

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO - UNINOVE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

**VALDELENA ALESSANDRA DA SILVA**

---

**ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE RNA CIRCULANTE E CORRELAÇÃO  
COM GENES REGULADOS NO TECIDO CARDÍACO E CEREBRAL EM  
INDIVÍDUOS COM HIPOTIREOIDISMO TRATADOS  
COM LEVOTIROXINA SÓDICA**

---

**SÃO PAULO - SP**  
**2020**

**VALDELENA ALESSANDRA DA SILVA**

---

**ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE RNA CIRCULANTE E CORRELAÇÃO  
COM GENES REGULADOS NO TECIDO CARDÍACO E CEREBRAL EM  
INDIVÍDUOS COM HIPOTIREOIDISMO TRATADOS  
COM LEVOTIROXINA SÓDICA**

---

**Defesa de Tese de Doutorado  
apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Medicina da  
Universidade Nove de Julho, como  
requisito para obtenção de título de  
Doutora em Medicina.**

**Orientador: Prof. Dr. Cléber P. Camacho**

**São Paulo - SP  
2020**

Silva, Valdelena Alessandra da.

Análise do transcriptoma de RNA circulante e correlação com genes regulados no tecido cardíaco e cerebral em indivíduos com hipotireoidismo tratados com levotiroxina sódica. / Valdelena Alessandra da Silva. 2020.

127 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo 2020.

Orientador (a): Prof. Dr. Cléber Pinto Camacho.

1. Medicina personalizada. 2. Hipotireoidismo primário. 3. Disfunção tireoidiana. 4. Levotiroxina. 5. Transcritos. 6. Genes
- I. Camacho, Cléber Pinto. II. Título.

CDU 616



São Paulo 16 de dezembro de 2020

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluna: VALDELENA ALESSANDRA DA SILVA

Titulo da tese: TRATAMENTO COM LEVOTIROXINA SÓDICA NO HIPOTIREOIDISMO E AS DIFERENÇAS DE EXPRESSÃO GÊNICA EM INDIVÍDUOS COM O HORMÔNIO TIREOESTIMULANTE DENTRO E FORA DO ALVO TERAPEUTICO.

Presidente: PROF. DR. CLEBER PINTO CAMACHO

Membro: PROF. DR. HUMBERTO DELLÉ

Membro: PROFA. DRA. GISELE GIANNOCCO

Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS

**Dedico esta tese à Deus, que sempre esteve presente em minha vida e nesta caminhada, ajudando-me a conquistar o que almejo.**

**À minha família pelo amor incondicional, apoio, companheirismo e incentivo.**

**Ao meu pai, Paulo César da Silva (*in memoriam*), pelo exemplo de amor, honestidade, dedicação e ter me ensinado que a vida é perfeita naquilo que tem que ser e que a esperança é a luz divina.**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Nove de Julho (Uninove), pela oportunidade e suporte técnico e científico. Bem como, pelo amparo na minha graduação e no meu Mestrado. Especialmente, Profa Dra Fernanda Marciano Consolim Colombo, Coordenadora do programa da pós graduação de Medicina, pelo incentivo, apoio e um exemplo a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Cléber P. Camacho, pela confiança e oportunidade de trabalhar ao seu lado desde o mestrado, pela infinita disponibilidade, prontidão e por ser o maior incentivador na superação dos meus limites, contribuindo para o meu engrandecimento profissional. Este é meu orientador que me lapidou e disse uma frase inesquecível em um momento difícil. Quando eu falei ele “que eu me sentia como um avião teco-teco atrás de Boeing 747”, e ele me respondeu: “- Não tem problema, mantenha-se no ar”. Certamente, sou grata pelo amparo, auxílio e privilégio por poder vivenciar toda sabedoria que o senhor possui.

À FAPESP, por ter acreditado em nosso trabalho e apoio financeiro, o qual nos proporcionou a execução de nossa pesquisa.

A Profa. Dra. Stella Regina Zamuner, pelo apoio e incentivo no início de minha caminhada no Academicismo, por ter compartilhado todo o seu conhecimento, por sua delicadeza e distinção, e por ter me indicado ao meu orientador.

Ao Prof. Dr. Joelmir Lucena Veiga da Silva, pela amizade, apoio, incentivo e ter me conduzido ao meio científico durante a Iniciação Científica, despertando-me para a vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Daniel Giannella Neto (in memoriam), pela paciência e ajuda nos momentos mais críticos em que pude ter a oportunidade de compartilhar com todo o seu conhecimento intelectual, por inserir conhecimento intelectual na minha trajetória acadêmica. Estará sempre vivo em minha memória.

A Profa Dra. Gisele Giannocco, pela ajuda que resultou no engrandecimento deste trabalho, considerações que vieram ampliar as nossas perspectivas.

Ao Prof. Dr. José Antônio Silva Junior, por elucidar argumentos primordiais para enriquecer este trabalho.

Ao Professor Dr. Humberto Dellê, por todo o conhecimento compartilhado, pela tranquilidade e disposição no auxílio de minhas dúvidas.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos, pelas considerações construtivas que ajudaram no aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Avelhaneda Penatti, pelas observações que complementaram este trabalho.

Aos colegas, Robson José de Almeida, Luiz Antonio de Jesus Rocha, Andrea Harumy de Lima Hirata, Albertina Gomes Rodrigues, Mariana de Almeida Camargo Lautenschlager, Miriam Duarte de Arruda Motta e Yone de Oliveira Di Sarli, pela parceria e pela certeza de uma revisão ímpar e imprescindível para a produção desse trabalho.

Ao Centro de Pesquisa e Diagnóstico Molecular de Doenças Genéticas da Universidade Federal de São Paulo, em especial ao Prof. Dr. João Bosco Pesquero, do departamento de Biofísica, pela parceria em nossa pesquisa. Aos seus colaboradores, Me. Patrícia Varella Lima Teixeira e Me. Leonardo Martins Silva, por ter nos acolhido e proporcionado a execução dos protocolos do transcriptomas. Cumprimento a todos pela solicitude e colaboração, os meus sinceros agradecimentos e apreço.

Ao Laboratório de Endocrinologia Molecular e Translacional da disciplina de Endocrinologia da Universidade Federal de São Paulo, especialmente ao Prof. Dr. Rui Maciel, e a sua equipe, à Msc. Teresa S. Kasamatsu, Luiz Antonio de Jesus Rocha, pela colaboração e auxílio técnico nas análises bioquímicas necessárias em nossa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Marvulle por ter nos auxiliado e permitido o desenvolvimento deste trabalho no Ambulatório Integrado da Saúde da Universidade Nove de Julho.

Aos Professores de enfermagem: Profa. Akiko Kawata, Profa. Mariana Lambert Ramachoti, Prof. Pedro Jorge dos Santos Cardoso e Profa. Valesca da Silva que nos assessoraram nas coletas de sangue dos pacientes.

A todos os alunos de Iniciação Científica do curso de graduação em Medicina, em especial: Ana Carolina Pires Queiroz de Jesus, Francine Machado Reis, Isadora Barberato Preto, Joyce Fernanda Lara, Lucio Antônio Pereira Junior, Marcele Pimenta Cavalcante, Mariana Fabbris Pereira e Samir Abd Fatah, pela colaboração, oportunidade de ensinar e participar de seus projetos, contribuindo para a minha

trajetória acadêmica.

As funcionárias do ambulatório, Bianca Silva Costa, Priscilla Ozorio Alves da Silva e Taiselane Leobas de Alencar, que sempre ficaram à disposição para nos ajudar no que fosse preciso durante o atendimento aos pacientes.

Meus agradecimentos a todos que contribuíram direta e indiretamente nesta pesquisa.

## RESUMO

O hipotireoidismo primário é caracterizado pela disfunção da glândula tireoide, sendo que é uma das doenças mais comuns e atinge aproximadamente 10% da população mundial. A disfunção tireoidiana tem como resposta a repercussão em diversos tecidos e o fármaco de escolha utilizado para a terapia de reposição ou suplementação é a levotiroxina sódica. Os hormônios tireoidianos podem regular a transcrição de genes e impactar o metabolismo e a homeostase energética do indivíduo. Os objetivos deste trabalho foram identificar genes circulantes associados com as repercussões tireoidiana sobre o funcionamento cardíaco e sobre o cérebro, especialmente em humor. Realizamos o transcriptoma de amostras de sangue total de oito indivíduos com hipotireoidismo e quatro indivíduos controle. As leituras de sequenciamento geradas tiveram alinhamento com a versão GRCh38. Posteriormente, fizemos análises qualitativas, quantitativas *in silico* e utilizando cruzamento de banco de dados com as nossas bibliotecas para detectar padrões. Encontramos genes expressos em tecido cardíaco e cerebral, que apresentavam doenças repercutidas no hipotireoidismo. Observamos que na disfunção da tireoide pode haver regulação em vários genes, em coração e cérebro, há uma tendência de oscilação de sinal quando tratamos com levotiroxina, com uma maior estabilidade em ganho de expressão nos indivíduos não tratados.

**Palavras-chave:** Medicina personalizada, Hipotireoidismo primário, Disfunção tireoidiana, Levotiroxina, Transcritos, Genes.

## ABSTRACT

Primary hypothyroidism is characterized by dysfunction of the thyroid gland, being one of the most common diseases and affecting approximately 10% of the world population. Thyroid dysfunction responds to repercussions in different tissues and the drug of choice used for replacement therapy or supplementation is levothyroxine sodium. Thyroid hormones can regulate gene transcription and impact an individual's metabolism and energy homeostasis. The objectives of this work were to identify circulating genes associated with the thyroid repercussions on cardiac functioning and on the brain, especially in mood. We performed the transcriptome of whole blood samples from eight individuals with hypothyroidism and four control subjects. The generated sequencing readings were aligned with the GRCh38 version. Subsequently, we made qualitative, quantitative analyzes in silico and using a cross-database with our libraries to detect patterns. We found genes expressed in cardiac and brain tissue, which had diseases that had repercussions in hypothyroidism. We observed that in thyroid dysfunction there may be regulation in several genes, in heart and brain, there is a tendency for signal oscillation when treated with levothyroxine, with greater stability in expression gain in untreated individuals.

**Keywords:** Personalized medicine, Primary hypothyroidism, Thyroid dysfunction, Levothyroxine, Transcripts, Genes.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Esquema representativo do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e regulação dos hormônios tireoidianos.....	18
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática do mecanismo de ação do receptor do hormônio tireoideano na presença de $T_3$ .....	22
<b>Figura 3.</b> Estrutura química da levotiroxina sódica.....	27
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática da população de estudo .....	39
<b>Figura 5.</b> Fluxograma de buscas de Bancos externos de transcriptomas.....	43
<b>Figura 6.</b> Análise de dados dos meus Bancos e dos conjuntos de dados. ....	44
<b>Figura 7.</b> Conjunto de genes expressos na glândula tireoide e integrinas. ....	48
<b>Figura 8.</b> Representação de genes correlacionados com amiodarona .....	49
<b>Figura 9.</b> Identificação dos genes em comum com a amiodarona, tecido cardíaco e glândula tireoide .....	51
<b>Figura 10.</b> Genes expressos no tecido cardíaco e nossa população. GSE35088: regulação da expressão do hormônio tireoideano no infarto do miocárdio; GSE67726: avalia a contribuição do hormônio tireoideano ao estresse $\beta$ -adrenérgico crônico. ....	63
<b>Figura 11.</b> Conjunto de dados externos entre: GSE67726, GSE35088, Integrinas, Amiodarona, Tiroxina e o nosso DGE.....	65
<b>Figura 12</b> Comparação entre o nosso DGE e dados externos (GSE24793 e GSE28999, tecidos), assim como as integrinas.....	67
<b>Figura 13.</b> Comparação entre os nossos achados e GSE5388 e GSE28999, onde o GSE5388 representa a desordem bipolar e o GSE28999 representa a ansiedade em modelos de <i>Mus musculus</i> .....	67
<b>Figura 14.</b> Conjunto de dados externo representando os genes e <i>overlaps</i> entre cérebro e o nosso DGE.....	69
<b>Figura 15.</b> Gráfico de correlação entre os principais achados das bibliotecas e os parâmetros clínicos dos nossos pacientes.....	70
<b>Gráfico 1.</b> Correlação de <i>CCNJL</i> com TSH.....	56
<b>Gráfico 2.</b> Correlação de <i>CXCR6</i> com TSH.....	56
<b>Gráfico 3.</b> Correlação de <i>CCNJL</i> com $T_4L$ .....	57

<b>Gráfico 4.</b> Correlação de <i>CXCR6</i> com $T_4L$ .....	57
<b>Gráfico 5.</b> Correlação de <i>CCNJL</i> e BDI em relação a administração de levotiroxina.....	59
<b>Gráfico 6.</b> Correlação de <i>CCNJL</i> e BAI em relação a administração da levotiroxina.....	59
<b>Gráfico 7.</b> Correlação de <i>CXCR6</i> e BDI em relação a administração da levotiroxina	60
<b>Gráfico 8.</b> Correlação de <i>CXCR6</i> e BAI em relação a administração da levotiroxina	60
<b>Gráfico 9.</b> Correlação de Zulewski e BDI em relação a administração da levotiroxina .....	61
<b>Gráfico 10.</b> Correlação de Zulewski e BAI em relação a administração da levotiroxina .....	61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Regulação dos fatores fisiopatológicos por intermédio das desiodases .....	20
<b>Tabela 2.</b> Fármacos e compostos antitireoidianos.....	36
<b>Tabela 3.</b> Valores medianos, mínimos e máximos, seguidos pelo valor de p das concentrações de TSH, T4L, anticorpos anti-Tg e anticorpos anti-TPO em 3 grupos .....	40
<b>Tabela 4.</b> Perfil de estudo de indivíduos para a análise de validação por PCR-RT...	42
<b>Tabela 5.</b> Resumo das ferramentas utilizadas no estudo para anotação e enriquecimento dos resultados.....	45
<b>Tabela 6.</b> Genes correlacionados com Integrinas em análise de mecanismos biológicos. ....	48
<b>Tabela 7.</b> Genes do DGE total correlacionados com a amiodarona .....	50
<b>Tabela 8.</b> Genes expressos no tecido cardíaco e doença cardiovascular. ....	52
<b>Tabela 9.</b> Resumo de doenças cardiovasculares repercutidas no hipotireoidismo...	53
<b>Tabela 10.</b> Apresentação de genes expressos em tecido cerebral e que estão associados a depressão, transtorno bipolar, desordem cognitiva, transtorno de memória, desabilidade intelectual e ansiedade .....	54
<b>Tabela 11.</b> Genes selecionados para a validação por PCT-RT.....	55
<b>Tabela 12.</b> Correlação entre genes de validação e demais parâmetros.....	58
<b>Tabela 13.</b> Banco de dados extenos de transcritos selecionados para a validação...	62
<b>Tabela 14.</b> Comparação das diferenças de expressão entre o estudo em sangue total e experimentos com GSE35088 ( <i>Mus musculus</i> , infarto) e GSE67726 ( <i>Rattus norvegicus</i> , efeitos do hormônio tireoideano).....	63
<b>Tabela 15.</b> Comparação entre os logFCs das nossas análises e bancos externos. O GSE24793 representa o cerebelo tratado com T3; O GSE5388 representa o cortex prefrontal dorsolateral de paciente portadores do transtorno de bipolaridade; O GSE28999 representa diferentes regiões do cérebro em modelos de <i>Mus musculus</i> em ansiedade.....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMPc: 3`-5`-adenosina monofosfato cíclica  
Anti-Tg: Anticorpos anti-tireoglobulina  
Anti-TPO: Anticorpos anti-tireoperoxidase  
BAI: *Beck Anxiety Inventory*  
BDI: *Beck Depression Inventory*  
CoA: Proteínas coativadoras  
CoR: Proteínas correpressoras  
D1: Iodotironina desiodase tipo I  
D2: Iodotironina desiodase tipo II  
D3: Iodotironina desiodase tipo III  
DIT: Diiodotirosina  
FDA: *Food and Drug Administration*  
FSH: Hormônio folículo estimulante  
hCG: Gonadrotrofina Coriônica Humana  
HSC: Hipotireoidismo subclínico  
HT: Hormônio Tireoideano  
HTs: Hormônios Tireoidianos  
ITG: Integrina  
L-T<sub>4</sub>: Levotiroxina sódica  
LH: Hormônio Luteinizante  
MAPK: Proteína Quinase Ativada  
MIT: Monoiodotirosina  
MTB: Maquinaria de Transcrição Basal  
NHANES: *National Health and Nutrition Examination Survey*  
NIS: Co-transportador de sódio-iodeto  
PCR: Reação da Cadeia de Polimerase  
PCR-RT: Reação da Cadeia de Polimerase em Tempo Real  
P13-k: Fosfatidil 3-Quinase  
rT<sub>3</sub>: T<sub>3</sub> reverso  
RXR: Receptor do ácido retinoico  
SNC: Sistema Nervoso Central

T<sub>2</sub>: 3,3'-diiodo-L-tironina

T<sub>3</sub>: 3,5,3'-triiodo-L-tironina ou Triiodotironina

T<sub>4</sub>: 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina ou Tiroxina

T<sub>4</sub>L: Tiroxina Livre

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Tg: Tireoglobulina

TBG: Globulina Ligadora da Tiroxina

TPO: Tireoperoxidase

TR: Receptor nuclear de triiodotironina

TREs: Elementos responsivos aos hormônios tiroidianos

TRH: Hormônio liberador de Tireotrofina (*Thyrotropin-releasing hormone*)

TSH: *Thyroid-Stimulating Hormone*

TSHR: Receptor de Hormônio Estimulante da Tireoide

## SUMÁRIO

<b>1.0 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 GLÂNDULA TIREOIDE.....	16
1.2 HORMÔNIOS TIREOIDIANOS.....	17
1.2.1 Eixo hipotálamo-hipófise- tireoide.....	17
1.2.2 Atuação das desiodases.....	19
1.2.3 Carreadores dos hormônios tireoidianos.....	21
1.2.4 Ação genômica dos hormônios tireoidianos.....	21
1.2.5 Ação não genômica dos hormônios tireoidianos.....	23
1.3 HIPOTIREOIDISMO.....	23
1.3.1 Complicações clínicas.....	24
1.4 FARMACOTERAPIA COM LEVOTIROXINA.....	27
1.5 FARMACOGENÉTICA E FARMACOGENÔMICA.....	30
1.6 MEDICINA DE PRECISÃO E TRANSCRIPTOMA.....	31
1.7 JUSTIFICATIVA.....	34
<b>2.0 OBJETIVOS</b> .....	35
<b>3.0 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
3.1 ETAPA 1 (SELEÇÃO DOS GENES).....	36
3.1.1 População de estudo: voluntários.....	36
3.1.2 Delineamento do estudo.....	38
3.1.3 Coleta e armazenamento.....	39
3.1.4 Análise bioquímica.....	40
3.1.5 Extração de RNA total e realização do transcriptoma.....	41
3.1.6 Hipotireoidismo induzido por cloridrato de amiodarona.....	41
3.2 ETAPA 2 – VALIDAÇÃO DOS GENES.....	42
3.3 ETAPA 3 – VALIDAÇÃO PELOS BANCOS.....	43
3.4 DADOS GENÔMICOS.....	44
3.5 BIOINFORMÁTICA.....	45
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	46
<b>4.0 RESULTADOS</b> .....	47
<b>5.0 DISCUSSÃO</b> .....	71
<b>6.0 CONCLUSÃO</b> .....	76
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	77
<b>ANEXOS</b> .....	90
<b>APÊNDICES</b> .....	105

## 1.0 INTRODUÇÃO

A glândula tireoide sintetiza e secreta os hormônios tireoidianos, 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina ou Tiroxina ( $T_4$ ) e 3,5,3'-triiodo-L-tironina ou Triiodotironina ( $T_3$ ) [1]. Esses hormônios tireoidianos regulam os processos metabólicos teciduais essenciais para o crescimento, desenvolvimento e maturação de vários órgãos, tal como, regulam o metabolismo no adulto [2-5].

A função da tireoide é coordenada pela glândula hipófise, localizada no cérebro. Por sua vez, a glândula hipófise produz o hormônio estimulador da tireoide (TSH), que induz a tireoide a secretar  $T_4$  e  $T_3$ . Essa regulação dos hormônios tireoidianos no sistema endócrino é sistematizada pelo mecanismo de retroalimentação (Figura 1), através do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide [6,7].

A maior proporção de hormônios tireoidianos secretados é o  $T_4$ , cerca de 80%, tanto no coloide quanto na forma livre em circulação. No entanto, a forma mais ativa desses hormônios é o  $T_3$ , aproximadamente 20%, que é convertido a partir da 5`desiodação do  $T_4$  em tecidos periféricos promovida pelas desidases [6,8,9]. Essas enzimas, iodotironina desidase tipo I (D1) e iodotironina desidase tipo II (D2), catalisam essa reação fundamental no metabolismo dos hormônios tireoidianos, onde D2 é a maior fonte de  $T_3$  em hipotireoidismo e eutireoidismo em humanos [10,11].

As ações biológicas dos hormônios tireoidianos são desencadeadas por meio da interação do  $T_3$  intracelular gerado pela ação da D2 com os receptores nucleares, determinando a ativação ou a inibição de seus genes-alvo e o controle da síntese de proteínas específicas [12,13].

Esses mecanismos contêm variações na expressão do transportador do hormônio tireoidiano, ativação e inativação do ligante local, expressão relativa das isoformas do Receptor de Hormônio Estimulante da Tireoide (TSHR) e a atividade das proteínas correpressoras e coativadoras do receptor (Figura 2). A combinação desses mecanismos regula a ação do hormônio tireoidiano (HT) na maioria dos tecidos [14,15].

A deficiência do HT está condicionada ao hipotireoidismo, que é diagnosticado pelo TSH. Esse ensaio possui uma relação log-linear inversa que é estabelecida entre Tiroxina Livre ( $T_4L$ ) e TSH, devido ao aumento exponencial nas concentrações de TSH relacionados as reduções lineares de concentração de  $T_4L$  [15-17].

Os sintomas mais comuns em adultos são fadiga, letargia, intolerância ao frio, ganho de peso, constipação, entre outros [18,19]. Assim como, está associado à redução do metabolismo, caracterizado por redução do gasto energético de repouso, ganho de peso, principalmente o TSH está associado à obesidade corporal e abdominal em adolescentes. Bem como, a aumento dos níveis de colesterol, redução da lipólise e redução da gliconeogênese [16-19]. Além da associação do hipotireoidismo a doenças neurodegenerativas, depressão e ansiedade [20].

O fármaco de escolha para o tratamento do hipotireoidismo é a levotiroxina sódica (L-T<sub>4</sub>). No entanto, uma proporção substancial de pacientes que atingem as metas de tratamento tem queixas persistentes [21,22].

O estado da tireoide regula a expressão gênica. Apesar de características clínicas consequentes de concentrações insuficientes de HT, os mecanismos das bases moleculares não são bem compreendidos, quais genes e como são regulados é extensamente desconhecido. E as dúvidas permanecem quanto a essa regulação em indivíduos tratados com levotiroxina [23-25].

## 1.1 GLÂNDULA TIREOIDE

A tireoide é a primeira glândula endócrina a se desenvolver no embrião humano, origina-se após vinte e dois dias da concepção, surgindo da invaginação e espessamento do assoalho da faringe primitiva, seguida pela migração em direção caudal até a base do pescoço e atinge a sua forma definitiva aos 51 dias [26,27]. Ela está localizada na região inferior do pescoço e estende-se da quinta vértebra cervical até a primeira vértebra torácica, encontrando-se intensamente vascularizada [26-29].

A unidade funcional básica da glândula tireoide é composta por folículos de morfologia globular. Cada folículo é composto por uma camada externa de células epiteliais cuboides circundados pela membrana basal, que envolve um lúmen ocupado por uma substância colóide produzida por suas células foliculares. O lúmen do folículo é composto basicamente por Tireoglobulina (Tg) [28-30]. No polo basal das células foliculares estão presentes os receptores para o TSH [29,30].

## 1.2 HORMÔNIOS TIREOIDIANOS

O mecanismo de síntese dos hormônios tireoidianos até o seu transporte para diversos tecidos ocorre por intermédio de dois mecanismos diferentes, não genômico e genômico [4,31].

O mecanismo não genômico é iniciado a partir do estímulo do TSH, que é sintetizado na hipófise anterior. O TSH é uma glicoproteína heterodimérica, com massa molecular de 28kDa constituída por duas subunidades não covalentes denominadas  $\alpha$  e  $\beta$ , no entanto, a subunidade  $\alpha$  também é comum nos Hormônios Luteinizantes (LH), hormônio folículo estimulante (FSH) e Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) [32]. Os sinais hormonais que têm efeitos modulatórios na secreção de TSH incluem dopamina, leptina e somatostatina, que funcionam como um ponto de regulação central da liberação do hormônio tireoidiano [33].

Neste mecanismo, o TSH estimula a produção e liberação de hormônios tireoidianos, ligando-se a um receptor de TSH acoplado à proteína G e localizado na célula folicular da tireoide [34]. Mas este mecanismo necessita de iodo, que é convertido em íon iodeto pela peroxidase, ocorrendo a captação do mesmo do líquido extracelular para as células foliculares tireoidianas, pelo co-transportador de sódio-iodeto (NIS) na membrana basolateral [35,36]. Simultaneamente, ocorre o transporte do líquido extracelular para as células glandulares e os folículos da tireoide. Neste processo, a Tireoperoxidase (TPO) é importante, trata-se de uma glicoproteína de membrana composta de 933 aminoácidos com peso molecular entre 220 e 230 kDa na forma dimérica funcional [37], e participa promovendo a oxidação e acoplamento do íon iodeto na Tg. Deste modo, este acoplamento oxidativo é catalisado pela mesma peroxidase, formando as iodotirosinas, moniodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT)

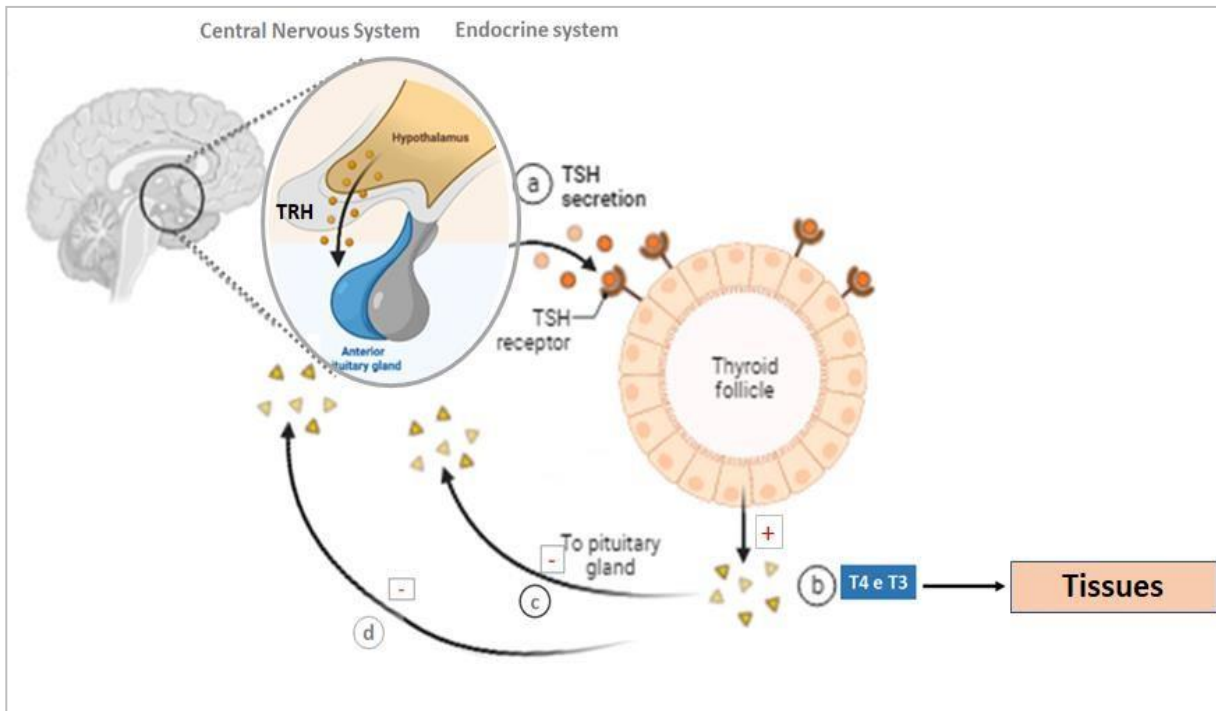
[35,36,38].

Após este processo, ocorre a geração dos hormônios  $T_4$  e  $T_3$ , que acoplados a Tg são recaptados pela célula e seguem com a proteólise. Estes hormônios são liberados na corrente sanguínea, e simultaneamente ocorre a devolução do iodo ao coloide, o que permite o reaproveitamento destas substâncias pela célula tireoidiana [39].

### 1.2.1 Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide

A regulação dos hormônios tireoidianos ocorre pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. O hipotálamo secreta o hormônio liberador de TRH, este estimula sobre a

glândula pituitária, ligando-se aos receptores TRH acoplados à proteína G no tireotrófico, repercutindo em um aumento do 3`-5`-adenosina monofosfato cíclica (AMPC) intracelular e posterior liberação de TSH. Esse mecanismo induz a glândula tireoide a gerar e secretar os hormônios tireoidianos para os tecidos periféricos (Figura 1) [40]. A variação interindividual no TSH e T4 livre tem disso associada ao polimorfismo no gene *D2* [41].



**Figura 1.** Esquema representativo do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e regulação dos hormônios tireoidianos. O hipotálamo secreta TRH, o TRH estimula a glândula pituitária a secretar TSH (a). O TSH secretado induz a glândula tireoide a sintetizar e secretar T4 e T3 para os tecidos periféricos (b). A modulação da concentração circulante dos hormônios tireoidianos é realizada por mecanismo de retroalimentação (c) e (d).

TRH (Hormônio liberador de Tireotrofina/ *Thyrotropin-releasing hormone*); TSH (Hormônio estimulante da tireoide/ *Thyroid-stimulating hormone*); T4 (Tiroxina); T3 (Triiodotironina).

Fonte: Adaptada. Construída no editor Biorender.com.

Nesse mecanismo de retroalimentação quando a concentração de T4 circulante está baixa, ocorre o aumento dos receptores de TRH e conseqüentemente um aumento de síntese de TSH circulante, tanto pelo hipotálamo como pela hipófise, o contrário também ocorre na presença de altas concentrações de hormônios tireoidianos [6,42-44]. Essa regulação altera a taxa de secreção do TRH pelo hipotálamo e tem como principal efeito reduzir a resposta dos tireotrofos [45].

Contudo, mais um mecanismo importante na regulação da síntese dos hormônios tireoidianos é a autorregulação da tireoide. Esse processo é fundamentado na alteração da sensibilidade da glândula tireoide ao TSH, onde o excesso de iodo

reduz a produção de peróxido de hidrogênio impedindo a síntese de hormônios tireoidianos, conhecido como efeito Wolff-Chaikoff [28,32].

Os hormônios  $T_4$  e  $T_3$  são convertidos por D2, esta conversão fornece um feedback negativo ao nível de ambos os tireotrofos na hipófise e no hipotálamo, resultando em redução da secreção de TRH e TSH em resposta a níveis teciduais adequados de hormônio tireoidiano [46-48].

A regulação do mecanismo de *feedback* é a chave para utilizar uma dosagem de TSH sérico para o diagnóstico e tratamento de hipotireoidismo, visto que, pequenas alterações no  $T_4$  sérico são amplificadas por alterações no TSH [48,49].

### 1.2.2 Atuação das desiodases

De acordo com o que foi citado, a principal forma de hormônios tireoidianos (HTs) secretados pela glândula tireoide e circulantes é o  $T_4$ , enquanto o  $T_3$  é considerado o hormônio ativo por se ligar com maior afinidade aos receptores nucleares. Mesmo que uma pequena quantidade de  $T_4$  seja convertida em  $T_3$  na glândula tireoide, a principal conversão do  $T_4$  em sua forma ativa ocorre principalmente nas células-alvo. E esse processo envolve as desiodases [47,50].

As iodotironinas desiodases são compostas por duas enzimas ativadoras: D1 e D2; e uma enzima inativadora: iodotironina desiodase tipo III (D3), que são diferencialmente expressas no desenvolvimento e em tecidos adultos. A D3 é expressa primeiro, seguida por D2 e D1, respectivamente. A indução de D1, D2 e D3 regula vários fatores fisiopatológicos que podem modificar a deiodinação em um determinado tecido (Tabela 1) [51,52].

**Tabela 1.** Regulação dos fatores fisiológicos por intermédio das desidases.

DESIDASES	TECIDOS-ALVO	FUNÇÃO FISIOLÓGICA
<b>D1</b>	Fígado, Rim e Tireoide Hipófise, Cérebro, Tecido adiposo marrom, Placenta,	Fornece T <sub>3</sub> para o plasma
<b>D2</b>	Tireoide, Músculo cardíaco e esquelético Hipófise, Cérebro, Útero,	Fornece T <sub>3</sub> para o espaço intracelular
<b>D3</b>	Placenta, Tecidos Fetais e Pele	Inativa T <sub>4</sub> e T <sub>3</sub>

D1: Iodotiroina desidase tipo I; D2: Iodotiroina desidase tipo II; D3: Iodotironina desidase tipo III; T<sub>4</sub>: Tiroxina; T<sub>3</sub>: Triiodotironina.

D1 é expressa no fígado, rim e tireoide. D2 é expressa na hipófise, cérebro, tecido adiposo marrom, placenta, tireoide, músculo cardíaco e esquelético. D3 é expressa na hipófise, cérebro, placenta, útero, tecidos fetais e pele [53-55].

Todas as desidases precisam de selênio para a atividade catalítica e defeitos nessa síntese de selenoproteínas podem levar ao metabolismo anormal dos hormônios tireoidianos e desarranjos no mecanismo de *feedback* hipotálamo-hipófise-tireoide [53,54,56].

A principal enzima responsável pelo rápido aumento de T<sub>3</sub> intracelular é a D2 em tecidos específicos, bem como, a principal produtora de T<sub>3</sub> sérico em humanos, embora possua uma meia-vida curta [44,55,56]. Em um estudo realizado por Watanabe M. *et al.* demonstrou que a atividade da D2 é estimulada pelos ácidos biliares, por meio da ativação do receptor acoplado à proteína G para o receptor dos ácidos biliares, conhecido como TGR5, que potencialmente liga a ação do HT com a sinalização do ácido biliar [56]. Esse receptor é expresso no tecido adiposo humano e a sua expressão se correlaciona com a taxa metabólica basal [56].

Panicker V *et al.* apresentaram que indivíduos hipotireoideos com polimorfismo no gene D2 tiveram melhora dos sintomas com a terapia combinada de T<sub>4</sub> e T<sub>3</sub> em comparação com a monoterapia de T<sub>4</sub>, sugerindo que indivíduos com redução da conversão do T<sub>4</sub> a T<sub>3</sub> devido a esse polimorfismo no D2 podem se beneficiar da indução do T<sub>3</sub> a à terapia de reposição [57]. Em um estudo de 2013, Hoang TD *et al.*

realizaram uma comparação em indivíduos hipotireoideos com monoterapia de T<sub>4</sub> com extrato de tireoide dessecada, que continha T<sub>4</sub> e T<sub>3</sub>, onde o desfecho foi um TSH sérico mantido no intervalo de referência, onde se observou nesses indivíduos pequena perda de peso, mas significativa, em comparação com o período em que eles foram tratados com a monoterapia de T<sub>4</sub> [58].

### 1.2.3 Carreadores dos hormônios tireoidianos

Uma vez secretados, os HTs se ligam às proteínas carreadoras que os transportam na circulação. Existem duas carreadores de HT no sangue, a globulina ligadora de tiroxina (TBG), uma proteína monomérica de 54 kDa que mostra maior afinidade para os THs, e a transtirretina (TTR), além de albumina [59,60]. Em adição aos transportadores mencionados, os HTs e alguns de seus metabólitos também podem se ligar a lipoproteínas de baixa densidade [61,62].

Existe uma diversidade de portadores envolvidas no transporte de HT por meio da membrana plasmática, sendo eles, os que desempenham um papel específico nos efeitos de suas mutações, os transportadores de monocarboxilato (MCT) 8 e 10; os transportadores de aminoácidos do tipo L (LATs) e os transportadores de ânions orgânicos (OATPs, SLC10 e SLC17) [62-65].

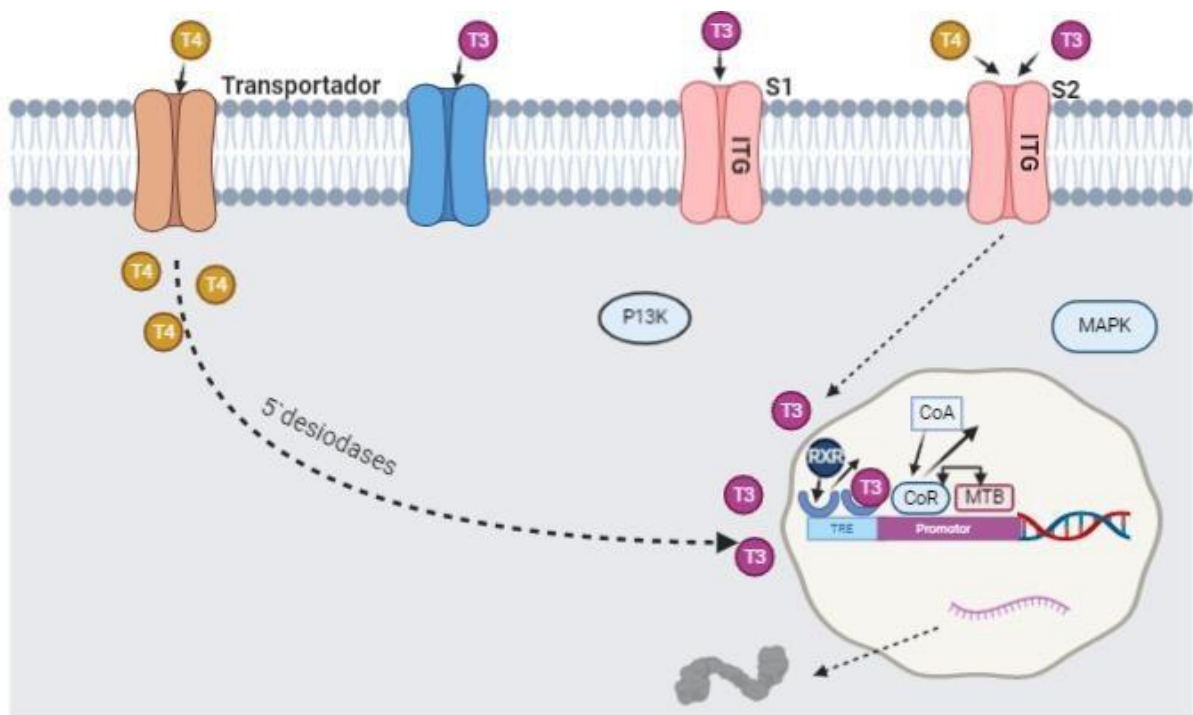
Há relatos que mutações no *MCT8* estão associadas com deficiência intelectual grave [62,66]. Recentemente, foi descoberto mutações em *OATP1C1* se associando com hipometabolismos cerebral grave e neurodegeneração juvenil [65,67].

