

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

**ROBSON JOSÉ DE ALMEIDA**

**PAINEL DE EXPRESSÃO GÊNICA COMO BIOMARCADOR NO**  
**HIPOTIROIDISMO POR TRANSCRIPTOMA RNA-SEQ EM INDIVÍDUOS COM**  
**HIPOTIROIDISMO PRIMÁRIO**

**SÃO PAULO - SP**  
**2016**

**ROBSON JOSÉ DE ALMEIDA**

**PAINEL DE EXPRESSÃO GÊNICA COMO BIOMARCADOR NO  
HIPOTIROIDISMO POR TRANSCRIPTOMA RNA-SEQ EM INDIVÍDUOS COM  
HIPOTIROIDISMO PRIMÁRIO**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Nove de Julho, como requisito para obtenção de título de Mestre em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Cléber Pinto Camacho

**São Paulo - SP  
2016**

**FICHA CATALOGRÁFICA**

***Almeida, Robson José de.***

***Painel de expressão gênica como biomarcador no hipotireoidismo por transcriptoma RNA-seq em indivíduos com hipotireoidismo primário / Robson José de Almeida, 2016.***

***74 f.***

***Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE,  
2016.***

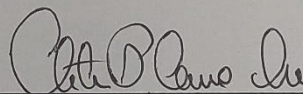
São Paulo, 14 de junho de 2016.

TERMO DE APROVAÇÃO

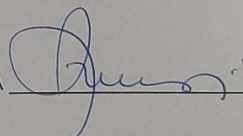
Aluno(a): ROBSON JOSÉ DE ALMEIDA

Título da Dissertação: "Desenvolvimento de painel de biomarcadores para o diagnóstico de hipotireoidismo primário".

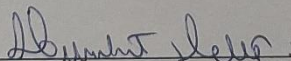
Presidente: PROF. DR. CLEBER PINTO CAMACHO



Membro: PROF. DR. MAGNUS REGIOS DIAS DA SILVA



Membro: PROF. DR. HUMBERTO DELLÉ



### **Dedicatória**

Dedico esta dissertação a toda minha família, que incondicionalmente me apoiaram a seguir meus sonhos.

Ao irmão Paulo José de Almeida (*in memoriam*), ser humano iluminado, que teve como missão nos ensinar o amor, simplicidade e a alegria de viver. A evolução de seu espírito sempre me inspirará.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Cléber Pinto Camacho, pela sabedoria e paciência em lapidar meu intelecto. Pelo apoio motivador e ensinamentos que transformaram minha vida. Que eu possa honrá-lo sempre, como digno ser humano e mestre que é. Gratidão eterna!

Ao Prof. Dr. Humberto Dellê, pelos aconselhamentos, redirecionamento profissional, aprendizados, preocupação e ajuda.

A Profa. Dra. Ivone Silva Duarte, pela predisposição e tranquilidade em prontamente me auxiliar nas dúvidas.

Ao Prof. Dr. Daniel Giannella Neto, pela forma simples, descontraída, porém amplamente experiente de transmitir conhecimento. Seus alvitreos jamais serão esquecidos!

Ao Prof. Dr. José Antônio Silva Junior, pela oportunidade de ser avaliado em qualificação e nas correções do conteúdo desse trabalho.

Ao Centro de Pesquisa e Diagnóstico Molecular de Doenças Genéticas da Escola Paulista de Medicina, departamento de biofísica, em especial ao Prof. Dr. João Bosco Pesquero, pela cordialidade em “abrir” seu laboratório em apoio e parceria a nossa pesquisa, disponibilizando de forma irrestrita seus colaboradores e equipamentos, bem como a Msc. Patrícia Varella Lima Teixeira (Escola Paulista de Medicina), que com muita gentileza e prestatividade nos auxiliou com sua larga experiência laboratorial, e o Msc. Leonardo Martins Silva (Escola Paulista de Medicina) pela atenção, solicitude e execução dos protocolos necessários ao transcriptoma. A todos, o meu absoluto respeito e gratidão.

Ao Centro de Pesquisa e Diagnóstico de Doenças Endócrinas da Escola Paulista de Medicina, departamento de endocrinologia, em particular a Msc. Teresa Kasamatsu, pela bondade de me ensinar e executar provas bioquímicas necessárias em nossa pesquisa.

Aos colegas de mestrado Lucas dos Santos Bacigalupo e Valdelena Alessandra da Silva, pela honra e a oportunidade de trabalharmos juntos, pela parceria e os momentos de mútuas motivações.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, certo que sem a aquisição do fomento esse trabalho não seria concretizado. Em nome de toda equipe envolvida nesse trabalho, o nosso muito obrigado.

A todos que de forma direta e indireta participaram para a concretização dessa pesquisa, o meu muito obrigado.

## Resumo

O hormônio tireoidiano (HT), modula de forma direta e indireta os processos fisiológicos primordiais para o desenvolvimento e manutenção do organismo humano. A atuação neuroendócrina fornece uma integração das complexas funções dos tecidos, gerando respostas coordenadas as específicas necessidades do organismo. O eixo hipotálamo, hipófise, tireoide é o exemplo clássico do controle neuroendócrino. O hipotireoidismo é definido pela incapacidade da glândula tireoide produzir HT suficiente para suprir as necessidades metabólicas do organismo. A determinação plasmática do hormônio estimulador da tireoide (TSH) é o primeiro teste realizado na suspeita do hipotireoidismo primário. A precisão do diagnóstico do TSH para detecção do hipotireoidismo ainda possui limitações. Atualmente os diagnósticos moleculares específicos para as doenças tireoidianas em sua maioria são confeccionados para os carcinomas de tireoide. O RNA-seq (sequenciamento de ácido ribonucleico) atualmente é construído por tecnologias denominadas de NGS (sequenciadores de nova geração) e realiza todo perfil dos transcritos de forma maciça. Os níveis de TSH e T4 livre definido para a maioria dos indivíduos em eutireoidismo podem não refletir as quantidades adequadas de hormônio para o correto funcionamento de todos os tecidos. O objetivo deste trabalho foi identificar o padrão de expressão gênica no sangue periférico de pacientes com hipotireoidismo e encontrar um gene ou um painel de genes capazes de diferenciar os indivíduos eutireoidianos de pacientes com hipotireoidismo primário. Conseguimos identificar 5 genes (CCNJL, IMPA2, FAM129B, SLC4A11 e CDK18) que podem ser úteis formando um painel de biomarcadores pela capacidade de diferenciar o eutireoidismo do hipotireoidismo primário e também correlacioná-los com os níveis séricos de TSH.

