por produzir o Hormônio Liberador de Tireotrofina (TRH), que tem por função estimular as células tireotróficas pituitárias da hipófise anterior a secretar o TSH (CARVALHO; DUPUY, 2017; NILSSON; FAGMAN, 2017b).

Em condições normais, quando há o aumento no nível de TSH no organismo, há o aumento na produção e liberação dos hormônios tireoidianos, que por sua vez

inibem o hipotálamo de secretar o TRH. Sem o estímulo do hormônio TRH, a hipófise anterior reduz a secreção de TSH no organismo. Os níveis plasmáticos de TSH só retornam quando há a diminuição dos níveis dos hormônios tireoidianos, os quais possuem a função inibitória no hipotálamo. Assim, esse balanço hormonal se regula nesse mecanismo de retroalimentação (ORTIGA-CARVALHO et al., 2016).

Como definido anteriormente, o HCP é a classificação mais recorrente dentre os diagnósticos de HC permanente e é caracterizado por falhas na glândula tireoide, seja no seu desenvolvimento ou na sua anatomia. Dessa forma, alterações na glândula variam a dinâmica das secreções hormonais do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. Nesse sentido, as principais características bioquímicas que caracterizam o HCP são o aumento dos níveis plasmáticos de TSH e a redução dos níveis dos hormônios tireodianos (T3 e T4 livre) (DUPREZ et al., 1998; ORTIGA-CARVALHO et al., 2016).

1.6. Genes associados ao Hipotireoidismo Congênito Primário

1.6.1. Genes associados a disormogênese tireoidiana

A disormonogênese tireoidiana corresponde de 15% a 20% dos casos de HCP e representa a menor taxa dentre as causas de HC, sendo atribuída a defeitos inatos na síntese dos hormônios tireoidianos. Esse quadro clínico está associado aos genes responsáveis pela síntese dos hormônios tireoidianos (ABDULJABBAR; AFIFI, 2012).

Dentre as alterações genéticas nos genes relacionados a síntese dos hormônios tireoidianos, destaca-se o *TG*, responsável pela síntese da proteína tireoglobulina (MEDEIROS-NETO, 1993; VAN DE GRAAF et al., 2001; HISHINUMA et al., 2006). Referente a captação de sódio e iodeto, destaca-se o gene *SLC5A5*, que sintetiza os canais NIS (FUJIWARA et al., 1997; GEYSELS, 2022), e que capta o

iodeto da circulação para as células foliculares. O gene *SLC26A4* codifica a proteína pendrina, que é a responsável pela liberação do iodeto das células foliculares para o coloide (BANGHOVA et al., 2008; KÜHNEN et al., 2014).

Outras alterações que ocorrem estão relacionadas as mutações nas enzimas responsáveis pela oxidação do iodeto, referentes aos genes *DUOX2* e *DUOX2A*, os quais sintetizam glicoproteínas membros da família NADPH oxidase, associadas a biossíntese dos hormônios tireoidianos (PETERS et al., 2019). O gene *TPO*, responsável pela síntese da tireoperoxidase, participa da organificação do iodeto no coloide, para que ocorra a adesão do iodo nos resíduos de tirosina (ABRAMOWICZ et al., 1992; ZHANG et al., 2020).

1.6.2. Genes associados a disgenesia tireoidiana

A disgenesia tireoidiana (DT) corresponde a aproximadamente 85% dos casos de HC, relacionado com as alterações estruturais da tireoide. Dentre os genes associados às alterações da tireoide, estão os fatores de transcrição *PAX8*, *FOXE1* e *TTF1*, além do gene *TSHR*, sendo todos eles responsáveis pela embriogênese da glândula (ABDULJABBAR; AFIFI, 2012).

Os fatores de transcrição *TTF1* e *PAX8* desempenham a função na regulação de genes associados ao desenvolvimento da tireoide (MONTANELLI; TONACCHERA, 2010). O fator de transcrição *TTF1* é responsável pela regulação da expressão dos genes *TG*, *TPO* e *TSHR* (BINGLE, 1997; GUAN et al., 2021). Além disso, os genes *PAX8* e *FOXE1* são fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento glandular e na regulação da expressão dos genes da *TG* e da *TPO* (MONTANELLI; TONACCHERA, 2010; BATJARGAL et al., 2022).

O gene *FOXE1/TTF2* tem por função promover a diferenciação celular e a migração para a posição sublingual no pescoço de células precursoras das células foliculares, as quais são responsáveis pela composição do folículo tireidiano (CASTANET; POLAK, 2010). A literatura mostra que mutações na região de ligação (*forkhead*), ou, na região poli-alaninas desse fator, estão associadas a disgenesia e ectopia (CHADWICK; OBERMAYR; FRISCHAUF, 1997; CASTANET; POLAK, 2010; PIMENTEL et al., 2017).

A resistência ao hormônio TSH pela glândula tireoide é definida pela resposta reduzida/ausente do receptor TSHR ou a nível pós-receptor. As mutações que conferem resistência ao fenótipo são caracterizadas por altas concentrações de TSH circulantes e níveis normais ou baixos de hormônios tireoidianos (NOGUEIRA et al., 1999).

Em humanos, o gene *TSHR* está localizado na região cromossômica 14q24 (GeneID: 7253), sendo constituído por 10 éxons. Os éxons de 1 a 9 e parte do 10, são responsáveis por codificar o domínio extracelular do receptor. A outra parte do éxon 10 é responsável por codificar os domínios transmembrana e intracelular (NAGAYAMA et al., 1989). Nesse sentido, alterações no gene *TSHR* podem acarretar perda ou ganho de função do receptor de TSH (TSHr) (DUPREZ et al., 1998).

O TSHr é uma proteína de função receptora e está envolvida na ativação da adenilato ciclase, enzima responsável pela formação do AMPc, através da conversão do ATP em AMPc, sendo importante pela participação de inúmeros processos intracelulares (KOHN et al., 1995; ROBICHAUX; CHENG, 2018).

As alterações no gene *TSHR*, estão associadas ao ganho ou perda de função do receptor. Nesse contexto, estudos realizados no Estado do Pará, mostraram uma

alta frequência de polimorfismos associados ao HCP, dentre eles, o polimorfismo rs1991517 (D727E) (ALVES et al., 2010; CORTINHAS ALVES et al., 2016).