### 1.2.4 Ação genômica dos hormônios tireoidianos

Os mecanismos de ação mais conhecidos dos HTs são dependentes de efeitos diretos na regulação da transcrição, mediados por receptores nucleares. Os efeitos dos hormônios tireoidianos são mediados por seus receptores, os TRs, e estes são codificados por dois genes distintos,  $\alpha$  (*TR $\alpha$* ) e  $\beta$  (*TR $\beta$* ), localizados no cromossomo 17 e 3, respectivamente [68,69]. Em consequência ao *splicing* alternativo e utilização interpolada do promotor, o gene *TRH $\alpha$*  pode originar seis isoformas; TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2, TRD $\alpha$ 1, TRD $\alpha$ 2, P46 e P28. Da mesma maneira, o gene *TRH $\beta$*  gerar as isoformas:

TR $\beta$ 1, TR $\beta$ 2 e TRH $\beta$ . Exclusivamente, TR $\beta$ 1, TR $\beta$ 2, TR $\alpha$ 1 são receptores efetivos na interação de um domínio ao DNA. Membros da superfamília dos receptores nucleares, essas isoformas apresentam expressões específicas para cada tecido e tem papéis distintos para a sinalização do HT. Posto que, mutações no TR podem originar diversos sintomas clínicos, que são dependentes do TR afetado. Portanto, uma complexa rede de mecanismos de transcrição e alteração pós-transcricional medeiam a expressão do gene, propiciando que os receptores são fatores de transcrição modulares que se ligam em sequências específicas de DNA, chamados de TREs [68-70].

TR regula o metabolismo de carboidratos e colesterol por meio de ações diretas na expressão gênica, bem como comunicação cruzada com outros receptores nucleares, incluindo receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR), receptor X do fígado (LXR) e vias de sinalização de ácido biliar. O HT modula a sensibilidade à insulina hepática, especialmente importante para a supressão da gliconeogênese hepática [71,72].



**Figura 2.** Representação esquemática do mecanismo de ação do receptor do hormônio tireoidiano na presença de T<sub>3</sub>. Em uma das vias, o receptor na integrina possui o domínio ligante S1, possui maior afinidade por T<sub>3</sub> e ativa P13K; e o domínio ligante S2, possui afinidade por T<sub>4</sub> e T<sub>3</sub> e ativa a MAPK. Em outra via, o T<sub>4</sub> é convertido pelas desiodases em T<sub>3</sub>. A ligação do T<sub>3</sub> ao TR promove uma mudança conformacional, dissociando os hemodímeros (TR/TR), favorecendo a associação de TR/RXR. Esta mudança conformacional induz a liberação dos CoR e a associação do TR com as proteínas CoA, que recrutam a MTB, ativando a transcrição do gene.

T<sub>4</sub>: Tiroxina; T<sub>3</sub>: Triiodotiroxina; P13-K: Fosfatidil Inositol 3-Quinase; MAPK: Proteína Quinase Ativada; RXR: Receptor de ácido retinoico; TR: Receptor nuclear de Triiodotironina; TRE: Elemento responsivo ao receptor de triiodotironina; CoA: Proteínas coativadoras; CoR: Proteínas corepressoras; MTB: Maquinaria de Transcrição Basal; ITG: Integrina.

Fonte: Própria autora.

O TR dependendo da ligação com o receptor de ácido retinoico (RXR) pode gerar um homodímero ou heterodímero [73].

Em vista disso, o TR encontra-se ligado ao TR, formando um homodímero (Figura 2). O acoplamento do T<sub>3</sub> ao TR gera uma mudança conformacional na estrutura do receptor formando um complexo, que dissocia o homodímero (TR-TR) e possibilita a associação do TR ao RXR (heterodímeros). Esta mudança conformacional estimula a liberação das proteínas corressoras (CoR) e a junção do TR as proteínas coativadoras (CoA). Assim, recrutam a Maquinaria de Transcrição Basal (MTB) e acionam a transcrição dos genes-alvo, modulando a expressão do gene [42,56,58-75].

### 1.2.5 Ação não genômica dos hormônios tireoidianos

Além dos mecanismos já observados, algumas funções do HT podem ser, em parte, também independentes de receptores nucleares. E essas ações dos hormônios tireoidianos (HTs) que não são iniciadas pela ligação do hormônio ao TR intranuclear são denominadas não genômicas. Os HTs podem iniciar na membrana plasmática ou no citoplasma. Eles podem começar na membrana plasmática ou no citoplasma. As ações podem iniciar no citoplasma ou na membrana plasmática, cujas ações são mediadas pela integrina  $\alpha\beta 3$  [72,76]. Essas ações não genômicas acontecem principalmente na membrana plasmática e são iniciadas pelo receptor na integrina  $\alpha\beta 3$  [59,76]. A integrina  $\alpha\beta 3$  é expressa pelas células na membrana sinovial e pelos condrócitos na cartilagem, nas articulações. A sinalização desta integrina pode promover uma variedade de processos implicados na osteoartrite, como inflamação, angiogênese e remodelação óssea [59,77].

O receptor na integrina  $\alpha\beta 3$  possui dois domínios ligantes: S1, que tem maior afinidade por T<sub>3</sub> e ativa Fosfatidil Inositol 3-Quinase (PI3-K) e S2, que possui afinidade por T<sub>4</sub> e T<sub>3</sub> e ativa a via Proteína Quinase Ativada (MAPK) e proliferação celular (Figura 2) [59,75-78].

## 1.3 HIPOTIREOIDISMO

O hipotireoidismo é uma decorrência da produção inadequada de hormônio da glândula tiroide ou a ação inadequada de HT em tecidos-alvo. Entre as disfunções da tiroide, o hipotireoidismo é o distúrbio mais frequente na população em geral, particularmente em mulheres [79,80]. Segundo o *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES 1999-2002), 3,7% da população dos EUA tem

hipotireoidismo, sendo mais comum em mulheres <sup>[81]</sup>. Na população mundial atinge cerca de 4% a 10% das pessoas <sup>[82]</sup>. Segundo Kajantie *et al.* as chances de uma mulher desenvolver hipotireoidismo aumentam 4,4 vezes em mulheres com baixo peso ao nascer e baixo índice de massa corporal durante a infância <sup>[83]</sup>. O estudo em Framingham numa população de homens e mulheres acima de 60 anos encontrou hipotireoidismo em 4,4% dos indivíduos com concentração de TSH maior que 10mUI/L, destes, 39% tinham baixas concentrações de T<sub>4</sub>L <sup>[84]</sup>. A prevalência de hipotireoidismo no Brasil, na cidade do Rio de Janeiro foi de 12,3% em mulheres adultas. Na região metropolitana de São Paulo foi de 8% na população geral <sup>[85]</sup>.

O risco de desenvolver hipotireoidismo, também aumenta com a idade avançada, anticorpos antitireoidianos e sexo feminino <sup>[83]</sup>.

A prevalência de hipotireoidismo é muito variável nas diversas partes do mundo, sendo maior em locais com deficiência de iodo na dieta <sup>[85]</sup>.

Quando se observa no hipotireoidismo primário uma elevada concentração de TSH na presença de T<sub>4</sub>L corresponde ao hipotireoidismo clínico, diferentemente, quando se percebe uma elevada concentração de TSH e T<sub>4</sub>L dentro do valor de referência categoriza o hipotireoidismo subclínico (HSC) <sup>[85]</sup>.

A taxa de conversão de hipotireoidismo subclínico para hipotireoidismo clínico é de 2% a 6% <sup>[44]</sup>. Conforme Somwaru *et al.* a taxa foi maior para indivíduos que tinham concentração de TSH entre 4,5mUI/L e 10,0mUI/L com a presença de anticorpos positivos <sup>[86]</sup>. Semelhantemente, Fatourech *et al.* demonstrou que cerca de 80% dos pacientes com HSC e concentração de TSH menor que 10,0mUI/L apresentavam anticorpos positivos para TPO <sup>[87]</sup>.

As causas de hipotireoidismo primário são: tireoidite linfocítica crônica (autoimune), tireoidite pós-parto, tireoidite subaguda (granulomatosa), anomalias congênitas, deficiência de iodo, doenças infiltrativas, sendo que, formas de iatrogenias de hipotireoidismo podem intercorrer de tireoidectomia, radioiodoterapia, hipotireoidismo induzido por fármacos antitireoidianos <sup>[20,56,83-85]</sup>.

### 1.3.1 Complicações clínicas

Os sintomas observados no hipotireoidismo são: bradicardia, reflexo de aquileu lentificado, pele seca, letargia, fala lentificada, fraqueza, adinamia, diminuição do volume de suor, pele fria, edema de pálpebras, intolerância ao frio, macroglossia, edema facial, mixedema, cabelo seco, unhas quebradiças, palidez da pele, constipação intestinal, ganho de peso, perda de cabelo, dispneia, rouquidão,

nervosismo, menorragia, surdez, dor precordial e baixa acuidade visual [87-91].

Os TRs estão presentes no miocárdio e nos tecidos endoteliais vasculares, permitindo alterações na concentração de HT para modular a atividade de órgãos-alvo. O indivíduo hipotireoideo apresenta manifestações cardiovasculares e hematológicas bem estabelecidas. Tanto que estão associadas de 20% a 80% na morbidade vascular e risco de mortalidade [92-94].

Os hormônios tireoidianos dispõem de diversos efeitos no sistema cardiovascular que podem impactar muito a função cardíaca. O hipotireoidismo está relacionado a débito cardíaco, devido ao relaxamento prejudicado do músculo liso vascular e à diminuição da disponibilidade de óxido nítrico endotelial, conseqüentemente, aumenta a rigidez arterial e aumenta a resistência vascular sistêmica. Essas alterações resultam em diminuição expressão da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático e inibe a ATPase. Os hormônios tireoidianos também regulam genes relacionados ao marcapasso por meio da transcrição, bem como o sistema beta-adrenérgico nos cardiomiócitos, assim como, interferem no sistema renina-angiotensina-aldosterona [95-97].

A associação do hormônio tireoidiano com a homeostasia da fisiologia cardiovascular em pacientes com hipotireoidismo tem efeitos profundos na função cardíaca, podendo impactar na modulação da contratilidade do miocárdio, frequência cardíaca, resistência vascular periférica, pressão arterial e ritmo cardíaco, função cardíaca sistólica e diastólica alteradas, abafamento de bulhas cardíacas, dor precordial, promovendo possíveis alterações cardiovasculares, principalmente insuficiência cardíaca [98-102].

Há também a associação entre a disfunção tireoidiana e perfil lipídico nos indivíduos com hipotireoidismo clínico ou subclínico e está estreitamente relacionada à dislipidemia e conseqüentemente ao risco cardiovascular [99]. A relação entre anormalidades lipídicas e HSC foram investigadas por diversos estudos e descobriram que HSC está associado com a elevação de triglicérides, colesterol total e lipoproteínas de baixa densidade [86,87,103,104].

Quanto a regulação dos genes cardíacos, a isoforma *TRα1* demonstrou desempenhar um papel importante na regulação dos genes cardíacos. Os genes cardíacos regulados positivamente são:  $\alpha$ -MHC; Canais  $K^+$  dependentes de voltagem (*Kv1.5*, *Kv4.2*); *SERCA2*;  $Na^+ + K^+ + ATPase$ ; Receptor  $\beta 1$ -adrenérgico; Adenina nucleotídeo translocase (*ANT1*). Já, os genes regulados negativamente são:  $\beta$ -MHC; Adenilil ciclase tipos V, VI; Receptor de hormônio tireoidiano  $\alpha 1$ ; Transportadores de hormônio tireoidiano (*MCT8*, *MCT10*); Trocador  $Na^+ / Ca^{2+}$  (*NCX1*); Fosfolambano [105-107].

A concentração de T<sub>3</sub> circulante está mais baixo em indivíduos com infarto agudo do miocárdio, está associada a uma condição clínica grave e com pior evolução [106,107].

Além das repercussões clínicas do HT no sistema cardiovascular, a literatura também relata repercussões associadas às disfunções do sistema nervoso central, com alterações cognitivas e afetam o aprendizado com prejuízo de memória, desatenção, irritabilidade, lentidão psicomotora e do humor, transtornos bipolares, podendo ocorrer ideação suicida. Em casos mais graves, pode levar a depressão e a demência [108-111].

Aproximadamente, 40% de pacientes hipotireoideos são acometidos por transtornos de ansiedade [99-101]. A prevalência de depressão em pacientes com hipotireoidismo é de 30% [102-114]. Vários estudos demonstram que os níveis séricos T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub> e TSH estão alterados em pacientes com depressão [108-110].

O HT tem repercussão no sistema nervoso central, regulando a expressão gênica na mielinização, diferenciação de células neuronais e gliais e viabilidade e função neuronal, desempenhando uma função no desenvolvimento neurológico. Desta forma, estimula o desenvolvimento neuronal, axônios e dendritos, aumentando a taxa de proliferação neuronal [109,115-118].

De acordo com Fischer *et al.*, há uma relação entre as funções cerebrais e os níveis de HT. Os receptores intracranianos e as reações bioquímicas intracerebrais estão estreitamente relacionadas aos hormônios tireoidianos [119].

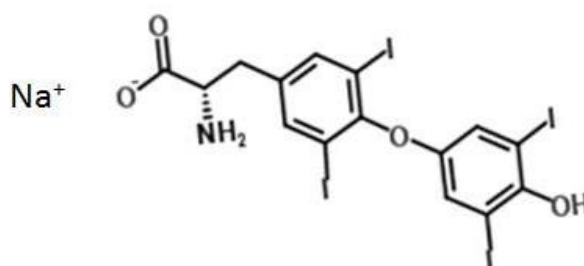
Dentre os pacientes com hipotireoidismo, aproximadamente 30% são acometidos por depressão e 40% apresentam transtorno de ansiedade [120].

No início do hipotireoidismo sintomas inespecíficos são percebidos. Entretanto, esquecimento, depressão, desaceleração no pensamento e problemas de concentração podem ser observadas em estágios posteriores do hipotireoidismo. Em condições clínicas graves, podem aparecer sintomas psicóticos [22,114]. Também, distúrbio do sono são comuns nesses pacientes. A maioria dos sintomas desaparece após o tratamento do hipotireoidismo [121]. Para mensurar a ansiedade e a depressão podem ser utilizadas as escalas de Beck, *Beck Anxiety Inventory* (BAI) para determinar o *score* de ansiedade e *Beck Depression Inventory* (BDI) para determinar o *score* de depressão [121,122].

## 1.4 FARMACOTERAPIA COM LEVOTIROXINA

A farmacoterapia para hipotireoidismo tem como objetivo a redução da mortalidade e prevenção das complicações hormonais da tireoide, portanto é administrado para completar ou substituir a produção endógena dos hormônios tireoidianos. A reposição da monoterapia de L-T<sub>4</sub> é utilizada em doses individualizadas de acordo com a resposta do paciente [21,22].

O L-T<sub>4</sub> é um levo-isômero sintético idêntico ao hormônio tiroxina endógeno (T<sub>4</sub>) produzido pela glândula tireoide [123]. A sua fórmula estrutural é um sal inodoro, higroscópico, insípido, a qual é acrescentada apenas uma molécula de sódio para proporcionar maior absorção intestinal (Figura 3) [124,125].



**Figura 3.** Estrutura química da levotiroxina sódica.

Fonte: Própria autora. Construída no editor de estruturas Químicas *chemspider.com*.

Nota-se que o uso terapêutico de L-T<sub>4</sub> no tratamento de hipotireoidismo ocorre na conversão periférica do pró-hormônio tiroxina (T<sub>4</sub>), administrado via exógena, no seu hormônio de metabolismo ativo, o T<sub>3</sub> [126]. Esta ativação ocorre por intermédio de duas enzimas D1 e D2 [12,127].

O mecanismo de ação do T<sub>4</sub> sintético, aumenta a taxa metabólica basal, amplia a utilização e mobilização dos estoques de glicogênio, promove a gliconeogênese e estimula a síntese proteica [128]. Considera-se que seus principais efeitos ocorrem através do controle da transcrição de DNA e as síntese de proteínas [127].

L-T<sub>4</sub> é um composto anfótero com dois grupos ácidos e um básico que interferem na sua dissolução e consequentemente na absorção [125,126].

Contudo, a absorção gastrointestinal da formulação de comprimidos de L-T<sub>4</sub>

administrado por via oral é de aproximadamente 60% a 90% em jejum. O tempo de pico plasmático é de 2 horas a 4 horas, ocorrendo a maior parte no jejuno e íleo superior [128].

O pH ácido no estômago, como ocorre no jejum, é importante para a absorção de uma dose de L-T<sub>4</sub> administrada via oral. Recomenda-se que L-T<sub>4</sub> deve ser administrada com o estômago vazio para que atinja a absorção máxima, o que reflete a influência da acidez gástrica no processo [127-130].

Do mesmo modo foi demonstrado por Centanni *et al* que a acidez gástrica desempenha um papel importante na absorção de L-T<sub>4</sub>. Realmente, os pacientes com gastrite atrófica ou por relacionada com *Helicobacter pylori* exibem um aumento da dose de L-T<sub>4</sub> em comprimido [131].

Desta maneira, o mesmo estudo de Centanni *et al* demonstrou que em pacientes com distúrbios endócrinos que tomam L-T<sub>4</sub> em diferentes horários de ingestão, terão maior absorção intestinal do hormônio quando ingerido antes do café da manhã em jejum [131]. De fato, o aumento do pH gástrico pode alterar a dissolução e a solubilidade do fármaco [129], além de interferir na absorção, pode aumentar a sua depuração [27,132,133].

Na tentativa de minimizar o problema de má absorção do fármaco devido ao aumento do pH gástrico, um estudo recente realizado na Universidade de Brescia, na Itália, obtém resultados que confirmam pela primeira vez, em um duplo-cego, que a formulação líquida de L-T<sub>4</sub> pode ser administrada no café da manhã, demonstrando que uma normalização reversível dos níveis de TSH em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica [134,135].

A absorção de L-T<sub>4</sub>, também pode ser afetada por estados de má absorção, doença do intestino delgado, como a doença celíaca [132].

A meia-vida de tiroxina endógena é de aproximadamente 9 a 10 dias em pacientes hipotireoidianos e 6 a 7 dias em pacientes eutireoidianos, o que permite dosagem uma vez ao dia, entretanto, a sua atividade biológica pode ser mantida por um período mais longo. Os efeitos de L-T<sub>4</sub> administrado via oral são observados dentro do período de três a cinco dias. A meia-vida varia de acordo com o estado da tireoide, para hipotireoidiano de nove a dez dias e para eutireoidiano de três a quatro dias [27,136].

Os hormônios tireoidianos circulantes estão ligados em mais de 99% com as proteínas plasmáticas, principalmente à *Thyroxine-Binding Globulin* (TBG), pré-albumina de ligação a tiroxina e menos ativamente à albumina, cujas capacidades e afinidades variam para cada hormônio. Os hormônios tireoidianos atravessam a barreira placentária nas primeiras semanas de gestação. Desse modo, a L-T<sub>4</sub> é

secretada no leite materno, mas não o suficiente para corrigir o hipotireoidismo no lactente [137,138].

Os efeitos adversos em caso de sobredosagem são sinais de tireotoxicose ocasionando taquicardia, tremor, sudorese, similar em caso de ligeira sobredosagem que ocasiona risco de fraturas osteoporóticas e fibrilação atrial, especialmente em idosos [139]. Uma meta-análise de estudos randomizados e controlados para o tratamento de hipotireoidismo clínico com terapia combinada de T<sub>4</sub> e T<sub>3</sub> contra a monoterapia de T<sub>4</sub> não encontrou diferença na eficácia terapêutica entre as terapias em relação aos efeitos colaterais, como dor física, fadiga, peso corporal, ansiedade, depressão, qualidade de vida e outros [140]. Existe controvérsia no que se refere a terapia de combinação sobre sua segurança e eficácia, e um consenso de que não é melhor do que a monoterapia de T<sub>4</sub> [141].

A despeito de várias marcas disponíveis no mercado sejam consideradas bioequivalentes, o *US Department of Health and Human Services* da FDA (*Food and Drug Administration*) e Green *et al.* nos Estados Unidos, acreditam que a bioequivalência terapêutica e a intercambiabilidade é questionável [142]. Do ponto de vista prático, existem várias descrições de casos em que pacientes sofreram efeitos deletérios produzidos pela intercambiabilidade entre marcas diferentes de L-T<sub>4</sub> sem a recomendação de um médico. Estudos relatam problemas de bioequivalência de fármacos, como marca que contém de 25% a 35% menos princípio ativo [133-135,143]. Em contrapartida, um estudo recente demonstrou que levotiroxina sódica genérica comparada com o mesmo fármaco referência são equivalentes [134].

Segundo a FDA a diferença entre a biodisponibilidade entre os fármacos terapêuticamente equivalentes nunca deve exceder a 9% [144].

O desenvolvimento de novas formulações orais, para a terapia de substituição do T<sub>4</sub>, ocorre com preparações líquidas ou em cápsula de gel. A forma farmacêutica líquida é mais ativa do que o comprimido em pacientes hipotireoidianos com distúrbios gástricos, distúrbios de absorção e interação medicamentosa [145].

Para entender melhor a farmacocinética e vantagens potenciais de diferentes formas farmacêuticas de L-T<sub>4</sub>, Yue *et al.* publicou que a biodisponibilidade da solução oral é maior do que em comprimido e cápsula, porque atinge a circulação sistêmica mais rápido, o que pode ser benéfica para minimizar as interações entre fármaco e alimentos [146].

A terapia farmacológica com L-T<sub>4</sub> é recomendada quando o nível de TSH é maior que 10,0mUI/L. Esta terapia é simples e segura quando administrada oralmente, tem uma meia vida longa no soro que permite uma administração diária, e resulta na resolução dos sinais e sintomas de hipotireoidismo na maioria dos pacientes. No

entanto, as evidências disponíveis sobre os riscos e benefícios do tratamento para pacientes com nível de TSH sérico menor que 10,0mUI/L permanece controversa e ainda não há um consenso sobre a importância clínica de eventos adversos e os benefícios do tratamento com tiroxina exógena [124,126].

Vários estudos questionam a eficácia da terapia de L-T<sub>4</sub> em pacientes com hipotireoidismo, principalmente em pacientes com hipotireoidismo subclínico, que continuam a sofrer com os sintomas ainda que, tenham alcançado a correção bioquímica adequada [125-140]. Assim como, existe a necessidade de investigação quando os pacientes com hipotireoidismo primário requerem dosagens mais elevadas [21,147-151].

## 1.5 FARMACOGENÉTICA E FARMACOGENÔMICA

Atualmente, a farmacogenética estuda as influências sobre as respostas a medicamentos dando ênfase em efeitos de genes isolados [151,152]. Esta área da farmacologia clínica, visa otimizar o tratamento por meio da personalização terapêutica, uma vez que a resposta farmacológica a um tratamento medicamentoso não é a mesma em todos os indivíduos [152]. Particularmente, procura identificar genes que predisponham às doenças, afetem a farmacodinâmica e farmacocinética de medicamentos, modulem respostas aos medicamentos, estejam associados às reações adversas a medicamentos [153].

Os testes genéticos clínicos cresceram substancialmente nos últimos 30 anos, à medida em que foram identificadas as mutações causadoras de doenças mendelianas, especialmente ajudadas pelos recentes avanços tecnológicos de base molecular. É importante salientar que a adoção de novos testes e estratégias tem sido frequentemente observada com cautela e consideração cuidadosa antes da implementação clínica, o que facilita o uso apropriado de novos testes genéticos. Embora o campo da farmacogenética tenha sido estabelecido na década de 1950, os testes clínicos para variantes farmacogenética constitucionais implicados na variabilidade interindividual da resposta a medicamentos só recentemente se tornaram disponíveis para ajudar os clínicos a orientar a farmacoterapia, em parte, devido a revisões de inserção de produtos mediadas pela FDA nos Estados Unidos, que incluem informações farmacogenética relevantes e recomendações para certos medicamentos [151-158].

Contudo, a identificação constante de genes com relevância, variantes de sequência e fenótipos associados a fármacos é evidenciada em paralelo com a literatura farmacogenética, em especial a conclusão do projeto genoma humano [159].

A farmacogenética é utilizada para definir genes que determinam a ação de um fármaco. A farmacogenômica está associada ao genoma humano, pela disponibilidade de dados de sequência genômica ampla. Embora os termos sejam utilizados de forma intercambiável, a farmacogenética é frequentemente considerada o estudo da resposta à fármacos em relação ao genoma [160].

Estudo de polimorfismo em *UGT1A1*, *UGT1A3*, *D1* e *D2*, relacionando-os com supressão de TSH nos pacientes com câncer diferenciado da tireoide em terapia de levotiroxina comprovou que os haplótipos *UTG1A* se associam à dosagem de T<sub>4</sub> nesses pacientes, porém o efeito é responsável por apenas 2% da variabilidade total e a recomendação de genotipagem *UGT1A* não é garantida. Enquanto os genótipos DIO1 e DIO2 não tiveram influência da dosagem de T<sub>4</sub> [161].

Alguns exemplos farmacogenéticos de certos medicamentos conseguiram alcançar aceitação na prática clínica. O notável progresso nas tecnologias de sequenciamento de genoma, certamente identificará outras importantes variantes de sequências e modelos moleculares mais sofisticados para prever as respostas aos medicamentos e facilitar uma farmacoterapia melhorada e mais eficaz [162].

Os ensaios de reação da cadeia de polimerase em tempo real (PCR-RT), sequenciadores de última geração, genotipagem, são concentrados na detecção de variações genéticas que modificam as interações de fármacos com os alvos ou as vias metabólicas dos fármacos (anabólicas ou catabólicas ou *upstream* e *downstream*, respectivamente), podendo ser utilizados para a seleção de formulações de fármacos e percepção de diversas imunogenicidades, inclusive, biomarcadores na farmacogenética para facilitar a terapia medicamentosa mais eficaz [163-165].

## 1.6 MEDICINA DE PRECISÃO E TRANSCRIPTOMA

A medicina de precisão abrange o uso de biomarcadores, que em sua maioria são marcadores moleculares para detectar traços genéticos específicos e orientar diferentes abordagens na prevenção e no tratamento de várias doenças [164].

Esta medicina de precisão e personalizada se inicia com a descoberta da estrutura do Ácido desoxirribonucleico (DNA) em 1952, em que fundamentos biológicos a respeito de genoma foram desenvolvidos e especificados por meio de técnicas experimentais, tais como, transcrição, tradução, código genético, modificações epigenéticas, entre outros [164,165].

Os ensaios de medicina personalizada, como exemplo, reação da cadeia de polimerase em tempo real (PCR-RT), sequenciadores de última geração, genotipagem, são concentrados na detecção de variações genéticas que modificam as interações de fármacos com os alvos ou as vias metabólicas dos fármacos (anabólicas ou catabólicas ou *upstream* e *downstream*, respectivamente) [151,152]. Mediante a isso, os ensaios de medicina personalizada são focados na detecção de variações genéticas que alteram as interações de fármacos com alvos ou as vias metabólicas dos fármacos (anabólicas e catabólicas ou *upstream* e *downstream*), podendo ser utilizados para a seleção de formulações de fármacos e percepção de diversas imunogenicidades de fármacos [160].

O progresso conquistado com o sequenciamento do genoma humano proporcionou um crescimento complexo em várias áreas da medicina, o que permitiu antecipar como algumas mutações iriam desenvolver doenças, seus comportamentos em relação a sua agressividade e resposta ao tratamento [162]. Esse progresso associado ao aprimoramento da tecnologia computacional no âmbito da bioinformática é significativo na prática da clínica médica em tratamentos personalizados [163].

Por conseguinte, essas ferramentas utilizadas na medicina de precisão, por meio de expressão gênica de cada indivíduo para diagnóstico e direcionamento em tratamentos, embora sejam beneficiadas em um reduzido número de indivíduos [164,165].

Atualmente, a farmacogenética estuda as influências sobre as respostas a medicamentos dando ênfase em efeitos de genes isolados [148]. Esta área da Farmacologia Clínica, visa otimizar o tratamento por meio da personalização terapêutica, uma vez que a resposta farmacológica a um tratamento medicamentoso não é a mesma em todos os indivíduos [149,162].

Particularmente, a farmacogenética procura identificar genes que predisponham às doenças, afetem a farmacodinâmica e farmacocinética de medicamentos, modulem respostas aos medicamentos, estejam associados às reações adversas a medicamentos [152]. Deste modo, a farmacogenética agrega uma

análise de banco de dados contendo genealogias familiares, sensibilidade de fármacos, informações genômicas e histórico de doenças [166].

Neste contexto, a medicina de precisão leva em consideração a variabilidade genética individual, compreendendo o transcriptoma. O transcriptoma é o conjunto completo de RNA ou transcrito de um organismo, grupo de células ou ainda de uma célula específica em uma determinada condição fisiológica e abrange o sequenciamento de todos os tipos de moléculas de RNA, como miRNA, mRNA, RNA codificantes e não codificantes, assim como as formas de *splicing* alternativos poliadenilados. Reunidos na análise eles refletem os genes que estão ativamente expressos em um tecido particular [153,167]. O processo de transcrição ocorre mediante a síntese de RNA a partir do DNA. O RNA determina quais genes serão expressos e podem se modificar durante a vida do organismo, ao contrário do DNA, que é estático. Uma das principais causas de modificações são as alterações ambientais, considerando que o organismo tenta se ajustar a estas mudanças para se manter vivo [167]. O transcriptoma tem como objetivo catalogar todas as espécies de transcritos, determinar as estruturas das transcrições de genes padrões de *splicing*, distintas modificações pós transcricionais e quantificar as 36 alterações dos níveis de cada expressão de transcritos sob diferentes condições [153,167].

O sequenciamento de alto desempenho de RNA denominado de RNA-seq possibilita além da compreensão do transcriptoma, também a quantificação dos genes [167,168]. O RNA-seq é realizado por *Next Generation Sequencing* (NGS) e tem sido largamente aplicado na investigação de diversas possibilidades de transcrição, também possibilita uma ampla visão do mapa do transcriptoma humano e um dos seus principais benefícios é que independe do conhecimento prévio sobre a sequência sob investigação [169]. Esse método consiste na conversão das moléculas de interesse de RNA em ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) conectado a adaptadores que geram uma quantidade bastante expressiva de sequências de DNA curtas, aproximadamente de 35 a 100 pares de bases [170].

## 1.7 JUSTIFICATIVA

Os hormônios tireoidianos são reguladores do metabolismo celular e fisiológico, sendo o T<sub>4</sub> a maior concentração na circulação sanguínea, convertendo-se a T<sub>3</sub>, que é biologicamente mais ativo em diversos tecidos. Eles podem regular positivamente ou negativamente a transcrição de genes que por sua vez, impactam o metabolismo e a homeostase energética [171]. Existem diversas vias de regulação do hormônio tireoidiano e a extensa concentração de genes em que a expressão é modificada pela condição do hormônio tireoidiano torna este estudo dos efeitos da ação deste hormônio desafiador [172]. Os princípios necessários para a ação do HT são bem conhecidos, mas a interação entre as várias vias existentes têm sido complexa. A análise da expressão genica pode revelar as diferenças sutis entre os indivíduos eutireoidianos e os pacientes tratados com a levotiroxina, além de permitir a identificação de biomarcadores capazes de identificar as repercussões do hipotireoidismo precocemente e servindo como alvos para a terapêutica de precisão. Efetuamos em uma etapa anterior até a extração do RNA, e conforme já apresentado, os HTs podem gerar diversos sintomas e esses sintomas refletem efeitos em tecidos. Sendo o sangue o sítio de ação do HT, verificar se o que estava acontecendo nele pode estar refletindo o que está ocorrendo em outros tecidos.

## 2.0 OBJETIVOS

Identificar transcritos circulantes associados com:

- I. As repercussões da disfunção tireoidiana sobre o funcionamento cardíaco.
- II. As repercussões da disfunção tireoidiana sobre o humor.

### 3.0 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o número: 665.331 – 28/05/2014. A pesquisa foi desenvolvida no Ambulatório de Promoção à Saúde e no Ambulatório de Endocrinologia, localizados na Universidade Nove de Julho, no Campus Vergueiro em São Paulo.

Nosso estudo foi dividido em 3 Etapas: Seleção dos genes, Validação dos genes e Validação pelos Bancos de estudos externos de transcriptomas.

#### 3.1 ETAPA 1 (SELEÇÃO DOS GENES)

##### 3.1.1 População de estudo: voluntários

A Etapa 1 se inicia com a triagem dos indivíduos, que foi realizada durante o período de março de 2014 a dezembro de 2016, onde foram atendidos 320 indivíduos. Destes 320 indivíduos, 120 foram incluídos. Foram realizadas as elucidações sobre a pesquisa e adesão ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1).

Foram incluídos indivíduos com idade entre 18 e 65 anos, com diagnóstico de hipotireoidismo em uso de terapia de levotiroxina e indivíduos saudáveis.

Foram excluídos pacientes com insuficiência renal, diagnóstico de diabetes mellitus tipo I e tipo II, com outras comorbidades (gastrite, nefropatia, hepatite), e que faziam uso de fármacos e compostos antitireoidianos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Fármacos e compostos antitireoidianos.

<b>Fármacos e Compostos antitireoidianos</b>
Tioureileno (carbimazol, metimazol, propilriouracila), Glicocorticoides, Amiodarona (antiarrítmico), Contrastes iodados, Suplementos de iodo ou Alimentos naturais com alto teor de iodo [46,173-175].
Fenobarbital (anticonvulsivante), Sulfato ferroso, hidróxido de alumínio, carbonato de cálcio, colestiramina, sucralfato, inibidores de bomba de prótons, inibidores de tirosina quinase, indutores de enzimas, Fenitoína, Carbamazepina, Rifampicina, Sertralina [46,175-177].
Contraceptivos e gravidez estão associados a mudanças na TGB, as quais também podem afetar a dosagem de hormônio da tireoide [178].
Compostos orgânicos (resorcinol, ácido p-aminosalicílico, sulfonilureia oral, fenobutazona, aminoglutetimida [179].
Poluição industrial (bifenilos policlorados e perclorato) [180,181].

Após elucidações e adesão ao TCLE, os pacientes foram avaliados com dados antropométricos, dados clínicos, referindo-se a triagem para doenças tireoidianas pré-existentes. Seguidas pelas variáveis clínicas, que foram realizadas no mesmo momento: peso, altura, aferição da pressão arterial, frequência cardíaca; ecocardiograma e eletrocardiograma; variáveis bioquímicas: TSH, T4L, Anti-Tg e Anti-TPO, colesterol total e frações, triglicerídeos, hemograma, ureia, creatinina, TGO, TGP, glicemia, transferrina; Zulewski (Apêndice 2), BAI (Apêndice 3) e BDI (Apêndice 4).

O Índice de Diagnóstico de Hipotireoidismo (Zulewski) é utilizado para pesquisa de sinais e sintomas de hipotireoidismo. É composto por 7 sintomas (diminuição de suor, rouquidão, parestesia, pele seca, constipação, perda de audição, aumento de peso) e 5 sinais (movimentos diminuídos, reflexo do tornozelo diminuído, pele grossa, edema periorbitário e pele fria). Para cada sintoma ou sinal presente, foi atribuído um ponto, totalizando-se o máximo de 12 pontos. Pacientes com pontuações entre zero e 2 são consideradas eutireoideos. Escore de 3 a 5 é compatível com hipotireoidismo subclínico e valores acima de 5 pontos são compatíveis com o estado hipotireoideo clínico. Neste estudo, foram consideradas as pontuações maiores que 5. Ainda, adicionou-se um ponto para as mulheres com idade inferior a 55 anos, visando o equilíbrio estatístico entre os participantes, uma vez que a frequência dos sintomas e sinais descritos acima parece ser significativamente maior nas mulheres a partir dos 55 anos de idade <sup>[182]</sup>.

O BAI é uma escala de autorrelato que mensura a intensidade dos sintomas de ansiedade, é composta por 21 itens, que são afirmações descritivas de sintoma de ansiedade. Cada um com quatro graus de frequência (nunca, ocasionalmente, frequentemente e quase sempre), que refletem níveis de gravidade crescente de cada um deles, aos quais foram atribuídos os valores de 0 (zero), 1, 2 e 3 pontos, respectivamente. O paciente irá considerar a frequência dos referidos sinais e sintomas observados durante a última semana, incluindo o dia de autopreenchimento do inventário. A pontuação pode variar de 0 a 63 pontos, cujo resultado será apresentado em mediana. A classificação recomendada é nível mínimo para pontuações de 0 a 7; leve, para pontuações de 8 a 15; moderado, de 16 a 25; e grave, para pontuações de 26 a 63 <sup>[122]</sup>.

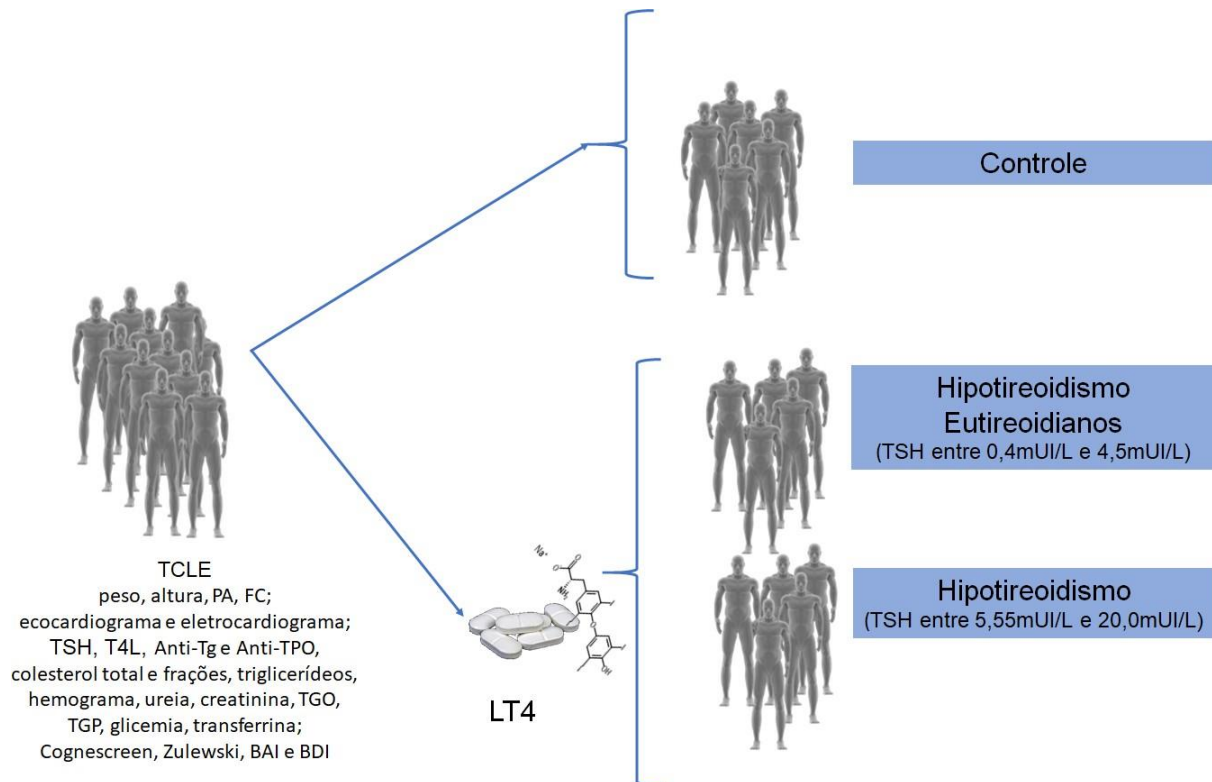
O BDI é uma escala de autorrelato que contém 21 itens. Cada item apresenta quatro alternativas de resposta, que indicam graus crescentes de gravidade de depressão. A pontuação total é resultado da soma das pontuações individuais dos

itens. Se a pontuação total for de 0 a 9 pontos, o nível de depressão é mínimo ou ausência de depressão; se a pontuação total foi de 10 a 18 pontos, o nível de depressão é leve a moderada; se a pontuação total foi de 19 à 29 pontos, o nível de depressão é moderada a grave e finalmente se a pontuação total foi de 30 a 63, o nível de depressão é grave. Os escores entre 18 a 19 pontos podem ser considerados como indicativo da existência de sintomas depressivos clinicamente significativos <sup>[121]</sup>.