**Palavras chaves:** Tireoide. Hipotireoidismo. Transcriptoma. RNA-seq. Sequenciamento. Biomarcador.



## Abstract

The thyroid hormone (TH), modulates directly and indirectly the primary physiological processes for the development and maintenance of the human body. The neuroendocrine activity provides an integration of complex functions of tissues, generating coordinates answers the specific needs of the body. The hypothalamus, pituitary, thyroid is the classic example of the neuroendocrine control. Hypothyroidism is defined by the thyroid gland unable to produce HT sufficient to meet the metabolic needs of the body. The plasma determination of thyroid stimulating hormone (TSH) is the first test performed on suspicion of primary hypothyroidism. The accuracy of diagnosis of TSH for Hypothyroidism detection still has limitations. Currently the specific molecular diagnostics for thyroid diseases are mostly made for thyroid carcinomas. RNA-Seq (ribonucleic acid sequencing) is currently built by technology called NGS (next generation sequencers) and performs all of the transcripts profile massively. TSH levels and free T4 set to most individuals in euthyroid may not reflect the proper amounts of hormone for the proper functioning of all tissues. The objective of this study was to identify the pattern of gene expression in peripheral blood of patients with hypothyroidism and find a gene or a panel of genes able to differentiate euthyroid individuals from patients with primary hypothyroidism. We have identified 5 genes (CCNJL, IMPA2, FAM129B, SLC4A11 and CDK18) that may be useful to form a panel of biomarkers for the ability to differentiate euthyroid primary hypothyroidism and also correlate them with the serum levels of TSH.

**Key words:** Thyroid. Hypothyroidism. Transcriptome. RNA Seq. Sequencing. Biomarker.

## **Lista de tabelas**

**Tabela 1** – Dados descritivos e bioquímicos.

**Tabela 2** – Dados moleculares do transcriptoma.

**Tabela 3** - Transcritos diferencialmente expressos entre os grupos HT e CTL.

**Tabela 4** – Identificação gênica dos transcritos e suas respectivas localizações cromossômicas, classificação de RNA e produtos.

**Tabela 5** – Correlação entre os genes e os níveis de TSH.

**Tabela 6** - Padrões estimados de expressão gênica.

## **Lista de figuras**

**Figura 1** – Gráfico MDS - Superfície multidimensional.

**Figura 2** – Gráfico de pontos 1.

**Figura 3** – Gráfico de pontos 2.

## Lista de abreviaturas e siglas

AIS – Ambulatório integrado de saúde

BR1 – Tampão de ressuspensão 1

BR2 – Tampão de ligação 2

BR3 – Tampão de lavagem 1

BR4 – Tampão de lavagem 2

BR5 – Tampão de eluição

CLT – Grupo controle

DAIT – Doença autoimune da tireoide

DIO – Iodotironina Desiodases

DIO1 – Desiodase tipo 1

DIO2 – Desiodase tipo 2

DIO3 – Desiodase tipo 3

DIT – 3,5-diiodo-L-tirosina

DM1 – Diabetes *mellitus* tipo 1

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FSH – Hormônio folículo estimulante

HC – Hipotireoidismo congênito

HCG – Gonadotrofina coriônica humana

HHT – Eixo hipotálamo, hipófise, tireoide

HT – Hormônio tireoidiano

HTST – Grupo de hipotireoidianos primários sem tratamento com L-T4

ISFET – Transistor de efeito de campo íon sensível

LH – Hormônio luteinizante

L-T4 – Levotiroxina

MCT – Microtubo

MIT – 3-moniiodo-L-tirosina

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NGS – Sequenciadores de nova geração

N-TSHr-Abs – Anticorpos de neutralização dos receptores do hormônio estimulante da tireoide

OATP1C1 – Polipeptídios co-transportadores de ânions orgânicos independentes de sódio 1C1

OMS – Organização mundial da saúde

PAAF - Punção aspirativa por agulha fina

PCR - Reação da cadeia de polimerase

PCR-RT - Reação da cadeia de polimerase em tempo real

PK – Proteinase K

PT – Tubo de processamento

PTH – Hormônio da paratiroide

RDD – Tampão de digestão de DNA

RNA - Ácido ribonucleico

RNFW – Água livre de RNase

RPM – Rotações por minuto

rT3 – T3 reverso

T2 - 3,3'-diiodo-L-tironina

T3 - 3,5,3'-triiodo-L-tironina (triiodotironina)

T4 - 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (tiroxina)

TBG – Globulina ligante de tiroxina

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TgAb – Anticorpo antitiroglobulina

TR - Receptor nuclear de triiodotironina (T3)

TPOAb – Anticorpo antiperoxidase

TER – Elementos de resposta ao hormônio tireoidiano

TRH – Hormônio liberador de tireotrofina

TSH – Hormônio estimulante da tiroide

TSHr – Receptor do hormônio estimulante da tiroide

## Lista de símbolos

$\alpha$  – Alfa

$\beta$  – Beta

H<sup>+</sup> - Íon hidrogênio

I – Iodo

kDa – Kilo Dalton(s)

kg – Kilo grama(s)

kg/dia – Kilo(s) grama(s) por dia

mU – Mili unidade(s)

mU/L – Mili unidade(s) por litro

ng/dL – Nano grama(s) por decilitro

ng/mL – Nano grama(s) por mililitro

pg/mL – Pico grama(s) por mililitro

pmol/L – Pico mol(s) por litro

pH – potencial hidrogeniônico

UI/mL – Unidade(s) internacional por mililitro

## Índice

Dedicatória .....	4
Resumo .....	7
Abstract .....	8
Lista de tabelas .....	9
Lista de figuras .....	10
Lista de abreviaturas e siglas .....	11
Lista de símbolos .....	13
1.0 Introdução .....	15
1.1 Hipotireoidismo .....	17
1.2 Repercussões clínicas da deficiência do HT .....	20
1.3 Tratamento com reposição hormonal no hipotireoidismo .....	23
1.4 Fisiologia molecular .....	24
1.5 Medicina personalizada .....	27
1.6 Diagnóstico molecular .....	29
1.7 Transcriptoma.....	30
1.8 Sequenciamento de última geração (NGS) .....	31
2.0 Justificativa .....	34
3.0 Materiais e métodos .....	35
3.1 Seleção de indivíduos saudáveis e com hipotireoidismo primário ..	35
3.2 Coleta e exames complementares .....	36
3.3 Extração do RNA total .....	37
3.4 Análise bioquímica.....	37
3.5 Execução do transcriptoma .....	38
3.6 Análise de bioinformática.....	38
3.7 Análise estatística.....	39
4.0 Resultados.....	40

5.0	Discussão.....	50
6.0	Conclusão .....	52
	Anexo 1 .....	53
	Anexo 2.....	56
	Bibliografia.....	63



## 1.0 Introdução

A glândula tireoide é um órgão localizado na região do pescoço, na porção anterior da traqueia, entre a cartilagem cricoide e o estreito supraesternal. Sua forma faz alusão à imagem de uma borboleta. Seus lobos direito e esquerdo são separados por uma região central chamada istmo. Na tireoide são sintetizados e posteriormente secretados na corrente sanguínea os hormônios tireoidianos 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (tiroxina ou T4) considerado um pró-hormônio e 3,5,3'-triiodo-L-tironina (triiodotironina ou T3) o hormônio bioativo<sup>1</sup>.