Este polimorfismo está associado com a resistência ao hormônio TSH, alterando a afinidade de ligação ao AMPc, modificando a transdução de sinal mediada por este segundo mensageiro (KOLLATI et al., 2020).

1.7. INDEL e aplicabilidade clínica

Os Marcadores INDEL são polimorfismos genéticos que diferem em frequências alélicas entre as populações ancestrais, podendo ser utilizados como marcadores informativos de Ancestralidade (MIAs) (WEBER et al., 2002). Esses MIAs possibilitam estimar o risco e a prevalência para o desenvolvimento de determinadas doenças associadas à grupos ancestrais (SANTOS et al., 2010; FONDEVILA et al., 2012).

É certo que a população brasileira possui como característica uma alta miscigenação. Assim, a utilização de marcadores INDEL possibilita uma maior segurança na análise do histórico de ancestralidade em relação a autodeclarada (SALOUM DE NEVES MANTA et al., 2013; RAMOS et al., 2016).

No início da colonização brasileira, ocorreu a miscigenação entre nativos americanos (ameríndios/indígenas), africanos e europeus, tornando o Brasil uma das populações mais heterogêneas do mundo. Entretanto, as proporções de imigrações desses grupos étnicos variam de acordo com cada região geográfica (SANTOS et al., 2010; PENA; SANTOS; TARAZONA-SANTOS, 2020).

2. OBJETIVOS

- Descrever as frequências das variantes do gene *TSHR* em uma população de pacientes com hipotireoidismo congênito primário.
- Avaliar as contribuições genéticas dos marcadores informativos de ancestralidade dos grupos Africanos, Ameríndios e Europeus em uma população de pacientes com hipotireoidismo congênito primário.
- Avaliar a relação dos marcadores informativos de ancestralidade com as frequências de polimorfismos do gene *TSHR* em uma população de pacientes com hipotireoidismo congênito primário.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. População do Estudo

Este estudo foi conduzido com pacientes diagnosticados com Hipotireoidismo Congênito Primário e tratados na Unidade de Referência Especializada Materno Infantil (UREMIA/PA) na cidade de Belém, no Estado do Pará, Brasil.

3.2. Critérios de Inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão do estudo foram o diagnóstico confirmatório de HCP por sintomas clínicos (presentes na primeira consulta), e, os dados bioquímicos referentes aos níveis plasmáticos do Hormônio Estimulante da Tireoide (TSH) e Tiroxina (T4). Foi utilizado como valor de referência para o TSH o limite superior de 20 mUI/L (VAN TROTSBURG et al., 2021). Foram excluídos pacientes sem diagnósticos confirmatório bioquímico, clínico, e, patologias associadas a tireopatias.

3.3. Amplificação e Genotipagem

O DNA genômico foi isolado a partir das amostras de sangue periférico dos pacientes, com a utilização do mini kit Invisorb® Spin Blood (Invitrogen do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Os éxons do gene *TSHR* foram amplificados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com a utilização do termociclador MJ96+/MJ96G (Applied Biosystems do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e sequenciados com os *primers* detalhados na Tabela 1 (DE ROUX et al., 1996).

Tabela 1 - Primers para a amplificação dos éxons do gene *TSHR*

Éxon	Primers	Tamanho do Amplicon(bp)	Amplicon Tm (°C)
1	1F GAGGATGGAGAAATAGCCCCGAG	302	54
	1R CACTACTTCGGGCTGTTATTGAG		
2	2F TAAGGTGAATTATTAGAAAAGC	205	48
	2R CTTGATAGAACACGTTTAGAGAA		
3	3F GCAGAATCCATGAGGGTGT	304	54
	3R AGAAACCAGGCCTCCCATTG		
4	4F ACCCTGTGGCGTAAATGCATAT	329	52
	4RCCCGACCCAGGCTATACACCATT		
5	5F GCTTTACTTATCTTCAACCTACC	291	52
	5R AGTTTGACTACAGGTTGTCTTC		
6	6F TATTGTGTCCTGTTATTTAAGTGCATA	293	54
	6R GTACTCTATAGAGTATATATGATAAGG		
7	7F TGGGATACATATGTGGGACCTG	324	54
	7R TGTTGGGTCACACTAACTCTGG		
8	8F TGGTCACATTTTATTCTGATATTTGT	272	54
	8R CTCCCCTTAATGTCTCCATTTATTCC		
9	9F TCATCTCCCAATTAACCTCAGG	408	54
	9R GCTTCCAATTTCTCTCCAC		
10	FA ACTGTCTTTGCAAGCGAGTT	875	54
	RB GTGTCATGGGATTGGAATGC		
	FC TGGCACTGACTCTTTTCTGT	868	56
	RD GTCCATGGGCAGGCAGATAC		

A amplificação por PCR foi realizada com 20 ng de DNA genômico em um volume final de 10 µL. A reação compreendeu 1 × PCR buffer (Invitrogen® do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 2 pmol de cada primer e 0,5 U de Taq polimerase (Invitrogen®).

Foram realizados 30 ciclos de PCR após uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 1 minuto. Cada ciclo consistiu em 1 minuto a 94°C (desnaturação), 1 minuto para o anelamento dos primers (53°C–61°C) e uma etapa de extensão de 1 minuto a 72°C. Uma extensão final foi completada a 72°C por 10 minutos. Todos os produtos derivados de PCR foram visualizados em géis de agarose a 1,8%.

Os genótipos populacionais foram determinados por sequenciamento utilizando o Kit de Sequenciamento de Ciclo BigDye Terminator v 3.1. Os produtos foram analisados em um sequenciador ABI 3130 da Applied Biosystems.

3.4. Análise de ancestralidade - Marcadores INDEL

Foram utilizados 48 marcadores INDEL para a análise de ancestralidade. Os marcadores selecionados foram previamente validados (SANTOS et al., 2010; FRANCEZ; RIBEIRO-RODRIGUES; DOS SANTOS, 2012a).

Após a amplificação do gene, as amostras foram genotipadas utilizando um Analisador Genético ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) e os resultados foram analisados pelo software GeneMapper v3.2 (Applied Biosystems). O marcador ABIGS LIZ-500 (Applied Biosystems) foi usado como referência para a identificação de INDELS. Os padrões de tamanhos conhecidos foram incluídos em cada ensaio para controle de qualidade.