### **3.1.2 Delineamento do estudo**

Foram selecionados 8 pacientes tratados com levotiroxina sódica. Estes 8 pacientes formaram um grupo com 4 indivíduos, constituído por 4 mulheres com eutireoidismo com tratamento adequados (HTT-at), definido como um TSH sérico entre 0,4mUI/L e 4,5mUI/L, e outro grupo com 4 indivíduos, constituído por 3 mulheres e 1 homem, com Hipotireoidismo com tratamento inadequado (HTT-out), definido como um TSH entre 5,55mUI/L e 20,0mUI/L, ambos com T4L dentro dos valores de referência. Dos indivíduos saudáveis, 4 foram selecionados (Controle: CTL), constituído por 3 mulheres e 1 homem (Figura 4).

Vale salientar que os testes de TSH dos 120 indivíduos foram confrontados pelos resultados de 2 métodos: o Método A foi realizado pelo Kit Roche Diagnostics® e o Método B foi realizado pelo Kit Abbott Architect I 2000, detecção do kit: de 0,0038mUI/L, e valores de referência: 0,34-5,60mUI/L.



**Figura 4.** Representação esquemática da população de estudo.

### 3.1.3 Coleta e armazenamento

Foi coletado 5ml de sangue em aspiração a vácuo em um tubo para preservação das moléculas de RNA (*PAXgene blood RNA*<sup>®</sup>), contendo 6,9mL de aditivo de preservação de RNA. Após a coleta, o tubo para obtenção do soro sanguíneo foi submetido à centrifugação de 1500rpm (rotações por minuto) durante 15 minutos, no qual houve a separação do gel na fase sólida contendo células e coágulo, da fase líquida contendo soro. Seguida da conservação em congelamento de -20°C para posterior realização das análises bioquímicas para dosagem plasmática de: TSH, T4L, anticorpos anti-Tg, anticorpos anti-TPO. Concomitantemente, o tubo *PAXgene blood RNA*<sup>®</sup> foi armazenado por 24 horas em temperatura ambiente (15°C a 25°C), com o propósito de garantir a completa lise celular e potencializar o rendimento das moléculas de RNA ao final da extração, de acordo com o fabricante. Após o tempo previsto, os tubos foram armazenados em congelamento a -20°C, para subsequente realização do transcriptoma.

### 3.1.4 Análise bioquímica

As análises bioquímicas de TSH, T4 Livre, Anti TPO, Anti TG foram executadas no equipamento Elecsys 2010 do fabricante Roche Diagnostics (IN, USA), com os Kits do mesmo fabricante, seguindo protocolos automatizados específicos para cada teste.

Os Kits e protocolos específicos automatizados foram utilizados para cada teste são:

- Kit Roche Diagnostics® para dosagem do hormônio TSH (Método A), referência: 11731459 122, detecção do Kit: 0,005-100mUI/L, e valores de referência: 0,27-4,20mUI/L.
- Kit Roche Diagnostics® para dosagem de T4L, referência: 06437281 190, detecção do Kit: 0,3-100pmol/L, fatores de conversão das unidades: pmol/L x 0,077688 = ng/dL, ng/dL x 12.872 = pmol/L, e valores de referência: 0,93-1,7ng/dL.
- Kit Roche Diagnostics® para dosagem de anticorpos anti-Tg, referência: 6368697 190, detecção do Kit: 10,0-4000UI/L, e valores de referência: menor que 115,0UI/L
- Kit Roche Diagnostics® para dosagem de anticorpos anti-TPO, referência: 06368590 190, detecção do Kit: 5,00 - 600UI/L, e valores de referência: menor que 34,0UI/L.

Os resultados da análise bioquímica realizada em uma etapa anterior estão demonstrados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Valores medianos, mínimos e máximos, seguidos pelo valor de p das concentrações de TSH, T4L, anticorpos anti-Tg e anticorpos anti-TPO em 3 grupos.

	CTL	HTT-at	HTT-out	Sig.
<b>TSH (mUI/L)</b>	2.35 (1.34-4.20)	1.54 (0,85-2.08)	7.06 (5.55-12.82)	0.018
<b>T4L (ng/dL)</b>	1.22 (1.06-1.33)	1.20 (1.15-1.38)	1.29 (1.21-1.33)	0.593
<b>Anti_Tg (UI/L)</b>	9.00 (9.00-10.20)	346.1 (51.3-512.4)	311.6(148.4-515.6)	0.024
<b>Anti-TPO (UI/L)</b>	8.80 (4.00-32.41)	326.2 (143.1-532.2)	417.6 (382.0-600.0)	0.025

CTL: Indivíduos Controle; HTT-at: Indivíduos com eutireoidismo com tratamento adequado; HTT-out: Indivíduos com hipotireoidismo com tratamento inadequado; TSH: *Thyroid-Stimulating Hormone*; T4L: Tiroxina livre; Anti-Tg: Anticorpos anti-tireoglobulina; Anti-TPO: Anticorpos anti-tireoperoxidase. Referências: TSH (0,27-4,20mUI/L), T4L (0,93-1,70ng/dL), Anti-Tg (menor que 115UI/L), e Anti-TPO (menor que 34UI/L).

### 3.1.5 Extração de RNA total e realização do transcriptoma

O RNA total foi extraído a partir do sangue periférico e foi extraído pelo kit PAXgene Blood RNA extraction® (Qiagen, NL, DE) seguindo o protocolo do fabricante (Apêndice 5).

Para o sequenciamento foi utilizado o equipamento Ion Proton™ System (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), mediante aos protocolos Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression® Kit, pelo catálogo número: A26325, A26326 e A26327.

As etapas de realização do transcriptoma, quantificação de RNA total, síntese de cDNA, amplificação das sequências-alvo, preparo das sequências iniciadoras, ligação dos barcodes aos amplicons, purificação da biblioteca, qPCR (Quantificação das bibliotecas), PCR de emulsão, hibridização das beads magnéticas e preparo dos chips estão detalhadas no Apêndice 6. Todo o material constituído nesse protocolo está armazenado em nossa biblioteca, assim como, as amostras estão armazenadas em nossa soroteca em freezer -80°C.

### 3.1.6 Hipotireoidismo induzido por cloridrato de amiodarona

Ao avaliarmos os transcritos verificamos alguns genes associados a amiodarona, e como o tecido cardíaco é um dos nossos alvos, resolvemos investigar esses genes.

O cloridrato de amiodarona é um fármaco que foi introduzido na cardiologia clínica em meados de 1960 como agente antianginoso. Subsequentemente, ele foi consagrado como antiarrítmico com alta concentração de iodo benzofurânico<sup>[183,184]</sup>. A estrutura química do cloridrato de amiodarona é muito semelhante a estrutura dos hormônios tireoidianos, principalmente quando notamos a presença de dois átomos de iodo no anel benzênico. Trata-se de um fármaco amplamente lipofílico de meia-vida longa, cerca de cem dias<sup>[185,186]</sup>.

Os efeitos adversos do cloridrato de amiodarona são observados com alterações importantes no TSH sérico, T<sub>4</sub>L e T<sub>3</sub> por mecanismos não elucidados totalmente até o momento, mas que podem ocasionar o hipotireoidismo induzido<sup>[187]</sup>. A alta concentração de iodo presente no fármaco poderá influenciar a função tireoidiana, mas tal fato é insuficiente para explicar o indício de anormalidades observados nos testes da função tireoidiana<sup>[188]</sup>. Aditivamente, o cloridrato de amiodarona e seus metabólitos exercem um efeito citotóxico no tecido da tireoide,

provocando a tireotoxicose. Evidentemente, o uso desta terapia de forma crônica pode gerar anormalidades na função tireoidiana, o que evidencia a necessidade da monitorização das concentrações séricas dos hormônios tireoidianos, e quando necessário o tratamento do hipotireoidismo com a reposição de levotiroxina [189-193].

### 3.2 ETAPA 2 – VALIDAÇÃO DOS GENES

Os grupos para a construção do transcriptoma representados na Figura 4, foram validados gerando as informações da Tabela 4.

**Tabela 4.** Perfil de estudo de indivíduos para a análise de validação por PCR-RT.

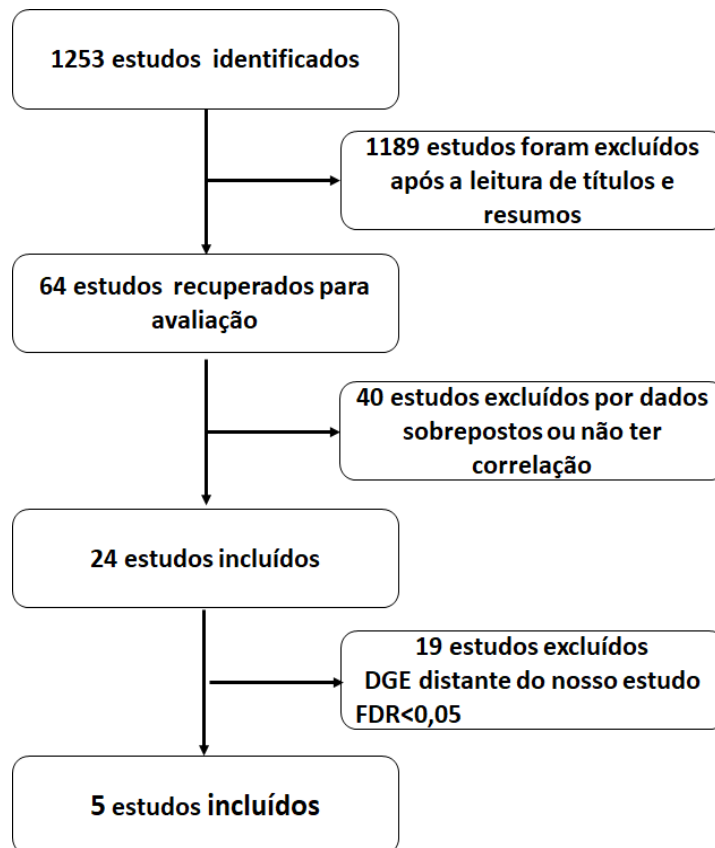
LT4	IDADE	SEXO	TSH	T4L	Anti-Tg	Anti-TPO
n	61	F	20,19	0,73	10,00	7,08
n	40	F	9,89	0,90	10,00	10,73
n	72	F	7,88	1,38	10,00	15,21
n	60	F	7,80	0,98	311,40	47,92
n	23	F	7,66	0,99	205,90	5,00
n	24	F	7,04	1,22	10,00	5,00
n	56	M	6,67	1,13	12,93	6,83
n	65	F	5,58	1,02	412,50	151,80
n	58	M	3,26	1,00	10,00	5,00
n	43	M	3,07	1,06	10,00	5,00
n	22	M	2,68	1,21	10,00	5,00
n	24	F	1,74	1,03	10,00	5,00
n	34	F	1,72	1,27	10,83	5,00
n	33	F	1,68	1,11	10,00	5,00
n	29	M	1,42	1,25	10,00	5,00
s	45	F	12,82	1,21	515,60	382,00
s	21	M	9,93	1,06	793,40	600,00
s	53	M	5,87	1,28	148,40	600,00
s	47	M	3,76	1,61	10,00	5,00
s	31	F	3,56	1,77	63,27	515,80
s	56	F	3,17	1,07	950,30	600,00
s	55	F	3,14	1,11	38,50	600,00
s	65	F	2,47	1,31	46,44	600,00
s	23	F	2,41	1,20	10,00	21,59
s	41	F	1,78	1,41	10,00	13,13
s	28	F	1,59	1,61	14,69	19,25
s	49	F	1,25	1,47	18,74	42,34
s	66	F	1,04	1,58	12,13	52,90
s	57	F	0,18	1,88	298,60	481,90
s	58	F	0,02	2,02	495,80	235,00

### 3.3 ETAPA 3 – VALIDAÇÃO PELOS BANCOS

Para os transcriptomas externos utilizamos o pacote limma<sup>[194]</sup>.

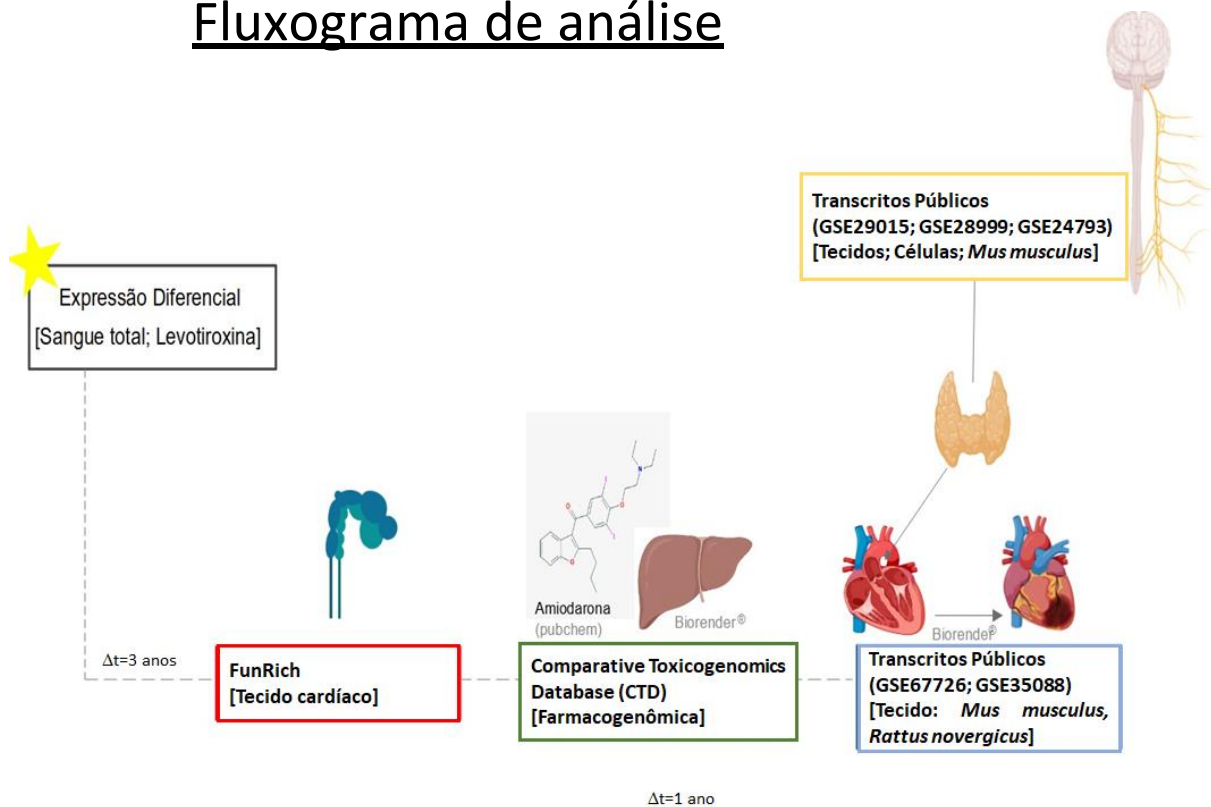
Encontramos inicialmente, representados na Figura 5, 1.253 estudos identificados quando eu utilizei essas palavras-chave: hipotireidismo, coração, cérebro, bipolar, ansiedade, arritmia, venoso, hipertensão e tireoide, sendo que após exclusões com leitura do título e resumos, dados que não tinham correlação e eram sobrepostos. Incluímos 24 estudos relevantes e muito interessantes. Incluímos 5 estudos, considerando os estudos que tinham mais relação com o tecido (cérebro e coração) e com tecido afetado pelo hormônio tireoidiano.

**Figura 5.** Fluxograma de buscas de Bancos externos de transcriptomas.



No estudo GSE67726 utilizamos  $FDR < 0.05$  e Fold Change maior ou menor do que 2.

## Fluxograma de análise



**Figura 6.** Análise de dados dos meus Bancos e dos conjuntos de dados.

### 3.4 DADOS GENÔMICOS

Após a detecção dos genes diferencialmente expressos, realizamos o cruzamento de bancos de dados com as nossas informações para detectar padrões – prática conhecida como enriquecimento. Para montagem das matrizes de network com os genes em comum, utilizamos o ToppCluster <sup>[195]</sup>. Para a construção gráfica fizemos uso do Cytoscape v.3.8.2 <sup>[196]</sup>. As ferramentas e o seu papel no estudo após a detecção dos genes diferencialmente expressos estão especificadas na Tabela 5.

**Tabela 5.** Resumo das ferramentas utilizadas no estudo para anotação e enriquecimento dos resultados.

BASE DE DADOS	DESCRIÇÃO	DISPONIBILIDADE
Functional Enrichment Analysis Tool (FUNRICH)	Plataforma que possui um banco manualmente acurado; Capacidade de enriquecimento e síntese de gráficos. Extraímos genes presentes em coração e integrinas	Aplicativo Desktop Windows <a href="http://www.funrich.org/">http://www.funrich.org/</a> [197]
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	Informações individuais de cada gene e confirmação dos tecidos de expressão	Browser <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/</a>
DisGeNET	Relação gene-doença. Classificação de doenças relacionadas ao coração ou cérebro.	Browser <a href="https://www.disgenet.org/">https://www.disgenet.org/</a> [198]
Comparative Toxicogenomics Database (CTD)	Identificação dos genes relacionados com amiodaroma e tiroxina.	Browser <a href="http://ctdbase.org/">http://ctdbase.org/</a> [199]
GEO DataSets	Base contendo dados públicos de diversas tecnologias de sequenciamento de nova e antigas gerações	Browser <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds</a>

### 3.5 BIOINFORMÁTICA

A análise *in silico* foi feita usando programas de bioinformática em que os dados foram gerados pelo Ion Proton™ System (*Thermo Fisher, MA, USA*), gravados em arquivos de extensão BAM (Binary Alignment Map), e arquivados por upload no servidor online do fabricante *Thermo Fisher* e localmente em *Hard Disks (HD)* externos.

As análises dos dados foram realizadas pelo programa R 4.0.2 [200], com o pacote adicional para análise de expressão diferencial gênica EdgeR (Robinson, MD, and Smyth, GK (2008) [201] disponível pela Bioconductor Open Source Software for Bioinformatics (<http://bioconductor.org/>). As conversões dos arquivos BAM originalmente gerados na plataforma NGS estavam alinhados para o RefSeq (NCBI), nós convertemos o arquivo para FASTQ através da função *fastq* disponível no

programa Samtools v1.7 <sup>[202]</sup> em ambiente Linux sob a distribuição Debian 9. Os FASTQ foram alinhados para Hg38 utilizando como referência o arquivo *Genome sequence, primary assembly* elaborado e mantido pelo projeto GENCODE <sup>[203]</sup>. A anotação foi realizada utilizando o sistema ensembl.

O alinhamento foi realizado com o STAR com os seus parâmetros padrões <sup>[204]</sup>. Os *reads* foram obtidos através da função `--quantMode GeneCounts`. A matriz resultante possuía 60.609 transcritos. No R, construímos uma matriz de contraste e filtramos contagens baixas com a função `FilterByExpr()` utilizando os critérios padrões. A normalização foi conduzida por *Trimmed Of Mean* (TMM). Para testar a nossa hipótese, utilizamos o *Likelihood Ratio Test* (LTR) com  $FDR < 0,05$ .

### 3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As variáveis contínuas serão apresentadas como valores medianos, mínimos e máximos. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para comparar os valores entre os grupos. A correlação entre os transcritos, dados laboratoriais e cognitivos serão realizados com o método de *Spearman*. Os dados foram analisados pelo IBM SPSS *Statistics* (versão 23.0 Armonk, NY: IBM Corp., EUA). Foi realizada uma correlação pearson pelo pacote `corrplot` (<https://github.com/taiyun/corrplot>). Para todas as análises, foi significativa um  $p < 0,05$ .

## 4.0 RESULTADOS

A partir dos resultados bioquímicos, iniciamos as análises qualitativas e quantitativas para a identificação de genes diferencialmente expressos nas bibliotecas dos grupos Controle (CTL) e com eutireoidismo com tratamento adequado (HTT-at).

Foi realizada a análise do transcriptoma dos 2 grupos (CTL vs HTT-at) e nos apontou o DGE com 199 transcritos diferencialmente expressos, em que 89 apresentam ganho de expressão e 110 apresentam perda de expressão. Este DGE encontra-se anotado no Anexo 1.

Para entender melhor os principais padrões de expressão gênica, seguimos com as análises do DGE com 199 transcritos com a classificação dos genes relacionados a fisiologia tireoidiana. Assim como, genes relacionados a fisiologia cardíaca e a fisiologia cerebral, relacionando os seus sítios de expressão, respectivamente. Ao mesmo tempo, identificamos os genes correlacionados com a amiodarona. Estas análises estão apresentadas a seguir nos grupos CTL vs.HTT-at (dentro do alvo terapêutico) e CTL vs HTT-out (fora do alvo terapêutico), nas Etapas 1, 2 e 3, conforme descritas no Material e Métodos.

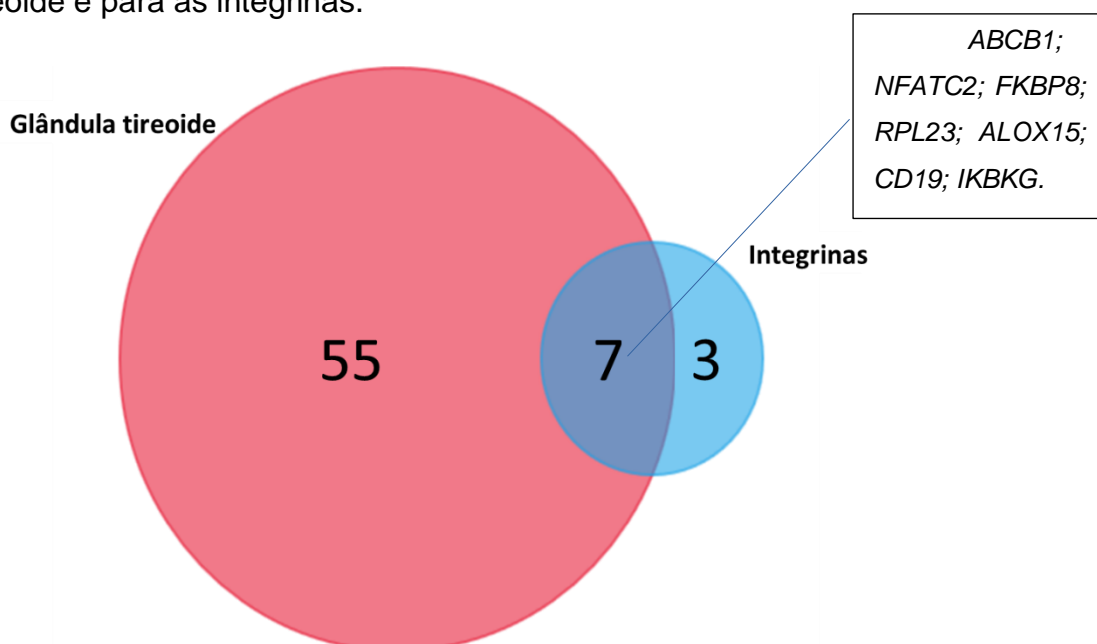
### ETAPA 1 – Seleção dos genes

Iniciando com a Etapa 1, explorando o DGE de 199 transcritos, observamos na análise de mecanismos biológicos 10 genes correlacionados com as integrinas. Destes 10 genes, 7 genes apresentaram ganho de expressão e 3 genes apresentaram perda de expressão, descritos na Tabela 6.

**Tabela 6.** Genes correlacionados com Integrinas em análise de mecanismos biológicos. Genes destacados possuem expressão na tiroide. CTL: Indivíduos Controle; HTT-at: Indivíduos com eutireoidismo com tratamento adequado; HTT-out: Indivíduos com hipotireoidismo com tratamento inadequado; LogFC: *Log Fold Change*.

Gene	logFC CTL vs HTT-at	LogFC CTL vs HTT-out	Descrição
<b>ABCB1</b>	2,47	3,03	<i>ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1</i>
<b>FKBP8</b>	2,39	-0,89	<i>FK506 binding protein 8, 38kDa</i>
<b>NFATC2</b>	2,20	-1,09	<i>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2</i>
<b>KIR3DL1</b>	1,82	-0,23	<i>killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 1</i>
<b>CXCL8</b>	1,81	0,64	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 8</i>
<b>RPL23</b>	0,59	2,26	<i>ribosomal protein L23</i>
<b>FZD5</b>	0,29	-1,64	<i>frizzled class receptor 5</i>
<b>IKBKG</b>	-0,40	-1,28	<i>inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma</i>
<b>ALOX15</b>	-0,74	-1,81	<i>arachidonate 15-lipoxygenase</i>
<b>CD19</b>	-2,31	-2,82	<i>CD19 molecule</i>

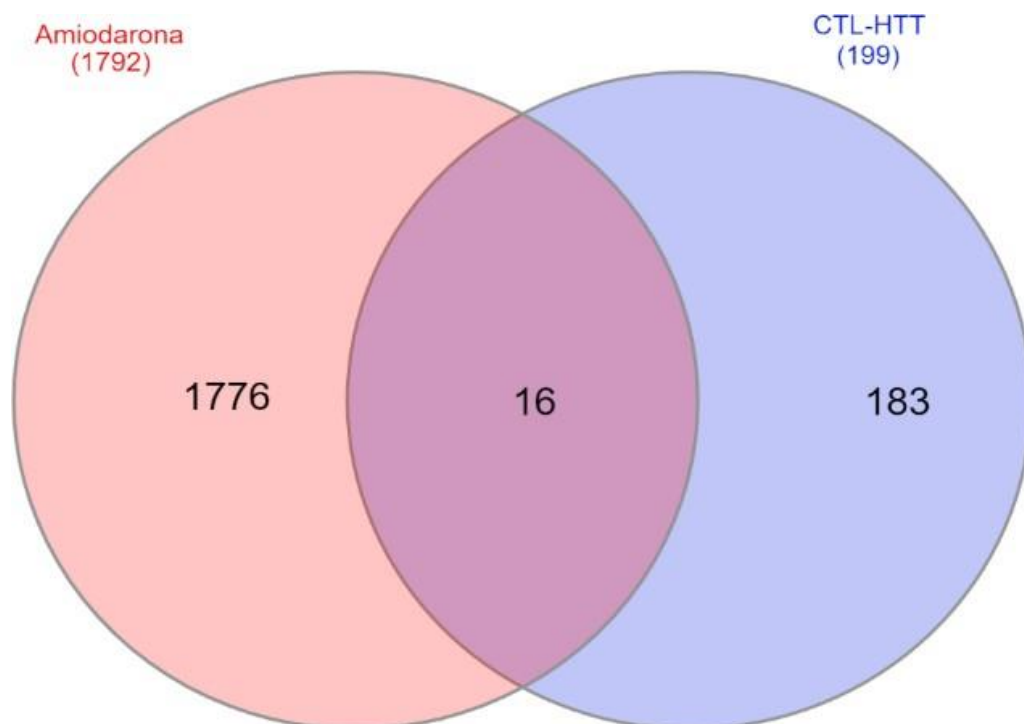
Seguindo as análises com as integrinas, verificamos a relação pelo diagrama de Venn dos 10 genes com o sítio de expressão da glândula tiroide apresentado na Figura 7. A base acurada do FunRich foi usada para a o sitio de expressão na glândula tiroide e para as integrinas.



**Figura 7.** Conjunto de genes expressos na glândula tiroide e integrinas.

O diagrama de Venn demonstrou os genes expressos na glândula tireoide e integrinas, entre o total do grupo vermelho representando os 62 genes expressos na glândula tireoide e o grupo azul representando os 10 genes de integrinas, podemos observar que na interseção existem 7 genes em comum que fazem parte das integrinas e estão expressos na glândula tireoide, sendo eles: **ABCB1; NFATC2; FKBP8; RPL23; ALOX15; CD19; IKBKG**.

A seguir, partindo da análise do DGE de 199 transcritos, encontramos 16 genes que foram correlacionados com a Amiodarona demonstrados na Figura 8.



**Figura 8.** Representação de genes relacionados com amiodarona.

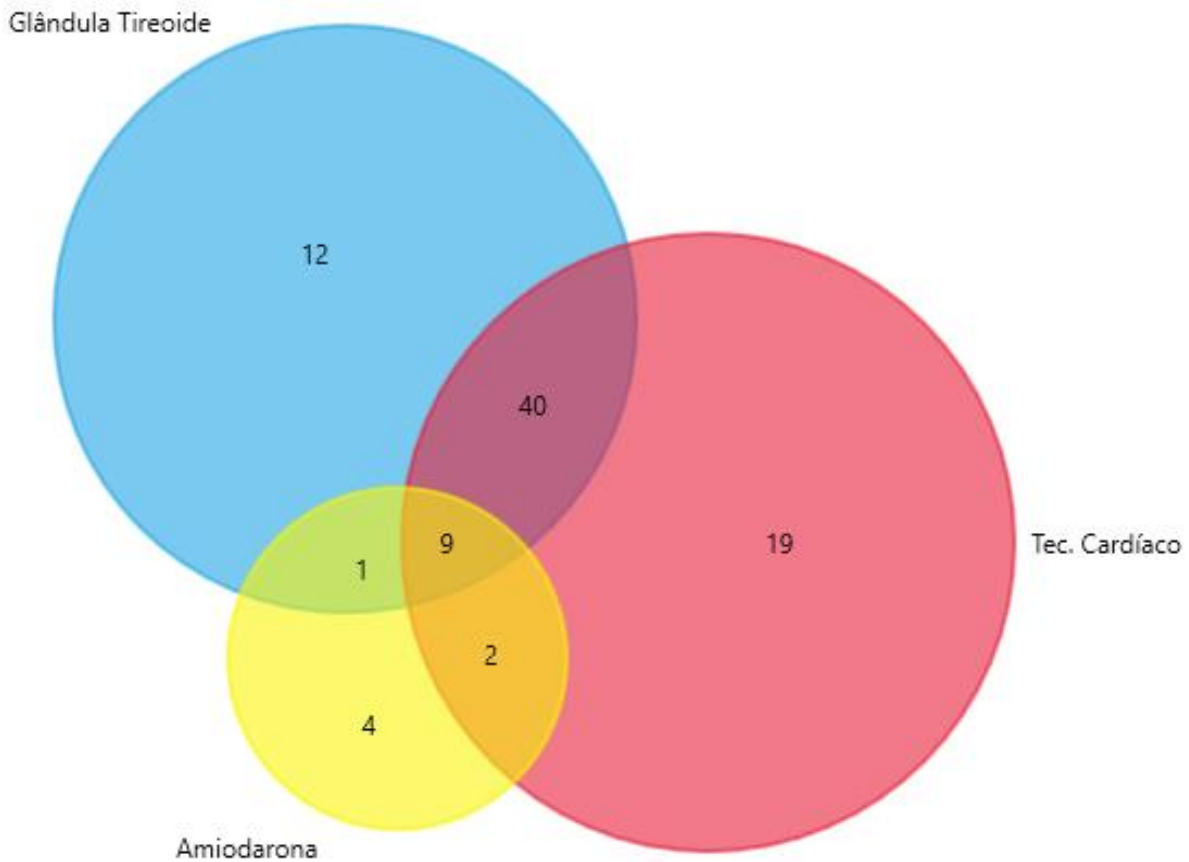
O diagrama de Venn representa os genes expressos no DGE e amiodarona, em vermelho, estão os genes presentes no banco de dados do CTD e o grupo azul representa os genes que identificamos pelo sangue total.

Podemos observar pela intersecção 16 genes em comum. Destes 16 genes, 8 genes apresentam ganho de expressão e 8 genes apresentam perda de expressão, representados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Genes do DGE total correlacionados com a amiodarona. CTL: Indivíduos Controle; HTT-at: Indivíduos com eutireoidismo com tratamento adequado; HTT-out: Indivíduos com hipotireoidismo com tratamento inadequado; LogFC: *Log Fold Change*.

Gene	logFC CTL vs HTP-at	logFC CTL vs HTP-out	Efeito da Amiodarona	Desfecho	Citação
<i>SLC4A4</i>	6,72	1,80	Aumento de expressão	Esteatose Hepática	Arch Toxicol. 2014 Aug;88(8):1573-88.
<i>ABCB1</i>	2,47	3,03	Expressão alterada	Fosfolipidose	Toxicol Appl Pharmacol. 2008 Jun 15;229(3):290-9.
<i>TNNT1</i>	2,21	0,21	Aumento da Expressão	X	X
<i>CXCL8</i>	1,81	0,64	[Desetilamiodarona: IL-8] Aumento da expressão	Reação imune ativada por mecanismo metabólico	Drug Metab Pharmacokinet. 2012;27(6):621-30.
<i>ANK1</i>	1,38	-3,64	Expressão alterada	Embrião de Zebrafish; Hepatotoxicidade	Toxicol Lett. 2014 Oct 1;230(1):48-56.
<i>KRT23</i>	0,86	-2,05	Aumento da expressão	Esteatose Hepática	Arch Toxicol. 2014 Aug;88(8):1573-88.
<i>RPL23</i>	0,59	2,26	Expressão alterada	Coagulopatia	J Toxicol Sci. 2009 Jun;34(3):281-93.
<i>TRIM61</i>	0,43	-1,24	Aumento da expressão	Seletividade para células tronco neurais	PLoS One. 2009;4(9):e7155.
<i>HBB</i>	-0,09	-1,38	Expressão alterada	Coagulopatia	J Toxicol Sci. 2009 Jun;34(3):281-93.
<i>RPS3A</i>	-0,24	-1,74	Expressão Alterada	Coagulopatia	J Toxicol Sci. 2009 Jun;34(3):281-93.
<i>DBI</i>	-0,84	-2,26	Expressão Alterada	Coagulopatia	J Toxicol Sci. 2009 Jun;34(3):281-93.
<i>NPRL3</i>	-0,95	1,34	Expressão Alterada	Embrião de Zebrafish; Hepatotoxicidade	Toxicol Lett. 2014 Oct 1;230(1):48-56.
<i>TMCC2</i>	-1,90	-2,34	Aumento da expressão	Seletividade para células tronco neurais	PLoS One. 2009;4(9):e7155.
<i>SLC66A2</i>	-1,98	-2,43	Expressão Alterada	Coagulopatia	J Toxicol Sci. 2009 Jun;34(3):281-93.
<i>CMBL</i>	-2,72	-3,23	Expressão Alterada	Células tronco neurais; Coagulopatia; Hepatotoxicidade	PLoS One. 2009;4(9):e7155.; J Toxicol Sci. 2009 Jun;34(3):281-93.; Toxicol Lett. 2014 Oct 1;230(1):8-56.
<i>RNF19A</i>	-6,79	-6,77	Aumento da expressão	Seletividade para células tronco neurais	PLoS One. 2009;4(9):e7155.

Em seguida, fizemos a comparação dos 70 genes expressos no tecido cardíaco com os 16 genes regulados pela amiodarona e os genes expressos na glândula tireoide, representados na Figura 9.



**Figura 9.** Identificação dos genes em comum com a amiodarona, tecido cardíaco e glândula tireoide

Podemos observar pelo diagrama a intersecção de 11 genes com intersecção em amiodarona e expressos no tecido cardíaco. Dos quais, consideramos 9 genes em comum com amiodarona, expressos em tecido cardíaco e glândula tireoide.

Progredindo com as análises, localizamos os principais sítios de expressão dos 199 genes em tecido cardíaco, que nos revelou 70 genes expressos no tecido cardíaco relacionados no Anexo 2.

Em seguida, estes 70 genes expressos no tecido cardíaco foram classificados quanto as suas funções, e notamos 31 genes correlacionados com doenças cardiovasculares.

**Tabela 8.** Genes expressos no tecido cardíaco e doença cardiovascular.

Gene	logFC CTL vs HTP-at	logFC CTL vs HTP-out	Descrição
<i>SLC4A4</i>	6,72	1,80	solute carrier family 4 (sodium bicarbonate cotransporter), member 4
<i>ABCB1</i>	2,47	3,03	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1
<i>ZNF208</i>	2,34	0,29	zinc finger protein 208
<i>TNNT1</i>	2,21	0,21	troponin T type 1 (skeletal, slow)
<i>NFATC2</i>	2,20	-1,09	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2
<i>COX7C</i>	1,82	-1,46	cytochrome c oxidase subunit VIIc
<i>SLC29A1</i>	1,64	-0,24	solute carrier family 29 (equilibrative nucleoside transporter), member 1
<i>GSTM1</i>	1,52	0,10	glutathione S-transferase mu 1
<i>ANK1</i>	1,38	-3,64	ankyrin 1, erythrocytic
<i>ISG15</i>	1,38	-0,06	ISG15 ubiquitin-like modifier
<i>RPL27</i>	0,66	-2,01	ribosomal protein L27
<i>C1orf21</i>	0,61	-2,10	chromosome 1 open reading frame 21
<i>RPL23</i>	0,59	2,26	ribosomal protein L23
<i>CXCR6</i>	0,31	-1,38	chemokine (C-X-C motif) receptor 6
<i>RPS27</i>	-0,09	-0,82	ribosomal protein S27
<i>HBB</i>	-0,09	-1,38	hemoglobin, beta
<i>PDCD6IP</i>	-0,16	-1,52	programmed cell death 6 interacting protein
<i>LY6E</i>	-0,20	-2,37	lymphocyte antigen 6 complex, locus E
<i>RPS3A</i>	-0,24	-1,74	ribosomal protein S3A
<i>IKBKG</i>	-0,40	-1,28	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma
<i>ALOX15</i>	-0,74	-1,81	arachidonate 15-lipoxygenase
<i>FMN1</i>	-0,81	-1,65	formin 1
<i>DBI</i>	-0,84	-2,26	diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-CoA binding protein)

<i>PLB1</i>	-0,85	-1,79	phospholipase B1
<i>TRPM2</i>	-0,90	-2,7	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2
<i>KANK2</i>	-1,16	0,52	KN motif and ankyrin repeat domains 2
<i>GUK1</i>	-1,30	-2,07	guanylate kinase 1
<i>IL5RA</i>	-1,42	1,74	interleukin 5 receptor, alpha
<i>CD19</i>	-2,31	-2,82	CD19 molecule
<i>ARG2</i>	-2,55	0,14	arginase 2
<i>RNF19A</i>	-6,79	-6,77	ring finger protein 19A, RBR E3 ubiquitin protein ligase

CTL: Indivíduos Controle; HTT-at: Indivíduos com eutireoidismo com tratamento adequado; HTT-out: Indivíduos com hipotireoidismo com tratamento inadequado; LogFC: *Log Fold Change*.