O hormônio tireoideo (HT), modula de forma direta e indireta os processos fisiológicos primordiais para o desenvolvimento e manutenção do organismo humano, atuando de forma efetiva no metabolismo celular. Sua ação correlaciona-se diretamente com o gasto energético. Nas condições de desequilíbrio das secreções do HT, formam-se dois eventos fisiopatológicos caracterizados em: 1- hipertireoidismo; definido pelo aumento da concentração plasmática do HT, estabelecendo um aumento do gasto energético em repouso (hipermetabolismo), resultando em perda de peso, redução dos níveis de colesterol, aumento da lipólise e gliconeogênese, 2 – hipotireoidismo; reconhecido pela diminuição da concentração plasmática do HT, exercendo redução do gasto energético em repouso (hipometabolismo), gerando ganho de peso especialmente associado à retenção de líquidos corpóreos (*mixedema*), aumento dos níveis de colesterol, redução da lipólise e gliconeogênese<sup>2</sup>.

A produção e secreção do HT é realizada graças a um mecanismo de controle *feedback*, que envolve o eixo das glândulas hipotálamo, hipófise e tireoide (HHT). Essa atuação neuroendócrina fornece uma integração das complexas funções dos tecidos, gerando respostas coordenadas às específicas necessidades do organismo. O eixo HHT é o exemplo clássico do controle neuroendócrino na regulação fisiológica do corpo humano durante o desenvolvimento e a vida adulta<sup>3</sup>.

O perfeito funcionamento da tireoide obedece à necessidade do organismo frente às diferentes condições, por exemplo; redução alimentar, diminuição da temperatura ambiente e doenças. Conforme as demandas metabólicas, o organismo por controle de *feedback* positivo sinaliza ao eixo HHT, especialmente aos receptores das glândulas hipotálamo e hipófise a diminuição das concentrações

plasmáticas circulantes de T3 e T4, que por *feedback* negativo ao eixo HHT promove a secreção do hormônio liberador de tirotrófina (TRH) pela glândula hipotálamo diretamente ao sistema portal, sensibilizando a glândula hipófise, excitando-a na secreção do hormônio estimulador da tireoide (TSH) na circulação sistêmica. O TSH tem como função estimular as células foliculares da tireoide a sintetizar e secretar T3 e T4<sup>3</sup>. A glândula tiroide pode sofrer alterações morfológicas, evidenciada pela perda da sua função com o passar da idade<sup>4</sup>.

Quando a tiroide exerce corretamente sua função, a captação do iodo é necessária para a formação do T4 e do T3. A oferta do iodeto plasmático para construção molecular do HT acontece basicamente pela alimentação. Nas células foliculares da tiroide, o iodeto é adicionado ao núcleo tirosil da tiroglobulina, formando as iodotirosinas 3-iodo-L-tirosina (MIT) e as 3,5-diiodo-L-tirosina (DIT). A formação do T4 requer a ligação de duas moléculas de DIT e a do T3 a ligação de uma molécula MIT e uma DIT. Tanto o T4 como o T3, são armazenados no coloide. A tiroide produz predominantemente o pró-hormônio T4 e em menor quantidade o hormônio bioativo T3. As concentrações secretadas na corrente sanguínea formam aproximadamente as seguintes proporções: 80% de T4 e 20% de T3<sup>5</sup>.

A deficiência de iodo leva ao hipotireoidismo grave, podendo até gerar um retardo mental transitório ou efetivo. Nas gestações deficientes de iodo, aumentam as chances de recém-nascidos com cretinismo. A deficiência leve ou moderada de iodo leva a diminuição da cognição em lactantes e crianças<sup>5</sup>. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) as orientações para ingestão adequada da dose diária de iodo são definidas por grupos populacionais e idades em µg/dia; crianças de até 5 anos: 90µg/dia; crianças de 6 a 12 anos: 120µg/dia; adultos maiores que 12 anos: 150µg/dia; na gestação: 250µg/dia; lactação: 250µg/dia, recomendações para profilaxia do bócio endêmico e hipotireoidismo<sup>6</sup>. O HT interage com uma ampla variedade de vias de sinalizações e basicamente sua modulação e ação está diretamente ligada ao estado nutricional e ingestão de iodo<sup>7</sup>.

## 1.1 Hipotiroidismo

As doenças da tireoide especialmente as autoimunes atingem cerca de 5% da população mundial. As disfunções tiroidianas são detectadas 5 a 10 vezes mais em mulheres do que em homens, e a sua frequência aumenta com a idade<sup>8</sup>.

Basicamente o hipotiroidismo é definido pela incapacidade da glândula tireoide produzir HT suficiente para suprir as necessidades metabólicas do organismo. Ele pode acontecer por falha primária da glândula ou por deficiente estimulação da tireoide pela glândula hipófise através do TSH. As desordens primárias da glândula podem ser decorrentes de anormalidades congênitas, destruição autoimune (Tiroidite Crônica de Hashimoto), deficiência de iodo ou doenças infiltrativas<sup>5: 8</sup>.

Formas iatrogênicas de hipotiroidismo podem ocorrer após tireoidectomia, radioiodoterapia, irradiações ionizantes no pescoço ou medicações. Outra forma de manifestação é o hipotiroidismo transitório, muitas vezes associado ao pós-parto, tiroidite subaguda ou ao efeito Wolf-Chaikoff. O hipotiroidismo central é causado tipicamente por disfunções das glândulas hipotálamo e hipófise, e são caracterizados pelos inadequados níveis séricos do TSH em relação ao T4 e T3. Algumas drogas são classicamente associadas à disfunção tiroidiana, como a amiodarona, lítio, *interferon alfa*, interleucina-2 e os inibidores de tirosina quinase<sup>9</sup>.