Como o modelo de miscigenação assume que cada indivíduo herda parte de seus marcadores de ancestralidade de populações ancestrais, os resultados foram plotados contra as três populações parentais que constituem a população brasileira para estratificação de ancestralidade. O tamanho da amostra da população parental em nosso banco de dados foi descrito anteriormente (FRANCEZ; RIBEIRO-RODRIGUES; DOS SANTOS, 2012a).

3.5. Análise Estatística

As frequências de polimorfismos foram calculadas dividindo o número de alelos de portadores do polimorfismo pelo número total de alelos examinados. As frequências alélicas foram expressas em porcentagens e as variáveis contínuas são apresentadas como médias \pm desvios padrão (DP).

As estimativas de miscigenação genética foram obtidas usando o software Structure v2.3.4, com um período de *burn-in* de 50.000 e 100.000 repetições de MCMC após o *burn-in*, utilizando um modelo independente de frequência de alelos. A normalização e a análise dos dados foram realizadas com um teste MANOVA utilizando o SPSS versão 22 (IBM SPSS Statistics para Windows, Armonk, NY: IBM Corp; 2013).

As análises estatísticas foram realizadas no RStudio versão 4.0.3 (RStudio, Inc., Boston, MA, EUA). Os índices de ancestralidade foram comparados entre grupos utilizando ANOVA. Regressões logísticas múltiplas foram utilizadas para avaliar potenciais associações entre as frequências dos polimorfismos do gene *TSHR* e os marcadores de ancestralidade genética, estimando razões de chances (ORs) e seus intervalos de confiança de 95% (ICs). Todos os valores de p reportados são bicaudais, com valores de $p < 0,05$ considerados estatisticamente significativos.

3.6. Comitê de Ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará - UFPA (CAAE: 66812122.1.0000.0018). Os responsáveis legais dos pacientes foram consultados antes da coleta de sangue e da entrevista. Os pacientes que concordaram em participar assinaram um termo de consentimento padrão. A participação no estudo foi voluntária, com os pacientes podendo se retirar do estudo sem consequências.

4. RESULTADOS

O sequenciamento dos éxons do gene *TSHR* revelou quatro alterações nucleotídicas: rs2234919 (c.154C> A; p.Pro52Thr), rs2075179 (c.561T> C; p.Asn187=), rs113951800 (c.1377G> A; p.Ala459=) e rs1991517 (c.2181C> G; p.Asp727Glu). 49 pacientes apresentaram um ou mais polimorfismos na região codificadora do gene *TSHR*.

Cinco pacientes apresentaram duas alterações nucleotídicas: três com polimorfismos rs2075179 (p.Asn187=) e rs1991517 (p.Asp727Glu); um com polimorfismos rs113951800 (p.Ala459=) e rs1991517 (p.Asp727Glu); e, um com polimorfismos rs2075179 (c.154C> A; p.Pro52Thr) e rs2075179 (c.561T> C; p.Asn187=). As frequências alélicas estão detalhadas na Tabela 2.

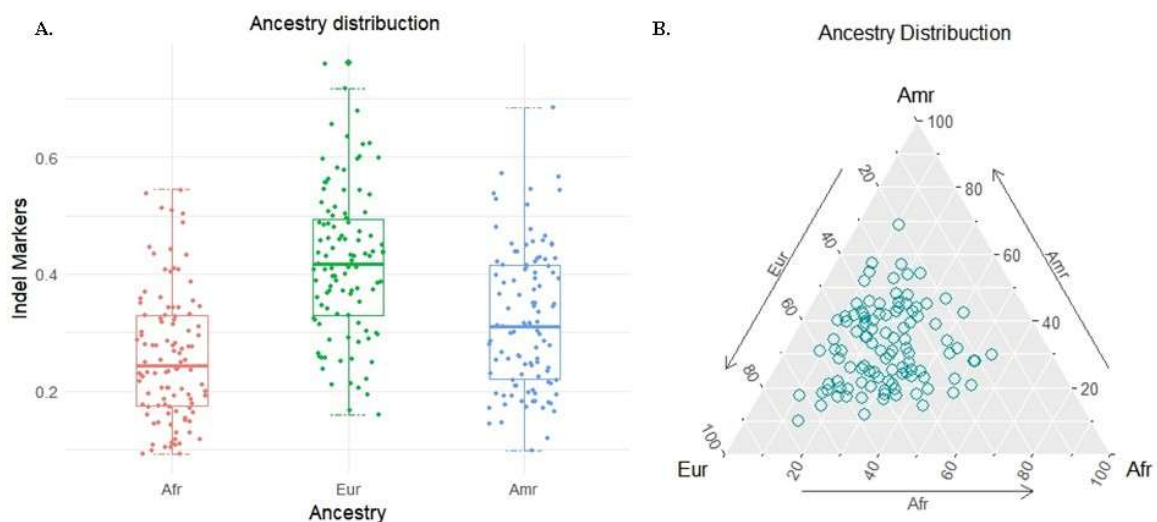
Tabela 2. Frequências de polimorfismos em pacientes com Hipotireoidismo Congênito Primário.

rsID	Alteração da proteína	Frequência Genotípica	Frequência Alélica
rs2234919	p.Pro52Thr	4/106 (3,77%)	1,89%
rs2075179	p.Asn187=	28/106 (CT: 23,58%) (CC: 2,83%)	14,62%
rs113951800	p.Ala459=	4/106 (3,77%)	1,89%
rs1991517	p.Asp727Glu	18/106 (17%)	8,5%

A distribuição dos marcadores de ancestralidade dos 106 pacientes testados indicou uma diferença significativa entre as ancestralidades Ameríndia, Europeia e Africana ($F=48,725$; $p<0,0001$), conforme mostrado na Figura 1.A.

A Figura 1.B ilustra o perfil de ancestralidade de cada paciente. Quanto mais próximo um dos círculos estiver dos vértices do triângulo, maior é a ancestralidade para aquele paciente. Esta análise permite uma representação visual das diferentes ancestralidades para o grupo de pacientes com HCP analisados.

Figura 1. A. O boxplot compara as contribuições dos marcadores Ameríndio (Amr), Africano (Afr) e Europeu (Eur) em pacientes com hipotireoidismo congênito primário (PCH). **B.** Estimativas da miscigenação genética dos pacientes.