Destes 31 genes, 14 genes apresentam ganho de expressão e 17 genes apresentam perda de expressão.

Continuamos as análises com os 31 genes classificando as doenças cardiovasculares que possuem influência do hipotireoidismo. Estas doenças estão classificadas conforme a Tabela 9.

**Tabela 9.** Resumo de doenças cardiovasculares repercutidas no hipotireoidismo.

<b>Doença Cardiovascular</b>	<b>Genes [DISGENET]</b>
Hipertensão	<i>HBB; SLC4A4; IL5RA; SLC29A1; DBI; GSTM1; ABCB1; RNF19A; NFATC2; CXCR6.</i>
Doença Vascular Venosa	<i>RPS3A; PLB1; CD19; ISG15; IKBKG; ANK1; RNF19A; ARG2; PDCD6IP; KANK2; CXCR6.</i>
Infarto Agudo do Miocárdio	<i>RPL23.</i>
Pressão Arterial Sistólica	<i>SLC4A4; ALOX15; PLB1; FMN1; GSTM1; ABCB1; RNF19A; TRPM2.</i>
Arritmia Cardíaca	<i>C1orf21.</i>
	<i>RPL27; ABCB1; RPS27; COX7C.</i>

Avançando com as análises, localizamos os principais sítios de expressão dos genes do DGE de sangue total no tecido cerebral e encontramos 90 genes expressos. Dentre os 90 genes expressos no tecido cerebral, 40 genes apresentaram ganho de expressão e 50 genes apresentaram perda de expressão, apresentados no Anexo 3.

Com base nos 90 genes expressos no tecido cerebral, identificamos 71 genes correlacionados a doença do sistema nervoso central e desordem mental. Destes 71 genes, selecionamos apenas os genes associados à depressão, transtorno bipolar, desordem cognitiva, transtorno de memória, desabilidade intelectual e ansiedade, totalizando 38 genes, apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Apresentação de genes expressos em tecido cerebral e que estão associados a depressão, transtorno bipolar, desordem cognitiva, transtorno de memória, desabilidade intelectual e ansiedade.

<b>Doença associada</b>	<b>Genes [DISGENET]</b>
Depressão	<i>IFI44; IFI27; ANK1; RNF19A; EEF1B2; GSTM1; NRGN; DBI; KANK2; MARCKS; IFI6; TRPM2; LY6E; ISG15; ABCB1; HLA-B; IFIT3; IMPA2; S100A8; UQCRB; MAN1B1; HBB; GPR162.</i>
Transtorno de Ansiedade	<i>DBI; KANK2; ALOX15; ABCB1; HLA-B.</i>
Desordens cognitivas	<i>RNF19A; NFATC2; TMTC1; ALOX15; PLB1; FAM3B; OLIG2; IKBKG; SMPD3.</i>
Transtorno Bipolar	<i>LRRC7; GSTM1; NRGN; MARCKS; TMTC1; TRPM2; PLB1; ABCB1; IMPA2; S100A8.</i>
Transtorno de memória	<i>SLC29A1; ALOX15; IKBKG; HLA-B.</i>
Desabilidade intelectual	<i>ANK1; SPTB; SLC4A4; EEF1B2; NFATC2; LY6E; CD19; OLIG2; IKBKG; SMPD3; GUK1; ZNF513; MAN1B1.</i>

## ETAPA 2 – Validação dos genes

Selecionamos 2 genes para a validação em PCR-RT. Os quais estão apresentados na Tabela 11 com os seus respectivos dados: LogFc no grupo CTL versus HTT-at e grupo CTL versus HTT-out e descrição.

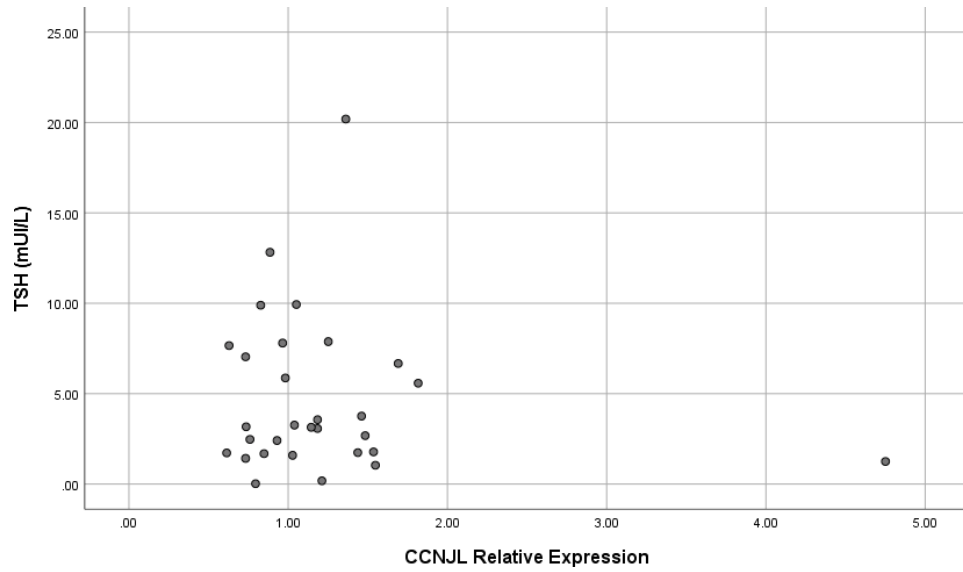
**Tabela 11.** Genes selecionados para a validação por PCT-RT.

Gene	logFC CTL vs HTT-at	logFC CTL vs HTT-out	Descrição
CXCR6	0,31	-1,38	<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 6</i>
CCNJL	-0,09	2,71	<i>cyclin J-like</i>

CTL: Indivíduos Controle; HTT-at: Indivíduos em eutireoidismo com tratamento adequado; HTT-out: Indivíduos com hipotireoidismo com tratamento inadequado; LogFC: *Log Fold Change*.

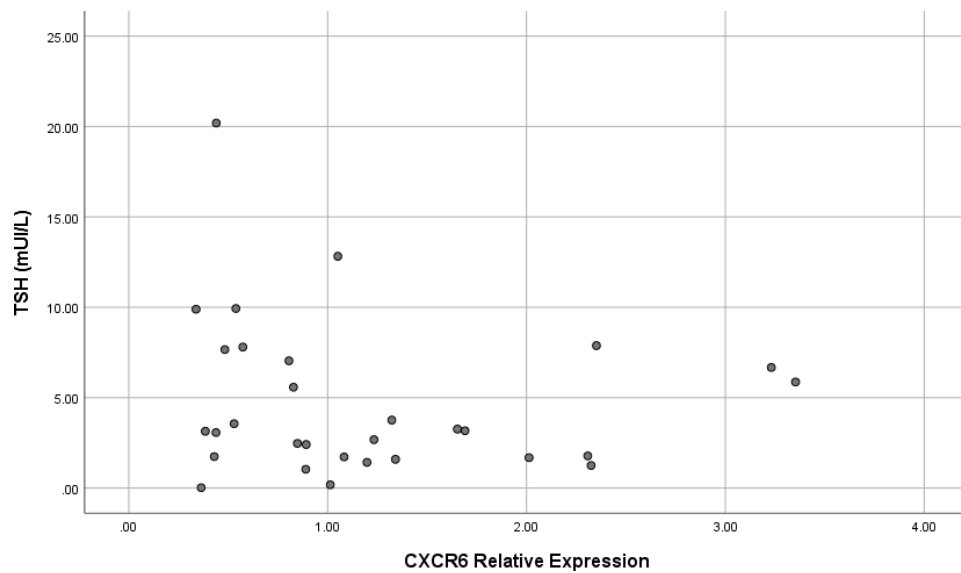
Adiante, todas as análises dos gráficos foram realizadas com a separa em dois grupos: indivíduos CTL (que não administram LT4) e indivíduos que utilizam LT4.

Os gráficos 1 e 2 demonstram a correlação entre os genes e a função tireoidiana com o TSH.

**Gráfico 1.** Correlação de *CCNJL* com TSH.

TSH: *Thyroid-Stimulating Hormone*.

Entre o *CCNJL* e o TSH não houve correlação.

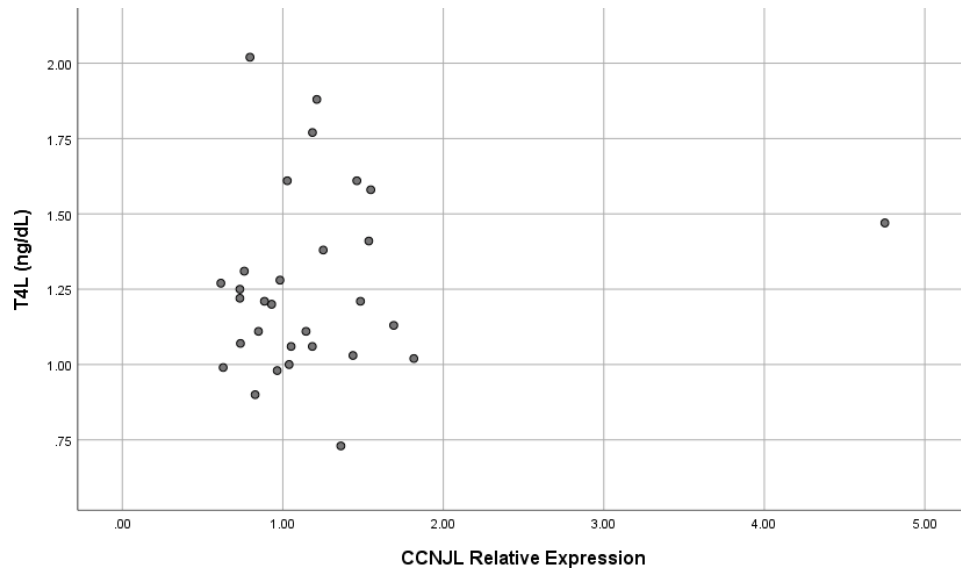
**Gráfico 2.** Correlação de *CXCR6* com TSH.

TSH: *Thyroid-Stimulating Hormone*.

Entre o *CXCR6* e o TSH houve correlação negativa.

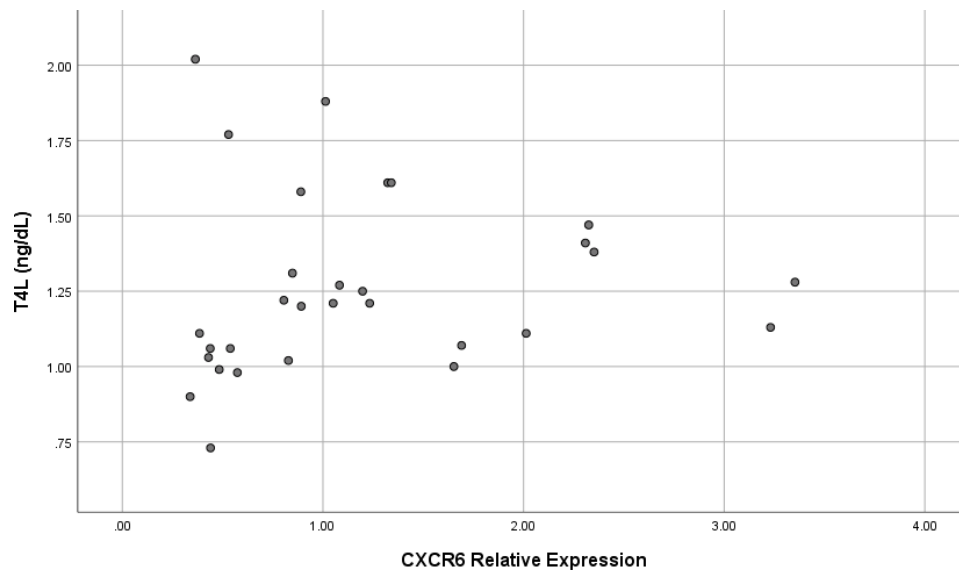
Os gráficos 3 e 4 demonstram a correlação entre os genes e a função tireoidiana com o T<sub>4</sub>L.

**Gráfico 3.** Correlação de *CCNJL* com T<sub>4</sub>L.



T<sub>4</sub>L: Tiroxina livre.

**Gráfico 4.** Correlação de *CXCR6* com T<sub>4</sub>L.



T<sub>4</sub>L: Tiroxina livre.

Correlacionamos por *Spearman* alguns parâmetros como a idade, TSH, T<sub>4</sub>L, Anti-Tg, Anti-TPO, BDI e BAI com *CCNJL* e *CXCR6*, apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12.** Correlação entre genes de validação e demais parâmetros.

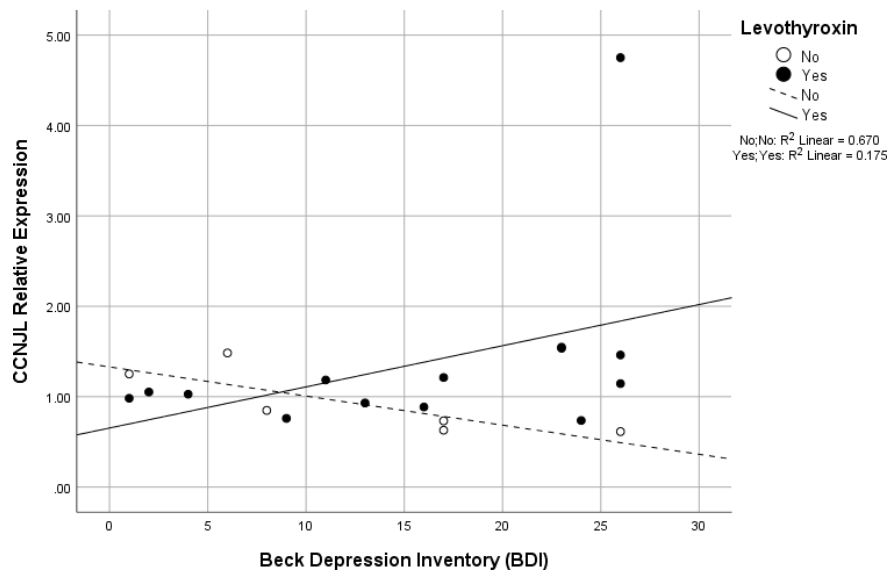
		<i>CCNJ</i>	<i>CXCR6</i>	TSH (mUI/L)	T <sub>4</sub> L (ng/dL)	AATg (UI/L)	AATPO (UI/L)	Age (years)	BDI	BAI
<b><i>CCNJ</i></b>	rs	1,000	,211	-,051	,131	-,143	,042	,327	,062	,137
	p		,264	,791	,489	,450	,825	,090	,795	,564
<b><i>CXCR6</i></b>	rs	,211	1,000	-,137	,338	-,107	-,060	,083	-,165	-,051
	p	,264		,469	,068	,574	,753	,673	,487	,830
<b>TSH (mUI/L)</b>	rs	-,051	-,137	1,000	-,575**	,090	,051	-,027	-,309	-,240
	p	,791	,469		,001	,637	,788	,892	,186	,308
<b>T<sub>4</sub>L (ng/dL)</b>	rs	,131	,338	-,575**	1,000	,091	,240	,097	,074	,284
	p	,489	,068	,001		,631	,201	,624	,756	,225
<b>Anti-Tg (UI/L)</b>	rs	-,143	-,107	,090	,091	1,000	,755**	,194	-,026	-,129
	p	,450	,574	,637	,631		,000	,323	,915	,588
<b>Anti-TPO (UI/L)</b>	rs	,042	-,060	,051	,240	,755**	1,000	,349	-,139	-,002
	p	,825	,753	,788	,201	,000		,069	,559	,994
<b>Age (years)</b>	rs	,327	,083	-,027	,097	,194	,349	1,000	,178	,382
	p	,090	,673	,892	,624	,323	,069		,465	,106
<b>BDI</b>	rs	,062	-,165	-,309	,074	-,026	-,139	,178	1,000	,686**
	p	,795	,487	,186	,756	,915	,559	,465		,001
<b>BAI</b>	rs	,137	-,051	-,240	,284	-,129	-,002	,382	,686**	1,000
	p	,564	,830	,308	,225	,588	,994	,106	,001	

TSH: *Thyroid-Stimulating Hormone*; T<sub>4</sub>L: Tiroxina livre; Anti-Tg: Anticorpos anti-tireoglobulina; Anti-TPO: Anticorpos anti-tireoperoxidase; BDI: *Beck Depression Inventory*; BAI: *Beck Anxiety Inventory*.

Identificamos que o TSH e o T<sub>4</sub>L apresentaram correlação negativa com índice de correlação de -0,575, e BDI e BAI apresentaram correlação positiva com índice de correlação de 0,686. Entre os genes de validação e demais parâmetros não houve correlação.

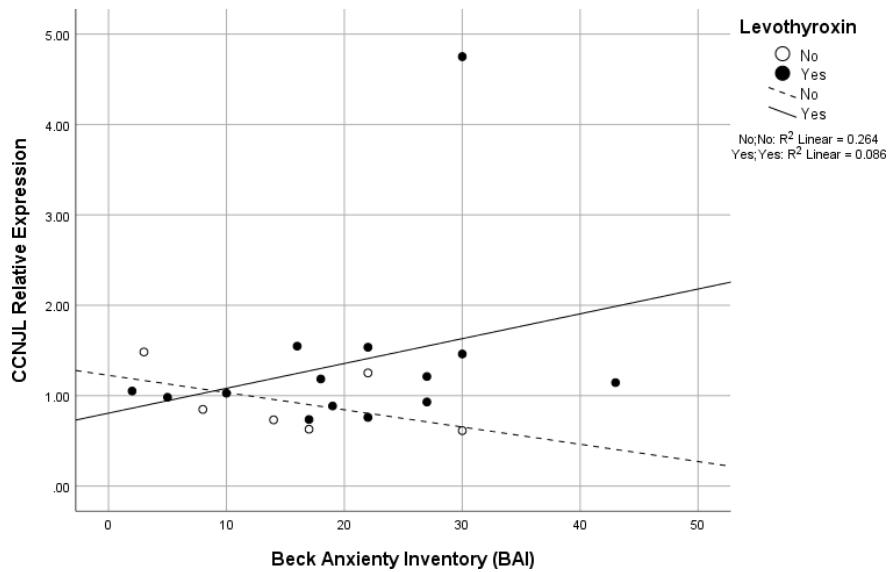
Quanto a administração de levotiroxina, avaliamos os genes de validação com BDI e BAI (Gráficos 5, 6, 7 e 8).

**Gráfico 5.** Correlação de CCNJL e BDI em relação a administração de levotiroxina.



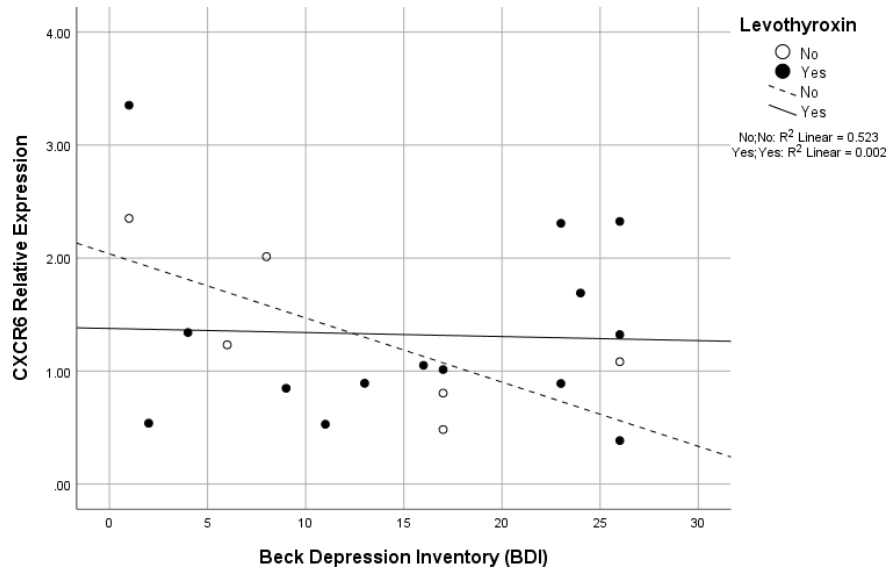
BDI: *Beck Depression Inventory*.

**Gráfico 6.** Correlação de CCNJL e BAI em relação a administração da levotiroxina.



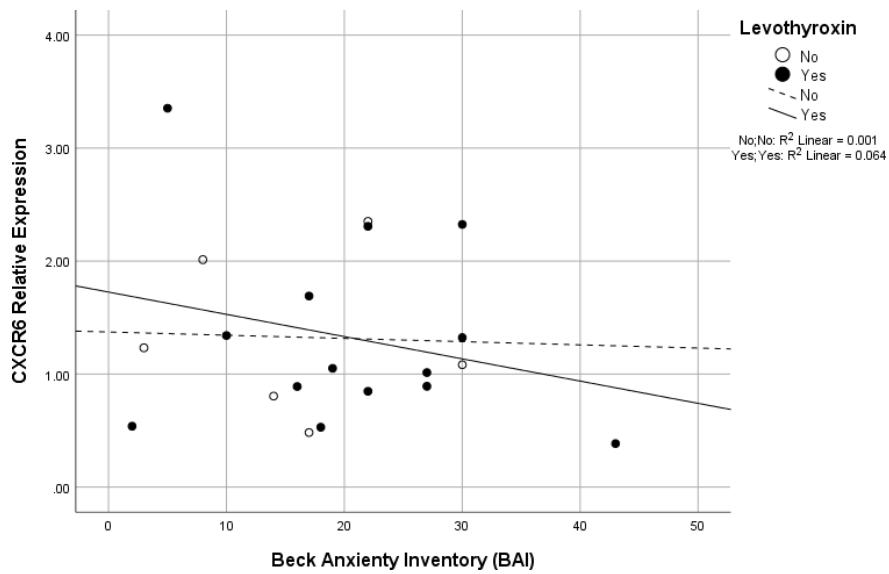
BAI: *Beck Anxiety Inventory*.

**Gráfico 7.** Correlação de CXCR6 e BDI em relação a administração da levotiroxina.



BDI: *Beck Depression Inventory*.

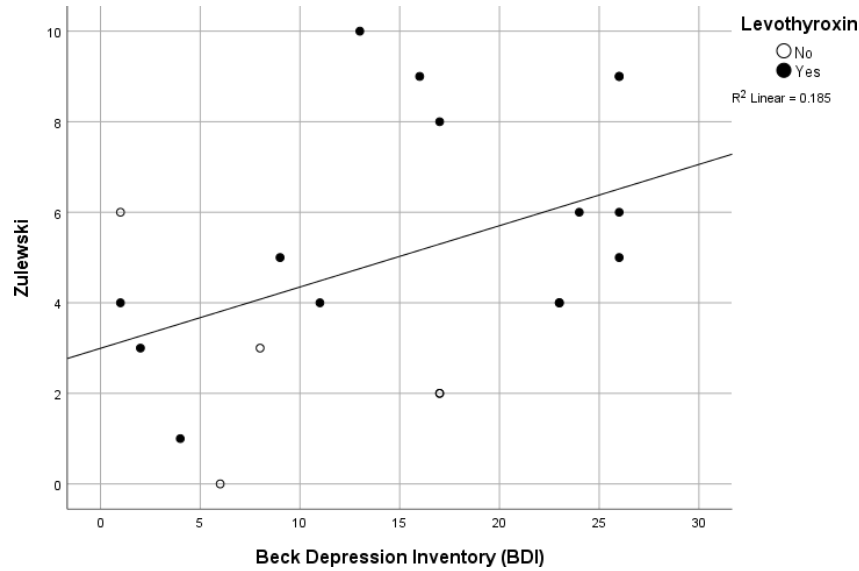
**Gráfico 8.** Correlação de CXCR6 e BAI em relação a administração da levotiroxina.



BAI: *Beck Anxiety Inventory*.

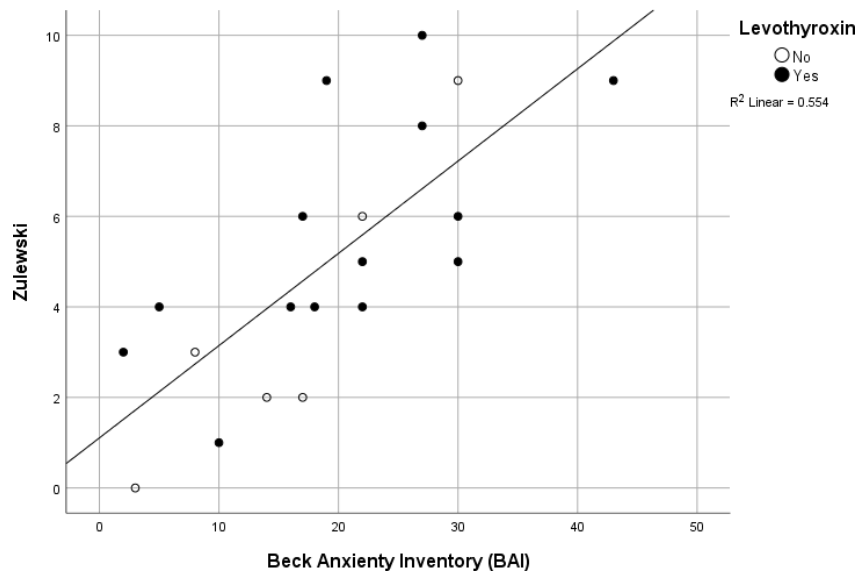
Continuando as análises com a administração de levotiroxina, avaliamos o Zulewski com BDI e BAI (Gráficos 9 e 10).

**Gráfico 9.** Correlação de Zulewski e BDI em relação a administração da levotiroxina.



BDI: *Beck Depression Inventory*.

**Gráfico 10.** Correlação de Zulewski e BAI em relação a administração da levotiroxina

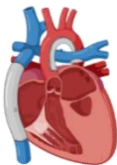
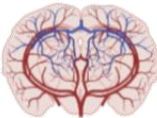


BAI: *Beck Anxiety Inventory*.

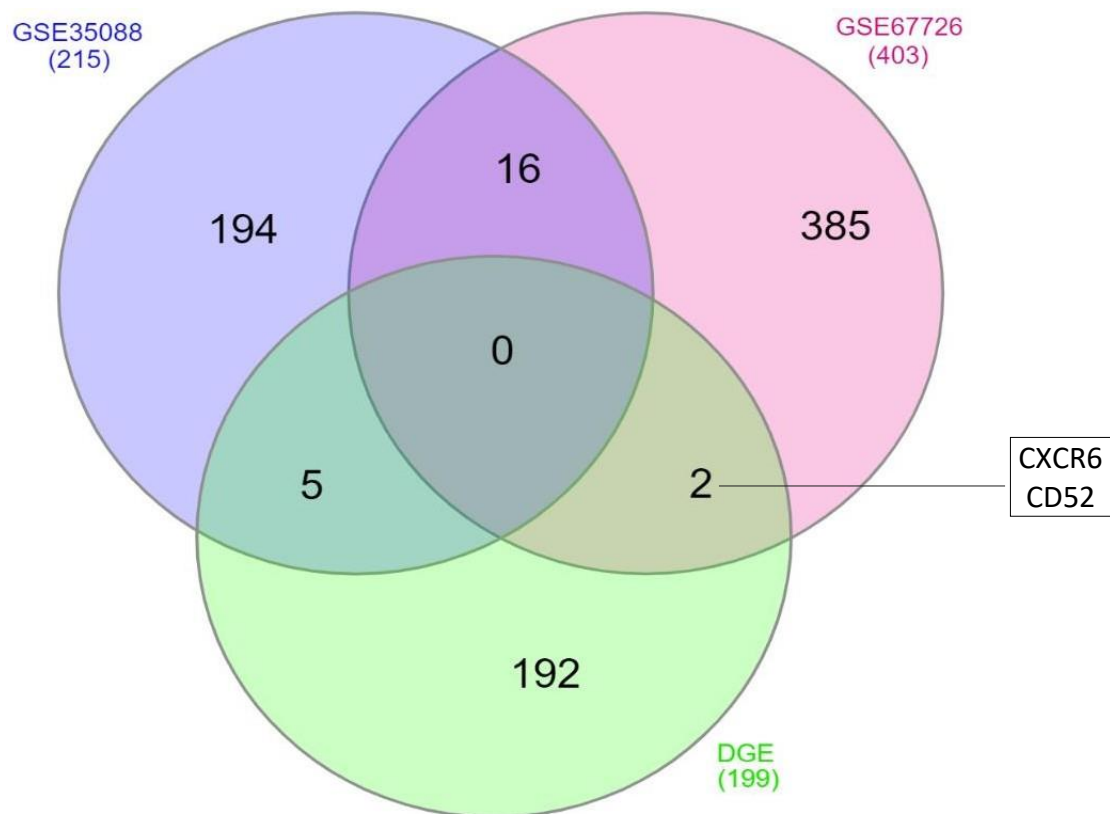
## ETAPA 3 – Validação pelos Bancos

Selecionamos 5 Bancos de dados externos para a validação, apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Banco de dados extenos de transcritos selecionados para a validação.

ID	Delineamento	Plaforma	Amostra	Desfecho
	<b>GSE35088</b> Rattus norvegicus Infarto do miocárdio – Sem tratamento vs Tratados com T4	Illumina	24	Benefício do tratamento com T4 em relação ao infarto.
	<b>GSE67726</b> Mus musculus Avaliação da função de contração cardíaca e o efeito do TR- $\alpha$ sobre o domínio Prolyl hydroxylase.	Agilent	6	TR- $\alpha$ pode auxiliar na sensibilização à hipóxia.
	<b>GSE5388</b> Homo sapiens Comparação: CTL vs Indivíduos bipolares Tratados com lítio vs Não se tratavam. Tecido cerebral pós morte.	Affymetrix Human Genome	61	Possível a desregulação da via de ubiquitinação e função sináptica possuem papel central na doença.
	<b>GSE24793</b> Mus musculus Culturas de neurônios cerebelares Recém nascidos tratadas com T3.	Affymetrix Mouse Genome	8	Sugere-se que o T3 não age de forma direta e sim de maneira indireta no desenvolvimento.
	<b>GSE28999</b> Mus musculus Comparação entre regiões do cérebro com alto vs baixo perfil de ansiedade	MP1P24K	70	Identificado 13 genes promissores para a detecção de ansiedade

Realizamos outro diagrama de Venn, dessa vez, analisando os resultados obtidos do GSE35088 e GSE67726 e buscando a sobreposição entre a espécie *Homo sapiens* (sangue total), *Rattus norvegicus*, e *Mus musculus*, onde o sequenciamento em tecido cardíaco foi realizado. As interseções estão demonstradas na Figura 10. Observamos uma interseção de no máximo 7 genes entre as espécies, sendo 5 relacionados ao infarto do miocárdio, e 2 relacionados com regulação  $\beta$ -adrenérgica.



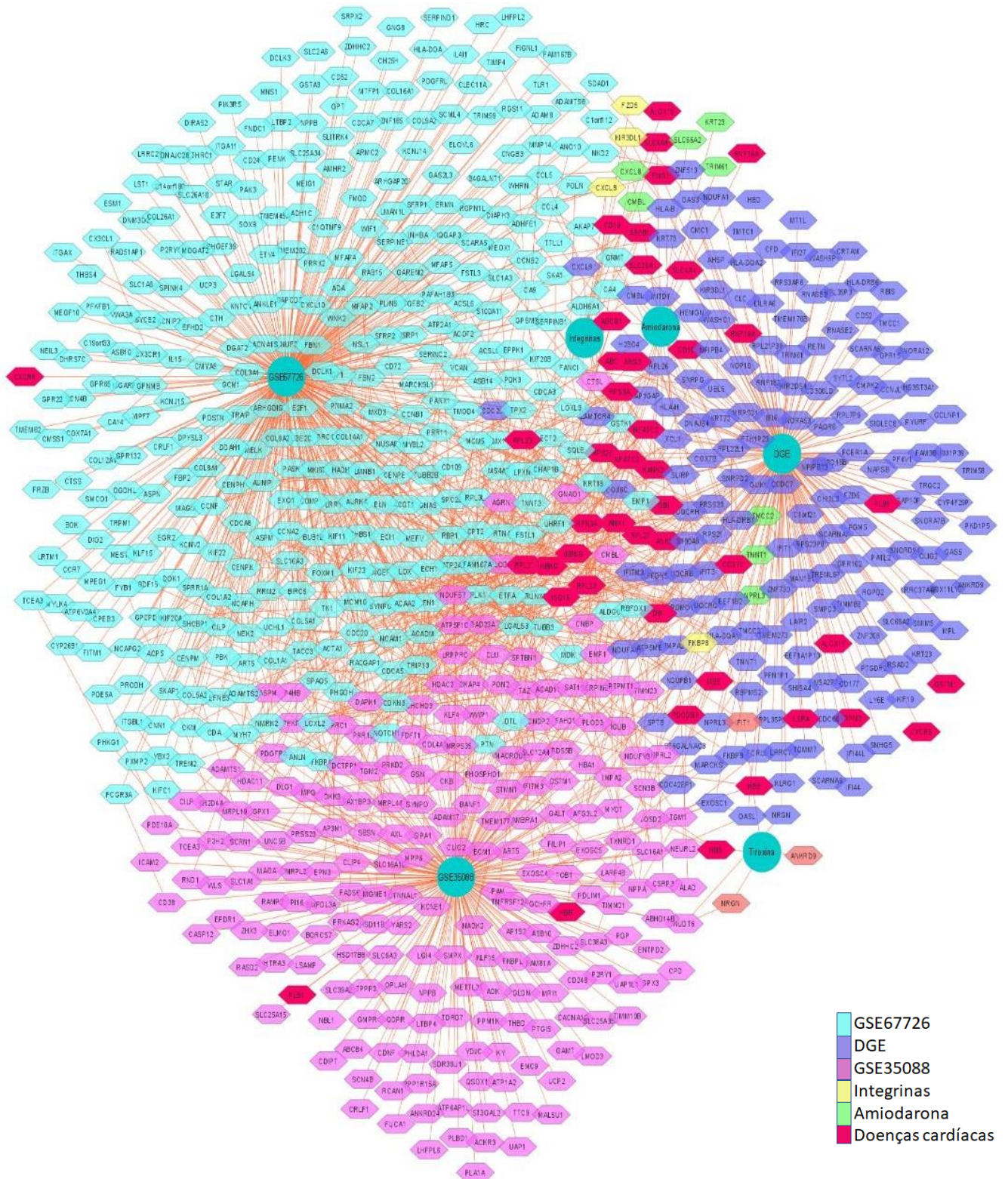
**Figura 10.** Genes expressos no tecido cardíaco e nossa população. GSE35088: regulação da expressão do hormônio tireoidiano no infarto do miocárdio; GSE67726: avalia a contribuição do hormônio tireoidiano ao estresse  $\beta$ -adrenérgico crônico.

A seguir, elaboramos uma tabela demonstrando as inversões de expressão entre as diferentes populações, com destaque para *IFITM3*, *CMBL*, *PLB1* e *CXCR6*.

**Tabela 14.** Comparação das diferenças de expressão entre o estudo em sangue total e experimentos com GSE35088 (*Mus musculus*, infarto) e GSE67726 (*Rattus norvegicus*, efeitos do hormônio tireoidiano).

Gene	(LogFC) CTL vs HTT-at	(LogFC) CTL vs HTT-out	(LogFC) Infarto vs T4	(LogFC) WT vs Knockout para PHD2/3
IFITM3	-1,43	1,89	-0,5	x
HBB	-0,09	-1,38	-0,5	x
CMBL	-2,72	-3,3	0,4	x
PLB1	-0,85	-1,79	-0,3	x
IMPA2	-2,10	1,34	0,61	x
CXCR6	0,31	-1,38	x	-2,93
CD52	-1,51	0,96	x	-2,41

Em seguida, analisamos os resultados obtidos dos bancos GSE35088 e GSE67726, e os relacionamos com a tiroxina (CTD: D013974), amiodarona (CTD: D000638) e os genes diferencialmente expressos (DGE) da nossa população. Resultando no network localizado na Figura 11.



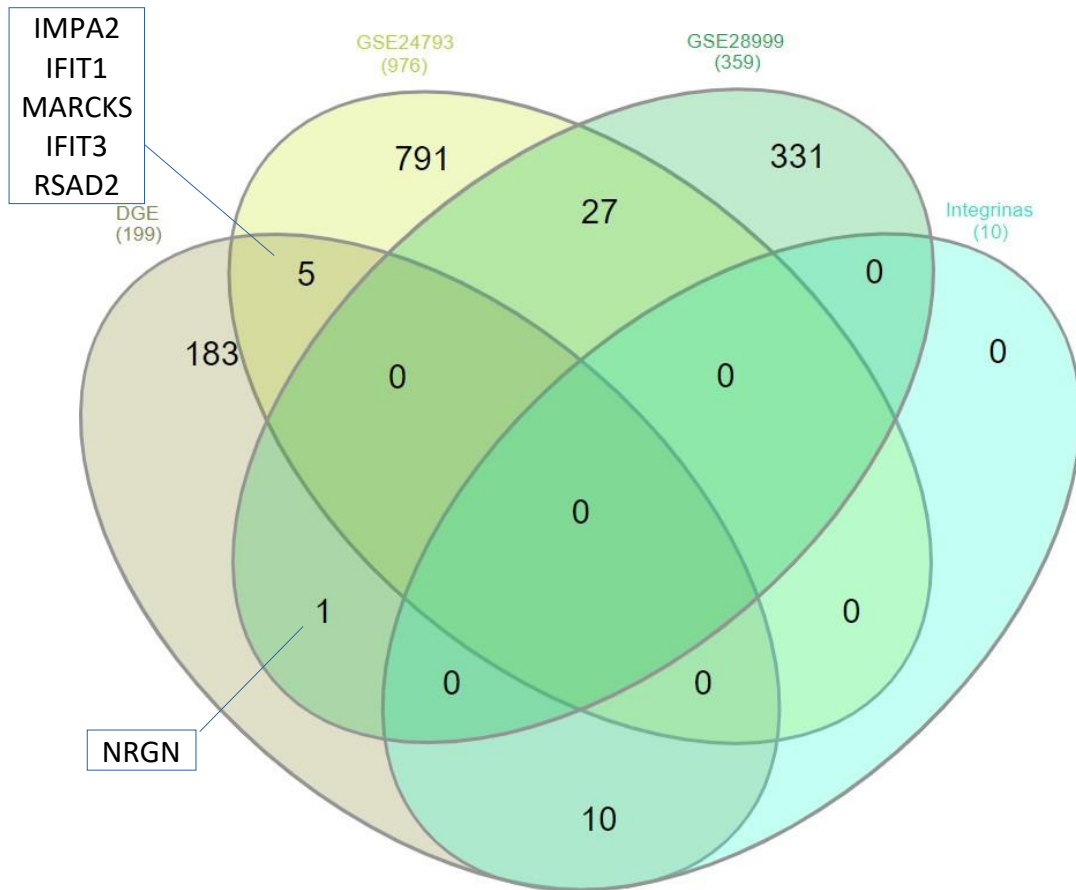
**Figura 11.** Conjunto de dados externos entre: GSE67726, GSE35088, Integrinas, Amiodarona, Tiroxina e o nosso DGE. A cor púrpura realça os genes que estão relacionados à doenças cardíacas na tabela 8. O network foi construído com o algoritmo *Compound Spring Embedder (CoSE)*. A cor ciano (esquerda) representa o banco GSE67726; A cor roxa (direita) representa o nosso DGE de sangue total; A cor rosa (inferior) representa o banco GSE35088; As integrinas estão representadas pelo grupo amarelo, enquanto a Amiodarona está sendo representada pelo grupo (superiores).