O hipotiroidismo pode resultar numa ampla apresentação de sinais clínicos e sintomas, muitas vezes inespecíficos. Os sinais clínicos e sintomas genéricos do hipotiroidismo incluem: ganho de peso, déficit de concentração, dores musculares difusas, depressão e nas mulheres, irregularidades menstruais e infertilidade. Os sintomas com alta especificidade incluem: constipação, intolerância ao frio, fraqueza muscular, pele seca, queda de cabelo, rouquidão. Os sintomas variam de acordo com a idade e sexo. Os achados mais comuns nos exames clínicos são: bócio, fase de relaxamento atrasado nos reflexos, cabelo fino ou quebradiço, *mixedema* (edema periférico), pele seca e bradicardia. Nos casos graves os hipotiroidianos podem apresentar derrame de pericárdio, derrame pleural, megacolon, instabilidade hemodinâmica e coma, muitas vezes confundido com choque séptico e o mais raro coma *mixedema*. Achados laboratoriais podem incluir; hiponatremia, hipóxia, hipercapnia, anemia normocítica, aumento da creatino quinase, hiperlipidemia e hiperprolactinemia<sup>9</sup>.

A melhor avaliação laboratorial da função tireoidiana para o diagnóstico de hipotireoidismo primário é a dosagem do TSH. A definição em que o TSH é um teste central para definir função tireoidiana possui seus méritos e desvantagens. Por outro lado, a interação TSH, T3 e T4 pode facilitar uma abordagem mais individualizada, frente as amplas variações inter-individuais de cada parâmetro<sup>9;10</sup>. Nos níveis plasmáticos aumentados do TSH o exame seguinte a ser realizado é a dosagem do hormônio T4 livre no plasma. O hipotireoidismo primário é caracterizado pela alta da concentração sérica do hormônio TSH e pela diminuição da concentração do hormônio T4 livre no plasma. Outra situação distinta ocorre quando os níveis de TSH estão aumentados e os níveis de T4 livre estão normais, caracterizando o hipotireoidismo subclínico. Quando os níveis de T4 livre estão baixos e os níveis de TSH estão inapropriadamente normais, provavelmente, estamos diante de um hipotireoidismo central (acometimento hipofisário ou hipotalâmico) e provas funcionais das glândulas hipotálamo e hipófise podem ser utilizadas para a conclusão do diagnóstico<sup>10</sup>.

A dosagem do TSH é o primeiro exame complementar a ser realizado na suspeita do hipotireoidismo primário, sempre levando em consideração a relação log-linear inversa entre as concentrações plasmáticas de TSH e T4 livre<sup>11</sup>. O TSH é exato, relativamente seguro, barato e amplamente disponível. Para o hipotireoidismo ainda não existe um teste padrão ouro, e mesmo que testes ultrasensíveis do TSH tenham melhorado e ajudado significativamente a investigação das doenças tireoidianas em especial o hipotireoidismo, a precisão do diagnóstico do TSH para detecção do hipotireoidismo ainda possui limitações. Os valores de referência para o TSH sérico, amplamente considerados como referências de normalidade, são 0,45mU/L a 4,5mU/L para a maioria das populações, exceto na gestação. A repetição do teste de TSH é importante para descartar a possibilidade de aumentos transitórios. Resultados entre 4,6mU/L a 10mU/L normalmente tendem a se normalizar nas repetições do exame<sup>11</sup>.

Os receptores de TSH (TSHr), muitas vezes desempenha um importante papel na Doença Autoimune da Tireoide (DAIT). Os anticorpos contra os receptores do TSH (TRAb) podem estimular, bloquear ou neutralizar a influência sobre os TSHr-Abs, especialmente em doença de Graves. Os anticorpos de bloqueio B-TSHr-Abs inibem a ação do TSH sobre o receptor, os anticorpos S-TSHr-Abs estimulam os

receptores e os anticorpos de neutralização N-TSHr-Abs são capazes de iniciar cascatas de sinalizações para a morte celular programada (apoptose)<sup>12</sup>. Entre as DAIT (doença de Graves ou tiroidite de Hashimoto) a prevalência é muito maior em mulheres do que em homens. A incidência de DAIT está muito relacionada à localização geográfica, fatores ambientais, genéticos e também ao envelhecimento<sup>13</sup>. A patogênese da tiroidite autoimune (Tiroidite de Hashimoto) é sustentada pela presença histológica de infiltração linfocítica da glândula tiroide, pela substituição do parênquima tiroidiano por um tecido fibroso ocasionando a destruição gradual da glândula e extrema presença de anticorpos de peroxidase da tiroide, sendo eles que desempenham um papel fundamental na patogênese da tiroidite de Hashimoto<sup>14</sup>.

Outro achado relevante é a associação do HT sobre o metabolismo da glicose e o desenvolvimento de resistência à insulina. Estudos apontam que no hipotireoidismo a resistência periférica dos tecidos à insulina é prevalentemente esperada<sup>15</sup>.

Sobre o hipotireoidismo subclínico a prevalência é especialmente mais alta em indivíduos caucasianos, mulheres, idosos e em populações com alta ingestão de iodo. As causas do hipotireoidismo primário subclínico se assemelham com as do hipotireoidismo primário clínico. O debate ainda é amplo sobre o melhor manejo nos casos de hipotireoidismo subclínico, e se deve ser tratado com reposição endógena de Levotiroxina (L-T4) ou não. Estudos clínicos randomizados sobre o efeito da reposição de L-T4 no hipotireoidismo subclínico não conseguiram demonstrar evidências consistentes na redução da morbidade cardiovascular, melhor qualidade de vida ou melhora nos sintomas nos grupos tratados<sup>16</sup>.

No manejo das disfunções tiroidianas, a dosagem do TSH é ainda o melhor método para a triagem das disfunções tiroidianas, bem como para o monitoramento dos pacientes em tratamento do hipotireoidismo. O TSH alterado, não é necessariamente característica de doenças tiroidianas, podendo ser causado por outras condições clínicas. A dosagem do T4 livre é fundamental na investigação de doença hipotálamo-hipofisária, sendo útil para a avaliação da resposta à Levotiroxina no início do tratamento. Anormalidades do T3 e T4 são relacionadas a alterações das proteínas transportadoras e não necessariamente são associadas a uma disfunção tiroidiana real. Na prática clínica não é necessário a dosagem do T3

como rotina para diagnóstico ou acompanhamento do paciente com hipotireoidismo. A dosagem dos anticorpos antitiroídianos (Anticorpo Anti-Tireoperoxidase - TPOAb e Anticorpo Anti-Tiroglobulina – TgAb) auxilia na definição etiológica da tireoidite autoimune. O TPOAb é o anticorpo mais prevalente e sensível, tendo muita utilidade em avaliar o risco de tireoidite pós parto<sup>17</sup>.

Devido a uma grande heterogeneidade dos tecidos, o TSH secretado pode não refletir o que acontece efetivamente no metabolismo dos tecidos alvos, sendo assim, ele pode não ser um bom indicador de eutireoidismo para alguns tecidos periféricos<sup>18</sup>.