Os pacientes sem polimorfismos foram testados ($n=57$) e os marcadores de ancestralidade nesse grupo apresentaram diferenças significativas entre as ancestralidades Ameríndia, Europeia e Africana ($F=22,599$; $p<0,0001$). As ancestralidades dos pacientes que apresentaram quaisquer tipos de polimorfismo foram significativamente diferentes entre as ancestralidades Europeia e Africana ($F=28,881$; $p<0,0001$) e entre Europeia e Ameríndia ($F=28,881$; $p<0,0001$), enquanto nenhuma diferença foi observada entre as ancestralidades Africana e Ameríndia ($F=28,881$; $p=0,341$). A ancestralidade Europeia foi maior em todos os subgrupos de polimorfismos (Tabela 3).

Tabela 3. Frequências dos marcadores informativos de ancestralidade em pacientes com hipotireoidismo congênito primário.

Pacientes	Ancestralidade Genética (mMédias±DP)			ANOVA	Post-hoc	
	Ameríndios	Europeus	Africanos			N
Todos os pacientes	32.20±11.90	41.80±12.50	25.90±11.00	106	F=48.725; p<0.0001	Africanos x Europeus – p<0.001 Africanos x Ameríndios – p<0.001 Europeus x Ameríndios – p<0.001
Pacientes sem polimorfismos	34.10±12.30	40.20±12.20	25.70±9.90	57	F=22.599; p<0.0001	Africanos x Europeus – p<0.001 Africanos x Ameríndios – p<0.001 Europeus x Ameríndios – p=0.016
Pacientes com quaisquer polimorfismos	30.10±11.10	43.70±12.60	26.20±12.20	49	F=28.881; p<0.0001;	Africanos x Europeus – p<0.001 Africanos x Ameríndios – p=0.341 Europeus x Ameríndios – p<0.001

						Africanos x Europeus – p=0.003
p.Pro52Thr	34.70±13.60	49.20±9.40*	16.00±4.90	4	F=11.210; p=0.004	Africanos x Ameríndios – p=0,078 Europeus x Ameríndios – p=0.208
p.Asn187=	27.10±10.00	42.70±14.30*	30.01±12.9	28	F= 12.274; p<0.0001	Africanos x Europeus – p<0.001 Europeus x Ameríndios – p<0.001
p.Ala459=	37.60±6.50	43.20±0.40*	19.20±6.20	4	F=23.276; p<0.0001;	Africanos x Europeus – p<0.001 Europeus x Ameríndios – p=0.498
p.Asp727Glu	30.10±12.60	45.60±11.30*	24.30±9.80	18	F=17,045; p<0.0001	Africanos x Europeus – p<0.001 Europeus x Ameríndios – p=0.387 Europeus x Ameríndios – p<0.001

Não foram observadas diferenças significativas na análise de regressão logística referente à relação entre os polimorfismos rs2075179 (p.Asn187=) ($p=0,073$) e rs1991517 (p.Asp727Glu) ($p=0,2$) e a ancestralidade genética (Figura 2). Os polimorfismos rs2234919 (p.Pro52Thr) e rs113951800 (p.Ala459=) não foram testados, devido ao baixo número de pacientes que apresentaram essas alterações nucleotídicas.

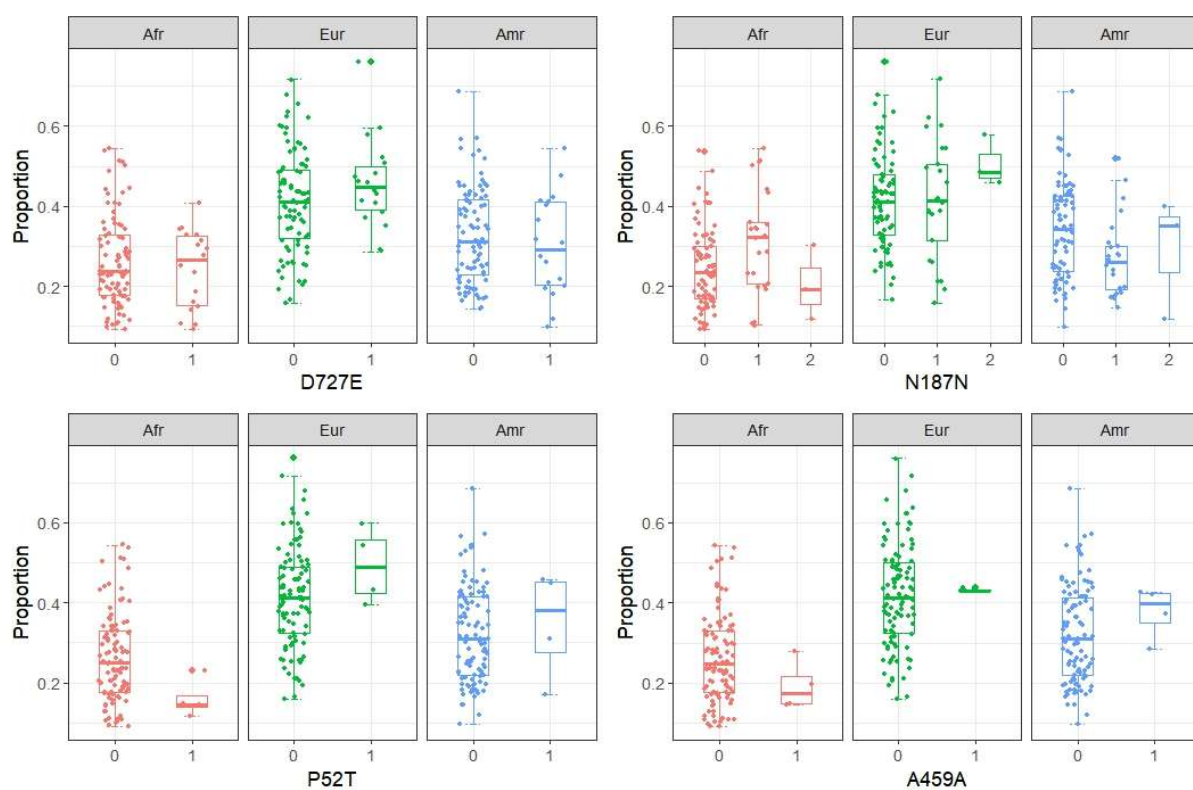


Figura 2. Distribuição das três ancestralidades e polimorfismos analisados neste estudo, abrangendo homozigoto do tipo selvagem (0), heterozigoto (1) e homozigoto mutante (2). A. Polimorfismo rs2234919 (P52T); B. Polimorfismo rs2075179 (N187N); C. Polimorfismo rs113951800 (A459A); D. Polimorfismo rs1991517 (D527E)

5. DISCUSSÃO

De acordo com a literatura vigente, este é o primeiro estudo que analisa a relação entre marcadores de ancestralidade e as frequências dos polimorfismos do gene *TSHR* em pacientes com HCP. Além disso, este é o primeiro estudo a caracterizar a ancestralidade de pacientes com HCP em uma população amazônica.