Observamos que os genes apresentados no *network* da Figura 11 possuem a maior parte das suas conexões com os genes do grupo GSE67726, onde foi avaliada a resposta do tecido cardíaco ao hormônio tireoidiano pelos receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Também existe concentração entre os genes identificados através do sangue total, objeto do presente estudo.

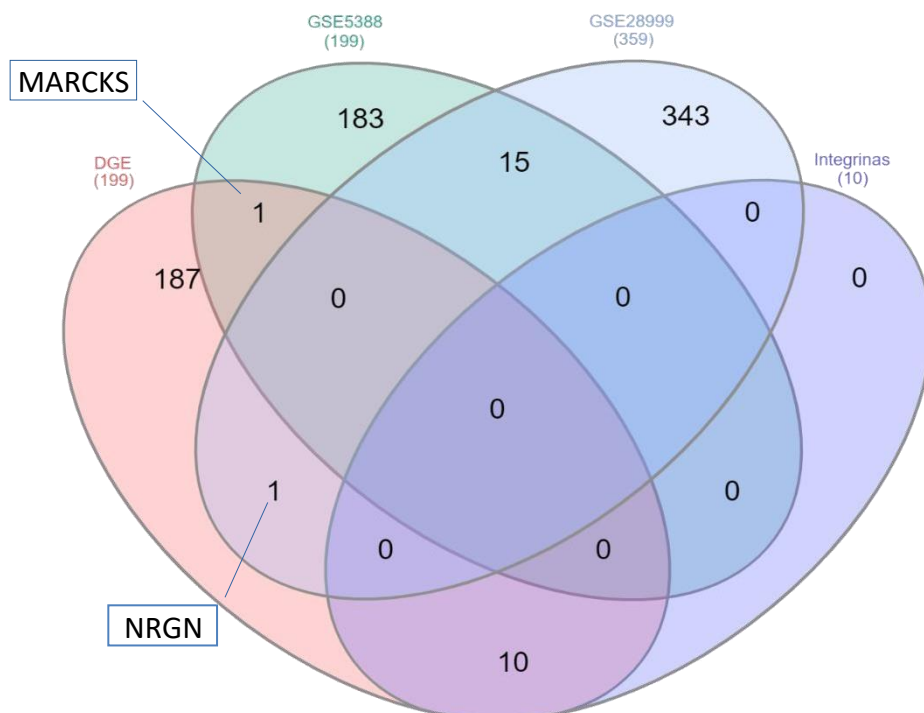
Através da análise de *network* na Figura 14 observamos que, de forma similar ao coração (Figura 11), o cérebro guarda o padrão de ter mais genes próximos do DGE que também estão próximos do centro. Observamos que as integrinas, tal como no gráfico anterior, possui a capacidade de criar ligações com diversos genes dispersos entre todos os estudos presentes nas análises.

Comparamos o nosso DGE com os resultados de transcriptoma obtidos dos estudos GSE24793, GSE5388 e GSE28999. Os resultados também foram comparados com as integrinas, resultando nos Venn localizados na Figura 12 e 13.

Como o estudo GSE24793 avaliou as diferenças de expressão de um *pool* celular sobre efeito do T3, a substituição que realizamos foi do GSE5388 pelo GSE28999. No GSE5388 foi avaliado o transtorno de bipolaridade em tecido cerebral pós morte na espécie *Homo sapiens*, enquanto o GSE28999 fez o transcriptoma de diversas regiões do cérebro de *Mus musculus*. A substituição resultou no Venn da Figura 13.



**Figura 12.** Comparação entre o nosso DGE e dados externos (GSE24793 e GSE28999, tecidos), assim como as integrinas.

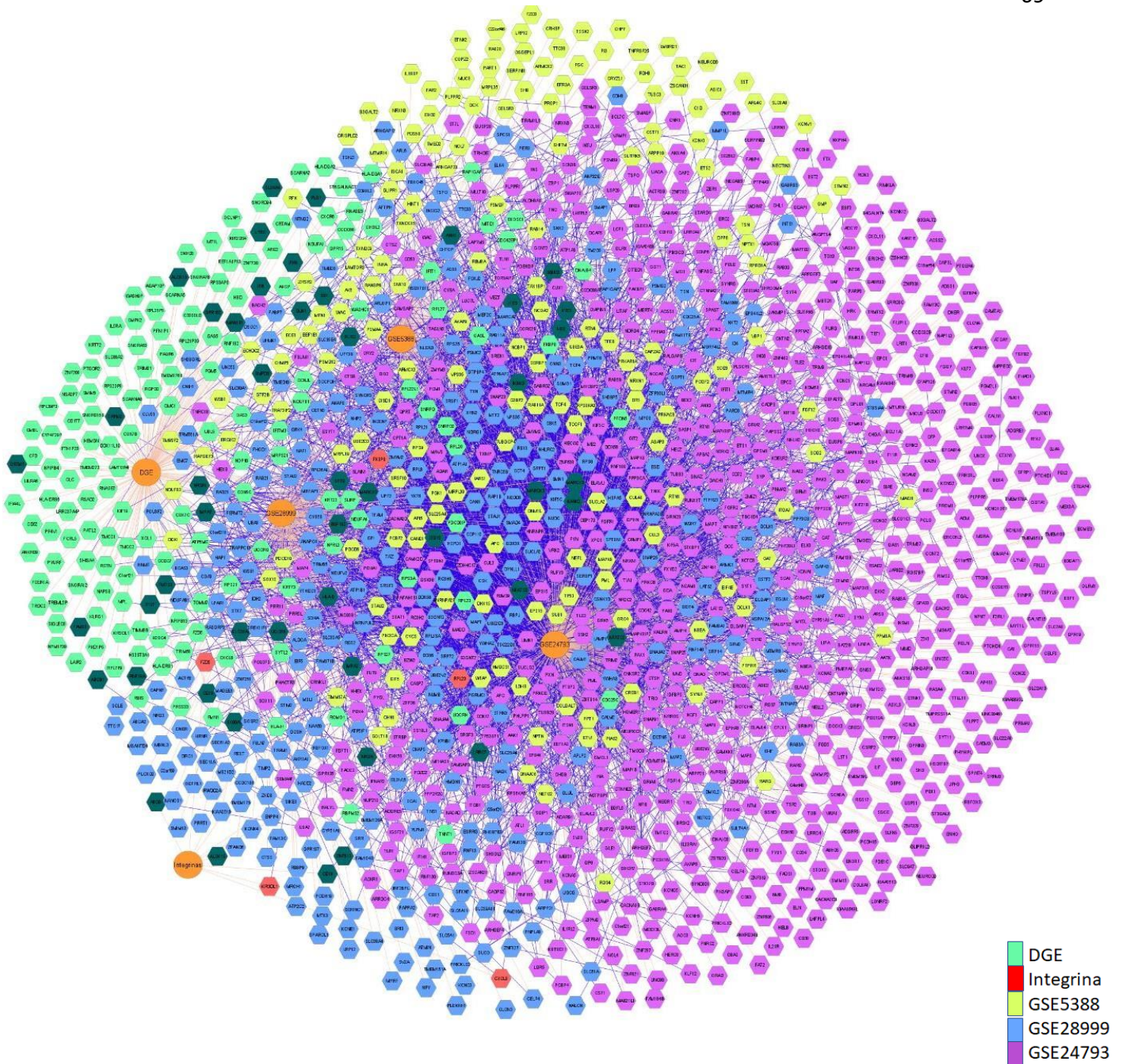


**Figura 13.** Comparação entre os nossos achados e GSE5388 e GSE28999, onde o GSE5388 representa a desordem bipolar e o GSE28999 representa a ansiedade em modelos de *Mus musculus*.

Após a identificação dos genes presentes entre as análises, seguimos para um resumo das suas expressões na forma de tabela.

**Tabela 15.** Comparação entre os logFCs das nossas análises e bancos externos. O GSE24793 representa o cerebelo tratado com T3; O GSE5388 representa o cortex prefrontal dorsolateral de paciente portadores do transtorno de bipolaridade; O GSE28999 representa diferentes regiões do cérebro em modelos de *Mus musculus* em ansiedade.

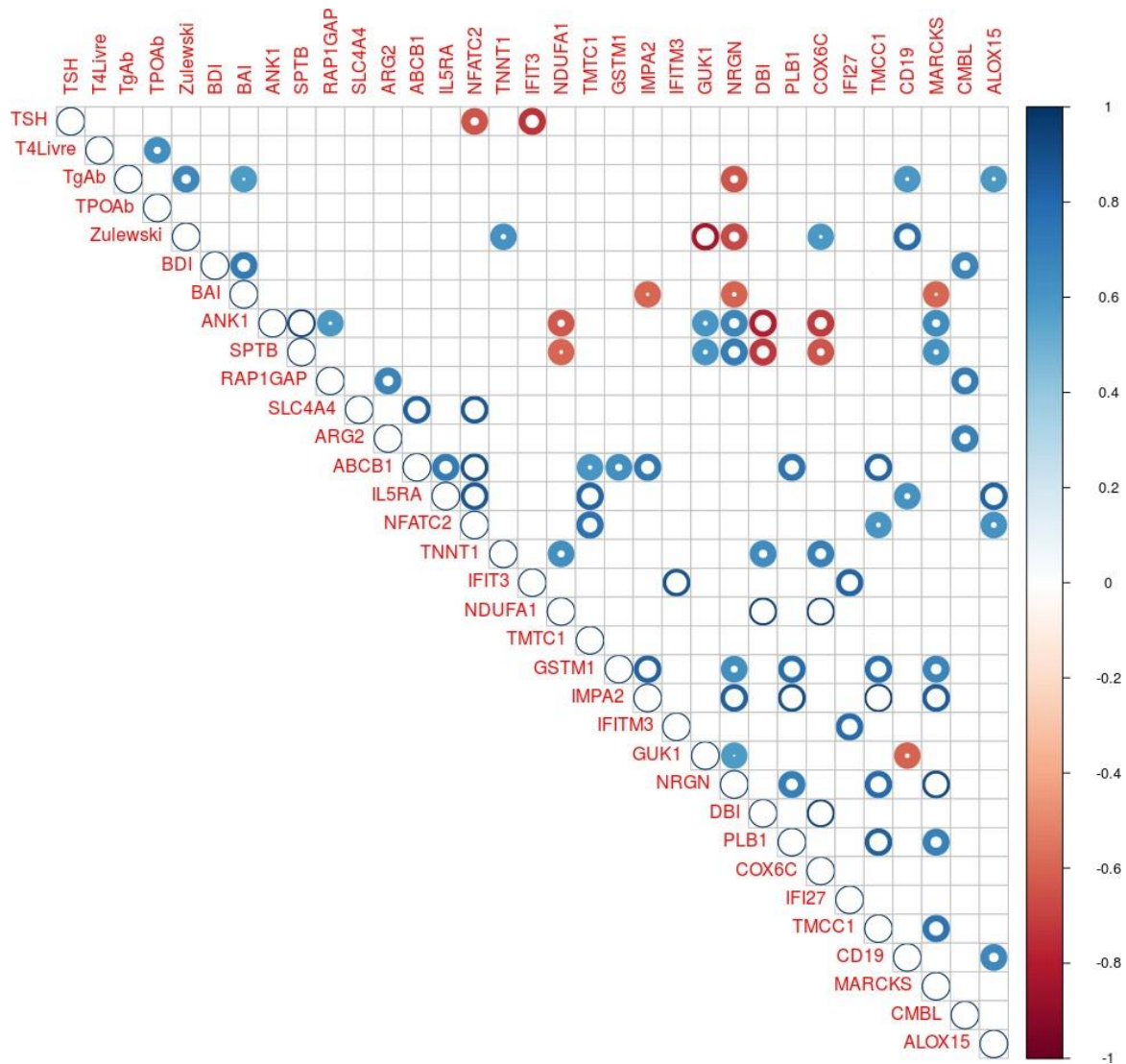
Gene	LogFC					
	CTL vs HTT-at	CTL vs HTT-out	GSE24793 6h	GSE24793 48h	GSE28999	GSE5388
<i>IMPA2</i>	-2,30	-1,34	1,6	-1,7	x	x
<i>IFIT1</i>	-1,26	-2,09	2,22	-2,14	x	x
<i>IFIT3</i>	0,8	2,83	2,13	-2,29	x	x
<i>RSAD2</i>	1,56	0,06	1,55	-3,54	x	x
<i>MARCKS</i>	-1,57	-1,82	-1.54	1.52	x	0,40
<i>NRGN</i>	-0,97	-2,18	x	x	-0.46	X



**Figura 14.** Conjunto de dados externo representando os genes e *overlaps* entre cérebro e o nosso DGE. Os genes destacados em verde escuro representam os genes associados à distúrbios mentais descritos na tabela 9. Os nodos vermelhos representam as integrinas (inferior esquerdo), os verde claros representam o nosso DGE (lado esquerdo), os amarelos (região superior) representam o GSE5388, os azuis claros (centro) representam o GSE28999, os roxos (lado direito) representam o GSE24793.

## Correlação entre os principais achados e os parâmetros clínicos

**Figura 15.** Gráfico de correlação entre os principais achados das bibliotecas e os parâmetros clínicos dos nossos pacientes. Observamos correlação com TSH, TPO, BDI, BAI e Zulewski de genes importantes destacados anteriormente. A cor representa a intensidade do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) e o raio interno do círculo indica o intervalo de confiança (maior, melhor). Apenas correlações significantes ( $q=0.95$ ) estão representadas.



## 5.0 DISCUSSÃO

No presente trabalho nós avaliamos o potencial do sequenciamento de nova geração para RNA-Seq transcriptoma de detectar, quantificar e qualificar transcritos circulantes através do sangue total. Possuindo como finalidade a identificação de possíveis biomarcadores que sirvam como um perfil comportamental de um tecido no contexto de uma condição que afeta o organismo de maneira global, como o hipotireoidismo.

Os nossos principais alvos de investigação foram: coração, verificando também a interação medicamentosa (amiodarona), e cérebro. Uma vez que, vários fatores de coagulação produzidos no fígado são intensificados por hormônio tireoidiano, decidimos verificar também o fígado [205]. Para a interação medicamentosa classificamos amiodarona, fígado, coração e observamos até mesmo a integrina na mesma etapa da análise. As integrinas representam neste trabalho a ação não genômica do hormônio tireoidiano, e identificamos em nosso DGE 10 genes relacionados às integrinas.

Em coração passamos a explorar a relação com os genes identificados como pertencentes ao tecido e que possuem relação com doenças cardiovasculares. Para rastreio da sua associação com doenças cardiovasculares repercutidas no hipotireoidismo, fizemos uso da base DISGENET, e a interseção resultou em 31 genes, e um resumo do que eles representam para cada doença pode ser identificada na Tabela 8. O *network* localizado na figura 11 foi realizado utilizando o *Compound Spring Embedder* (CoSE) com o *software* Cytoscape, os genes periféricos são genes que possuem baixa profundidade no *network* e menor importância em relação aos demais.

Observamos que os grupos DGE, Amiodarona e Integrinas foram os grupos que possuíram maior participação na conformação do gráfico, assim como, são detentores dos genes de maior relevância funcional para o coração. Apesar de utilizarmos um banco acurado como referência, as interações medicamentosas ainda podem representar efeitos secundários, levando em consideração que os pacientes fazem uso da levotiroxina, o *network* pode se sobressair aos tradicionais diagramas de *Venn*.

Em nosso transcriptoma, identificamos 199 genes diferencialmente expressos (DGE), sendo 16 genes relacionados à amiodarona. A amiodarona é um antiarrítmico muito utilizado na prática clínica, contém 37% de iodo em peso e sua estrutura é semelhante a estrutura química dos hormônios tireoidianos. Ela pode ocasionar disfunção tireoidiana devido a liberação de grande quantidade de iodo, que poderá

causar hipotireoidismo ou tireotoxicose [206]. Recentemente, Pietzner et al. demonstrou que a tireotoxicose aumentou os níveis de várias proteínas da cascata de coagulação, incluindo fatores de coagulação IX, XI e XIII em plasma [207].

Também, a amiodarona representa um fármaco com forte interação hepática e que também pode afetar a arritmia cardíaca. Observamos na Tabela 7 que 5 dos 16 genes possuem um efeito hepatotóxico elevado, enquanto os outros 11 estão dispersos entre ação imune, metabolismo, marcação específica de célula do sistema imune e coagulopatias.

Nessa análise de interação com amiodarona, destacaram-se os genes *SLC4A4*, *ABCB1*, e *ANK1*. Através do sangue total nós observamos que o *SLC4A4* apresenta 6 vezes a expressão e *ABCB1* possui o dobro de expressão quando estão sob o efeito da LT4. Enquanto o *ANK1* inverte a sua expressão, sendo positivo para a LT4 "no alvo" e negativo para *ANK1* "fora do alvo" em relação ao eutireoídiano, representados na tabela 7.

O *Sodium Bicarbonate Cotransporter NBCe1 (SLC4A4)* tem sido reconhecido como um gene que sofre influência direta do TSH, de forma que o TSH tende a prolongar a meia-vida do transportador na membrana basolateral [208]. Nós identificamos um aumento de +6.72 em pacientes "no alvo" e +1.80 em pacientes "fora do alvo".

O *ABCB1* é modulado pela ação do hormônio tireoídiano, de forma que a expressão do RNA foi encontrada como possuindo um FC de +1.8 em pacientes hipotireoídianos conforme relata *MD Alscher, et al.* [209], nós identificamos um aumento de +2.47 em pacientes "no alvo" e +3.03 em pacientes "fora do alvo", sugere-se que a ação dos hormônios tireoídianos sobre o *ABCB1* é não genômica, de forma a afetar as bombas de íons localizadas na membrana celular [210].

O *ANK1* é um gene expresso na medula óssea, coração e próstata, e a sua hipermetilação, bem como a expressão do RNA já foi associada ao Alzheimer [211,212]. Apesar do Alzheimer ser uma doença multisetorial, a possível contribuição do hipotireoidismo é alvo de investigações, com indicação de que TSH elevado pode favorecer o desenvolvimento da doença [213]. No entanto, a contribuição direta do *ANK1* para as doenças neurodegenerativas em um contexto de hipotireoidismo ou LT4 é pouco conhecida na literatura.

Após a amiodarona, exploramos a expressão gênica do tecido cardíaco. Para esta aproximação, fizemos uso do banco de dados acurado do Funrich, o resultado pode ser observado na Figura 9. Ao todo, 10 genes possuem associação entre amiodarona, tecido cardíaco e tireoide, enquanto 40 genes que estão na tireoide também estão expressos no tecido cardíaco. Selecionamos esses 10 genes para as

análises futuras, como uma forma de representar a ação não genômica.

Em cérebro também exploramos a relação com os genes identificados como pertencentes ao tecido e que possuem relação com doenças do sistema nervoso central e humor repercutidas no hipotireoidismo. Observamos no grupo DGE a relação com os genes identificados como pertencentes ao tecido e que possuem relação com doenças do sistema nervoso central e humor repercutidas no hipotireoidismo. Para rastreio da sua associação com doenças, fizemos uso da base DISGENET, e a interseção resultou em 38 genes, e um resumo do que eles representam para cada doença pode ser identificada na Tabela 10.

Observando a Etapa 2, a validação do *CXCR6* e *CCNJL*. Em relação a levotiroxina, a correlação desses genes com o BDI e BAI foi negativa. Houve correlação positiva entre Zulewski e BDI, o que pode sugerir que o gene se correlaciona com o sintoma de hipotireoidismo, mas não com a clínica clássica, pelo TSH.

O *CXCR6* é um marcador imune expresso em linfonodos e baço, avaliado em Carcinoma Papilífero de Tireoide (CPT) e Doença de Graves [214,215]. Ademais, houve associação ao estudo do estresse  $\beta$ -adrenérgico [GSE67726] e em doenças cardiovasculares repercutidas no hipotireoidismo. O *CXCR6* perde expressão em indivíduos fora do alvo terapêutico.

O *CCNJL* está associado a hipóxia e imunidade e tem o objetivo de prever o risco de carcinoma hepatocelular e observaram que risco está diretamente relacionado ao aumento de expressão. Em estudo recentemente o hormônio tireoidiano regulou positivamente a expressão deste gene em perfis de gene humano em sangue total [216]. O *CCNJL* ganha expressão em indivíduos fora do alvo.

A seguir, na Etapa 3, fizemos uso do banco GSE35088, onde avaliaram a influência do hormônio tireoidiano no infarto do miocárdio de *Rattus norvegicus*, na publicação original [217], em que os autores relatam que os hormônios tireoidianos poderiam representar um efeito protetor ao desfecho, a seguir, o banco GSE67726 avalia a contribuição do hormônio ao estresse  $\beta$ -adrenérgico crônico em um cenário de hidroxilação dependente de PHD2/3, para ambos os estudos nós coletamos os dados na base do Gene Expression Omnibus (GEO) e reanalizamos.

De 215 genes identificados pelo estudo do infarto, 16 são comuns ao estudo do estresse  $\beta$ -adrenérgico, 5 são comuns entre o infarto e nosso estudo em sangue total, e 2 são comuns entre o estresse  $\beta$ -adrenérgico e o nosso estudo em sangue total. Os genes que se destacaram na primeira interseção foram: *IFITM3*, *HBB*, *CMBL*, *PLB1* e *IMPA2*. Na segunda: *CXCR6* e *CD52*.

Quando avaliadas as expressões, observamos inversões de expressão nos

genes *CMBL*, *PLB1*, e *CXCR6* em diferentes cenários. De acordo com o logFC apresentado na Tabela 14, o tratamento "no alvo" tende a reduzir a expressão de RNA, com exceção do *CXCR6*. Enquanto o "fora do alvo" tende há inversão em *IFITM3*, *IMPA2*, *CXCR6* e *CD52*.

Destes, destacamos o *CMBL*. O *CMBL* age por meio da transcrição de uma cisteína hidrolase altamente expressa no tecido hepático e intestino, sendo atuante no Citocromo P450 convertendo formas inativas de fármacos em formas ativas [218]. O tratamento "no alvo" reduz a expressão do seu RNA. O resultado sugere que o tratamento pode atuar não só reduzindo a expressão de genes ao tentar linearizar processos complexos que não seguem uma ordem gaussiana, como também pode reduzir a expressão de genes responsáveis pelo próprio metabolismo da levotiroxina, diminuindo a sua ação. Este gene teve correlação com BDI e o observamos entre os genes de amiodarona.

A seguir, o gene *PLB1* codifica a fosfolipase B1, uma enzima altamente expressa no intestino, e que também possui função no coração. No coração, ela contribui para o ciclo de contração e relaxamento [219], entretanto, a sua associação com o hormônio tireoidiano é desconhecida. Observamos que este gene perde expressão tanto no grupo dentro do alvo como no grupo fora do alvo, embora a perda de expressão seja maior nos indivíduos fora do alvo, e também observado entre os genes de doença cardiovascular repercutidas no hipotireoidismo.

Em seguida, a relação das desordens e transtornos mentais com o cérebro por si mesmas podem ser profundamente complexas devido à heterogeneidade de funções entre as regiões cerebrais. Por esse motivo, no estudo GSE5388, onde avaliaram tecido *pos mortem* de pacientes portadores de bipolaridade, nós optamos por selecionar amostras que não faziam uso de lítio, por ser um interferente do TPO e perturbador da síntese de hormônios tireoidianos, e no estudo GSE28999, onde avaliaram a ansiedade, nós selecionamos o núcleo paraventricular hipotalâmico, a amígdala basolateral, amígdala central e núcleo acumbênico, sendo a amígdala comumente associada à ansiedade e medo [220,221]. Na interseção identificamos 1 gene entre o nosso DGE e o estudo realizado para ansiedade, e 1 gene entre o nosso DGE e o estudo realizado para bipolaridade, sendo eles: *MARCKS* e *NRGN*.

O *MARCKS* é altamente expresso no cérebro como uma proteína de ligação *cross* filamentos com função de fagocitose, motilidade celular e mitogênese [222,223,224]. Este gene teve correlação com BAI e está presente em doenças do sistema nervoso central repercutidas no hipotireoidismo. Está presente nos bancos [GSE24793] e [GSE5388]. O *MARCKS* é regulado negativamente.

O *NRGN* é altamente expresso no cérebro e codifica um substrato de proteína quinase pós-sináptica que se liga à calmodulina na ausência de cálcio. Este gene é sugerido como alvo direto para o hormônio tireoidiano no cérebro humano, e o controle de sua expressão pode ser base de muitas consequências de hipotireoidismo nos estados mentais, não só de adultos, como durante o desenvolvimento [222,223,224]. Observamos correlação com TgAb, Zulewski e BAI. Está presente entre os genes de doenças do sistema nervoso central repercutidas no hipotireoidismo. A sua expressão é regulada negativamente em todos os cenários.

Para validar alguns dos nossos achados, fizemos uma correlação Pearson, demonstrando um comportamento similar entre o coeficiente de correlação dos genes. Tiveram correlação com o TSH: *IFIT3*, *NFATC2*; TgAb: *NRGN*, *CD19*, *ALOX15*; Zulewski: *GUK1*, *CD19*, *NRGN*, *TNNT1*, *COX6C*; BDI: *CMBL*; BAI: *IMPA2*, *NRGN*, *MARCKS*.

O sangue representa o reflexo de diversos tecidos de maneira quase simultânea. Assim como, observamos que a condição da tireoide regula vários genes no sangue total humano, e que o estado da tireoide interfere na regulação do gene.

No entanto, as fragilidades deste estudo estão relacionadas ao tamanho da amostra da população, pois encontramos mais genes que seriam bons candidatos de acordo com as sobreposições e outros estudos. Acreditamos que se tivéssemos um número maior de participantes no estudo, poderíamos ter uma análise mais acurada dos subgrupos nele presentes.

Entretanto, os pontos fortes são o acesso à uma grande base de dados que realizou diferentes sequenciamentos em tecidos com propósitos similares ou situações que podem ser afetadas pelo hormônio tireoidiano.

Dentre as perspectivas futuras deste trabalho, está a validação de genes de interesse e a ampliação deste estudo para a doença de Alzheimer.

## 6.0 CONCLUSÃO

No sentido da expressão, observamos uma tendência de oscilação de sinal quando tratamos, em coração e cérebro, e uma maior estabilidade em ganho na população não tratada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- <sup>1</sup> BIANCO, A. C. Cracking the code for thyroid hormone signaling. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, v. 124, p. 26-35, 2013.
- <sup>2</sup> Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 122: 3035–3043, 2012.
- <sup>3</sup> Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev* 31: 139–170, 2010.
- <sup>4</sup> BIONDI, B.; COOPER, D. S. Thyroid hormone therapy for hypothyroidism. *Endocrine*, 66, n. 1, p. 18-26, Oct 2019.
- <sup>5</sup> DUMITRESCU, A. M.; REFETOFF, S. The syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone. *Biochim Biophys Acta*, v. 1830, n. 7, p. 3987-4003, Jul 2013.
- <sup>6</sup> LUO, Y. et al. A novel role for flotillin-containing lipid rafts in negative-feedback regulation of thyroid-specific gene expression by thyroglobulin. *Thyroid*, Sep 2016.
- <sup>7</sup> CHIOVATO, L.; MAGRI, F.; CARLÉ, A. Hypothyroidism in Context: Where We've Been and Where We're Going. *Adv Ther*, 36, n. Suppl 2, p. 47-58, 09 2019a.
- <sup>8</sup> Iwen KA, Schroder E, Brabant G. Thyroid hormone and the metabolic syndrome. *Eur Thyroid J* 2: 83–92, 2013.
- <sup>9</sup> TAROZA, S.; RASTENYTĖ, D.; BURKAUSKAS, J.; PODLIPSKYTĖ, A. *et al.* Deiodinases, organic anion transporter polypeptide polymorphisms and symptoms of anxiety and depression after ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 29, n. 9, p. 105040, Sep 2020.
- <sup>10</sup> TSIBULNIKOV, S.; MASLOV, L.; VORONKOV, N.; OELTGEN, P. Thyroid hormones and the mechanisms of adaptation to cold. *Hormones (Athens)*, 19, n. 3, p. 329-339, Sep 2020.
- <sup>11</sup> OLIVEIRA, K. C.; LAUREANO-MELO, R.; DA CONCEIÇÃO, R. R.; DE SOUZA, J. S. *et al.* Thyroxine replacement modifies changes in deiodinase and thyroid hormone transporter expression induced by subclinical hypothyroidism in rats. *Hormones (Athens)*, Sep 2020.
- <sup>12</sup> CALLEBAUT, I. et al. The iodothyronine selenodeiodinases are thioredoxin-fold family proteins containing a glycoside hydrolase clan GH-A-like structure. *J Biol Chem*, v. 278, n. 38, p. 36887-96, Sep 2003.
- <sup>13</sup> CHENG, S. Y.; LEONARD, J. L.; DAVIS, P. J. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev*, 31, n. 2, p. 139-170, Apr 2010.
- <sup>14</sup> Liu YY, Brent GA. Thyroid hormone crosstalk with nuclear receptor signaling in metabolic regulation. *Trends Endocrinol Metab* 21: 166–173, 2010.
- <sup>15</sup> RITTER, M. J.; AMANO, I.; HOLLENBERG, A. N. Thyroid Hormone Signaling and the Liver. *Hepatology*, 72, n. 2, p. 742-752, Aug 2020.
- <sup>16</sup> MATYJASZEK-MATUSZEK, B. et al. Diagnostic methods of TSH in thyroid screening tests. *Ann Agric Environ Med*, v. 20, n. 4, p. 731-5, 2013.
- <sup>17</sup> Chami, R.; Moreno-Reyes, R.; Corvilain, B. TSH measurement is not an appropriate screening test for autonomous functioning thyroid nodules: a retrospective study of 368 patients. *European Journal of Endocrinology*, v. 170, n. 4, p. 593-599, 2014.

18. Brent GA. Hypothyroidism and thyroiditis. In: Williams Textbook of Endocrinology, edited by Melmed SP, Larsen PR, Kronenberg HM, editors. Philadelphia, PA: Elsevier, 2012.
19. WANG, Y.; DONG, X.; FU, C.; SU, M. *et al.* Thyroid Stimulating Hormone (TSH) Is Associated With General and Abdominal Obesity: A Cohort Study in School-Aged Girls During Puberty in East China. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, p. 620, 2020.
20. ITTERMANN, T.; VÖLZKE, H.; BAUMEISTER, S. E.; APPEL, K. *et al.* Diagnosed thyroid disorders are associated with depression and anxiety. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*, 50, n. 9, p. 1417-1425, Sep 2015.
21. VAN MOLL, C. C.; SUSANTO, C. R.; KOX-VAN GASTEL, P. [A pitfall in the treatment of hypothyroidism]. *Ned Tijdschr Geneesk*, v. 159, p. A9064, 2015.
22. JONKLAAS, J. *et al.* Guidelines for the treatment of hypothyroidism: prepared by the american thyroid association task force on thyroid hormone replacement. *Thyroid*, v. 24, n. 12, p. 1670-751, Dec 2014.
23. Vella Kristen R, Ramadoss Preeti, Costa-e-Sousa Ricardo H, Astapova Inna, Ye Felix D, Holtz Kaila A, ... Hollenberg Anthony N. Thyroid Hormone Signaling In Vivo Requires a Balance between Coactivators and Corepressors. *Molecular and Cellular Biology*. 2014; 34(9):1564–1575.
24. Visser WE, Heemstra KA, Swagemakers SM, Ozgür Z, CorssmitEP, Burggraaf J, van Ijcken WF, van der Spek PJ, Smit JW, Visser TJ. The physiological levels of thyroid hormone regulate numerous muscle transcriptions. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94 (9): 3487–3496.
25. Clément K, Viguerie N, Diehn M, Alizadeh A, Barbe P, Thalamas C, Storey JD, Brown PO, Barsh GS, Langin D. In vivo regulation of human skeletal muscle gene expression by thyroid hormone. *Genome Res*. 2002; 12 (2): 281–291.
26. MOORE, K. L. *Fundamentals of clinical anatomy*. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 501. 2004.
27. VILLACORTE, M. *et al.* Thyroid follicle development requires Smad1/5- and endothelial cell-dependent basement membrane assembly. *Development*, v. 143, n. 11, p. 1958-70, Jun 2016.
28. ESTIENNE, V. *et al.* Multicenter study on TGPO autoantibody prevalence in various thyroid and non-thyroid diseases; relationships with thyroglobulin and thyroperoxidase autoantibody parameters. *Eur J Endocrinol*, v. 141, n. 6, p. 563-9, Dec 1999.
29. SILVERTHORN. D. U. *Human Physiology - An Integrated Approach*. São Paulo, Artmed, 7 ed, 2017.p. 764-767.
30. Roitt IM, Doniach D, Campbell PN, Hudson RV. Auto antibodies in Hashimoto's disease (lymphadenoid goitre). *Lancet* 1956; 2: 820-1.
31. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*. (2001) 81:1097–142. 10.1152/physrev.2001.81.3.1097.
32. CARVALHO, G. A.; PEREZ, C. L.; WARD, L. S. The clinical use of thyroid function tests. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v. 57, n. 3, p. 193-204, Apr 2013.
33. Lopez M, Alvarez CV, Nogueiras R, Dieguez C. Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends Mol Med* 19: 418–427, 2013.
34. SAGAR, G. D. *et al.* The thyroid hormone-inactivating deiodinase functions as a homodimer. *Mol Endocrinol*, v. 22, n. 6, p. 1382-93, Jun 2008.
35. CAVALIERI, R. R. Iodine metabolism and thyroid physiology: current concepts. *Thyroid*, v. 7, n. 2, p. 177-81, Apr 1997.

36. ORTIGA-CARVALHO, T. M.; SIDHAYE, A. R.; WONDISFORD, F. E. Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. *Nat Rev Endocrinol*, 10, n. 10, p. 582-591, Oct 2014a.
37. Sawin CS. The heritage of the thyroid: a brief history. In Werner & Ingbar's, editores. *The thyroid: a Fundamental and Clinical text*. 10 ed. Philadelphia. PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
38. VAISMAN, M.; ROSENTHAL, D.; CARVALHO, D. P. [Enzymes involved in thyroid iodide organification]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v. 48, n. 1, p. 9-15, Feb 2004.
39. SENESE, R. et al. Thyroid: biological actions of 'nonclassical' thyroid hormones. *J Endocrinol*, v. 221, n. 2, p. R1-12, May 2014.
40. Hershman JM. Clinical application of thyrotropin-releasing hormone. *N Engl J Med* 290: 886–890, 1974.
41. Hoftijzer HC, Heemstra KA, Visser TJ, le Cessie S, Peeters RP, Corssmit EP, Smit JW. The type 2 deiodinase ORFa-Gly3Asp polymorphism (rs12885300) influences the set point of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in patients treated for differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 96: E1527–1533, 2011.
42. SASAKI, S. et al. Ligand-induced recruitment of a histone deacetylase in the negative-feedback regulation of the thyrotropin beta gene. *EMBO J*, v. 18, n. 19, p. 5389-98, Oct 1999.
43. Fonseca TL, Correa-Medina M, Campos MP, Wittmann G, Werneck-de-Castro JP, Arrojo e Drigo R, Mora-Garzon M, Ueta CB, Caicedo A, Fekete C, Gereben B, Lechan RM, Bianco AC. Coordination of hypothalamic and pituitary T<sub>3</sub> production regulates TSH expression. *J Clin Invest* 123: 1492–1500, 2013.
44. Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS, Zeold A, Bianco AC. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev* 29: 898–938, 2008.
45. FLIERS, E.; KALSBECK, A.; BOELEN, A. Beyond the fixed setpoint of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Eur J Endocrinol*, v. 171, n. 5, p. R197-208, Nov 2014.
46. Larsen PR, Zavacki AM. The role of the iodothyronine deiodinases in the physiology and pathophysiology of thyroid hormone action. *Eur Thyroid J* 1: 232–242, 2012.
47. Mullur R., Liu Y.Y., Brent G.A. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* 2014;94:355–382. doi: 10.1152/physrev.00030.2013
48. Astapova I, Vella KR, Ramadoss P, Holtz KA, Rodwin BA, Liao XH, Weiss RE, Rosenberg MA, Rosenzweig A, Hollenberg AN. The nuclear receptor corepressor (NCoR) controls thyroid hormone sensitivity and the set point of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Mol Endocrinol* 25: 212–224, 2011.
49. SALVATORE, D. et al. Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in human thyroid. *J Clin Invest*, v. 98, n. 4, p. 962-8, Aug 1996.
50. BIANCO, A. C. et al. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev*, v. 23, n. 1, p. 38-89, Feb 2002.
51. ARROJO E DRIGO, R.; BIANCO, A. C. Type 2 deiodinase at the crossroads of thyroid hormone action. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 43, n. 10, p. 1432-41, Oct 2011.
52. DENTICE, M. et al. The deiodinases and the control of intracellular thyroid hormone signaling during cellular differentiation. *Biochim Biophys Acta*, v. 1830, n. 7, p. 3937-45, Jul 2013.
53. Schneider MJ, Fiering SN, Thai B, Wu SY, St Germain E, Parlow AF, St Germain DL, Galton VA. Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (*Dio1*) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice. *Endocrinology* 147: 580–589, 2006.
54. BAYSE, C. A.; MARSAN, E. S.; GARCIA, J. R.; TRAN-THOMPSON, A. T. Thyroxine binding to type III iodothyronine deiodinase. *Sci Rep*, 10, n. 1, p. 15401, 09 2020.
55. Maia AL, Kim BW, Huang SA, Harney JW, Larsen PR. Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T<sub>3</sub> in euthyroid humans. *J Clin Invest* 115: 2524–2533, 2005.