## **1.2 Repercussões clínicas da deficiência do HT**

De forma mais abrangente os sintomas e sinais mais frequentes no hipotireoidismo clínico são: bradicardia, pele grossa e seca, letargia, fala lenta, fraqueza, adinamia, diminuição da sudorese, pele fria, edema palpebral, intolerância ao frio, macroglossia, edema facial, *mixedema*, cabelo seco e sem brilho, aumento da área cardíaca (notável apenas na imagem radiológica), palidez da pele, perturbações da memória, constipação, ganho de peso, perda de cabelo, dispneia, rouquidão, anorexia, nervosismo, menorragia, surdez, palpitações, abafamento de bulhas cardíacas, dor precordial, baixa acuidade visual entre muitos outros, sendo infelizmente a maioria inespecíficas<sup>11</sup>.

O coração é particularmente vulnerável a diminuição sérica do T3, sendo esse hormônio essencial para a morfologia e bom desempenho cardíaco na vida adulta<sup>19</sup>. A relação do HT e o sistema cardiovascular é algo extremamente estabelecido, sendo que uma disfunção tireoidiana pode levar o indivíduo ao um risco elevado de desenvolver insuficiência cardíaca<sup>20; 21; 22</sup>. Necessariamente os médicos precisam examinar os resultados dos exames da função tireoidiana como uma variável contínua de modo semelhante aos fatores de riscos coronarianos atualmente aceitos, tais como elevação da glicemia, pressão arterial e colesteróis<sup>23</sup>.

Nas repercussões para o sistema nervoso, o hipotireoidismo é uma causa frequente de alteração do humor, da cognição e da memória, sendo uma causa reversível em idosos<sup>24; 25</sup>.

Nos estudos relacionados ao metabolismo ósseo, as ações do T3 são complexas e ainda parcialmente compreendidas. Sabe-se que o T3 estimulam vias diretas e indiretas do ciclo da remodelação óssea, reabsorção, formação, proliferação de osteoclastos, diferenciação celular, apoptose, aumenta a expressão de osteocalcina, colágeno tipo 1, fosfatase alcalina e metaloproteínas. Além disso, o T3 atua de forma sinérgica com os hormônios osteoclastogênicos como o hormônio da paratiroide (PTH) e vitamina D. Há forte interação dos HT nos receptores tiroidianos  $\alpha 1$  (TR $\alpha 1$ ) ósseos e alterações nessa interação podem significar problemas neste metabolismo<sup>26</sup>. O HT influencia diretamente a homeostase e remodelação óssea. Alguns estudos observacionais encontraram um aumento de fratura óssea em pessoas com hipotireoidismo. Um estudo prospectivo de coorte de 3567 idosos encontrou um risco aumentado de fratura de quadril em homens com hipotireoidismo subclínico e uma tendência semelhante nas mulheres<sup>27</sup>.

Em idosos as disfunções tiroidianas são amplamente prevalentes, especialmente associadas a outras morbidades mal tratadas ou não diagnosticadas. Além disso, os sinais e sintomas de disfunções tiroidianas são mais sutis ou ausentes em idosos, tornando o diagnóstico mais difícil. Os riscos associados ao hipotireoidismo em idosos são; cardiovasculares (fibrilação atrial, insuficiência cardíaca etc.), osteoporose, oftalmopatias, deficiência cognitiva, nódulos benignos ou malignos na tireoide<sup>28</sup>. Não há dúvidas sobre o tratamento com reposição por L-T4 em pacientes idosos diagnosticados com hipotireoidismo, porém o mesmo não é ainda conclusivo nesses mesmos pacientes quando em hipotireoidismo subclínico<sup>29</sup>.

O rim desempenha um importante papel na depuração do iodo, TSH e TRH. O HT influencia diretamente a expressão e atividade dos canais iônicos celulares e transportadores. Exemplos dessas alterações (desequilíbrio eletrolítico) são clinicamente visto em pacientes hipotireoidianos. Estudos com modelos animais demonstraram que no hipotireoidismo existe uma diminuição na capacidade renal de diluir a urina devido a não libertação osmótica da arginina vasopressina, um aumento da excreção do sódio, caracterizados pela redução da reabsorção de sódio dos segmentos distais e proximais dos túbulos renais. Muitos relatos de casos documentam o aumento dos níveis séricos de creatinina no hipotireoidismo<sup>30</sup>.

Alterações oftalmológicas também são percebidas no hipotireoidismo, mas são extremamente raras<sup>31</sup>.

Na infância, o hipotireoidismo primário tem como causa mais comum a tireoidite crônica de Hashimoto. Normalmente nessa fase ela acaba sendo assintomática, e as principais razões para o encaminhamento médico são os bóciós<sup>32</sup>. A fase mais comum para manifestação da doença é a adolescência. Não se sabe precisamente o gatilho para o desenvolvimento da doença, mas o uso de drogas como lítio, amiodarona, *interferon alfa*, hormônios (estrogênios), substâncias alimentares (iodo, selênio), estresse, tabagismo e recentemente toxinas ambientais, são fatores consideráveis no surgimento da doença nessa faixa etária<sup>33</sup>. Outra forma também observada na população infantil e adolescente é o hipotireoidismo subclínico cuja prevalência é da ordem de 2%, caracterizado pelas mesmas condições hormonais básicas nos adultos; TSH sérico elevado, e níveis séricos de T4 livre normais. A decisão do tratamento do hipotireoidismo subclínico em crianças e adolescentes deve-se levar em conta tanto o risco de desenvolvimento de hipotireoidismo e as possíveis consequências já descritas em adultos como doenças cardiovasculares, depressão, dislipidemia entre outros<sup>34</sup>.

Em recém-nascidos a disgenesia da tireoide é a causa mais comum no hipotireoidismo congênito (HC). Ele pode assumir várias formas, muitas vezes o tecido tireoideo encontra-se ectópico frequentemente na base da língua, ou alguns pacientes apresentam atireose ou hipoplasia da glândula tireoide. De 30 a 40% dos casos de HC a glândula tireoide é anatomicamente perfeita. Defeitos na síntese do HT, desenvolvimento de bócio, resistência ao TSH, normalmente são associadas a mutações genéticas hereditárias autossômicas recessivas<sup>35</sup>. A prevalência de nascidos vivos com HC é de 1:2000 a 1:4000 em países com boa suficiência iódica. No Brasil a prevalência aproximada é de 1:2595 a 1:4795<sup>36</sup>. A triagem neonatal para hipotireoidismo congênito é de essencial importância. Atualmente com desenvolvimento de ensaios sensíveis que medem os níveis no soro de T4 e TSH nos recém-nascidos a partir de uma mancha de sangue em papel filtro, favorece o diagnóstico precoce da doença, conseqüentemente o tratamento, afastando assim as crianças do retardo mental. Antes de 1972, infelizmente a detecção clínica por sinais e sintomas era a única forma de diagnóstico do HC, o que acarretou em grande número de crianças permanentemente lesionadas neurologicamente. Atualmente a triagem neonatal para hipotireoidismo congênito é uma ferramenta aceita no contexto dos cuidados primários de saúde para crianças, e em apenas



duas semanas o diagnóstico e o tratamento se necessário é iniciado<sup>37</sup>. Atualmente não há forma de distinguir crianças com hipotireoidismo leve ou transitório dos com hipotireoidismo verdadeiramente congênito, portanto a necessária reavaliação da função tireoidiana no início da vida é de suma importância, normalmente aos 3, 4, 7, 8 anos de idade<sup>35</sup>.