A caracterização da diversidade genética e distribuição de polimorfismos em diferentes populações amazônicas pode ajudar a identificar marcadores de risco específicos para HCP. Isso é especialmente relevante nesta região, onde os recursos para diagnóstico e tratamento podem ser limitados. Estudos focados em populações miscigenadas são escassos e investigar os polimorfismos associados a doenças nessas populações ainda representa uma lacuna significativa na pesquisa científica.

Todas as quatro alterações nucleotídicas no gene *TSHR* encontradas neste estudo já foram descritas anteriormente na região (ALVES et al., 2010; CORTINHAS ALVES et al., 2016). Em nossos achados, a análise de regressão logística não identificou associações significativas entre a presença dos polimorfismos detectados e qualquer tipo de ancestralidade. Isso pode ser explicado pelo padrão de ancestralidade genética heterogênea da amostra analisada ou pelo tamanho amostral limitado.

Os polimorfismos rs2075179 (p.N187N) e rs113951800 (p.A459A), são variantes que não alteram os seus respectivos aminoácidos que compõem o receptor de TSH. Esses polimorfismos foram encontrados em pacientes com HCP, mas não apresentaram uma relação com a doença ou outras tireopatias (GABRIEL et al., 1999; CORTINHAS ALVES et al., 2016).

O polimorfismo rs2234919 (p.P52T) está localizado no domínio extracelular do receptor TSHR, ocasionando uma troca de uma Prolina por Tionina da proteína na posição 52, podendo alterar a conformação tridimensional do receptor (MATAKIDOU, 2003). Entretanto, este polimorfismo já foi descrito em pacientes de tireopatias de diversas populações. Apesar de ocasionar uma alteração em um aminoácido, não apresenta um impacto significativo para associação com a causa de doenças relacionadas a tireoide (BAYRAM et al., 2013a; MATAKIDOU, 2003; WANG et al., 2017).

O polimorfismo rs1991517 (p.D727E) ocasiona uma substituição do aspartato por ácido glutâmico na alça intracelular do receptor de TSH. Essa alteração talvez esteja ligada a um possível impacto na ativação do 2º mensageiro, alterando os níveis de AMPc do fólculo tireoidiano (GABRIEL et al., 1999; KOLLATI et al., 2020). Apesar da alteração, ainda não é bem estabelecida na literatura se essa mudança ocasiona impactos clínicos significativos. Este polimorfismo foi associado em pacientes com HCP no Estado do Pará (ALVES et al., 2010; CORTINHAS ALVES et al., 2016), e com pacientes de bócio multinodular tóxico no estado de Minnesota, Estados Unidos da América (GABRIEL et al., 1999). Entretanto, em outras populações com tireopatias, essa relação não é tão clara (SU et al., 2019)

Nesse sentido, a diversidade dos resultados dos polimorfismos descritos na ocorrência de HC e outras tireopatias pode estar associada a diversidade gênica entre populações, fatores ambientais e interações entre genes e gene-ambiente (BAYRAM et al., 2013a). Mutações em heterozigose podem apresentar perdas funcionais leves, enquanto que a associação de homozigose de mutações podem ocasionar resistência ao TSH (WANG et al., 2017).

Dessa forma, é difícil realizar a associação genótipo e fenótipo avaliando uma única mutação com a ocorrência da doença, visto que nem todos os genes associados a ocorrência da doença foram investigados (WANG et al., 2017).

Considerando apenas as informações geradas a partir do método de autodeclaração étnico-racial, vários estudos relataram diferenças na prevalência de HCP em diferentes populações. Grupos Asiáticos e Latinos (hispânicos) apresentaram taxas mais altas, enquanto a população Africana apresentou uma taxa mais baixa em comparação com a incidência de HC na população Europeia (HINTON et al., 2010; STOPPA-VAUCHER; VAN VLIET; DELADOËY, 2011; FEUCHTBAUM et al., 2012).

Além disso, estudos anteriores corroboraram uma associação entre variações étnicas e variantes genéticas do gene *TSHR* (BAYRAM et al., 2013b; GABRIEL et al., 1999; HLBERG et al., 2000; MUSA; HARUN; JUNIT, 2008; SYKIOTIS et al., 2003; TUG et al., 2012). Evidências sugerem uma maior prevalência de HCP em populações com menor grau de miscigenação e em populações caucasianas (Lohmueller et al., 2008). A literatura mostra que a diversidade genética em algumas populações Africanas pode protegê-las contra doenças, como a disgenesia tireoidiana (Schuster et al., 2010).

A prevalência de HCP no Brasil é menor em indivíduos negros do que em indivíduos brancos, com uma prevalência intermediária entre pessoas de pele parda (SICHIERI et al., 2007). OLMOS et al., (2015) investigaram a influência de gênero, raça e *status* socioeconômico no diagnóstico e tratamento de distúrbios da tireoide e concluíram que as cores de pele parda e negra eram protetoras contra hipotireoidismo em comparação com a pele branca.

Além das diferenças detectadas entre populações caucasianas e africanas, também foram observadas diferenças nas taxas de HCP entre asiáticos, reforçando a importância de estudos que investiguem a relação entre etnia e a presença de variantes polimórficas no gene *TSHR* (PARK et al., 2016; SUN et al., 2018; YU et al., 2018).

Na população amazônica há poucos estudos utilizando marcadores informativos de ancestralidade e outras doenças (DA SILVA et al., 2017; LEAL et al., 2020).

Nossos achados mostram uma alta prevalência de ancestralidade europeia em todos os grupos e subgrupos analisados e uma baixa prevalência de ancestralidade africana, especialmente no polimorfismo rs2234919 (p.Pro52Thr). No entanto, isso pode estar associado ao baixo número de portadores desse polimorfismo na amostra (n=4).