- <sup>56</sup>. Watanabe M, Houten SM, Matak C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, Ezaki O, Kodama T, Schoonjans K, Bianco AC, Auwerx J. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 439: 484–489, 2006.
- <sup>57</sup>. Panicker V, Saravanan P, Vaidya B, Evans J, Hattersley AT, Frayling TM, Dayan CM. Common variation in the *DIO2* gene predicts baseline psychological well-being and response to combination thyroxine plus triiodothyronine therapy in hypothyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 1623–1629, 2009.
- <sup>58</sup>. Hoang TD, Olsen CH, Mai VQ, Clyde PW, Shakir MK. Desiccated thyroid extract compared with levothyroxine in the treatment of hypothyroidism: a randomized, double-blind, crossover study. *J Clin Endocrinol Metab* 98: 1982–1990, 2013.
- <sup>59</sup>. Pascual A., Aranda A. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013; 1830 : 3908–3916. doi: 10.1016 / j.bbagen.2012.03.012.
- <sup>60</sup>. Janssen S.T., Janssen O.E. Directional thyroid hormone distribution via the blood stream to target sites. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2017;458:16–21. doi: 10.1016/j.mce.2017.02.037.
- <sup>61</sup>. McLean T.R., Rank M.M., Smooker P.M., Richardson S.J. Evolution of thyroid hormone distributor proteins. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2017;459:43–52. doi: 10.1016/j.mce.2017.02.038
- <sup>62</sup>. Mendoza A., Hollenberg A.N. New insights into thyroid hormone action. *Pharmacol. Ther.* 2017;173:135–145. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.012.
- <sup>63</sup>. de Souza E.C., Dias G.R., Cardoso R.C., Lima L.P., Fortunato R.S., Visser T.J., Vaisman M., Ferreira A.C., Carvalho D.P. MCT8 is Downregulated by Short Time Iodine Overload in the Thyroid Gland of Rats. *Horm. Metab. Res.* 2015;47:910–915. doi: 10.1055/s-0035-1550008.
- <sup>64</sup>. Bianco A.C., Dumitrescu A., Gereben B., Ribeiro M.O., Fonseca T.L., Fernandes G.W., Bocco B.M.L.C. Paradigms of Dynamic Control of Thyroid Hormone Signaling. *Endocr. Rev.* 2019;40:1000–1047. doi: 10.1210/er.2018-00275.
- <sup>65</sup>. Groeneweg S., van Geest F.S., Peeters R.P., Heuer H., Visser W.E. Thyroid Hormone Transporters. *Endocr. Rev.* 2020;41:bnz008. doi: 10.1210/endrev/bnz008.
- <sup>66</sup>. Dumitrescu A.M., Liao X.H., Best T.B., Brockmann K., Refetoff S. A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *Am. J. Hum. Genet.* 2004;74:168–175. doi: 10.1086/380999.
- <sup>67</sup>. Strømme P., Groeneweg S., Lima de Souza E.C., Zevenbergen C., Torgersbråten A., Holmgren A., Gurcan E., Meima M.E., Peeters R.P., Visser W.E., et al. Mutated Thyroid Hormone Transporter OATP1C1 Associates with Severe Brain Hypometabolism and Juvenile Neurodegeneration. *Thyroid.* 2018;28:1406–1415. doi: 10.1089/thy.2018.0595.
- <sup>68</sup>. McKenna NJ, O'Malley BW Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Célula.* 2002; 108: 465–474. doi: 10.1016 / S0092-8674 (02) 00641-4.
- <sup>69</sup>. Aranda A., Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol. Rev.* 2001; 81 : 1269–1304. doi: 10.1152 / physrev.2001.81.3.1269.
- <sup>70</sup>. Davis P.J., Davis F.B., Cody V. Membrane receptors mediating thyroid hormone action. *Trends Endocrinol. Metab.* 2005;16:429–435. doi: 10.1016/j.tem.2005.09.007.

71. Mikkonen L, Hirvonen J, Janne OA. SUMO-1 regulates body weight and adipogenesis via PPARgamma in male and female mice. *Endocrinology* 154: 698–708, 2013.
72. Talukdar S, Bhatnagar S, Dridi S, Hillgartner FB. Chenodeoxycholic acid suppresses the activation of acetyl-coenzyme A carboxylase-alpha gene transcription by the liver X receptor agonist T0–901317. *J Lipid Res* 48: 2647–2663, 2007.
73. CHIN, W. W. et al. Thyroid hormone regulation of thyrotropin gene expression. *Recent Prog Horm Res*, v. 48, p. 393-414, 1993.
74. FONDELL, J. D. et al. Unliganded thyroid hormone receptor alpha can target TATA-binding protein for transcriptional repression. *Mol Cell Biol*, v. 16, n. 1, p. 281-7, Jan 1996.
75. GUYTON, A.C.; HALL, J.E., *Treatise on medical physiology*, 12 ed. Rio de Janeiro; Elsevier, 2011, p.931-965.
76. Davis PJ, Goglia F, Leonard JL. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Nat Rev Endocrinol.* (2016) 12:111–21. 10.1038/nrendo.2015.205.
77. TSIBULNIKOV, S.; MASLOV, L.; VORONKOV, N.; OELTGEN, P. Thyroid hormones and the mechanisms of adaptation to cold. *Hormones (Athens)*, 19, n. 3, p. 329-339, Sep 2020.
78. Davis P.J., Goglia F., Leonard J.L. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2016;12:111–121. doi: 10.1038/nrendo.2015.
79. HOERMANN, R. et al. Is pituitary TSH an adequate measure of thyroid hormone-controlled homeostasis during thyroxine treatment? *Eur J Endocrinol*, v. 168, n. 2, p. 271-80, Feb 2013.
80. GAITONDE, D. Y.; ROWLEY, K. D.; SWEENEY, L. B. Hypothyroidism: an update. *Am Fam Physician*, v. 86, n. 3, p. 244-51, Aug 2012.
81. AOKI, Y. et al. Serum TSH and total T4 in the United States population and their association with participant characteristics: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES 1999-2002). *Thyroid*, v. 17, n. 12, p. 1211-23, Dec 2007.
82. SGARBI, J. A. et al. The Brazilian consensus for the clinical approach and treatment of subclinical hypothyroidism in adults: recommendations of the thyroid Department of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v. 57, n. 3, p. 166-83, Apr 2013.
83. KAJANTIE, E. et al. Spontaneous hypothyroidism in adult women is predicted by small body size at birth and during childhood. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 91, n. 12, p. 4953-6, Dec 2006.
84. SAWIN, C. T. et al. The aging thyroid. Thyroid deficiency in the Framingham Study. *Arch Intern Med*, v. 145, n. 8, p. 1386-8, Aug 1985.
85. REINERS, C. et al. The First Meeting of the WHO Guideline Development Group for the Revision of the WHO 1999 Guidelines for Iodine Thyroid Blocking. *Radiat Prot Dosimetry*, v. 171, n. 1, p. 47-56, Sep 2016.
86. SOMWARU, L. L. et al. The natural history of subclinical hypothyroidism in the elderly: the cardiovascular health study. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 97, n. 6, p. 1962-9, Jun 2012.
87. FATOURECHI, V. Subclinical hypothyroidism: an update for primary care physicians. *Mayo Clin Proc*, v. 84, n. 1, p. 65-71, 2009.

88. Rock MJ, Holden P, Horton WA, Cohn DH. The cartilage oligomeric matrix protein promotes cell fixation through two independent mechanisms involving CD47 and  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin. *Mol Cell Biochem.* 2010; 338 (1-2): 215–224.
89. CHIOVATO, L.; MAGRI, F.; CARLÉ, A. Hypothyroidism in Context: Where We've Been and Where We're Going. *Adv Ther*, 36, n. Suppl 2, p. 47-58, 09 2019b.
90. COOPER, D. S.; BIONDI, B. Subclinical thyroid disease. *Lancet*, 379, n. 9821, p. 1142-1154, Mar 2012.
91. CANARIS, G. J. et al. The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch Intern Med*, v. 160, n. 4, p. 526-34, Feb 2000.
92. B. Biondi, DS Cooper The clinical significance of subclinical thyroid dysfunction *Endocr Rev*, 29 (2008), pp. 76 - 131
93. A. Jabbar, S. Razvi Thyroid disease and vascular risk *Clin Med (Lond)*, 14 (Suppl 6) (2014), pp. S29 - s32.
94. A. Jabbar, A. Pingitore, SH Pearce, A. Zaman, G. Iervasi, S. Razvi Thyroid hormones and cardiovascular diseases *Nat Rev Cardiol*, 14 (2017), pp. 39 – 55
95. Klein I, Danzi S. Thyroid disease and the heart. *Circulation.* 2007. October 9; 116 15: 1725– 35.
96. RAZVI, S. et al. Levothyroxine treatment of subclinical hypothyroidism, fatal and nonfatal cardiovascular events, and mortality. *Arch Intern Med*, v. 172, n. 10, p. 811-7, May 2012.
97. BRENTA, G. et al. Clinical practice guidelines for the management of hypothyroidism. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v. 57, n. 4, p. 265-91, Jun 2013.
98. Almeida C, Vaisman M, Costa AJ, Reis FA, Reuters V, Teixeira P, et al. Are neuropsychological changes relevant in subclinical hypothyroidism? *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007;51(4):606-11.
99. STOJKOVIĆ, M.; ŽARKOVIĆ, M. Subclinical Thyroid Dysfunction and the Risk of Cardiovascular Disease. **Curr Pharm Des**, Nov 2020.
100. BIONDI, B. Mechanisms in endocrinology: Heart failure and thyroid dysfunction. *Eur J Endocrinol*, v. 167, n. 5, p. 609-18, Nov 2012.
101. BAUMGARTNER, C.; BLUM, M. R.; RODONDI, N. Subclinical hypothyroidism: summary of evidence in 2014. *Swiss Med Wkly*, v. 144, p. w14058, 2014.
102. NING, N. et al. Prognostic Role of Hypothyroidism in Heart Failure: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*, v. 94, n. 30, p. e1159, Jul 2015.
103. LIOUDAKI, E. et al. Subclinical hypothyroidism and vascular risk: an update. *Hormones (Athens)*, v. 12, n. 4, p. 495-506, 2013 Oct-Dec 2013.
104. BOEKHOLDT, S. M. et al. Initial thyroid status and cardiovascular risk factors: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 72, n. 3, p. 404-10, Mar 2010.
105. TAROZA, S.; RASTENYTĖ, D.; BURKAUSKAS, J.; PODLIPSKYTĖ, A. et al. Deiodinases, organic anion transporter polypeptide polymorphisms and symptoms of anxiety and depression after ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 29, n. 9, p. 105040, Sep 2020.
106. Davis JD, Tremont G. Neuropsychiatric aspects of hypothyroidism and treatment reversibility. *Minerva Endocrinol.* 2007;32(1):49-65.
107. Gitlin M, Altshuler LL, Frye MA, Suri R, Huynh EL, Fairbanks L, et al. Peripheral thyroid hormones and response to selective serotonin reuptake inhibitors. *J Psychiatry Neurosci.* 2004;29:383–6.

108. COOPER, D. S.; BIONDI, B. Subclinical thyroid disease. **Lancet**, 379, n. 9821, p. 1142-1154, Mar 2012.
109. Tremont G, Stern RA, Westervelt HJ, Bishop CL, Davis JD. Neurobehavior Neurobehavior in thyroid disorders. *Med Health R.* 2003; 86:318-22.
110. Saxena J, Singh PN, Srivastava U, Siddiqui AQ. A study of thyroid hormones (T3, T4& TSH) in patients of depression. *Indian J Psychiatry.* 2000; 42:243–6. *Indian J Psychiatry.* 2000; 42:243-6.
111. CHENG, S. Y.; LEONARD, J. L.; DAVIS, P. J. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev*, 31, n. 2, p. 139-170, Apr 2010.
112. Grabe HJ, Volzke H, Ludemann J, Wolff B, Schwahn C, John U, Meng W, Freyberger HJ (2005) Mental and physical complaints in thyroid disorders in the general population. *Acta Psychiatr Scand* 112(4):286–293. doi:10.1111/j.1600-0447.2005.00586.x.
113. Gupta S, Saha PK, Mukhopadhyay A. Prevalence of hypothyroidism and importance of cholesterol estimation in patients suffering from major depressive disorder. *J Indian Med Assoc.*
114. Joffe RT, Sullivan TB. The significance of an isolated elevated TSH level in a depressed patient: A clinical commentary. *Int J Psychiatry Med.* 2014;48:167–73.  
meta-analysis. *Transl Psychiatry*, 8, n. 1, p. 239, 10 2018.
115. Boral GC, Ghosh AB, Pal SK, Ghosh KK, Nandi DN. Thyroid function in different psychiatric disorders. *Indian J Psychiatry.* 1980;22:200–2.
116. Bauer M, Heinz A, Whybrow PC. Thyroid hormones, serotonin and mood: Of synergy and significance in the adult brain. *Mol Psychiatry.* 2002;7:140–56.
117. Smith JW, Evans AT, Costall B, Smythe JW. Thyroid hormones, brain function and cognition: A brief review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2002;26:45–60.
118. Bernal J, Nunez J. Thyroid hormones and brain development. *Eur J Endocrinol.* 1995;133:390–8.
119. Fischer S, Ehlert U. Hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis functioning in anxiety disorders. A systematic review. *Depress Anxiety.* 2018;35(1):98-110.
120. Ahmed R. Developmental thyroid diseases and monoaminergic dysfunction. *Adv Appl Sci Res.* 2017;8(3):1-10.
121. Medici M, Direk N, Visser WE, Korevaar TI, Hofman A, Visser TJ, et al. Thyroid function within the normal range and the risk of depression: a population-based cohort study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(4):1213-9.
122. Yarpuz YM, Aydoğan Ü, Sarı O, Aydoğdu A, Üçkaya G, Fenercioğlu A, et al. Subklinik hipotiroidili hastalarda tiroid replasman tedavisinin anksiyete ve depresyon düzeylerine etkisi. *Klinik Psikiyatri Dergisi.* 2009;12(4):180-7.
123. U.S. Food and Drug Administration 2007 Pharmacy compounding/compounding of bio-identical hormone replacement therapies. Available at: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Testimony/ucm154031.htm>.
124. JORGENSEN, E. C. Structure activity relationships of thyroxine analogs. *Pharmacol Ther B*, 2, n. 4, p. 661-682, 1976.
125. CODY, V. Thyroid hormone structure-activity relationships: molecular structure of 3,5,3'-triiodothyropropionic acid. *Endocr Res*, 14, n. 2-3, p. 165-176, 1988.
126. MULLUR, R.; LIU, Y. Y.; BRENT, G. A. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol Rev*, v. 94, n. 2, p. 355-82, Apr 2014.
127. IMS National prescription audit. Use of Meds in the U.S. review of 2010.

128. ZAMFIRESCU, I.; CARLSON, H. E. Absorption of levothyroxine when coadministered with various calcium formulations. *Thyroid*, v. 21, n. 5, p. 483-6, May 2011.
129. Lamson MJ. Pamplin CL. Rolleri RL. Klein I. Quantitation of a substantial reduction in levothyroxine (T4) absorption by food. *Thyroid*. 2004; 14: 876.
130. BENVENGA, S. et al. Altered intestinal absorption of L-thyroxine caused by coffee. *Thyroid*, v. 18, n. 3, p. 293-301, Mar 2008.
131. CENTANNI, M. et al. Thyroxine in goiter, *Helicobacter pylori* infection, and chronic gastritis. *N Engl J Med*, v. 354, n. 17, p. 1787-95, Apr 2006.
132. VIGÁRIO, P. O. S. et al. Inadequate levothyroxine replacement for primary hypothyroidism is associated with poor health-related quality of life—a Brazilian multicentre study. *Endocrine*, v. 44, n. 2, p. 434-40, Oct 2013.
133. BIONDI, B.; COOPER, D. S. Thyroid hormone therapy for hypothyroidism. *Endocrine*, 66, n. 1, p. 18-26, Oct 2019.
134. RICHOU, M.; GILLY, O.; TAILLARD, V.; PAUL DE BRAUWERE, D. *et al.* Levothyroxine dose adjustment in hypothyroid patients following gastric sleeve surgery. *Ann Endocrinol (Paris)*, 81, n. 5, p. 500-506, Oct 2020.
135. HENNESSEY, J. V. et al. Adverse event reporting in patients treated with levothyroxine: results of the pharmacovigilance task force survey of the American Thyroid Association, American Association of Clinical Endocrinologists, and the Endocrine Society. *Endocr Pract*, v. 16, n. 3, p. 357-70, 2010 May-Jun 2010.
136. CAPPELLI, C. et al. Oral liquid levothyroxine treatment at breakfast: a mistake? *Eur J Endocrinol*, v. 170, n. 1, p. 95-9, Jan 2014.
137. GKOTSINA, M. et al. Improved levothyroxine pharmacokinetics after bariatric surgery. *Thyroid*, v. 23, n. 4, p. 414-9, Apr 2013.
138. BACH-HUYNH, T. G. et al. Timing of levothyroxine administration affects serum thyrotropin concentration. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 94, n. 10, p. 3905-12, Oct 2009.
139. CARDOSO, L. F.; MACIEL, L. M.; PAULA, F. J. The multiple effects of thyroid disorders on bone and mineral metabolism. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v. 58, n. 5, p. 452-63, Jul 2014.
140. GROZINSKY-GLASBERG, S. et al. Thyroxine-triiodothyronine combination therapy versus thyroxine monotherapy for clinical hypothyroidism: meta-analysis of randomized controlled trials. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 91, n. 7, p. 2592-9, Jul 2006.
141. Melville N. No Thyroid-Function Benefits With T4/T3 Combo in Crossover Study. 2015 International Thyroid Congress and Annual Meeting of the American Thyroid Association; Orlando, Florida. Abstract 7, presented October 19, 2015.
142. Department of Health and Human Services, FDA, and Center for Drug Evaluation and Research (2009e2). Guidance for the industry: bioavailability and bioequivalence studies for general oral drug considerations considerations oral [<http://www.fda.gov/cder/guidance/4964dft.pdf>] (acessado em 02 de março de 2020).
143. Effectiveness of Generic vs Brand-Name Levothyroxine in Achieving Normal Thyrotropin Levels. *JAMA Netw Open*, 3, n. 9, p. e2017645, Sep 2020.
144. U.S. Food and Drug Administration 2007 Pharmacy compounding/compounding of bio-identical hormone replacement therapies. Available at: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Testimony/ucm154031.htm>. Acessado dia 10/04/2020.
145. FALLAHI, P. et al. Advancements in the treatment of hypothyroidism with L-T4 liquid formulation or soft gel capsule: an update. *Expert Opin Drug Deliv*, p. 1-9, Aug 2016.

146. Yue CS, Scarsi C & Ducharme MP. Pharmacokinetics and potential advantages of a new oral solution of levothyroxine vs. other available dosage forms. *Arzneimittel-Forschung* 2012 62 631–636.
147. Sawin CT, et al. Oral thyroxine: variation in biologic action and tablet content. *Ann Intern Med*, v. 100, n. 5, p. 641-5, May 1984.
148. JAVED, Z.; SATHYAPALAN, T. Levothyroxine treatment of mild subclinical hypothyroidism: a review of potential risks and benefits. *Ther Adv Endocrinol Metab*, v. 7, n. 1, p. 12-23, Feb 2016.
149. TRIFIRÒ, G. et al. Drug interactions with levothyroxine therapy in patients with hypothyroidism: observational study in general practice. *Clin Drug Investig*, v. 35, n. 3, p. 187-95, Mar 2015.
150. Hypothyroidism in adults. Levothyroxine if warranted by clinical and laboratory findings, not for simple TSH elevation. *Prescrire Int*, v. 24, n. 164, p. 241-4, 246, Oct 2015.
151. Department of Health and Human Services, FDA, and Center for Drug Evaluation and Research (200ge2). Guidance for the industry: bioavailability and bioequivalence studies for general oral drug considerations considerations oral [<http://www.fda.gov/cder/guidance/4964dft.pdf>] (acessado em 02 de março de 2020).
152. Burmester JK, Sedova M, Shapero MH, Mansfield E. DMET microarray technology for pharmacogenomics-based personalized medicine. *Methods Mol Biol*. 2010; 632:99–124.
153. SHASTRY, B. S. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. *Pharmacogenomics J*, v. 6, n. 1, p. 16-21, 2006 Jan-Feb 2006.
154. CHOWBAY, B.; ZHOU, S.; LEE, E. J. An interethnic comparison of polymorphisms of the genes encoding drug-metabolizing enzymes and drug transporters: experience in Singapore. *Drug Metab Rev*, v. 37, n. 2, p. 327-78, 2005.
155. Kan YW, Dozy AM. Antenatal diagnosis of sickle-cell anaemia by D.N.A. analysis of amniotic-fluid cells. *Lancet*. 1978;2:910–912.
156. Scott SA, Edelmann L, Liu L, Luo M, Desnick RJ, Kornreich R. Experience with carrier screening and prenatal diagnosis for 16 Ashkenazi Jewish genetic diseases. *Hum Mutat*. 2010;31:1240–1250.
157. Patrinos GP, Kollia P, Papadakis MN. Molecular diagnosis of inherited disorders: lessons from hemoglobinopathies. *Hum Mutat*. 2005;26:399–412.
158. Relling MV, Altman RB, Goetz MP, Evans WE. Clinical implementation of pharmacogenomics: overcoming genetic exceptionalism. *Lancet Oncol*. 2010;11:507–509.
159. Motulsky AG. Drug reactions enzymes, and biochemical genetics. *J AmMed Assoc*. 1957;165:835–837.
160. Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*. 1999; 286: 487–491. 10.1126/science.286.5439.487.
161. SANTORO, A. B. et al. Effect of UGT1A1, UGT1A3, DIO1 and DIO2 polymorphisms on L-thyroxine doses required for TSH suppression in patients with differentiated thyroid cancer. *Br J Clin Pharmacol*, v. 78, n. 5, p. 1067-75, Nov 2014.
162. Tayo BO, Teil M, Tong L, et al. Genetic background of patients from a university medical center in Manhattan: implications for personalized medicine. *PLoS One*. 2011;6:e19166.
163. Ryan SG. Regression to the truth: replication of association in pharmacogenetic studies. *Pharmacogenomics*. 2003; 4: 201–207.
164. KREJSA, C.; ROGGE, M.; SADEE, W. Protein therapeutics: new applications for pharmacogenetics. *Nat Rev Drug Discov*, v. 5, n. 6, p. 507-21, Jun 2006.

165. COCCA, M. et al. Pharmacogenetics driving personalized medicine: analysis of genetic polymorphisms related to breast cancer medications in Italian isolated populations. *J Transl Med*, v. 14, p. 22, 2016.
166. MA, D.; LIU, F. Genome Editing and Its Applications in Model Organisms. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, v. 13, n. 6, p. 336-44, Dec 2015.
167. DELANEY, S. K. et al. Toward clinical genomics in everyday medicine: perspectives and recommendations. *Expert Rev Mol Diagn*, v. 16, n. 5, p. 521-32, 2016.
168. SHASTRY, B. S. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. *Pharmacogenomics J*, v. 6, n. 1, p. 16-21, 2006 Jan-Feb 2006.
169. MCGONIGLE, I. V. The collective nature of personalized medicine. *Genet Res (Camb)*, v. 98, p. e3, 2016.
170. GARBER, M. et al. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nat Methods*, v. 8, n. 6, p. 469-77, Jun 2011.
171. TRAPNELL, C. et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNAseq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc*, v. 7, n. 3, p. 562-78, Mar 2012.
172. FERREIRA, E. N. et al. Linear mRNA amplification approach for RNAseq from limited amount of RNA. *Gene*, v. 564, n. 2, p. 220-7, Jun 2015.
173. Bartalena L, Brogioni S, Grasso L, Bogazzi F, Burelli A, Martino E. Treatment of amiodarone-induced thyrotoxicosis, a difficult challenge: results of a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2930-3.
174. Samuels MH, McDaniel PA. Thyrotrophin levels during hydrocortisone infusions that mimic fasting-induced cortisol elevations: a clinical research study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3700-4.
175. IRVING, S. A.; VADIVELLO, T.; LEESE, G. P. Drugs that interact with levothyroxine: an observational study from the Thyroid Epidemiology, Audit and Research Study (TEARS). *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 82, n. 1, p. 136-41, Jan 2015.
176. Campbell NR, Hasinoff BB, Stalts H, Rao B, Wong, NC. Ferrous sulfate reduces thyroxine efficacy in patients with hypothyroidism. *Ann Intern Med* 1992;117:1010-3
177. WOLTER, P.; DUMEZ, H.; SCHÖFFSKI, P. Sunitinib and hypothyroidism. *N Engl J Med*, v. 356, n. 15, p. 1580; author reply 1580-1, Apr 2007.
178. ILLOUZ, F. et al. Tyrosine kinase inhibitors and modifications of thyroid function tests: a review. *Eur J Endocrinol*, v. 160, n. 3, p. 331-6, Mar 2009.
179. Gaitan E, Cooksey RC, Legan J, et al. : antithyroid and goitrogenic effects of coal water extracts from iodine-sufficient goiter areas. *Thyroid*, 1993; 3 49-53.
180. Langer P, Tajtakova M, Fodor G, et al. : Increased thyroid volume and prevalence of thyroid disorders in an area heavily polluted by polychlorinated biphenyls. *Eur J Endocrinol* 1998; 139: 402-409.
181. Braverman LE, Ele X, Pino S et al. The effect of perchlorate, thiocyanate, and nitrate on thyroid function in workers exposed to long-term perchlorate. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 700-706.
182. Zulewski H, Müller B, Exer P, Miserez AR, Staub JJ. Estimation of tissue hypothyroidism by a new clinical score: evaluation of patients with various grades of hypothyroidism and controls. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Mar;82(3):771-6.
183. GAMMAGE, M. D.; FRANKLYN, J. A. Amiodarone and the thyroid. *Q J Med*, 62, n. 238, p. 83-86, Feb 1987.
184. Unger J, Lambert M, Jonkheer MH, Denayer Ph. Amiodarone and the thyroid: pharmacological, toxic and therapeutic effects. *J Int Med* 1993;233:435-43.

185. Latini R, Tognoni G, Kates RE. Clinical pharmacokinetics of amiodarone. *Clin Pharmacokinet* 1984;9:136-56.
186. JABROCKA-HYBEL, A.; BEDNARCZUK, T.; BARTALENA, L.; PACH, D. *et al.* Amiodarone and the thyroid. *Endokrynol Pol*, 66, n. 2, p. 176-186, 2015.
187. Kennedy RL, Griffiths H, Gray TA. Amiodarone and the thyroid. *Clin Chem* 1989;35:1882-7.
188. Rao RH, McCready VR, Spathis GS. Iodine kinetic studies during amiodarone treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:563-8.
189. ROSENE, M. L.; WITTMANN, G.; ARROJO E DRIGO, R.; SINGRU, P. S. *et al.* Inhibition of the type 2 iodothyronine deiodinase underlies the elevated plasma TSH associated with amiodarone treatment. *Endocrinology*, 151, n. 12, p. 5961-5970, Dec 2010.
190. LOH, K. C. Amiodarone-induced thyroid disorders: a clinical review. *Postgrad Med J*, 76, n. 893, p. 133-140, Mar 2000a.
191. MARTINO, E.; BARTALENA, L.; BOGAZZI, F.; BRAVERMAN, L. E. The effects of amiodarone on the thyroid. *Endocr Rev*, 22, n. 2, p. 240-254, Apr 2001.
192. MATSUBARA, K.; SANOH, S.; OHTA, S.; KITAMURA, S. *et al.* An improved thyroid hormone reporter assay to determine the thyroid hormone-like activity of amiodarone, bithionol, closantel and rafoxanide. *Toxicol Lett*, 208, n. 1, p. 30-35, Jan 2012.
193. Hammes SR, Davis PJ. Overlapping nongenomic and genomic actions of thyroid hormone and steroids. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* (2015) 29:581–93. 10.1016/j.beem.2015.04.001.
194. RITCHIE, M. E.; PHIPSON, B.; WU, D.; HU, Y. *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*, 43, n. 7, p. e47, Apr 2015.
195. KAIMAL, V.; BARDES, E. E.; TABAR, S. C.; JEGGA, A. G. *et al.* ToppCluster: a multiple gene list feature analyzer for comparative enrichment clustering and network-based dissection of biological systems. *Nucleic Acids Res*, 38, n. Web Server issue, p. W96-102, Jul 2010.
196. SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S. *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*, 13, n. 11, p. 2498-2504, Nov 2003.
197. PATHAN, M.; KEERTHIKUMAR, S.; ANG, C. S.; GANGODA, L. *et al.* FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *Proteomics*, 15, n. 15, p. 2597-2601, Aug 2015.
198. PIÑERO, J.; RAMÍREZ-ANGUITA, J. M.; SAÜCH-PITARCH, J.; RONZANO, F. *et al.* The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update. *Nucleic Acids Res*, 48, n. D1, p. D845-D855, 01 2020.
199. DAVIS, A. P.; GRONDIN, C. J.; JOHNSON, R. J.; SCIACKY, D. *et al.* Comparative Toxicogenomics Database (CTD): update 2021. *Nucleic Acids Res*, Oct 2020.
200. RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R. RStudio. Boston, MA RStudio, PBC; 2020.
201. Robinson MD, Smyth GK. Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. *Biostatistics*. 2008;9(2):321-32.
202. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009 Aug 15;25(16):2078-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352. Epub 2009 Jun 8.

203. Harrow J, Frankish A, Gonzalez JM, Tapanari E, Diekhans M, Kokocinski F, Aken BL, Barrell D, Zadissa A, Searle S, Barnes I, Bignell A, Boychenko V, Hunt T, Kay M, Mukherjee G, Rajan J, Despacio-Reyes G, Saunders G, Steward C, Harte R, Lin M, Howald C, Tanzer A, Derrien T, Chrast J, Walters N, Balasubramanian S, Pei B, Tress M, Rodriguez JM, Ezkurdia I, van Baren J, Brent M, Haussler D, Kellis M, Valencia A, Reymond A, Gerstein M, Guigó R, Hubbard TJ. GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Res.* 2012 Sep;22(9):1760-
204. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15-21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635.
205. MASSOLT, E. T.; MEIMA, M. E.; SWAGEMAKERS, S. M. A.; LEEUWENBURGH, S. et al. Thyroid State Regulates Gene Expression in Human Whole Blood. *J Clin Endocrinol Metab*, 103, n. 1, p. 169-178, 01 2018.
206. YLLI, D.; WARTOFSKY, L.; BURMAN, K. D. Evaluation and Treatment of Amiodarone-Induced Thyroid Disorders. *J Clin Endocrinol Metab*, Nov 2020.
207. Pietzner M, Engelmann B, Kacprowski T, Golchert J, Dirk AL, Hammer E, Iwen KA, Nauck M, Wallaschofski H, Führer D, Münte TF, Friedrich N, Volker U, Homuth G, Brabant G. Plasma proteome and metabolome characterization of an experimental human thyrotoxicosis model. *BMC Med.* 2017;15(1):6.
208. VIRREIRA, M.; JIN, L.; DJERBIB, S.; DE DEKEN, X. et al. Expression, Localization, and Regulation of the Sodium Bicarbonate Cotransporter NBCe1 in the Thyroid. *Thyroid*, 29, n. 2, p. 290-301, 02 2019.
209. BURK, O.; BRENNER, S. S.; HOFMANN, U.; TEGUDE, H. et al. The impact of thyroid disease on the regulation, expression, and function of ABCB1 (MDR1/P glycoprotein) and consequences for the disposition of digoxin. *Clin Pharmacol Ther*, 88, n. 5, p. 685-694, Nov 2010a.
210. LIN, H. Y.; TANG, H. Y.; DAVIS, F. B.; MOUSA, S. A. et al. Nongenomic regulation by thyroid hormone of plasma membrane ion and small molecule pumps. *Discov Med*, 14, n. 76, p. 199-206, Sep 2012.
211. LUNNON, K.; SMITH, R.; HANNON, E.; DE JAGER, P. L. et al. Methylomic profiling implicates cortical deregulation of ANK1 in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*, 17, n. 9, p. 1164-1170, Sep 2014.
212. DE JAGER, P. L.; SRIVASTAVA, G.; LUNNON, K.; BURGESS, J. et al. Alzheimer's disease: early alterations in brain DNA methylation at ANK1, BIN1, RHBDF2 and other loci. *Nat Neurosci*, 17, n. 9, p. 1156-1163, Sep 2014.
213. CHOI, B. W.; KIM, S.; KANG, S.; WON, K. S. et al. Relationship Between Thyroid Hormone Levels and the Pathology of Alzheimer's Disease in Euthyroid Subjects. *Thyroid*, 30, n. 11, p. 1547-1555, Nov 2020.
214. CHO, S. W.; KIM, Y. A.; SUN, H. J.; OH, B. C. et al. CXCL16 signaling mediated macrophage effects on tumor invasion of papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer*, 23, n. 2, p. 113-124, 02 2016.
215. AUST, G.; KAMPRAD, M.; LAMESCH, P.; SCHMÜCKING, E. CXCR6 within T-helper (Th) and T-cytotoxic (Tc) type 1 lymphocytes in Graves' disease (GD). *Eur J Endocrinol*, 152, n. 4, p. 635-643, Apr 2005a.
216. HU, B.; YANG, X. B.; SANG, X. T. Development and Verification of the Hypoxia-Related and Immune-Associated Prognosis Signature for Hepatocellular Carcinoma. *J Hepatocell Carcinoma*, 7, p. 315-330, 2020.
217. CHEN, Y. F.; POTTALA, J. V.; WELTMAN, N. Y.; GE, X. et al. Regulation of gene expression with thyroid hormone in rats with myocardial infarction. *PLoS One*, 7, n. 8, p. e40161, 2012.
218. ISHIZUKA, T.; FUJIMORI, I.; KATO, M.; NOJI-SAKIKAWA, C. et al. Human carboxymethylenebutenolidase as a bioactivating hydrolase of olmesartan medoxomil in liver and

- intestine. *J Biol Chem*, 285, n. 16, p. 11892-11902, Apr 2010.
- <sup>219</sup>. KMIOT, W. A.; KEIGHLEY, M. R. Totally stapled abdominal restorative proctocolectomy. *Br J Surg*, 76, n. 9, p. 961-964, Sep 1989.
- <sup>220</sup>. TYE, K. M.; PRAKASH, R.; KIM, S. Y.; FENNO, L. E. et al. Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature*, 471, n. 7338, p. 358-362, Mar 2011.
- <sup>221</sup>. GONG, L.; LIAO, T.; LIU, D.; LUO, Q. et al. Amygdala Changes in Chronic Insomnia and Their Association with Sleep and Anxiety Symptoms: Insight from Shape Analysis. *Neural Plast*, 2019, p. 8549237, 2019.
- <sup>222</sup>. MARTÍNEZ DE ARRIETA, C.; MORTE, B.; COLOMA, A.; BERNAL, J. The human RC3 gene homolog, NRG1 contains a thyroid hormone-responsive element located in the first intron. *Endocrinology*, 140, n. 1, p. 335-343, Jan 1999a.
- <sup>223</sup>. TUNC-OZCAN, E.; HARPER, K. M.; GRAF, E. N.; REDEI, E. E. Thyroxine administration prevents matrilineal intergenerational consequences of in utero ethanol exposure in rats. *Horm Behav*, 82, p. 1-10, 06 2016.
- <sup>224</sup>. MARTÍNEZ DE ARRIETA, C.; MORTE, B.; COLOMA, A.; BERNAL, J. The human RC3 gene homolog, NRG1 contains a thyroid hormone-responsive element located in the first intron. *Endocrinology*, 140, n. 1, p. 335-343, Jan 1999b.