Nas mulheres o HT está envolvido no controle do ciclo menstrual, bem como na fertilidade, e o T3 possui ação específica sobre os ovócitos e sua deficiência pode afetar todos os aspectos da reprodução<sup>38</sup>. A doença tireoidiana é o segundo distúrbio endócrino mais comum entre as mulheres em idade reprodutiva. Normalmente quando não tratada durante a gestação, aumentam significativamente os riscos de aborto espontâneo, descolamento prematuro da placenta, pré-eclâmpsia e restrição do crescimento fetal. Tireoidite é a forma mais comum de disfunção da tireoide pós-parto<sup>39</sup>. A presença de anticorpos anti-tireoglobulina (anti TG) e anti-peroxidase (anti TPO) são comuns em mulheres em idade fértil, associado com a função anormal da tireoide, e mais prevalente em mulheres idosas. O aumento da produção dos HT durante a gravidez exige também o aumento na ingestão de Iodo<sup>40</sup>. Hipotireoidismo subclínico em gestantes não é uma condição plenamente definida, mas sim uma desordem entre a normalidade e a fisiopatologia. A disponibilidade do HT principalmente nas primeiras semanas de gravidez é essencial para o desenvolvimento embrionário<sup>41</sup>.

### **1.3 Tratamento com reposição hormonal no hipotireoidismo**

L-T4 é o tratamento de escolha para o hipotireoidismo. Em média tem uma meia vida de 7 dias e inicialmente sua dosagem segura pode variar entre 1,5mcg Kg/dia a 1,6mcg Kg/dia em pacientes sem significativas comorbidades, ou tradicionalmente começando com uma dosagem pequena e gradualmente aumentando a titulação até a dose calculada ideal. As exceções são idosos com conhecida doença isquêmica do coração. Convencionalmente os pacientes hipotireoidianos tomam a levotiroxina pela manhã meia hora antes do café com o estômago vazio a fim de evitar o comprometimento da absorção do fármaco pelos alimentos, muito embora estudos recentes tenham demonstrado melhor eficiência do

controle bioquímico do TSH com a administração noturna da L-T4, no entanto também sugerem uma estratégia alternativa aos pacientes que tem dificuldades de tomar o hormônio pela manhã com o estômago vazio<sup>42</sup>. A proteína que transporta o HT no plasma é a globulina de ligação de tiroxina (TBG) responsável por cerca de 80% do transporte plasmático, a albumina e prealbumina. Em particular alguns alimentos podem influenciar na redução da absorção da levotiroxina; fibras alimentares, uvas, soja, café e mamão. O uso de antiácidos ou sulfato ferroso também reduz a absorção intestinal do hormônio<sup>43</sup>. A reposição na infância e adolescência obedece tipicamente as seguintes doses: 4mcg/Kg/dia a 6mcg/Kg/dia para crianças de 1 a 5 anos; 3mcg/Kg/dia a 4 mcg/Kg/dia para crianças de 6 a 10 anos; 2mcg/Kg/dia à 3 mcg/Kg/dia para 11 anos ou mais velhos<sup>33</sup>. A levotiroxina continua permanecendo como o padrão de cuidados para o tratamento do hipotireoidismo<sup>44; 45</sup>.

#### **1.4 Fisiologia molecular**

O TSH é uma glicoproteína heterodimérica, com massa molecular de 28 kDa composta por duas subunidades designadas alfa e beta, embora a subunidade alfa também é comum nos hormônios luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH) e coriônico humano gonadotrofina (HCG), e sua síntese na hipófise é estimulada pela ação do TRH. No passado os ensaios para determinação de TSH sérico se caracterizavam pela baixa sensibilidade e especificidade, e sua principal desvantagem era a reatividade com outros hormônios glicoproteicos de estrutura semelhante ao TSH como o FSH, LH e HCG. Atualmente os métodos aplicados na determinação do TSH são muito mais sensíveis e específicos, devido à utilização de dois anticorpos monoclonais que identificam dois epítomos diferentes da molécula do TSH, eliminando de vez a reatividade cruzada com outros hormônios<sup>8</sup>. Alguns indivíduos podem desenvolver anticorpos contra a molécula de TSH<sup>46</sup>. A produção do HT pela tireoide é regulada principalmente pelo hormônio TSH via ligação em receptores de TSH (TSHR) nos tirócitos foliculares. Essa ativação TSHR, estimula uma ampla variedade de processos envolvidos nas sínteses dos HT, resultando na produção e liberação do T3 e T4. Em pessoas saudáveis

aproximadamente 20% da produção tireoidiana é composta de T3, sendo os 80% desse hormônio ativo é realizado de forma extra tireoidiana por ação das enzimas desiodases iodotironinas. Quando secretados na corrente sanguínea o HT é ligado às proteínas plasmáticas tireoglobulina e albumina. Nas células dos tecidos alvos, o T3 deve se ligar aos receptores de triiodotironina (TR), que são membros da família de receptores nucleares e sua estrutura proteica consiste de diferentes domínios, ou seja, da ativação da função N-terminal função 1 (AF1), domínio de ligação a molécula de DNA, região de dobradiça e domínio C-terminal função 2 (AF2).