Devido as limitações do estudo, não foi possível a coleta para um grupo controle para que fosse feita uma comparação do padrão de ancestralidade dos pacientes de HCP e pessoas sem a doença. Entretanto, os padrões de ancestralidade encontrados neste estudo, são semelhantes aos achados de pesquisas com outras doenças (FRANCEZ; RIBEIRO-RODRIGUES; DOS SANTOS, 2012b; CARVALHO et al., 2015; DA SILVA et al., 2017; LEAL et al., 2020). Devido ao baixo grupo amostral, que limitou o estudo, não foi possível realizar uma análise de incidência por município do Estado.

Nesse contexto, nossos achados sobre o perfil dos marcadores informativos de ancestralidade em pacientes com HCP foram semelhantes aos encontrados em estudos anteriores sobre a composição da ancestralidade no Brasil, mostrando uma baixa prevalência de ancestralidade africana em comparação com a ameríndia e a

européia (FRANCEZ; RIBEIRO-RODRIGUES; DOS SANTOS, 2012b; SALOUM DE NEVES MANTA et al., 2013). Esse perfil de ancestralidade está associado à formação histórica da população do Norte do Brasil (PARRA et al., 2003; LINS et al., 2010; FRANCEZ; RIBEIRO-RODRIGUES; DOS SANTOS, 2012a).

6. CONCLUSÕES

O presente estudo não detectou evidências de uma relação entre as frequências de polimorfismos alélicos do gene *TSHR* e a ancestralidade genética. No entanto, algumas limitações devem ser destacadas, como a diversa origem genética dos pacientes com HCP e o fato de que nem todos os fatores genéticos associados a doença foram identificados, necessitando de mais estudos sobre outros genes associados a sua etiologia.

Os polimorfismos D727E e P52T são recorrentes em populações com tireopatias. Apesar de alterarem a estrutura do receptor de TSH, ainda não está elucidada sua ligação com a ocorrência da doença.

A análise de INDEL indicou diferenças entre os marcadores de ancestralidade ameríndia, europeia e africana no grupo analisado, mostrando uma maior prevalência de marcadores de ancestralidade ameríndia e europeia do que africana em todos os grupos da população analisada.

Dessa forma, são necessárias mais pesquisas que explorem a associação de ancestralidade com o HCP em outras populações do território brasileiro, para possibilitar a comparação com os padrões de ancestralidades encontrados neste estudo. Além disso, é fundamental estudos que associem a ancestralidade com os outros genes envolvidos com a embriogênese da glândula tireoide.

Essas análises podem possibilitar o desenvolvimento de novas metodologias para o rastreio e diagnóstico etiológico para o HC no Brasil.

7. REFERÊNCIAS

- ABDULJABBAR, M. A.; AFIFI, A. M. Congenital hypothyroidism. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 1–2, 1 jan. 2012.
- ABRAMOWICZ, M. J. et al. Identification of a mutation in the coding sequence of the human thyroid peroxidase gene causing congenital goiter. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. 4, p. 1200–1204, 1 out. 1992.
- ALVES, E. A. C. et al. High Frequency of D727E Polymorphisms in Exon 10 of the TSHR Gene in Brazilian Patients with Congenital Hypothyroidism. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 23, n. 12, jan. 2010.
- BANGHOVA, K. et al. Pendred syndrome among patients with congenital hypothyroidism detected by neonatal screening: identification of two novel PDS/SLC26A4 mutations. **European Journal of Pediatrics**, v. 167, n. 7, p. 777–783, jul. 2008.
- BATJARGAL, K. et al. Functional analysis of *PAX8* variants identified in patients with congenital hypothyroidism *in situ*. **Clinical Pediatric Endocrinology**, v. 31, n. 4, p. 234–241, 2022.
- BAYRAM, B. et al. The Association Between Development and Progression of Multinodular Goiter and Thyroid-Stimulating Hormone Receptor Gene D727E and P52T Polymorphisms. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 17, n. 2, p. 109–114, fev. 2013a.
- BAYRAM, B. et al. The Association Between Development and Progression of Multinodular Goiter and Thyroid-Stimulating Hormone Receptor Gene D727E and P52T Polymorphisms. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 17, n. 2, p. 109–114, fev. 2013b.
- BINGLE, D. Thyroid Transcription Factor-I. 1997.
- BROWN, R. S.; DEMMER, L. A. The Etiology of Thyroid Dysgenesis—Still an Enigma after All These Years. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 9, p. 4069–4071, set. 2002.
- CARVALHO, D. C. et al. Amerindian genetic ancestry and INDEL polymorphisms associated with susceptibility of childhood B-cell Leukemia in an admixed population from the Brazilian Amazon. **Leukemia Research**, v. 39, n. 11, p. 1239–1245, nov. 2015.
- CARVALHO, D. P.; DUPUY, C. Thyroid hormone biosynthesis and release. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 458, p. 6–15, dez. 2017.
- CASTANET, M.; POLAK, M. Spectrum of Human *Foxe1/TTF2* Mutations. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 73, n. 6, p. 423–429, 2010.
- CHADWICK, B. P.; OBERMAYR, F.; FRISCHAUF, A.-M. FKHL15, a New Human Member of the Forkhead Gene Family Located on Chromosome 9q22. **Genomics**, v. 41, n. 3, p. 390–396, maio 1997.
- CHANG, W.-C. et al. R450H TSH receptor mutation in congenital hypothyroidism in Taiwanese children. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 11–12, p. 1004–1007, jun. 2012.
- CORTINHAS ALVES, E. A. et al. Evaluation of the *tshr* gene reveals polymorphisms associated with typical symptoms in primary congenital hypothyroidism. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 1, 1 jan. 2016.
- COSTA, R. D. et al. Evaluation of newborn screening in the state of Mato Grosso from 2005 to 2019. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 42, p. e2022161, 2024.