**ANEXO 1 – DGE COM 199 TRANSCRITOS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS, EM QUE 89 GENES APRESENTAM GANHO DE EXPRESSÃO E 110 GENES APRESENTAM PERDA DE EXPRESSÃO**

Gene	logFC CTL vs HTT-at	logCPM	LR	Descrição	Map location
<i>RAP1GAP</i>	8,17	1,96	82,51	<i>eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2</i>	2q33.3
<i>SLC4A4</i>	6,72	1,04	72,18	<i>solute carrier family 4 (sodium bicarbonate cotransporter), member 4</i>	4q21
<i>PTGDR2</i>	2,74	1,11	20,36	<i>prostaglandin D2 receptor 2</i>	11q12-q13.3
<i>CDC42EP1</i>	2,68	2,25	33,23	<i>CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1</i>	22q13.1
<i>KIF19</i>	2,64	1,13	19,3	<i>kinesin family member 19</i>	17q25.1
<i>ABCB1</i>	2,47	3,05	69,85	<i>ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1</i>	7q21.12
<i>SIGLEC8</i>	2,46	6,55	44,41	<i>sialic acid binding Ig-like lectin 8</i>	19q13.33-q13.41
<i>FKBP8</i>	2,39	2,93	43,35	<i>FK506 binding protein 8, 38kDa</i>	19p12
<i>ZNF208</i>	2,34	2,73	24,84	<i>zinc finger protein 208</i>	19p12
<i>TNNT1</i>	2,21	5,72	46,93	<i>troponin T type 1 (skeletal, slow)</i>	19q13.4
<i>FTH1P23</i>	2,21	1,92	17,05	<i>ferritin heavy chain 1 pseudogene 23</i>	3p13
<i>NFATC2</i>	2,20	2,84	65,25	<i>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2</i>	20q13.2
<i>MOCS1A</i>	2,15	2,97	20,76	<i>MOCS1 cDNA ORF clone, Homo sapiens(Human)</i>	6p21.2
<i>MPL</i>	2,08	3,19	37,97	<i>MPL proto-oncogene, thrombopoietin receptor</i>	1p34
<i>COX7B</i>	2,00	6,97	32,82	<i>cytochrome c oxidase subunit VIIb</i>	Xq21.1
<i>GPR162</i>	1,95	2,58	16,74	<i>G protein-coupled receptor 162</i>	12p13
<i>RPL26</i>	1,94	6,19	24,6	<i>ribosomal protein L26</i>	17p13
<i>TMEM176B</i>	1,89	3,04	43,18	<i>transmembrane protein 176B</i>	7q36.1
<i>HLA-DRB1</i>	1,85	2,83	19,3	<i>major histocompatibility complex, class II, DR beta 1</i>	6p21.3
<i>COX7C</i>	1,82	0,97	33,28	<i>cytochrome c oxidase subunit VIIc</i>	5q14
<i>KIR3DL1</i>	1,82	1,16	22,64	<i>killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 1</i>	19q13.4

<i>CXCL8</i>	1,81	5,76	22,52	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 8</i>	4q13-q21
<i>HLA-DRB6</i>	1,81	2,9	17,72	<i>major histocompatibility complex, class II, DR beta 6 (pseudogene)</i>	6p21.32
<i>NDUFA4</i>	1,79	7,87	19,36	<i>NDUFA4, mitochondrial complex associated</i>	7p21.3
<i>NDUFA1</i>	1,72	4,13	35,29	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 1, 7.5kDa</i>	Xq24
<i>EEF1B2</i>	1,71	5,11	38,77	<i>eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2</i>	2q33.3
<i>MITD1</i>	1,69	4,49	24,87	<i>MIT, microtubule interacting and transport, domain containing 1</i>	2q11.2
<i>SLC29A1</i>	1,64	3,1	39,05	<i>solute carrier family 29 (equilibrative nucleoside transporter), member 1</i>	6p21.1
<i>RPL22L1</i>	1,60	2,96	23,67	<i>ribosomal protein L22-like 1</i>	3q26.2
<i>RBPM5</i>	1,59	3,28	22,97	<i>RNA binding protein with multiple splicing 2</i>	15q22.31
<i>AC116533.1</i>	1,57	3,77	16,92	<i>Homo sapiens chromosome 11, clone RP11-466H18</i>	AC116533
<i>RSAD2</i>	1,56	5,48	32,07	<i>radical S-adenosyl methionine domain containing 2</i>	2p25.2
<i>AHSP</i>	1,53	5,29	22,28	<i>alpha hemoglobin stabilizing protein</i>	16p11.2
<i>GSTM1</i>	1,52	5,57	32,24	<i>glutathione S-transferase mu 1</i>	1p13.3
<i>RBIS</i>	1,51	8,46	21,38	<i>ribosomal biogenesis factor</i>	8q21.2
<i>PKD1P5</i>	1,48	4,03	16,74	<i>polycystin 1, transient receptor potential channel interacting pseudogene 5</i>	16p12.3
<i>CLC</i>	1,47	3,54	44,91	<i>Charcot-Leyden crystal galectin</i>	19q13.1
<i>CRTAM</i>	1,47	4,98	40,14	<i>cytotoxic and regulatory T cell molecule</i>	11q24.1
<i>FCRL5</i>	1,45	6,4	28,33	<i>Fc receptor-like 5</i>	1q23.1
<i>KIR2DS4</i>	1,42	3,3	18,2	<i>killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 4</i>	19q13.42
<i>XCL1</i>	1,38	5,21	28,71	<i>chemokine (C motif) ligand 1</i>	1q23
<i>ISG15</i>	1,38	6,47	19,58	<i>ISG15 ubiquitin-like modifier</i>	1p36.33
<i>ANK1</i>	1,38	4,85	268,49	<i>ankyrin 1, erythrocytic</i>	8p11.1
<i>S100A8</i>	1,32	6,31	28,24	<i>S100 calcium binding protein A8</i>	1q21.3
<i>LAIR2</i>	1,29	5,79	22,8	<i>leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 2</i>	19q13.4
<i>AC131568.1</i>	1,29	5,06	16,4	<i>Homo sapiens chromosome 8, clone RP11-1146N6</i>	AC131568

<i>TREML5P</i>	1,17	6,37	17,86	<i>triggering receptor expressed on myeloid cells like 5, pseudogene</i>	6p21.1
<i>UQCRB</i>	1,16	3,01	25,06	<i>ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein</i>	8q22
<i>TMCC1</i>	1,13	2,36	21,49	<i>transmembrane and coiled-coil domain family 1</i>	3q22.1
<i>PATL2</i>	1,12	6,7	17,7	<i>protein associated with topoisomerase II homolog 2 (yeast)</i>	15q21.1
<i>LRRC37A4P</i>	1,11	2,77	18,29	<i>leucine rich repeat containing 37 member A4, pseudogene</i>	17q21.31
<i>SNORA7B</i>	1,10	1,94	18,56	<i>small nucleolar RNA, H/ACA box 7B</i>	3q21.3
<i>RPS3AP6</i>	1,09	7,8	17,35	<i>RPS3A pseudogene 6</i>	15q22.2
<i>AL592114.1</i>	1,08	2,79	18,25	<i>Vesicle transport protein GOT1A</i>	
<i>SYTL2</i>	1,06	5,89	30,87	<i>synaptotagmin-like 2</i>	11q14
<i>AC239859.1</i>	1,02	7,41	18,98	<i>Homo sapiens BAC clone CH17-13123 from chromosome 1</i>	AC239859
<i>CD177</i>	1,02	17,79	18,71	<i>CD177 molecule</i>	19q13.2
<i>IFI44L</i>	0,92	5,74	30,18	<i>interferon-induced protein 44-like</i>	1p31.1
<i>AC241952.1</i>	0,90	1,99	16,51	<i>Homo sapiens BAC clone CH17-449C21 from chromosome 1</i>	AC241952
<i>KRT23</i>	0,86	2,36	43,11	<i>keratin 23, type I</i>	17q21.2
<i>DNAJB4</i>	0,83	9,71	24,25	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4</i>	1p31.1
<i>IFIT3</i>	0,80	4,00	37,49	<i>interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3</i>	10q24
<i>TOMM7</i>	0,80	4,57	19,29	<i>translocase of outer mitochondrial membrane 7 homolog (yeast)</i>	7p15.3
<i>RPL27</i>	0,66	2,24	32,74	<i>ribosomal protein L27</i>	17q21
<i>C1orf21</i>	0,61	2,28	38,33	<i>chromosome 1 open reading frame 21</i>	1q25
<i>RPL23</i>	0,59	5,95	34,49	<i>ribosomal protein L23</i>	17q
<i>SNRPG</i>	0,57	2,62	28	<i>small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G</i>	2p13.3
<i>CMC1</i>	0,51	7,9	19,67	<i>C-x(9)-C motif containing 1</i>	3p24.1
<i>TRIM61</i>	0,43	3,24	20,26	<i>tripartite motif containing 61</i>	4q32.3
<i>MT1L</i>	0,43	5,03	16,66	<i>metallothionein 1L, pseudogene</i>	16q13
<i>EXOSC1</i>	0,41	2,1	22,03	<i>exosome component 1</i>	10q24
<i>DDX11L10</i>	0,37	2,8	17,5	<i>DEAD/H-box helicase 11 like 10 (pseudogene)</i>	16p13.3
<i>IFI44</i>	0,35	3,88	30,09	<i>interferon-induced protein 44</i>	1p31.1

<i>CXCR6</i>	0,31	9,51	21,59	<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 6</i>	3p21.31
<i>PGM5</i>	0,30	3,67	25,43	<i>phosphoglucomutase 5</i>	9q13
<i>FZD5</i>	0,29	3,12	23,98	<i>frizzled class receptor 5</i>	2q33.3
<i>UQCRH</i>	0,29	3,86	21,48	<i>ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein</i>	1p33
<i>NPM1P39</i>	0,28	5,79	18,09	<i>nucleophosmin 1 pseudogene 39</i>	1p36.11
<i>SNORA12</i>	0,26	2,29	18,36	<i>small nucleolar RNA, H/ACA box 12</i>	10q24.31
<i>ANKRD9</i>	0,24	1,99	25,08	<i>ankyrin repeat domain 9</i>	14q32.31
<i>CYP4F29P</i>	0,24	6,99	17,81	<i>cytochrome P450 family 4 subfamily F member 29, pseudogene</i>	21q11.2
<i>TIMM8B</i>	0,20	3,4	26,12	<i>translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog B (yeast)</i>	11q23.1-q23.2
<i>RPS21</i>	0,18	8,13	21,73	<i>ribosomal protein S21</i>	20q13.3
<i>TSTA3</i>	0,08	9,1	52,99	<i>tissue specific transplantation antigen P35B</i>	8q24.3
<i>GPR15</i>	0,08	3,2	25,46	<i>G protein-coupled receptor 15</i>	3q11.2-q13.1
<i>TMEM273</i>	0,06	3,81	18,91	<i>transmembrane protein 273</i>	10q11.23
<i>HLA-DQA1</i>	0,05	5,73	19,21	<i>major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1</i>	6p21.3
<i>HLA-B</i>	0,04	4,3	17,48	<i>major histocompatibility complex, class I, B</i>	6p21.3
<i>AGAP10P</i>	0,00	7,82	17,59	<i>ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 10, pseudogene</i>	10q11.22
<i>RPL7P9</i>	-0,05	5,81	29,64	<i>ribosomal protein L7 pseudogene 9</i>	1p21.3
<i>NDUFB1</i>	-0,06	3,74	20,22	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 1, 7kDa</i>	14q32.12
<i>CCNJL</i>	-0,09	2,81	31,49	<i>cyclin J-like</i>	5q33.3
<i>RPS27</i>	-0,09	3,24	20,88	<i>ribosomal protein S27</i>	1q21
<i>HBB</i>	-0,09	7,01	16,85	<i>hemoglobin, beta</i>	11p15.5
<i>TRIM58</i>	-0,14	3,34	24,21	<i>tripartite motif containing 58</i>	1q44
<i>RNF182</i>	-0,15	1,54	20,6	<i>ring finger protein 182</i>	6p23
<i>SMIM5</i>	-0,15	4,02	18,82	<i>small integral membrane protein 5</i>	17q25.1
<i>PDCD6IP</i>	-0,16	5,02	22,15	<i>programmed cell death 6 interacting protein</i>	3p22.3
<i>LY6E</i>	-0,20	1,33	24,62	<i>lymphocyte antigen 6 complex, locus E</i>	8q24.3

<i>TMTC1</i>	-0,23	4,27	32,54	<i>transmembrane and tetra-tricopeptide repeat containing 1</i>	12p11.22
<i>RPS3A</i>	-0,24	5,9	26,47	<i>ribosomal protein S3A</i>	4q31.2-q31.3
<i>AC138866.2</i>	-0,26	4,73	16,67	<i>Homo sapiens chromosome 5 clone RP11-1415C14</i>	AC138866
<i>KLRG1</i>	-0,27	4,65	29,12	<i>killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1</i>	12p13.31
<i>IFI27</i>	-0,31	1,75	23,14	<i>interferon, alpha-inducible protein 27</i>	14q32
<i>OLIG2</i>	-0,37	6,02	18,69	<i>oligodendrocyte lineage transcription factor 2</i>	21q22.11
<i>IKBKG</i>	-0,40	3,96	16,55	<i>inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma</i>	Xq28
<i>SHISA4</i>	-0,41	9,32	18,99	<i>shisa family member 4</i>	1q32.1
<i>OAS3</i>	-0,42	4,95	39,24	<i>2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa</i>	12q24.2
<i>ZNF730</i>	-0,42	4,06	19,91	<i>zinc finger protein 730</i>	19p12
<i>FO538757.1</i>	-0,48	1,72	16,42	<i>DEAD/H-Box Helicase 11 (DDX11) Pseudogene 5</i>	1p36.33
<i>CCDC66</i>	-0,52	4,94	20,76	<i>coiled-coil domain containing 66</i>	3p14.3
<i>TRGC2</i>	-0,52	4,09	17,84	<i>T cell receptor gamma constant 2</i>	7p14.1
<i>PF4V1</i>	-0,55	2	41,4	<i>platelet factor 4 variant 1</i>	4q12-q21
<i>RPL21P39</i>	-0,56	2,56	17,05	<i>ribosomal protein L21 pseudogene 39</i>	3q24
<i>MAN1B1</i>	-0,58	5,7	21,19	<i>mannosidase, alpha, class 1B, member 1</i>	9q34
<i>PYURF</i>	-0,60	9,51	26,69	<i>PIGY upstream reading frame</i>	4q
<i>RPL39P3</i>	-0,64	2,79	17,29	<i>ribosomal protein L39 pseudogene 3</i>	6q13
<i>SCARNA6</i>	-0,65	7,69	16,74	<i>small Cajal body-specific RNA 6</i>	2q37.1
<i>ZNF513</i>	-0,66	5,93	23,66	<i>zinc finger protein 513</i>	2p23.3
<i>CCDC7</i>	-0,66	6,23	18,26	<i>coiled-coil domain containing 7</i>	10p11.22
<i>EEF1A1P13</i>	-0,67	7,04	16,77	<i>eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 pseudogene 13</i>	5p15.2
<i>SCARNA5</i>	-0,69	3,84	16,74	<i>small Cajal body-specific RNA 5</i>	2q37.1
<i>HS3ST3A1</i>	-0,71	4,25	26,07	<i>heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3A1</i>	17p12
<i>LILRA6</i>	-0,72	4,68	16,9	<i>leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 6</i>	19q13.4
<i>ALOX15</i>	-0,74	5,28	24,61	<i>arachidonate 15-lipoxygenase</i>	17p13.3

<i>SMPD3</i>	-0,75	6,27	57,78	<i>sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral membrane (neutral sphingomyelinase II)</i>	16q22.1
<i>WASHC1</i>	-0,75	5,36	20,48	<i>WASH complex subunit 1</i>	9p24.3
<i>MRPS21</i>	-0,80	6,56	16,65	<i>mitochondrial ribosomal protein S21</i>	1q21
<i>FMN1</i>	-0,81	8,1	16,85	<i>formin 1</i>	15q13.3
<i>RGPD2</i>	-0,83	5,63	19,87	<i>RANBP2-like and GRIP domain containing 2</i>	2p11.2
<i>RPS23P8</i>	-0,83	5,96	17,63	<i>ribosomal protein S23 pseudogene 8</i>	Xq13.1
<i>DBI</i>	-0,84	2,89	25,08	<i>diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-CoA binding protein)</i>	2q12-q21
<i>PLB1</i>	-0,85	4,26	23,44	<i>phospholipase B1</i>	2p23.2
<i>UQCRCQ</i>	-0,87	4,95	23,21	<i>ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit VII, 9.5kDa</i>	5q31.1
<i>KRT73</i>	-0,87	2,58	19,67	<i>keratin 73, type II</i>	12q13.3
<i>TRPM2</i>	-0,90	1,8	28,76	<i>transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2</i>	21q22.3
<i>FAM3B</i>	-0,90	5,13	20	<i>family with sequence similarity 3, member B</i>	21q22.3
<i>RNASE3</i>	-0,91	5,76	22,6	<i>ribonuclease, RNase A family, 3</i>	14q11.2
<i>FCER1A</i>	-0,92	9,14	20,87	<i>Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide</i>	1q23
<i>OCLNP1</i>	-0,92	3,18	17,62	<i>OCLN pseudogene 1</i>	5q13.2
<i>NPRL3</i>	-0,95	3,75	56,57	<i>NPR3-like, GATOR1 complex subunit</i>	16p13.3
<i>SNRPD2</i>	-0,95	7,17	34,14	<i>small nuclear ribonucleoprotein D2 polypeptide 16.5kDa</i>	19q13.2
<i>NRGN</i>	-0,97	3,38	25,52	<i>neurogranin (protein kinase C substrate, RC3)</i>	11q24
<i>COX6C</i>	-0,97	3,34	23,2	<i>cytochrome c oxidase subunit VIc</i>	8q22.2
<i>UBL5</i>	-0,97	4,33	18,99	<i>ubiquitin-like 5</i>	19p13.3
<i>AC023449.1</i>	-0,99	4,34	18,09	<i>Homo sapiens chromosome 15, clone RP11-345J18, complete sequence.</i>	AC023449
<i>PAQR6</i>	-1,03	8,1	24,7	<i>progesterin and adipoQ receptor family member VI</i>	1q22
<i>H2BC4</i>	-1,04	6,18	20,52	<i>H2B clustered histone 4</i>	6p22.2
<i>IFI6</i>	-1,07	5,21	33,55	<i>interferon, alpha-inducible protein 6</i>	1p35
<i>ST6GALNAC3</i>	-1,09	6,61	19,9	<i>ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminy-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 3</i>	1p31.1

<i>RPL35P5</i>	-1,10	6,39	17,87	<i>ribosomal protein L35 pseudogene 5</i>	7q11.21
<i>NPIP4</i>	-1,15	4,33	19,73	<i>nuclear pore complex interacting protein family member B4</i>	16p12.2
<i>KANK2</i>	-1,16	3,78	19,12	<i>KN motif and ankyrin repeat domains 2</i>	19p13.2
<i>SNORA53</i>	-1,19	10,46	18,38	<i>small nucleolar RNA, H/ACA box 53</i>	12q23.1
<i>PFN1P1</i>	-1,20	7,02	17,57	<i>profilin 1 pseudogene 1</i>	1q24.3
<i>SNORD15B</i>	-1,25	6,46	18,54	<i>small nucleolar RNA, C/D box 15B</i>	11q13.4
<i>IFIT1</i>	-1,26	2,92	19,76	<i>interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1</i>	10q23.31
<i>GAS5</i>	-1,26	8,03	17,49	<i>growth arrest specific 5</i>	1q25.1
<i>NOP10</i>	-1,29	0,91	20,45	<i>NOP10 ribonucleoprotein</i>	15q14-q15
<i>HBD</i>	-1,29	8,4	18,16	<i>hemoglobin, delta</i>	11p15.5
<i>GUK1</i>	-1,30	5,76	28,02	<i>guanylate kinase 1</i>	1q32-q41
<i>CDC25C</i>	-1,30	4,92	24,89	<i>cell division cycle 25C</i>	5q31
<i>ATP5ME</i>	-1,32	3,09	22,63	<i>TP synthase membrane subunit</i>	4p16.3
<i>HLA-H</i>	-1,35	6,22	18,6	<i>major histocompatibility complex, class I,</i>	6p22.1
<i>NSA2P7</i>	-1,35	1,69	17,1	<i>NSA2 pseudogene 7</i>	9q22.32
<i>KRT72</i>	-1,36	4,62	22,07	<i>keratin 72, type II</i>	12q13.13
<i>PFDN5</i>	-1,39	2,06	35,47	<i>prefoldin subunit 5</i>	12q12
<i>IL5RA</i>	-1,42	3,7	68,94	<i>interleukin 5 receptor, alpha</i>	3p26-p24
<i>CMPK2</i>	-1,43	6,82	31,76	<i>cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial</i>	2p25.2
<i>IFITM3</i>	-1,43	1,63	28,83	<i>killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1</i>	12p13.31
<i>WASH9P</i>	-1,43	4,75	16,45	<i>WAS protein family homolog 9, pseudogene</i>	1p36.33
<i>CD52</i>	-1,51	1,84	22,51	<i>CD52 molecule</i>	1p36
<i>MARCKS</i>	-1,57	2,64	16,49	<i>myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate</i>	6q22.2
<i>NAPSB</i>	-1,59	3,84	32,8	<i>napsin B aspartic peptidase, pseudogene</i>	19q13.33
<i>LAMTOR4</i>	-1,62	3,43	19,44	<i>late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 4</i>	7q22.1
<i>CFD</i>	-1,65	4,12	19,07	<i>complement factor D (adipsin)</i>	19p13.3
<i>HLA-DQA2</i>	-1,68	7,76	17,26	<i>major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 2</i>	6p21.3

<i>SNHG5</i>	-1,78	3,86	18,94	<i>small integral membrane protein 5</i>	17q25.1
<i>ROMO1</i>	-1,85	9,43	33,93	<i>reactive oxygen species modulator 1</i>	20q11.22
<i>RNASE2</i>	-1,88	1,33	22,61	<i>ribonuclease, RNase A family, 2 (liver, eosinophil-derived neurotoxin)</i>	14q11.2
<i>TMCC2</i>	-1,90	7,36	32,73	<i>transmembrane and coiled-coil domain family 2</i>	1q32.1
<i>SCARNA7</i>	-1,93	2,81	17,08	<i>small Cajal body-specific RNA 7</i>	3q25.33
<i>PRSS33</i>	-1,95	3,19	56,39	<i>protease, serine, 33</i>	16p13.3
<i>SLC66A2</i>	-1,98	6,33	37,07	<i>solute carrier family 66 member 2</i>	18q23
<i>SLIRP</i>	-2,01	3,09	37,62	<i>SRA stem-loop interacting RNA binding protein</i>	14q24.3
<i>CD300LD</i>	-2,03	2,92	18,74	<i>CD300 molecule-like family member d</i>	17q25.1
<i>HEMGN</i>	-2,05	4,07	30,93	<i>hemogen</i>	9q22.33
<i>RETN</i>	-2,16	3,09	49,28	<i>resistin</i>	19p13.2
<i>NPIP13</i>	-2,27	1,47	19,05	<i>nuclear pore complex interacting protein family, member B13</i>	16p11.2
<i>IMPA2</i>	-2,30	8,64	28,9	<i>inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2</i>	18p11.2
<i>CD19</i>	-2,31	1,03	21,18	<i>CD19 molecule</i>	16p11.2
<i>ARG2</i>	-2,55	4,6	70,15	<i>arginase 2</i>	14q24.1
<i>SNORD94</i>	-2,56	0,43	18,49	<i>small nucleolar RNA, C/D box 94</i>	2p11.2
<i>CMBL</i>	-2,72	0,85	23,41	<i>carboxymethylenebutenolidase homolog (Pseudomonas)</i>	5p15.2
<i>LRRC7</i>	-3,11	7,24	196,11	<i>leucine rich repeat containing 7</i>	1p31.1
<i>CHI3L2</i>	-3,27	3,18	85,02	<i>chitinase 3-like 2</i>	1p13.3
<i>OASL</i>	-3,70	0,92	31,15	<i>2'-5'-oligoadenylate synthetase-like</i>	12q24.2
<i>SPTB</i>	-5,91	0,63	82,95	<i>spectrin, beta, erythrocytic</i>	14q23-q24.2
<i>RNF19A</i>	-6,79	8,42	175,23	<i>ring finger protein 19A, RBR E3 ubiquitin protein ligase</i>	8q22

**ANEXO 2 – 70 GENES EXPRESSOS NO TECIDO CARDÍACO, EM QUE 31 GENES APRESENTAM GANHO DE EXPRESSÃO E 39 GENES APRESENTAM PERDA DE EXPRESSÃO**

Gene	logFC CTL vs HTP-at	logFC CTL vs HTP-out	Descrição
<i>RAP1GAP</i>	8,17	0,38	<i>eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2</i>
<i>SLC4A4</i>	6,72	1,80	<i>solute carrier family 4 (sodium bicarbonate cotransporter), member 4</i>
<i>ABCB1</i>	2,47	3,03	<i>ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1</i>
<i>SIGLEC8</i>	2,46	1,71	<i>sialic acid binding Ig-like lectin 8</i>
<i>FKBP8</i>	2,39	-0,89	<i>FK506 binding protein 8, 38kDa</i>
<i>ZNF208</i>	2,34	0,29	<i>zinc finger protein 208</i>
<i>TNNT1</i>	2,21	0,21	<i>troponin T type 1 (skeletal, slow)</i>
<i>NFATC2</i>	2,20	-1,09	<i>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2</i>
<i>COX7B</i>	2,00	0,73	<i>cytochrome c oxidase subunit VIIb</i>
<i>COX7C</i>	1,82	-1,46	<i>cytochrome c oxidase subunit VIIc</i>
<i>NDUFA4</i>	1,79	0,58	<i>NDUFA4, mitochondrial complex associated</i>
<i>NDUFA1</i>	1,72	-0,56	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 1, 7.5kDa</i>
<i>SLC29A1</i>	1,64	-0,24	<i>solute carrier family 29 (equilibrative nucleoside transporter), member 1</i>
<i>GSTM1</i>	1,52	0,10	<i>glutathione S-transferase mu 1</i>
<i>FCRL5</i>	1,45	0,47	<i>Fc receptor-like 5</i>
<i>ISG15</i>	1,38	-0,06	<i>ISG15 ubiquitin-like modifier</i>
<i>ANK1</i>	1,38	-3,64	<i>ankyrin 1, erythrocytic</i>
<i>TMCC1</i>	1,13	-1,19	<i>transmembrane and coiled-coil domain family 1</i>
<i>SYTL2</i>	1,06	-0,97	<i>synaptotagmin-like 2</i>
<i>KRT23</i>	0,86	-2,05	<i>keratin 23, type I</i>

<i>DNAJB4</i>	0,83	-0,92	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4</i>
<i>RPL27</i>	0,66	-2,01	<i>ribosomal protein L27</i>
<i>C1orf21</i>	0,61	-2,10	<i>chromosome 1 open reading frame 21</i>
<i>RPL23</i>	0,59	5,95	<i>ribosomal protein L23</i>
<i>IFI44</i>	0,35	-1,27	<i>interferon-induced protein 44</i>
<i>CXCR6</i>	0,31	-1,38	<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 6</i>
<i>PGM5</i>	0,30	-1,50	<i>phosphoglucomutase 5</i>
<i>UQCRH</i>	0,29	-1,37	<i>ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein</i>
<i>TIMM8B</i>	0,20	-1,46	<i>translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog B (yeast)</i>
<i>RPS21</i>	0,18	-1,48	<i>ribosomal protein S21</i>
<i>GPR15</i>	0,08	-1,71	<i>G protein-coupled receptor 15</i>
<i>RPS3A</i>	-0,24	-1,74	<i>RPS3A pseudogene 6</i>
<i>NDUFB1</i>	-0,06	-1,24	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 1, 7kDa</i>
<i>HBB</i>	-0,09	-1,38	<i>hemoglobin, beta</i>
<i>RPS27</i>	-0,09	-0,82	<i>ribosomal protein S27</i>
<i>TRIM58</i>	-0,14	-1,67	<i>tripartite motif containing 58</i>
<i>PDCD6IP</i>	-0,16	-1,52	<i>programmed cell death 6 interacting protein</i>
<i>LY6E</i>	-0,20	-2,37	<i>lymphocyte antigen 6 complex, locus E</i>
<i>IKBKG</i>	-0,40	-1,28	<i>inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma</i>
<i>MAN1B1</i>	-0,58	-1,62	<i>mannosidase, alpha, class 1B, member 1</i>
<i>ALOX15</i>	-0,74	-1,81	<i>arachidonate 15-lipoxygenase</i>
<i>FMN1</i>	-0,81	-1,65	<i>formin 1</i>
<i>DBI</i>	-0,84	-2,26	<i>diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-CoA binding protein)</i>
<i>PLB1</i>	-0,85	-1,79	<i>phospholipase B1</i>
<i>FAM3B</i>	-0,90	-1,66	<i>family with sequence similarity 3, member B</i>

<i>TRPM2</i>	-0,90	-2,7	<i>transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2</i>
<i>FCER1A</i>	-0,92	-1,92	<i>Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide</i>
<i>NPRL3</i>	-0,95	1,34	<i>NPR3-like, GATOR1 complex subunit</i>
<i>NRGN</i>	-0,97	-2,18	<i>neurogranin (protein kinase C substrate, RC3)</i>
<i>COX6C</i>	-0,97	1,02	<i>cytochrome c oxidase subunit VIc</i>
<i>PAQR6</i>	-1,03	-1,97	<i>progesterin and adipoQ receptor family member VI</i>
<i>IFI6</i>	-1,07	-2,18	<i>interferon, alpha-inducible protein 6</i>
<i>KANK2</i>	-1,16	0,52	<i>KN motif and ankyrin repeat domains 2</i>
<i>CDC25C</i>	-1,30	-1,91	<i>cell division cycle 25C</i>
<i>GUK1</i>	-1,30	-2,07	<i>guanylate kinase 1</i>
<i>PFDN5</i>	-1,39	-2,97	<i>prefoldin subunit 5</i>
<i>IL5RA</i>	-1,42	1,74	<i>interleukin 5 receptor, alpha</i>
<i>IFITM3</i>	-1,43	1,89	<i>killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1</i>
<i>MARCKS</i>	-1,57	-1,82	<i>myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate</i>
<i>LAMTOR4</i>	-1,62	-1,78	<i>late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 4</i>
<i>CFD</i>	-1,65	-0,94	<i>complement factor D (adipsin)</i>
<i>HLA-DQA2</i>	-1,68	-1,35	<i>major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 2</i>
<i>ROMO1</i>	-1,85	-2,57	<i>reactive oxygen species modulator 1</i>
<i>SLIRP</i>	-2,01	-1,98	<i>SRA stem-loop interacting RNA binding protein</i>
<i>CD300LD</i>	-2,03	-1,33	<i>CD300 molecule-like family member d</i>
<i>CD19</i>	-2,31	-2,82	<i>CD19 molecule</i>
<i>ARG2</i>	-2,55	0,14	<i>arginase 2</i>
<i>CHI3L2</i>	-3,27	-0,74	<i>chitinase 3-like 2</i>
<i>SPTB</i>	-5,91	-3,28	<i>spectrin, beta, erythrocytic</i>
<i>RNF19A</i>	-6,79	-6,77	<i>ring finger protein 19A, RBR E3 ubiquitin protein ligase</i>

### ANEXO 3 - 90 GENES EXPRESSOS NO TECIDO CEREBRAL, EM QUE 38 GENES APRESENTAM GANHO DE EXPRESSÃO E 52 GENES APRESENTAM PERDA DE EXPRESSÃO

Gene	logFC CTL vs HTP-at	logFC CTL vs HTP-out	Descrição
<i>RAP1GAP</i>	8,17	0,38	<i>eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2</i>
<i>SLC4A4</i>	6,72	1,80	<i>solute carrier family 4 (sodium bicarbonate cotransporter), member 4</i>
<i>PTGDR2</i>	2,74	0,57	<i>prostaglandin D2 receptor 2</i>
<i>CDC42EP1</i>	2,68	1,55	<i>CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1</i>
<i>ABCB1</i>	2,47	3,03	<i>ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1</i>
<i>SIGLEC8</i>	2,46	1,71	<i>sialic acid binding Ig-like lectin 8</i>
<i>FKBP8</i>	2,39	-0,89	<i>FK506 binding protein 8, 38kDa</i>
<i>ZNF208</i>	2,34	0,29	<i>zinc finger protein 208</i>
<i>TNNT1</i>	2,21	0,21	<i>troponin T type 1 (skeletal, slow)</i>
<i>NFATC2</i>	2,20	-1,09	<i>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2</i>
<i>MPL</i>	2,08	0,25	<i>MPL proto-oncogene, thrombopoietin receptor</i>
<i>GPR162</i>	1,95	0,31	<i>G protein-coupled receptor 162</i>
<i>RPL26</i>	1,94	0,44	<i>ribosomal protein L26</i>
<i>NDUFA4</i>	1,79	0,58	<i>NDUFA4, mitochondrial complex associated</i>
<i>NDUFA1</i>	1,72	-0,56	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 1, 7.5kDa</i>
<i>EEF1B2</i>	1,71	-0,47	<i>eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2</i>
<i>SLC29A1</i>	1,64	-0,24	<i>solute carrier family 29 (equilibrative nucleoside transporter), member 1</i>
<i>GSTM1</i>	1,52	0,10	<i>glutathione S-transferase mu 1</i>
<i>ANK1</i>	1,38	-3,64	<i>ankyrin 1, erythrocytic</i>
<i>ISG15</i>	1,38	-0,06	<i>ISG15 ubiquitin-like modifier</i>
<i>S100A8</i>	1,32	-0,59	<i>S100 calcium binding protein A8</i>
<i>LAIR2</i>	1,29	-0,38	<i>leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 2</i>

<i>UQCRB</i>	1,16	-0,57	<i>ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein</i>
<i>TMCC1</i>	1,13	-1,19	<i>transmembrane and coiled-coil domain family 1</i>
<i>SYTL2</i>	1,06	-0,97	<i>synaptotagmin-like 2</i>
<i>IFI44</i>	0,92	0,18	<i>interferon-induced protein 44-like</i>
<i>KRT23</i>	0,86	-2,05	<i>keratin 23, type I</i>
<i>DNAJB4</i>	0,83	-0,92	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4</i>
<i>IFIT3</i>	0,80	2,83	<i>interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3</i>
<i>RPL27</i>	0,66	-2,01	<i>ribosomal protein L27</i>
<i>C1orf21</i>	0,61	-2,10	<i>chromosome 1 open reading frame 21</i>
<i>RPL23</i>	0,59	2,26	<i>ribosomal protein L23</i>
<i>PGM5</i>	0,30	-1,50	<i>phosphoglucomutase 5</i>
<i>UQCRH</i>	0,29	-1,37	<i>ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein</i>
<i>TIMM8B</i>	0,20	-1,46	<i>translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog B (yeast)</i>
<i>TSTA3</i>	0,08	-2,07	<i>tissue specific transplantation antigen P35B</i>
<i>GPR15</i>	0,08	-1,71	<i>G protein-coupled receptor 15</i>
<i>HLA-B</i>	0,04	-1,33	<i>major histocompatibility complex, class I, B</i>
<i>CCNJL</i>	-0,09	2,71	<i>cyclin J-like</i>
<i>HBB</i>	-0,09	-1,38	<i>hemoglobin, beta</i>
<i>TRIM58</i>	-0,14	-1,67	<i>tripartite motif containing 58</i>
<i>PDCD6IP</i>	-0,16	-1,52	<i>programmed cell death 6 interacting protein</i>
<i>LY6E</i>	-0,20	-2,37	<i>lymphocyte antigen 6 complex, locus E</i>
<i>TMTC1</i>	-0,23	-1,94	<i>transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 1</i>
<i>RPS3A</i>	-0,24	-1,74	<i>ribosomal protein S3A</i>
<i>IFI27</i>	-0,31	1,17	<i>interferon, alpha-inducible protein 27</i>
<i>OLIG2</i>	-0,37	-1,07	<i>oligodendrocyte lineage transcription factor 2</i>
<i>IKBKG</i>	-0,40	-1,28	<i>inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma</i>

<i>MAN1B1</i>	-0,58	-1,62	<i>mannosidase, alpha, class 1B, member 1</i>
<i>ZNF513</i>	-0,66	-1,81	<i>zinc finger protein 513</i>
<i>HS3ST3A1</i>	-0,71	-1,95	<i>heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3A1</i>
<i>ALOX15</i>	-0,74	-1,81	<i>arachidonate 15-lipoxygenase</i>
<i>SMPD3</i>	-0,75	0,9	<i>sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral membrane (neutral sphingomyelinase II)</i>
<i>RPS21</i>	-0,80	0,4	<i>mitochondrial ribosomal protein S21</i>
<i>FMN1</i>	-0,81	-1,65	<i>formin 1</i>
<i>RGPD2</i>	-0,83	-1,69	<i>RANBP2-like and GRIP domain containing 2</i>
<i>DBI</i>	-0,84	-2,26	<i>diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-CoA binding protein)</i>
<i>PLB1</i>	-0,85	-1,79	<i>phospholipase B1</i>
<i>TRPM2</i>	-0,90	-2,7	<i>transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2</i>
<i>FAM3B</i>	-0,90	-1,66	<i>family with sequence similarity 3, member B</i>
<i>FCER1A</i>	-0,92	-1,92	<i>Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide</i>
<i>NPRL3</i>	-0,95	1,34	<i>NPR3-like, GATOR1 complex subunit</i>
<i>SNRPD2</i>	-0,95	1,4	<i>small nuclear ribonucleoprotein D2 polypeptide 16.5kDa</i>
<i>NRGN</i>	-0,97	-2,18	<i>neurogranin (protein kinase C substrate, RC3)</i>
<i>COX6C</i>	-0,97	1,02	<i>cytochrome c oxidase subunit VIc</i>
<i>IFI6</i>	-1,07	-2,18	<i>interferon, alpha-inducible protein 6</i>
<i>KANK2</i>	-1,16	0,52	<i>KN motif and ankyrin repeat domains 2</i>
<i>HBD</i>	-1,29	-1,79	<i>hemoglobin, delta</i>
<i>CDC25C</i>	-1,30	-1,91	<i>cell division cycle 25C</i>
<i>GUK1</i>	-1,30	-2,07	<i>guanylate kinase 1</i>
<i>PFDN5</i>	-1,39	-2,97	<i>prefoldin subunit 5</i>
<i>IL5RA</i>	-1,42	1,74	<i>interleukin 5 receptor, alpha</i>
<i>IFITM3</i>	-1,43	1,89	<i>killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1</i>
<i>MARCKS</i>	-1,57	-1,82	<i>myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate</i>

<i>LAMTOR4</i>	-1,62	-1,78	<i>late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 4</i>
<i>HLA-DQA2</i>	-1,68	-1,35	<i>major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 2</i>
<i>ROMO1</i>	-1,85	-2,57	<i>reactive oxygen species modulator 1</i>
<i>TMCC2</i>	-1,90	-2,34	<i>transmembrane and coiled-coil domain family 2</i>
<i>PRSS33</i>	-1,95	-3,25	<i>protease, serine, 33</i>
<i>SLIRP</i>	-2,01	-1,98	<i>SRA stem-loop interacting RNA binding protein</i>
<i>CD300LD</i>	-2,03	-1,33	<i>CD300 molecule-like family member d</i>
<i>HEMGN</i>	-2,05	-2,07	<i>hemogen</i>
<i>IMPA2</i>	-2,30	-1,34	<i>inositol(myo)-1(or monophosphatase 2</i> 4)-
<i>CD19</i>	-2,31	-2,82	<i>CD19 molecule</i>
<i>ARG2</i>	-2,55	0,14	<i>arginase 2</i>
<i>LRRC7</i>	-3,11	2,43	<i>leucine rich repeat containing 7</i>
<i>CHI3L2</i>	-3,27	-0,74	<i>chitinase 3-like 2</i>
<i>OASL</i>	-3,70	-3,9	<i>2'-5'-oligoadenylate synthetase-like</i>
<i>SPTB</i>	-5,91	-3,28	<i>spectrin, beta, erythrocytic</i>
<i>RNF19A</i>	-6,79	-6,77	<i>ring finger protein 19A, RBR E3 ubiquitin protein ligase</i>

## APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

### TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA CLÍNICA

Nome do Voluntário: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone para contato: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

Estas informações estão sendo fornecidas de maneira clara e simples para sua participação voluntária neste estudo. As informações contidas neste prontuário foram fornecidas pela aluna Carolina Augusta Xavier, pelo Dr Caue Cosme Dutra da Silva ou pelo Prof. Dr. Cléber Pinto Camacho, objetivando firmar acordo escrito mediante no qual, o voluntário da pesquisa autoriza sua participação com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação, podendo se retirar da pesquisa quando desejar.

#### 1. Título do Trabalho Experimental: AVALIAÇÃO DO HUMOR EM MULHERES

##### HIPOTIROIDEAS.

**2. Objetivo:** Estudar a saúde do corpo humano e da tireoide através da análise dos testes de avaliação do humor e da dosagem de TSH no sangue.

**3. Justificativa:** Muitos indivíduos com hipotireoidismo tratados com hormônio apresentam pequenas alterações nos exames que avaliam a saúde da glândula tireoide, o que pode levar a ocorrência de alterações de humor nestes indivíduos. Por isto, faremos a análise do humor e dos níveis de TSH.

**4. Procedimentos da Fase Experimental:** Os voluntários de ambos os sexos serão selecionados através de entrevistas com aplicação de questionários, com duração aproximada de 10 minutos. Os voluntários selecionados serão submetidos à avaliação clínica geral, além da coleta de exames de sangue rotineiros para a sua avaliação clínica e escalas para a avaliação do humor (Inventário de Depressão de Beck, e Inventário de Ansiedade de Beck), com duração aproximada de 10 minutos.

**5. Desconforto ou Riscos Esperados:** Os voluntários serão submetidos aos riscos mínimos relacionados à coleta de sangue (pequenos sangramentos e hematomas).

**6. Informações:** O voluntário tem garantia que receberá respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos benefícios e outros assuntos relacionados com pesquisa. Também os pesquisadores citados acima assumem o compromisso de informação durante todo o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando do estudo.

**7. Métodos Alternativos Existentes:** Não existem métodos alternativos à coleta de exames laboratoriais.

**8. Retirada do Consentimento:** O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo quando quiser

**9. Aspecto Legal:** Este projeto foi elaborado de acordo com as diretrizes e normas regulamentadas de pesquisa envolvendo seres humanos atendendo à Resolução n.º 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério de Saúde – Brasília – DF.

**10. Garantia do Sigilo:** Os pesquisadores asseguram a privacidade dos voluntários.

**11. Formas de Ressarcimento das Despesas decorrentes da Participação na Pesquisa:** Não haverá ressarcimento de despesas com eventuais deslocamentos e/ou qualquer gasto realizado por parte do voluntário.