Os TR são codificados por dois genes; *TRH $\alpha$*  e *TRH $\beta$*  genes. Devido ao *splicing* alternativo e uso alternativo do promotor, o gene *TRH $\alpha$*  pode dar origem a seis isoformas; TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2, TRD $\alpha$ 1, TRD $\alpha$ 2, P46 e P28. O gene *TRH $\beta$*  também pode produzir isoformas via uso de promotor alternativo, sendo elas; TR $\beta$ 1, TR $\beta$ 2 e TRH $\beta$ . Apenas os TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1, TR $\beta$ 2 são receptores efetivamente úteis na ligação de um domínio ao DNA, realizando assim a modulação da transcrição gênica. A função das outras isoformas de receptores ainda são desconhecidas. Sabe-se que o T3 tem maior afinidade aos receptores TR $\alpha$ 1 do que no TR $\beta$ 1. A conexão do domínio do receptor com a ligação ao DNA modula a transcrição de sequências específicas, conhecida como elementos de resposta ao hormônio tireoidiano (TRE). Os TR podem vincular para um TRE como monómeros, homodímeros ou heterodímeros. As mutações nos TR dão origem a uma variedade de sintomas clínicos dependendo do TR defeituoso. A resistência do hormônio tireoidiano é uma síndrome em que os níveis de HT estão aumentados sem supressão adequada do TSH. As causas mais comuns de mutações são por heterozigose no gene *TRH $\beta$* , afetando principalmente o domínio de ligação<sup>47</sup>. O HT regula as funções celulares por dois mecanismos distintos, genômicos (nucleares) e não genômicos (não nucleares), embora a maioria dos efeitos do HT seja genômicos. Embora o T3 exerça primordial ação genômica, uma quantidade crescente de evidências mostra que seu efeito é iniciado fora do núcleo envolvendo diferentes vias de transdução de sinalizações<sup>48</sup>.

O acesso que as células têm ao T3 é basicamente controlado por dois mecanismos; 1 - transporte ativo para dentro das células; 2 - conversão enzimática do T4 em T3 pelas desiodases. Essa conversão resulta na principal fonte de T3 nos seres humanos e correspondem cerca de 80% da produção, e o restante (20% que

não sofreram ação das desiodases) é produzido diretamente pela tiroide<sup>49</sup>. A entrada celular do HT em muitos tecidos como o cérebro é dependente de proteínas específicas de membrana como, por exemplo, o monocarboxilato transportador 8 (MCT8). Esses transportadores também regulam de forma crítica o efluxo do HT da glândula tireoide.

Outra ação primordial na regulação do HT acontece pelas enzimas da família desiodases iodotironina intracelulares (DIO) cuja função é converter o pro hormônio T4 na forma ativa T3, que se classificam em desiodases tipo 1 (DIO1) do tecido hepático e renal, desiodases tipo 2 (DIO2) que atuam na hipófise, hipotálamo, cérebro, tecido adiposo marrom, cóclea, osso e músculos esqueléticos desempenhando um papel central na regulação do feedback negativo do eixo HHT. Nessa família de enzimas também existem as desiodases tipo 3 (DIO3) normalmente presentes no sistema nervoso central, placenta, pele e tecido fetal, que converte o T4 em T3 reverso (rT3) e T3 em 3,3'-diiodo-L-tironina (T2) limitando assim a ação do HT<sup>50</sup>. As DIO2 atuam removendo um átomo de iodo do anel exterior favorecendo a conversão da tetraiodotironina (T4 ou tiroxina) em triiodotironina (T3 forma ativa). A DIO1 catalisa a remoção dos átomos de iodo tanto do anel interno como externo formando T3 ou T2 dependendo do substrato. A DIO3 promove a inativação do T4 em T3 reverso ou T3 em T2 ambos pela deionização no anel interno da molécula. Podemos definir a DIO3 como principal inativador do HT. As desiodases são selenioproteínas, sendo assim susceptível a deficiência de selênio. Todas as desiodases são proteínas ancoradas as membranas celulares com peso de 29 – 33kDa. Atualmente, há evidências convincentes de que o controle do HT realizados pelas desiodases reflete significativamente na fisiologia dos diferentes órgãos e tecidos, garantindo ou não os efeitos do hormônio T3 de forma adequada em todas as fases da vida<sup>51; 52</sup>.

Outra estrutura essencial para atuação do HT são os transportadores de membrana. O MCT8 é um transportador de membrana altamente específico para os HT especialmente no cérebro. O MCT8 está presente nos neurônios e é importantíssimo para captação do T3 convertido a partir do T4. Os neurônios são os principais alvos dos HT no desenvolvimento do cérebro, e mutações no gene *MCT8* podem causar privação do T3 nas células nervosas e assim acarretar um desajuste psicomotor entre outros de origem neurológica. Estudos clínicos mostraram que

mutação do gene *MCT8* causou atraso da mielinização neural em recém-nascidos. O gene *MCT8* é constituído de 6 exons e localiza-se na região do cromossomo X (Xq13.2) codificando uma proteína de 539 a 613 aminoácidos<sup>53; 54; 55</sup>. O *MCT8* é expresso em muitos tecidos, tais como fígado, rim, coração, cérebro, osso, placenta, pulmão e músculo esquelético<sup>56; 57</sup>. O *MCT10* também é um transportador de membrana, e tem a mesma estrutura que o *MCT8*, sua expressão está presente em diversos tecidos especialmente intestino, fígado, músculo esquelético, coração e placenta. Ele é um excelente transportador tanto de influxo como efluxo de aminoácidos aromáticos<sup>58</sup>. O transportador aminoácido permeasse tipo T 1 (*LAT1*) carrega tanto T3 como T4, e os polipeptídios co-transportadores de ânions orgânicos independentes de sódio *1C1* (*OATP1C1*) carregam somente T4<sup>51</sup>.

## **1.5 Medicina personalizada**

Desde os estudos iniciais do DNA (ácido desoxirribonucleico) em 1953, muitos conceitos biológicos sobre o genoma como a transcrição, tradução, código genético, modificações epigenéticas, foram estabelecidas e desenvolvidas através de várias técnicas experimentais da pesquisa<sup>59</sup>. O desenvolvimento de tecnologias para análise genética tais como termocicladores, PCR-RT (reação da cadeia de polimerase em tempo real), sequenciadores de última geração, genotipagens combinado com uma acelerada otimização tecnológica computacional na área da bioinformática, demonstrou-se ser importante ferramenta na prática clínica médica. Esses estudos levaram as descobertas de novas variantes associadas a mutações genéticas responsáveis por doenças raras entre outras. A caracterização genética do indivíduo permite o estabelecimento de intervenções personalizadas. Um exemplo atual é a farmacogenética, exames específicos de interação genética e posteriores vias metabólicas, com a droga pesquisada. Drogas que para pessoas exercem um ótimo resultado, para outras nem tanto graças a essas variabilidades genéticas<sup>60</sup>. Para muitos pesquisadores a prática médica denominada de medicina personalizada, através da análise gênica de cada indivíduo vem sendo considerada como uma revolução que poderia transformar os cuidados de saúde das populações<sup>61</sup>. Outra vertente que atualmente vem sendo implantada nesse conceito

de medicina personalizada é a medicina de precisão, que é um modelo médico emergente e sugere ser uma grande promessa na melhora, profilaxia, diagnóstico e tratamento de muitas doenças. A medicina de precisão integra uma grande análise de bases de dados, incluindo genealogias familiares, história de doenças, sensibilidade de drogas e dados genômicos<sup>62</sup>.