- DA, D.-Z. et al. Congenital Hypothyroidism Patients With Thyroid Hormone Receptor Variants Are Not Rare: A Systematic Review. **INQUIRY: The Journal of Health Care Organization, Provision, and Financing**, v. 58, p. 004695802110679, jan. 2021.
- DA SILVA, E. M. et al. Effect of genetic ancestry to the risk of susceptibility to gastric cancer in a mixed population of the Brazilian Amazon. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 646, dez. 2017.
- DE ROUX, N. et al. Microsatellites and PCR primers for genetic studies and genomic sequencing of the human ISH receptor gene. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 117, n. 2, p. 253–256, mar. 1996.
- DUPREZ, L. et al. TSH Receptor Mutations and Thyroid Disease. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 9, n. 4, p. 133–140, maio 1998.
- DUSSAULT, J. H. et al. Preliminary report on a mass screening program for neonatal hypothyroidism. **The Journal of Pediatrics**, v. 86, n. 5, p. 670–674, maio 1975.
- FEUCHTBAUM, L. et al. Birth prevalence of disorders detectable through newborn screening by race/ethnicity. **Genetics in Medicine**, v. 14, n. 11, p. 937–945, nov. 2012.
- FONDEVILA, M. et al. Forensic performance of two insertion–deletion marker assays. **International Journal of Legal Medicine**, v. 126, n. 5, p. 725–737, set. 2012.
- FORD, G.; LAFRANCHI, S. H. Screening for congenital hypothyroidism: A worldwide view of strategies. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 2, p. 175–187, mar. 2014.
- FRANCEZ, P. A. D. C.; RIBEIRO-RODRIGUES, E. M.; DOS SANTOS, S. E. B. Allelic frequencies and statistical data obtained from 48 AIM INDEL loci in an admixed population from the Brazilian Amazon. **Forensic Science International: Genetics**, v. 6, n. 1, p. 132–135, jan. 2012a.
- FRANCEZ, P. A. D. C.; RIBEIRO-RODRIGUES, E. M.; DOS SANTOS, S. E. B. Allelic frequencies and statistical data obtained from 48 AIM INDEL loci in an admixed population from the Brazilian Amazon. **Forensic Science International: Genetics**, v. 6, n. 1, p. 132–135, jan. 2012b.
- FUJIWARA, H. et al. Congenital hypothyroidism caused by a mutation in the Na⁺/I⁻ symporter. **Nature Genetics**, v. 16, n. 2, p. 124–125, 1 jun. 1997.
- GABRIEL, E. M. et al. Germline Polymorphism of Codon 727 of Human Thyroid-Stimulating Hormone Receptor Is Associated with Toxic Multinodular Goiter. v. 84, n. 9, 1999.
- GARMENDIA MADARIAGA, A. et al. The Incidence and Prevalence of Thyroid Dysfunction in Europe: A Meta-Analysis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 99, n. 3, p. 923–931, 1 mar. 2014.
- GEYSELS, R. C. Silent but Not Harmless: A Synonymous SLC5A5 Gene Variant Leading to Dysghormonogenic Congenital Hypothyroidism. 2022.
- GUAN, L. et al. Thyroid Transcription Factor-1: Structure, Expression, Function and Its Relationship with Disease. **BioMed Research International**, v. 2021, p. 1–10, 28 set. 2021.
- HINTON, C. F. et al. Trends in Incidence Rates of Congenital Hypothyroidism Related to Select Demographic Factors: Data From the United States, California, Massachusetts, New York, and Texas. **Pediatrics**, v. 125, n. Supplement_2, p. S37–S47, 1 maio 2010.

- HISHINUMA, A. et al. Haplotype Analysis Reveals Founder Effects of Thyroglobulin Gene Mutations C1058R and C1977S in Japan. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 8, p. 3100–3104, 1 ago. 2006.
- HLBERG, T. M. et al. Lack of Association of Nonautoimmune Hyperfunctioning Thyroid Disorders and a Germline Polymorphism of Codon 727 of the Human Thyrotropin Receptor in a European Caucasian Population. 2000.
- KOHN, L. D. et al. The Thyrotropin Receptor. Em: **Vitamins & Hormones**. [s.l.] Elsevier, 1995. v. 50p. 287–384.
- KOLLATI, Y. et al. The rs1991517 polymorphism is a genetic risk factor for congenital hypothyroidism. **3 Biotech**, v. 10, n. 6, p. 285, jun. 2020.
- KÜHNEN, P. et al. Identification of PENDRIN (SLC26A4) Mutations in Patients With Congenital Hypothyroidism and “Apparent” Thyroid Dysgenesis. 2014.
- LAFRANCHI, S. Congenital Hypothyroidism: Etiologies, Diagnosis, and Management. **Thyroid**, v. 9, n. 7, p. 735–740, jul. 1999.
- LAU, C. S.; JOSEPH, R.; AW, T. C. Screening for Congenital Hypothyroidism. **Annals of the Academy of Medicine, Singapore**, v. 49, n. 12, p. 934–936, 31 dez. 2020.
- LEAL, D. F. D. V. B. et al. Amerindian genetic ancestry as a risk factor for tuberculosis in an amazonian population. **PLOS ONE**, v. 15, n. 7, p. e0236033, 16 jul. 2020.
- LINS, T. C. et al. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. **American Journal of Human Biology**, v. 22, n. 2, p. 187–192, mar. 2010.
- MACIEL, L. M. Z. et al. Hipotireoidismo congênito: recomendações do Departamento de Tireoide da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, n. 3, p. 184–192, abr. 2013.
- MAGALHÃES, P. K. R. et al. Programa de Triagem Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 2, p. 445–454, fev. 2009.
- MARINI DE CARVALHO, T. et al. Newborn screening: A national public health programme in Brazil. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 30, n. 4, p. 615–615, ago. 2007.
- MATAKIDOU, A. Risk of non-medullary thyroid cancer influenced by polymorphic variation in the thyroglobulin gene. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 3, p. 369–373, 4 dez. 2003.
- MEDEIROS-NETO, G. Defective Thyroglobulin Synthesis and Secretion Causing Goiter and Hypothyroidism. 1993.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **programas de Diagnóstico Precoce do Hipotireoidismo Congênito e Fenilcetonúria**. , 15 jan. 1992.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Programa Nacional de Triagem Neonatal – PNTN**. , 6 jun. 2001. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2001/GM/GM-822.htm>>
- MONTANELLI, L.; TONACCHERA, M. Genetics and phenomics of hypothyroidism and thyroid dys- and agenesis due to PAX8 and TTF1 mutations. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 322, n. 1–2, p. 64–71, 30 jun. 2010.