**12. Descarte do material e doação do material a ser descartado:** Ao término da pesquisa todo o material residual não será descartado e será doado para arquivamento e posterior utilização em pesquisas relacionadas a análise de proteínas, RNA e DNA.

**13. Local da Pesquisa:** A pesquisa será desenvolvida no Ambulatório Integrado de Saúde, localizado na Rua Vergueiro, 235/249 – Liberdade, São Paulo – SP / CEP: 01504-001. Contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UNINOVE: Rua. Vergueiro nº 235/249 – Liberdade – SP, CEP. 01504-001 - 1º andar e telefone: (11) 3385-9059.

**14. Nome Completo e telefones do Pesquisador (Orientador) para Contato:** Prof. Dr. Cléber Pinto Camacho – Tel: (11) 3385-9241.

**15. Consentimento Pós-Infomação:**

Eu, \_\_\_\_\_, após leitura e compreensão deste termo de informação e consentimento, entendo que minha participação é voluntária, e que posso sair a qualquer momento do estudo, sem prejuízo algum. Confirmo que recebi cópia deste termo de consentimento, e autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo no meio científico. \* **Não assine este termo se ainda tiver alguma dúvida a respeito.**

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

Nome \_\_\_\_\_ (por  
extenso): \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
1ª via: Instituição

2ª via: Voluntário

## APÊNDICE 2 – QUESTIONÁRIO DE ZULEWSKI APLICADO AOS PACIENTES

### Índice de diagnóstico de hipotireoidismo (Zulewski) – Pontos [ ]

Hipotireoidismo: mais de 5 pontos	Intermediário: 3-5 pontos	Eutireoidismo: menor de 3 pontos
<i>Para o julgamento clínico, somar 1 ponto na mulheres menores de 55 anos.</i>		

	Baseado em	Sim	Não	
Sintomas	Diminuição de suor	Suando em um quarto quente ou um dia quente de verão	1	0
	Rouquidão	Voz falada, voz cantada	1	0
	Parestesia	Sensação subjetiva	1	0
	Pele seca	Pele seca notada espontaneamente necessita de tratamento	1	0
	Constipação	Hábito intestinal e uso de laxantes	1	0
	Perda de audição	Perda de audição progressiva	1	0
	Aumento de peso	Aumento de peso documentado ou roupas apertadas	1	0
Sinais	Movimentos diminuídos	Observar paciente tirando a roupa	1	0
	Reflexo tornozelo diminuído	Observar o relaxamento do reflexo	1	0
	Pele grossa	Examinar mãos, antebraço, cotovelo para rugosidades e pele espessamento da pele	1	0
	Edema periorbitário	Pode encobrir a curva do osso malar	1	0
	Pele fria	Comparar a temperatura das mãos com a do examinador	1	0
<b>TOTAL</b>				

## **APÊNDICE 3 – INVENTÁRIO DE DEPRESSÃO DE BECK APLICADO AOS PACIENTES: BDI (BECK DEPRESSION INVENTORY)**

### **Universidade Nove de Julho Inventário de Depressão de Beck -BDI**

**Nome:** \_\_\_\_\_

**Idade:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Este questionário consiste em 21 grupos de afirmações. Depois de ler cuidadosamente cada grupo, faça um círculo em torno do número (0, 1, 2 ou 3) próximo à afirmação, em cada grupo, que descreve melhor a maneira que você tem se sentido na última semana, incluindo hoje. Se várias afirmações num grupo parecerem se aplicar igualmente bem, faça um círculo em cada uma. Tome cuidado de ler todas as afirmações, em cada grupo, antes de fazer sua escolha.

**1) 0 Não me sinto triste**

- 1 Eu me sinto triste
- 2 Estou sempre triste e não consigo sair disto
- 3 Estou tão triste ou infeliz que não consigo suportar

**2) 0 Não estou especialmente desanimado quanto ao futuro**

- 1 Eu me sinto desanimado quanto ao futuro
- 2 Acho que nada tenho a esperar
- 3 Acho o futuro sem esperanças e tenho a impressão de que as coisas não podem

melhorar

**3) 0 Não me sinto um fracasso**

- 1 Acho que fracassei mais do que uma pessoa comum
- 2 Quando olho pra trás, na minha vida, tudo o que posso ver é um monte de fracassos
- 3 Acho que, como pessoa, sou um completo fracasso

**4) 0 Tenho tanto prazer em tudo como antes**

- 1 Não sinto mais prazer nas coisas como antes
- 2 Não encontro um prazer real em mais nada
- 3 Estou insatisfeito ou aborrecido com tudo

**5) 0 Não me sinto especialmente culpado**

- 1 Eu me sinto culpado grande parte do tempo
- 2 Eu me sinto culpado na maior parte do tempo

- 3 Eu me sinto sempre culpado
- 6) 0** Não acho que esteja sendo punido
- 1 Acho que posso ser punido
  - 2 Creio que vou ser punido
  - 3 Acho que estou sendo punido
- 7) 0** Não me sinto decepcionado comigo mesmo
- 1 Estou decepcionado comigo mesmo
  - 2 Estou enojado de mim
  - 3 Eu me odeio
- 8) 0** Não me sinto de qualquer modo pior que os outros
- 1 Sou crítico em relação a mim por minhas fraquezas ou erros
  - 2 Eu me culpo sempre por minhas falhas
  - 3 Eu me culpo por tudo de mal que acontece
- 9) 0** Não tenho quaisquer ideias de me matar
- 1 Tenho ideias de me matar, mas não as executaria
  - 2 Gostaria de me matar
  - 3 Eu me mataria se tivesse oportunidade
- 10) 0** Não choro mais que o habitual
- 1 Choro mais agora do que costumava
  - 2 Agora, choro o tempo todo
  - 3 Costumava ser capaz de chorar, mas agora não consigo, mesmo que o queria
- 11) 0** Não sou mais irritado agora do que já fui
- 1 Fico aborrecido ou irritado mais facilmente do que costumava
  - 2 Agora, eu me sinto irritado o tempo todo
  - 3 Não me irrito mais com coisas que costumavam me irritar
- 12) 0** Não perdi o interesse pelas outras pessoas
- 1 Estou menos interessado pelas outras pessoas do que costumava estar
  - 2 Perdi a maior parte do meu interesse pelas outras pessoas
  - 3 Perdi todo o interesse pelas outras pessoas
- 13) 0** Tomo decisões tão bem quanto antes
- 1 Adio as tomadas de decisões mais do que costumava
  - 2 Tenho mais dificuldades de tomar decisões do que antes

3 Absolutamente não consigo mais tomar decisões

**14)** 0 Não acho que de qualquer modo pareço pior do que antes

- 1 Estou preocupado em estar parecendo velho ou sem atrativo
- 2 Acho que há mudanças permanentes na minha aparência, que me fazem parecer sem

atrativo

3 Acredito que pareço feio

**15)** 0 Posso trabalhar tão bem quanto antes

- 1 É preciso algum esforço extra para fazer alguma coisa
- 2 Tenho que me esforçar muito para fazer alguma coisa
- 3 Não consigo mais fazer qualquer trabalho

**16)** 0 Consigo dormir tão bem como o habitual

- 1 Não durmo tão bem como costumava
- 2 Acordo 1 a 2 horas mais cedo do que habitualmente e acho difícil voltar a dormir
- 3 Acordo várias horas mais cedo do que costumava e não consigo voltar a dormir

**17)** 0 Não fico mais cansado do que o habitual

- 1 Fico cansado mais facilmente do que costumava
- 2 Fico cansado em fazer qualquer coisa
- 3 Estou cansado demais para fazer qualquer coisa

**18)** 0 O meu apetite não está pior do que o habitual

- 1 Meu apetite não é tão bom como costumava ser
- 2 Meu apetite é muito pior agora
- 3 Absolutamente não tenho mais apetite

**19)** 0 Não tenho perdido muito peso se é que perdi algum recentemente

- 1 Perdi mais do que 2 quilos e meio
- 2 Perdi mais do que 5 quilos
- 3 Perdi mais do que 7 quilos

Estou tentando perder peso de propósito, comendo menos: Sim \_\_\_\_\_ Não \_\_\_\_\_

**20)** 0 Não estou mais preocupado com a minha saúde do que o habitual

- 1 Estou preocupado com problemas físicos, tais como dores, indisposição do estômago ou constipação
- 2 Estou muito preocupado com problemas físicos e é difícil pensar em outra coisa
- 3 Estou tão preocupado com meus problemas físicos que não consigo pensar em qualquer outra coisa

**21) 0** Não notei qualquer mudança recente no meu interesse por sexo

- 1 Estou menos interessado por sexo do que costumava
- 2 Estou muito menos interessado por sexo agora
- 3 Perdi completamente o interesse por sexo

## APÊNDICE 4 – PACIENTES: BAI (*BECK ANXIETY INVENTORY*)

Universidade Nove de Julho

Inventário de ansiedade de Beck – BAI

Nome: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Data: // \_\_\_\_\_

Abaixo está uma lista de sintomas comuns de ansiedade. Por favor, leia cuidadosamente cada item da lista. Identifique com que frequência você tem sido incomodado por cada sintoma durante a última semana, incluindo hoje, colocando um “x” no espaço correspondente, na mesma linha de cada sintoma.

	Nunca	Ocasionalmente	Frequentemente	Quase sempre
1. Dormência ou formigamento				
2. Sensação de calor				
3. Tremores nas pernas				
4. Incapaz de relaxar				
5. Medo que aconteça o pior				
6. Atordoado ou tonto				
7. Palpitação ou aceleração do coração				
8. Sem equilíbrio				
9. Aterrorizado				
10. Nervoso				
11. Sensação de sufocação				
12. Tremores nas mãos				
13. Trêmulo				
14. Medo de perder o controle				
15. Dificuldade para respirar				
16. Medo de morrer				
17. Assustado				
18. Indigestão ou desconforto abdominal				
19. Sensação de desmaio				
20. Rosto afogueado				
21. Suor (não devido ao calor)				

## APÊNDICE 5 – EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

- 1- Centrifugação dos tubos PAXgene blood RNA, por 10 minutos à 3500rpm (rpm, sempre utilizando um rotor de balanço exterior com adaptadores de tubos de mesmo volume (balanceamento da centrífuga).
- 2- Eliminação do sobrenadante por meio de decantação e visualizado o pellet ao fundo do tubo.
- 3- Transferência de 4,0mL de água livre de RNase (RNFW), e fechado o tubo com uma nova tampa Hemogard BD secundária, fornecidos pelo Kit.
- 4- Agitação ao vórtex até a visível dissolução do pellet.
- 5- Centrifugação dos tubos PAXgene blood RNA, por 10 minutos à 3500RPM, sempre utilizando um rotor de balanço exterior com adaptadores de tubos de mesmo volume (balanceamento da centrífuga).
- 6- Eliminação do sobrenadante, sem interferir com o pellet.
- 7- Transferência de 350,0µL de tampão de ressuspensão (BR1), fornecido pelo Kit.
- 8- Agitação ao vórtex até a visível dissolução do pellet.
- 9- Transferência da amostra (350,0µL) para um microtubo (MCT) de 1,5mL.
- 10- Adição de 300,0µL de tampão de ligação (BR2), e 40,0µL proteinase K (PK), fornecidos pelo Kit.
- 11- Agitação ao vórtex por 5 segundos.
- 12- Incubação por 10 minutos à 55°C em agitador incubador, sob velocidade de aproximadamente 400rpm.
- 13- Transferência do lisado diretamente para uma coluna de rotação do homogeneizador PAXgene (coluna de cor lilás PSC) e transferido em um tubo de processamento (PT) de 2,0mL, fornecidos pelo Kit.
- 14- Centrifugação por 3 minutos à 15000RPM em microcentrífuga, adequadamente balanceada.
- 15- Transferência da totalidade do sobrenadante da fração residual para um MCT de 1,5mL, sem interferir com o pellet do PT.
- 16- Adição de 350,0µL de etanol 99% grau de pureza.
- 17- Agitação ao vórtex por 5 segundos.
- 18- Centrifugação para remover as gotas presentes no interior da tampa do MCT. Centrifugado em microcentrífuga por 3 segundos (SPIN).

- 19- Transferência de 700,0µL da amostra para outra coluna de rotação de RNA PAXgene (coluna de cor vermelha PRC), colocada em um tubo de processamento (PT) de 2,0mL.
- 20- Centrifugação por 1 minuto à 15000rpm em microcentrífuga, adequadamente balanceada.
- 21- Transferência para coluna (PRC) em um novo tubo de processamento (PT) de 2mL e eliminado o PT antigo contendo o produto residual.
- 22- Transferido a amostra restante à coluna PRC.
- 23- Centrifugação por 1 minuto à 15000rpm em microcentrífuga, adequadamente balanceada.
- 24- Transferência para coluna PRC em um novo PT de 2,0mL, e eliminado o PT antigo contendo o produto residual.
- 25- T Transferência de 350,0µL de tampão de lavagem 1 (BR3) para a coluna PRC.
- 26- Centrifugação por 1 minuto à 15000RPM em microcentrífuga, adequadamente balanceada.
- 27- Transferência para a coluna PRC em um novo PT de 2,0mL, e eliminado o PT antigo contendo o produto residual.
- 28- Preparação do mix de DNase I e tampão de digestão de DNA (RDD), fornecidos pelo Kit. Em um MCT de 1,5mL transferimos 10,0µL de solução de DNase com 70,0µL de tampão de digestão de DNA (RDD) por amostra, totalizando um volume de mix de 80,0µL. Homogeneizando suavemente com a mão, pois a DNase I é especialmente sensível a desnaturação física.
- 29- Transferência dos 80,0µL do mix diretamente para a membrana da coluna PRC e aguardar por 15 minutos, com a amostra em temperatura ambiente.
- 30- Transferência de 350,0µL de tampão de lavagem 1 (BR3) para a coluna PRC, fornecidos pelo Kit.
- 31- Centrifugação por 1 minuto à 15000RPM em microcentrífuga, adequadamente balanceada.
- 32- Transferência para a coluna PRC em um novo PT de 2,0mL, e eliminação o PT antigo contendo o produto residual.
- 33- Transferência de 500,0µL de tampão de lavagem 2 (BR4) para a coluna de rotação PRC, fornecidos pelo Kit.

- 34- Centrifugação por 1 minuto à 15000rpm em microcentrífuga, adequadamente balanceada.
- 35- Transferência para a coluna PRC em um novo PT de 2,0mL, e eliminação do PT antigo contendo o produto residual.
- 36- Transferência mais 500,0µL de tampão de lavagem 2 (BR4) para a coluna de rotação PRC, fornecidos pelo Kit.
- 37- Centrifugação por 3 minutos à 15000rpm em microcentrífuga, adequadamente balanceada.
- 38- Transferência para a coluna PRC em um novo PT de 2,0mL, e eliminação do PT antigo contendo o produto residual.
- 39- Centrifugação por 1 minuto em microcentrífuga adequadamente balanceada, com 15000rpm.
- 40- Eliminação do PT antigo contendo o produto residual.
- 41- Transferência para a coluna PRC em um novo MCT de 1,5mL.
- 42- Transferência de 40,0µL de tampão de eluição (BR5) diretamente para membrana da coluna PRC, fornecidos pelo Kit.
- 43- Centrifugação por 1 minuto à 15000rpm em microcentrífuga, adequadamente balanceada.
- 44- Repetição do passo da eluição, transferindo mais 40,0µL de tampão de eluição (BR5) diretamente para membrana da coluna PRC, fornecidos pelo Kit, utilizando o mesmo MCT de 1,5mL.
- 45- Incubação do MCT contendo o eluído por 5 minutos à 65°C.
- 46- Arrefecimento do MCT em gelo por 3 minutos. Imediatamente após o arrefecimento armazenamos as amostras (todas devidamente identificadas) com o extraído de RNA em freezer -80°C.

**APÊNDICE 6 – ETAPAS DE PREPARO: REALIZAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA, QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL, SÍNTESE DE Cdna, AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS-ALVO, PREPARO DAS SEQUÊNCIAS INICIADORAS, LIGAÇÃO DOS *BARCODES* AOS *AMPLICONS*, PURIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA, qPCR (QUANTIFICAÇÃO DAS BIBLIOTECAS), PCR DE EMULSÃO, HIBRIDIZAÇÃO DAS *BEADS* MAGNÉTICAS E PRAPARO DOS *CHIPS*.**

**Realização do transcriptoma - Sequenciamento plataforma NGS**

Etapa 1: Quantificação do RNA Total pelo *Kit Qubit RNA Assay Kit*, catálogo números Q32852 e Q32855, mensurado no equipamento *Qubit 2.0 Fluorometer*, ambos do fabricante *Thermo Fisher Scientific*. Protocolo utilizado:

1 – Preparo de dois microtubos para as amostras padrões e um microtubo para cada amostra dos RNA a serem quantificados.

2 – Preparação da solução de trabalho diluindo o *Qubit RNA* reagente 1:200 em tampão *Qubit RNA*. Preparado 200,0mL de solução de trabalho para cada padrão e para cada amostra de RNA a ser quantificada.

3 – Preparado os microtubos transferindo os volumes de acordo com as seguintes recomendações:

<b>Volume</b>	<b>Padrão</b>	<b>Amostras</b>
<b>Solução de trabalho</b>	190,0µL	180,0 – 199,0µL
<b>Amostra padrão</b>	10,0µL	---
<b>Amostra</b>	----	1,0 – 20,0µL
<b>Total em cada tubo</b>	200,0µL	200,0µL

4 – Homogeneização no vórtex e incubação por 2 minutos em temperatura ambiente, todas as amostras e os padrões.

5 – Leitura das amostras padrões e as amostras de RNA no equipamento *Qubit Fluorometer 2.0*, de acordo com as normas de calibração.

Etapa 2: Iniciação do protocolo do transcriptoma com o isolamento, quantificação do RNA e transcriptase reversa RNA ;

1 – Diluição das amostras de RNA para uma concentração final de 10ng em volume final de 5,0µL.

2 – Preparação do *maxter mix* para a quantidade de amostras adicionando os seguintes volumes conforme as recomendações para cada amostra:

<b>Componente</b>	<b>Volume</b>
<b>5X VILO™ RT Reaction Mix</b>	1,0µL
<b>10X SuperScript® III Enzyme Mix</b>	0,5
<b>DNase-treated total RNA (10 ng)</b>	≤3,5
<b>Nuclease-Free water</b>	Para 5,0µL
<b>Total</b>	5,0µL

3 – Homogeneização no vórtex e spin de 2 segundos.

4 – Transferência das amostras ao termociclador obedecendo as seguintes orientações de programação:

<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
<b>42°C</b>	30 minutos
<b>85°C</b>	5 minutos
<b>4°C</b>	Período de espera

Etapa 3 – Amplificação dos alvos:

1 – Manipulação das amostras em recipiente com gelo para manter a temperatura refrigerada de 4°C

2 – Preparação o *mastermix* de acordo com a quantidade de amostras, seguindo as seguintes recomendações:

<b>Componente</b>	<b>Volume por reação</b>
<b>5X Ion AmpliSeq HiFi Mix (red cap)</b>	4,0µL
<b>Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Core Panel</b>	8,0µL
<b>Nuclease-Free Water</b>	3,0µL

Total	15,0µL
-------	--------

3 – Homogeneização do PCR *mastermix* no vórtex e efetuado um spin para retirar as gotículas do MCT.

4 – Transferência 15,0-µL de *mastermix* em cada amostra da reação de transcrição.

5 - Homogeneização no vórtex e *spin*.

6 – Transferências das amostras no termociclador obedecendo as seguintes programações:

Estágio	Temperatura	Tempo
Espera	99°C	2 minutos
Ciclo: Programar de acordo com a tabela	99°C	15 segundos
	60°	16 minutos
Espera	10°C	Espera

Concentração de RNA da amostra de entrada	Valor	Número de ciclos
	0,1 – 1,0ng	16
	10,0ng	12
	100,0ng	10

Etapa 4 – Digerir parcialmente as sequencias iniciadoras, obedecendo as seguintes recomendações:

1 – Transferência de 2,0mL do reagente *FuPa Reagent* para cada amostra amplificada.

2 – Homogeneização no vórtex e *spin*.

3 – Transferências das amostras ao termociclador e efetuado a seguinte programação:

Temperatura	Tempo
50°C	10 minutos
55°C	10 minutos
60°C	20 minutos
10°C	Espera

Etapa 5 – Ligando os adaptadores aos *amplicons* e purificando-os, de acordo com as seguintes recomendações:

1 - Preparação para cada código de barras escolhido uma mistura de *Ion P1 Adapter* e *Ion Xpress Barcode X* em uma diluição final de 1:4 para cada adaptador, conforme os volumes indicados:

Exemplo de <i>Mix</i> adaptador para até 4 reações	
Componente	Volume
<i>Ion P1 Adapter</i>	2,0µL
<i>Ion Xpress Barcode X</i>	2,0µL
<i>Nuclease-Free water</i>	4,0µL
Total	8,0µL

Realizado a reação de ligação seguindo as seguintes recomendações:

2 – Transferência para cada amostra digerida os componentes adaptadores preparados conforme os volumes indicados:

Componente	Volume
<i>Switch Solution</i>	4,0µL
<i>Mix</i> adaptador <i>Barcode</i> diluído	2,0µL
Total: incluindo os 22 µL do <i>amplicon</i> (amostra)	28,0µL

3 – Homogeneização

4 – Transferência de 2,0mL de DNA ligase a cada MCT (30,0µL de volume total)

5 – Homogeneização

6 – Transferência aos MCT no termociclador e efetuado a seguinte programação:

Temperatura	Tempo
22°C	30 minutos
72°C	5 minutos
10°C	Espera

Etapa 6 – Purificando a biblioteca não amplificada, conforme as seguintes recomendações:

1 – Transferido 5,0µL do reagente *Agencourt AMPure XP* nos MCT e homogeneizados 5 vezes com a própria pipeta para misturar a suspensão de esferas com o DNA.

2 – Incubado por 5 minutos em temperatura ambiente

3 – Transferido os MCT em uma rack magnética com o *DynaMag* ímã e incubado por 2 minutos. Após os 2 minutos retirado e desprezado o sobrenadante sem interferir com o sedimento.

4 – Adicionado 150,0µL de etanol 70%, movendo os MCT em um giro de 180° de sua posição inicial para lavar o *pellet*, após desprezado o sobrenadante sem interferir com o sedimento.

- 5 – Repetido novamente o passo anterior para uma segunda lavagem.
- 6 – Removido todo etanol com pipeta de 20,0µL, mantendo os MCT na *rack* com ímã abertos por 2 minutos para secagem em temperatura ambiente.

Etapa 7 – Quantificar as bibliotecas por qPCR, conforme as etapas recomendadas:

- 1 – Retirado os MCT da *rack* ímã e adicionado 50,0µL de *Low TE* ao *pellet* para dispensar as esferas. Agitado em vórtex e efetuado spin.
- 2 – Colocar novamente os MCT a *rack* magnética e aguardar por 2 minutos. Transferido o 45,0µL do sobrenadante para o poço de uma placa nova.
- 3 – Preparado cinco diluições em séries de 10 vezes do *E. coli* DH10B *Ion Control Library* a 6,8pM, 0,68pM, 0,068pM e 0,0068pM e 0,00068pM e marcados como padrão e usado a concentrações no *software* do equipamento qPCR.
- 4 – Diluído cada biblioteca *Ion AmpliSeq* usando as seguintes recomendações;

RNA de entrada	Concentração	Diluição recomendada
	10ng	1:10.000

- 5 – Preparado as misturas de reação em 3 poços para cada biblioteca padrão e cada amostra, seguindo as recomendações para calcular o volume necessário do *mastermix*;

Componente	Volume por reação	
	Placa de 96 poços	Placa de 384 poços
<i>2X TaqMan Master Mix</i>	10,0µL	5,0µL
<i>20X Ion TaqMan Assay</i>	1,0µL	0,5µL
Total	11,0µL	5,5µL

- 6 – Realizado na placa de 96 poços, transferido 11,0µL do *mastermix* em cada poço e adicionado 9,0µL da das bibliotecas padrão e as amostras.
- 7 – Programado o equipamento da *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System* nas seguintes configurações:

Estágio	Temperatura	Tempo
Espera	50°C	2 minutos
Espera	95°C	20 segundos
40 ciclos	95°C	1 segundo
	60°C	20 segundos

8 – Seguindo o qPCR, calculado a concentração média da biblioteca AmpliSeq transcriptoma não diluída pela multiplicação determinada por qPCR da biblioteca diluída utilizada no ensaio.

9 – As amostras que tiveram concentração maior de 100,0pM, efetuado diluição com *Nuclease-Free water* para o valor de 100,0pM em volume de 8,0µL.

Etapa 8 – Realizado PCR emulsão no equipamento *Ion PI HI-Q OT2 200 Kit*, sob o catálogo: A26434, seguindo as instruções:

1 – Acoplado os reagentes necessários no equipamento; *Ion OneTouch Reaction Oil* (25,0mL) e *Nuclease-free Water*.

2 – Preparado os reagentes de trabalho; *Ion PI Master Mix*, *Ion PI Enzyme Mix*, *Ion PI Ion Sphere Particles*, agitados em vórtex e efetuado spin.

3 – Diluído as amostras conforme orientação de 100,0pM iniciais em volume de 8,0µL adicionando 92,0µL de *Nuclease free Water*, para volume total de 100,0µL.

4 – Homogeneização em vórtex e *spin*

5 – Transferido em MCT de 2,0mL, adicionado os seguintes reagentes na seguinte ordem:

Ordem	Reagente	Volume
1	<i>Nuclease-free Water</i>	80,0µL
2	<i>Ion PI Enzyme Mix</i>	120,0µL
3	<i>Ion PI ISPs</i>	100,0µL
4	Biblioteca diluída	100,0µL
	Volume total incluindo <i>mastermix</i>	2400,0µL

6 – Agitado em vórtex e centrifugado por 2 segundos e acondicionado o tubo na sua posição no equipamento.

7 – Alimentado o equipamento com o *Ion OneTouch Reaction Filter*.

8 – Inicializado a configuração do *Ion OneTouch 2 Instrument*, obedecendo as seguintes configurações na tela *touch*; seleciona *run*, selecionado a opção *Proton: Ion PI Hi-Q OT2 200 Kit*, selecionado *next*, selecionado *assisted*, selecionado *yes*, e esperado o término do processo, em média 5 horas.

Etapa 9 – Realizado o enriquecimento das bibliotecas com partículas de esferas (*beads*) no equipamento *Ion OneTouch ES*.

Etapa 10 – Lavado as bibliotecas e as partículas de esferas (*beads*) e quantificado a amostra no *Qubit Fluorometer*, seguindo as recomendações de valores: 10 a 30% de DNA ligado as esferas é o valor ideal.

Etapa 11 – Calibrado automaticamente do Equipamento *Ion Proton™ System*.

Etapa 12 - Preparados os *chips* que receberam as bibliotecas com as *beads*. A solução produto de todos os protocolos anteriores foi injetada no *Ion PI Chip Kit V3* de forma que o líquido se espalhasse por toda matriz do componente e por consequência nos poços microscópicos do *chip*. Utilizamos 1 *chip* para sequenciar 4 amostras do grupo controle e outro *chip* para sequenciar 4 amostras do grupo hipotiroídianos clínicos sem de tratamento com L-T4.

1 – Centrifugado o *Ion Chip Kit V3* por 5 minutos em centrífuga especial para *Ion PI Chip*, eliminando toda bolha de ar que existia na matriz.

2 – Acondicionado o *Ion PI Chip* no soquete do equipamento *Ion Proton™ System*, efetuado o cadastro da corrida e o protocolo utilizado RNA-seq. O sequenciamento do transcriptoma levou em média 3 horas e meia.

### **Quantificação do RNA total**

A quantificação do RNA total foi realizada pelo *Kit Qubit RNA Assay Kit®*, catálogo números Q32852 e Q32855, mensurado no equipamento *Qubit 2.0 Fluorometer®*, ambos do fabricante *Thermo Fisher Scientific*.

O sequenciamento foi iniciado a partir do preparo de 2 microtubos para as amostras padrões e 1 microtubo para cada amostra RNA que foram quantificados. Seguida pela preparação da solução diluindo *Qubit* RNA reagente em tampão *Qubit* RNA na proporção de 1:200 realizada para cada amostra padrão e para cada amostra de RNA. Após o preparo dos microtubos de acordo com as recomendações foram transferidos os volumes: para a solução padrão: 190,0µL de solução e 10,0µL de amostra padrão, com total de 200,0µL em cada tubo; e para as amostras: de 180,0µL a 199,0µL de solução e 1,0,0µL a 20,0µL da amostra de RNA totalizando 200,0µL em cada tubo. Seguido pela homogeneização no vórtex e incubação por 2 minutos em temperatura ambiente. As leituras das amostras padrão e das amostras de RNA foram realizadas no equipamento *Qubit Fluorometer*<sup>®</sup> 2.0, de acordo com as normas de calibração.

### **Síntese de cDNA**

O protocolo do transcriptoma foi iniciado com o isolamento, quantificação do RNA e transcriptase reversa do RNA, em que foi feita a diluição das amostras de RNA para uma concentração final de 10,0ng e volume final de 5,0µL, seguida da preparação do *maxter mix*, no qual foram adicionados os volumes específicos para cada amostra: 1,0µL de 5X VILO™ RT Reaction Mix, 0,5µL de 10X SuperScript® III Enzyme Mix, menor ou igual a 3,5µL de DNase-treated® total RNA (1,00ng) e 5,0µL de Nuclease-Free water®, atingindo o volume final de 5,0µL. Seguido pela homogeneização no vórtex e *spin* de 2 segundos, as quais foram transferidas para o termociclador com as orientações de programação para temperatura e tempo: 42°C em 30 minutos, 85°C em 5 minutos e 4°C em período de espera, respectivamente.

### **Amplificação das sequências-alvo**

A amplificação das sequências-alvo tem como objetivo aumentar a fonte de sinal luminoso para a maioria dos sequenciadores e iônico do *Ion Proton*<sup>™</sup> System que serão detectados.

Esta etapa começou com a manipulação das amostras em recipiente com gelo para manter a temperatura à 4°C, dando continuação com a preparação do *mastermix* onde os volumes transferidos foram: 4,0µL de 5X *Ion AmpliSeq HiFi Mix (red cap)*, 8,0µL de *Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Core Panel* e 3,0µL de *Nuclease-Free Water*, com volume final de 15,0µL. Homogeneizou-se o PRC *mastermix* no vórtex seguido de um *spin* para retirar gotículas do microtubo MCT e continuando com a transferência de 15,0µL de *mastermix* para cada amostra da reação de transcrição, conduzido para homogeneização no vórtex e *spin* e as amostras foram transferidas para o termociclador programado: no estágio de espera com 99°C em 2 minutos; no estágio de ciclo com 99°C em 15 segundos e 60° em 16 minutos; e no estágio espera com 10°C com tempo em espera. Com volume da concentração de RNA da amostra de entrada e quantidade de ciclos: 0,1ng a 1,0ng com 16 ciclos, 10,0ng com 12 ciclos e 100,0ng com 10 ciclos.

### **Preparo das sequências iniciadoras**

Nas sequências iniciadoras ocorre uma digestão inicial com a transferência de 2,0mL do reagente *FuPa*<sup>®</sup> para cada amostra amplificada, seguida da homogeneização no vórtex e *spin*, e transferência das amostras para o termociclador em conformidade com as recomendações para a programação da temperatura e tempo estimado: 50°C em 10 minutos, 55°C em 10 minutos e 60°C em 20 minutos.

### **Ligação dos *barcodes* aos *amplicons***

Etapa que consiste em preparação para cada código de barras escolhido em um composto de adaptador *Ion P1* e *barcode Ion Xpress*, na qual envolveu uma diluição final de 1:4 para cada adaptador. Deu-se o seguimento com a reação de ligação na transferência de: 2,0µL de adaptador *Ion P1*, 2,0µL *barcode Ion Xpress*, 4,0µL de *Nuclease-Free water*, resultando no total de 8,0µL, sendo que estes volumes foram referidos em, no máximo, 4 reações.

Na sequência foi realizada a reação de ligação em que foi transferido: 4,0µL *Switch Solution*, 2,0µL do composto anteriormente diluído, resultando no volume total

de 28,0µL, incluindo os 22,0µL do *amplicon* (amostra). Seguida da agitação em vórtex para homogeneização e *spin*, após foi acrescentado 2,0mL de DNA ligase a cada MCT, atingindo 30,0µL de volume total, agitado posteriormente para homogeneização e novamente um *spin*. Logo depois os tubos MCT foram dispostos no termociclador com a programação de temperatura *versus* tempo: 22°C em 30 minutos; 72°C em 5 minutos e 10°C no tempo de espera.

### **Purificação da biblioteca**

A biblioteca não amplificada foi realizada com a transferência do reagente *Agencourt AMPure XP*<sup>®</sup> que foram homogeneizados com a pipeta por 5 vezes para promover a mistura da suspensão das esferas com o DNA, transportadas para a incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. Depois do tempo de incubação, os MCT foram afixados em uma rack magnética com o DynaMag<sup>®</sup> ímã e novamente incubado por 2 minutos. Após o período de incubação foram retirados e desprezou-se o sobrenadante cuidadosamente para que não houvesse interferência com o sedimento. Dando seguimento com a repetição da etapa anterior com o objetivo de uma segunda lavagem. Depois da repetição, o etanol foi removido totalmente com a pipeta, mantendo os MCT na rack com os ímãs abertos por 2 minutos para secagem em temperatura ambiente.

### **qPCR (Quantificação das bibliotecas)**

A quantificação das bibliotecas iniciou com a retirada dos MCT da rack magnética os ímãs e pipetando 50,0µL de *Low TE*<sup>®</sup> ao *pellet* para dispensar as esferas e transportados para homogeneização em vórtex e posterior *spin*. Novamente, os MCT foram transportados para a *rack* magnética e aguardados 2 minutos. Logo depois do tempo decorrido foram transferidos 45,0µL do sobrenadante para o poço de uma placa nova.

Enquanto isso, foram preparadas 5 diluições em séries de 10 vezes do *E. coli* DH10B *Ion Control Library*<sup>®</sup> a 6,8pM, 0,68pM, 0,068pM e 0,0068pM e 0,00068pM, em que marcados como padrão e usadas as concentrações no *software* do equipamento

qPCR. Cada biblioteca *Ion AmpliSeq*<sup>®</sup> de RNA de entrada foi diluída na proporção de 1:10000 com concentração de 10,0ng. Em seguida, foram preparadas as misturas de reação em 3 poços para cada biblioteca padrão e cada amostra. Essas misturas foram realizadas na placa de 96 poços, em que foram transferidos 11,0µL de solução (10,0µL de *2X TaqMan*<sup>®</sup> e 1,0µL de *20X Ion TaqMan Assay*<sup>®</sup>) em cada poço e pipetado 9µL das bibliotecas padrão e das amostras. Continuando com a programação do equipamento *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System*<sup>®</sup> nas seguintes configurações: estágio em espera com temperatura de 50°C e 95°C nos períodos de 2 minutos e 20 segundos, respectivamente; e estágio de 40 ciclos com temperaturas de 95°C e 60°C nos períodos de 1 segundo e 20 segundos, respectivamente.

Dando prosseguimento com o qPCR com o cálculo da concentração média da biblioteca do transcriptoma *AmpliSeq*<sup>®</sup> não diluída pela multiplicação determinada por qPCR da biblioteca diluída utilizada no ensaio. Sendo que as amostras que tiveram concentração maior que 100,0pM foi realizada diluição com *Nuclease-Free water*<sup>®</sup> para o valor de 100,0pM em volume de 8,0µL.

## PCR de emulsão

No PCR de emulsão são criados milhões de micro reatores, os quais contêm todos os reagentes necessários para uma reação de PCR e pequenas esferas nomeadas por *beads* cobertas com a sequência complementar ao adaptador. Foi realizado no equipamento *Ion PI HI-Q OT2 200 Kit*<sup>®</sup>, sob o catálogo: A26434, iniciando com o acoplamento dos reagentes necessários ao equipamento *Ion OneTouch Reaction Oii*<sup>®</sup> de 25,0mL e o *Nuclease-free Water*<sup>®</sup>. Onde foram preparados os reagentes: *Ion PI Master Mix*, *Ion PI Enzyme Mix*<sup>®</sup>, *Ion PI Ion Sphere Particles*<sup>®</sup>, e homogeneizados em vórtex seguido por *spin*. Continuando com a diluição das amostras em 100,0pM iniciais em volume e 8,0µL mais adição de 92,0µL de *Nuclease free Water*<sup>®</sup> para obtenção de volume final de 100,0µL, seguida da homogeneização em vórtex e *spin*. Logo após foi transferido para MCT e foram pipetados reagentes na seguinte ordem e proporção: 80,0µL de *Nuclease-free Water*<sup>®</sup>, 120,0µL de *Ion PI Enzyme Mix*<sup>®</sup>, 100,0µL de *Ion PI ISPs*<sup>®</sup>, 100,0µL da Biblioteca diluída, respectivamente, atingindo o volume total de 2400,0µL incluindo o *mastermix*. Imediatamente foi homogeneizado em vórtex e centrifugado por 2 minutos e o tubo de

MCT foi disposto na posição adequada no equipamento. O referido equipamento, *Ion OneTouch 2 Instrument*<sup>®</sup>, foi alimentado com o *Ion OneTouch Reaction Filter*<sup>®</sup>, e configurado na opção *Proton: Ion PI Hi-Q OT2 200 Kit*<sup>®</sup> no período médio de 5 horas.

### **Hibridização das *beads* magnéticas**

Essa etapa de enriquecimento das bibliotecas com as *beads* foi realizada no equipamento *Ion OneTouch ES*<sup>®</sup>, em seguida foi realizado o lavado das bibliotecas e as *beads*, mais a quantificação da amostra no *Qubit Fluorometer*<sup>®</sup>, seguindo as recomendações de que valores ideais são de 10 a 30% de DNA ligado as esferas. Logo após, prosseguiu-se com a calibração do sequenciador no equipamento *Ion Proton*<sup>™</sup> *System*<sup>®</sup>.

### **Preparo dos *chips***

Os *chips* que receberam as bibliotecas com as *beads* foram preparados com a solução produto de todos os protocolos anteriores, onde foi pipetada no *Ion PI Chip Kit V3*<sup>®</sup> de modo em que a solução ficou uniforme na matriz do componente e conseqüentemente nos poços microscópicos do *chip*. Foram utilizados 1 *chip* para sequenciar 4 amostras do grupo de eutiroidianos tratados com levotiroxina com bom controle e mais 1 *chip* para sequenciar 4 amostras do grupo de hipotiroidianos subclínico com tratamento inadequado de levotiroxina. Seguido com a centrifugação do *Ion Chip Kit V3*<sup>®</sup> no período de 5 minutos em centrífuga especial para *Ion PI Chip*<sup>®</sup>, eliminando toda bolha de ar que existia na matriz. Logo após o *Ion PI Chip*<sup>®</sup> foi disposto no bocal do equipamento *Ion Proton System*<sup>®</sup> seguido com o cadastro da corrida e o protocolo utilizado no RNA-seq. Esse sequenciamento do transcriptoma transcorreu em aproximadamente 3 horas e meia.