- MUSA, M.; HARUN, F.; JUNIT, S. M. An investigation into the D727E polymorphism in the TSH receptor gene in patients with congenital hypothyroidism. v. 16, 2008.
- NAGAYAMA, Y. et al. Molecular cloning, sequence and functional expression of the cDNA for the human thyrotropin receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 165, n. 3, p. 1184–1190, dez. 1989.
- NARUMI, S. et al. *TSHR* Mutations as a Cause of Congenital Hypothyroidism in Japan: A Population-Based Genetic Epidemiology Study. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 4, p. 1317–1323, 1 abr. 2009.
- NILSSON, M.; FAGMAN, H. Development of the thyroid gland. **Development**, v. 144, n. 12, p. 2123–2140, 15 jun. 2017a.
- NILSSON, M.; FAGMAN, H. Development of the thyroid gland. **Development**, v. 144, n. 12, p. 2123–2140, 15 jun. 2017b.
- NOGUEIRA, C. R. et al. Structural Analysis of the Thyrotropin Receptor in Four Patients with Congenital Hypothyroidism Due to Thyroid Hypoplasia. **Thyroid**, v. 9, n. 6, p. 523–529, jun. 1999.
- OLMOS, R. D. et al. Gender, race and socioeconomic influence on diagnosis and treatment of thyroid disorders in the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 8, p. 751–758, ago. 2015.
- ORTIGA-CARVALHO, T. M. et al. Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis. Em: TERJUNG, R. (Ed.). **Comprehensive Physiology**. 1. ed. [s.l.] Wiley, 2016. p. 1387–1428.
- PARK, K.-J. et al. *DUOX2* Mutations Are Frequently Associated With Congenital Hypothyroidism in the Korean Population. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 36, n. 2, p. 145–153, 1 mar. 2016.
- PARMENTIER, M. et al. Molecular Cloning of the Thyrotropin Receptor. **Science**, v. 246, n. 4937, p. 1620–1622, 22 dez. 1989.
- PARRA, F. C. et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 1, p. 177–182, 7 jan. 2003.
- PENA, S. D. J.; SANTOS, F. R.; TARAZONA-SANTOS, E. Genetic admixture in Brazil. **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 184, n. 4, p. 928–938, dez. 2020.
- PETERS, C. et al. *DUOX2 / DUOX2A2* Mutations Frequently Cause Congenital Hypothyroidism that Evades Detection on Newborn Screening in the United Kingdom. **Thyroid**, v. 29, n. 6, p. 790–801, jun. 2019.
- PIMENTEL, C. P. et al. Does the Polymorphism in the Length of the Polyalanine Tract of *FOXE1* Gene Influence the Risk of Thyroid Dysgenesis Occurrence? **Journal of Thyroid Research**, v. 2017, p. 1–6, 2017.
- RAMOS, B. R. D. A. et al. Neither self-reported ethnicity nor declared family origin are reliable indicators of genomic ancestry. **Genetica**, v. 144, n. 3, p. 259–265, jun. 2016.
- RASTOGI, M. V.; LAFRANCHI, S. H. Congenital hypothyroidism. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 5, n. 1, p. 17, dez. 2010.
- ROBICHAUX, W. G.; CHENG, X. Intracellular cAMP Sensor EPAC: Physiology, Pathophysiology, and Therapeutics Development. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 2, p. 919–1053, 1 abr. 2018.

- SALOUM DE NEVES MANTA, F. et al. Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e75145, 20 set. 2013.
- SANTOS, N. P. C. et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. **Human Mutation**, v. 31, n. 2, p. 184–190, fev. 2010.
- SAÚDE, M. DA. **Triagem neonatal biológica: manual técnico**. [s.l.] Ms, 2016.
- SICHERI, R. et al. Low prevalence of hypothyroidism among black and Mulatto people in a population-based study of Brazilian women. **Clinical Endocrinology**, v. 66, n. 6, p. 803–807, jun. 2007.
- STOPPA-VAUCHER, S.; VAN VLIET, G.; DELADOËY, J. Variation by Ethnicity in the Prevalence of Congenital Hypothyroidism Due to Thyroid Dysgenesis. **Thyroid**, v. 21, n. 1, p. 13–18, jan. 2011.
- SU, X. et al. TSHR rs2288496 associated with thyroid hormone and predict the occurrence of lymph node metastasis of papillary thyroid cancer. **Cancer Biomarkers**, v. 26, n. 4, p. 461–470, 11 dez. 2019.
- SUN, F. et al. The genetic characteristics of congenital hypothyroidism in China by comprehensive screening of 21 candidate genes. **European Journal of Endocrinology**, v. 178, n. 6, p. 623–633, jun. 2018.
- SYKIOTIS, G. P. et al. Functional significance of the thyrotropin receptor germline polymorphism D727E. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, n. 4, p. 1051–1056, fev. 2003.
- TAYLOR, P. N. et al. Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 5, p. 301–316, maio 2018.
- TUG, E. et al. The Impact of the D727e Polymorphism has no Significant Role in Multi Nodular Goiter. **Balkan Journal of Medical Genetics**, v. 15, n. 2, p. 67–71, 1 dez. 2012.
- VAN DE GRAAF, S. et al. Up to date with human thyroglobulin. **Journal of Endocrinology**, v. 170, n. 2, p. 307–321, 1 ago. 2001.
- VAN TROTSBURG, P. et al. Congenital Hypothyroidism: A 2020–2021 Consensus Guidelines Update—An ENDO-European Reference Network Initiative Endorsed by the European Society for Pediatric Endocrinology and the European Society for Endocrinology. **Thyroid**, v. 31, n. 3, p. 387–419, 1 mar. 2021.
- WANG, F. et al. Next-generation sequencing of NKX2.1 , FOXE1 , PAX8 , NKX2.5 , and TSHR in 100 Chinese patients with congenital hypothyroidism and athyreosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 470, p. 36–41, jul. 2017.
- WASSNER, A. J. Pediatric Hypothyroidism: Diagnosis and Treatment. **Pediatric Drugs**, v. 19, n. 4, p. 291–301, ago. 2017.
- WASSNER, A. J. Congenital Hypothyroidism. **Clinics in Perinatology**, v. 45, n. 1, p. 1–18, mar. 2018.
- WASSNER, A. J.; BROWN, R. S. Congenital hypothyroidism: recent advances. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity**, v. 22, n. 5, p. 407–412, out. 2015.
- WEBER, J. L. et al. Human Diallelic Insertion/Deletion Polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, v. 71, n. 4, p. 854–862, out. 2002.

YU, B. et al. Newborn Screening and Molecular Profile of Congenital Hypothyroidism in a Chinese Population. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 509, 29 out. 2018.

ZHANG, R.-J. et al. The TPO mutation screening and genotype-phenotype analysis in 230 Chinese patients with congenital hypothyroidism. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 506, p. 110761, abr. 2020.