A abordagem diagnóstica das doenças endócrinas tendo sido realizada tradicionalmente por achados físicos, exames laboratoriais ou exames de imagens. Com o avanço das técnicas da biologia molecular, o papel do diagnóstico genético tem assumido maior importância na endocrinologia. Hoje ao invés de se analisar todos os genes, analisam-se genes candidatos à determinada doença, facilitando a interpretação de uma determinada via celular<sup>63</sup>. Um exemplo já amplamente aceito e introduzido na prática médica são os exames moleculares que identificam mutações específicas para os cânceres, como biomarcadores com valores prognósticos e preditivos que melhoraram muito a individualização das terapias<sup>64</sup>. No contexto da análise molecular aos distúrbios da tireoide, atualmente os esforços vem sendo empenhados na identificação e análise dos polimorfismos interferentes na produção das desidases<sup>65</sup>.

A medicina personalizada de última geração sugere a terapêutica por modulações de RNA (ácido ribonucleico). Várias moléculas de RNA podem inibir ou aumentar a expressão de qualquer mRNA (ácido ribonucleico mensageiro), como caminho para manipular o destino de células e tecidos doentes<sup>66</sup>.

A identificação genômica de cada indivíduo é a base de um teste molecular, seja ele realizado através que qual for à metodologia, *Sanger* ou sequenciamento de última geração (NGS). Em qualquer método o contexto e algoritmos de bioinformática serão utilizados para transformar e analisar os dados brutos gerados a partir dos equipamentos em valores para que possam ser avaliados e interpretados<sup>67</sup>.

A medicina está prestes a rever inteiramente a metodologia diagnóstica com os testes moleculares<sup>63</sup>.

## 1.6 Diagnóstico molecular

Os avanços na biologia molecular revelam que pelo menos 87,3% do genoma humano é ativamente transcrito e que <3% desse transcrito efetivamente codifica proteínas. Esta conclusão de certa forma é até inesperada, e sugere que a maior parte do transcriptoma é constituída por RNA não codificante<sup>68</sup>.

Atualmente os diagnósticos moleculares específicos para as doenças tiroidianas em sua maioria são realizados para os carcinomas de tireoide. Tradicionalmente, o método diagnóstico padrão ouro é principalmente realizado pelo perfil citológico do tecido tiroidiano por PAAF (punção aspirativa por agulha fina). No entanto, 30% das biópsias pré-operatórias são inconclusivas. Aí entra o fundamental papel do diagnóstico molecular, levantando a necessidade de biomarcadores moleculares para evitar cirurgias desnecessárias entre tantos outros procedimentos. O papel dos marcadores moleculares vem sendo proposto para prever o risco de malignidade, e em paralelo com a citologia aspirativa podem fazer a diferença na tomada de decisões<sup>69; 70</sup>.

Pelos estudos no âmbito da biologia molecular foram revelados que a comunicação intercelular não é realizada apenas pelas vias clássicas já conhecidas como citocinas, fatores de crescimento, neurotransmissores ou hormônios em geral, mas principalmente através da troca de pequenas moléculas de RNA. Estas moléculas são organizadas em exossomos, que são constituídos de proteínas, mRNA e miRNA (micro ácido ribonucleico), os quais podem ser utilizados como estratégia diagnóstica não invasiva com potencial de avaliar o funcionamento dos tecidos<sup>71; 72</sup>.

## 1.7 Transcriptoma

O transcriptoma é o conjunto total de transcritos em uma célula, e sua expressão reflete especificamente uma condição fisiológica, facilitando a compreensão dos constituintes moleculares de uma célula e tecido, bem como, conseguimos por ele entender o desenvolvimento de doenças. Os principais objetivos do transcriptoma são; catalogar todas as sequencias de transcritos, determinar as estruturas das transcrições de genes, avaliar modificações pós transcricionais e quantificar as alterações dos níveis de cada expressão de transcritos sob diferentes condições<sup>73</sup>. O transcriptoma engloba o sequenciamento de todos os tipos de moléculas de RNA, exemplo; miRNA, mRNA, RNA codificantes e não codificantes e também as formas de splicing alternativos poliadenilados. Juntos na análise eles refletem genes que estão ativamente expressos em um tecido em particular<sup>74</sup>.

O RNA-seq (sequenciamento de ácido ribonucleico) atualmente é realizado por tecnologias denominadas de NGS (sequenciamento de última geração) e realiza todo perfil dos transcritos de forma maciça. Por esse método as moléculas de interesse de RNAs são convertidas em cDNA (ácido desoxirribonucleico complementar) ligados a adaptadores e sequenciado de forma paralela, gerando sequências de DNA (aproximadamente de 35 a 100 pares de bases)<sup>73</sup>. As sequências de nucleotídeos (genericamente chamados) são mapeadas para um genoma de referência ou montado para gerar um novo transcriptoma. Lendo o mapa de um genoma de referência podemos avaliar e explorar a atividade de transcrição em todo genoma ou quantificar o nível de expressão de cada transcrito. Em comparação com as técnicas de *microarrays* ou sequenciamento *Sanger* o RNA-seq tem muitas vantagens, entre elas, maior sensibilidade, o que faz com que necessitemos de uma pequena quantidade de RNAs, baixa possibilidade de falsos positivos provenientes de hibridização cruzada, permite uma gama ilimitada de expressão dinâmica (sem saturação de sinal) além da possibilidade de processar várias amostras em tecnologias de alto rendimento (as amostras podem ser multiplexadas e sequenciadas em paralelos)<sup>75; 76; 77</sup>.



## 1.8 Sequenciamento de última geração (NGS)

O primeiro sequenciamento completo do genoma humano demorou 12 anos para ser concluído a um custo de quase US \$ 3 milhões de euros<sup>78</sup>. O esforço envolveu centenas de pesquisadores do mundo inteiro, com a única plataforma disponível na época para sequenciamento, o *Sanger* de primeira geração<sup>79</sup>. O término desse projeto ambicioso aconteceu em 2002. E de lá pra cá o desenvolvimento de novas plataformas de sequenciamento se tornaram totalmente necessárias, e sua evolução foi vertiginosa<sup>80</sup>. Desde a década de 1990, a matriz de micro arranjos de DNA tem sido a tecnologia de escolha para estudos em larga escala em níveis de expressão de genes<sup>81</sup>. A capacidade dessas matrizes em analisar simultaneamente milhares de transcrições levou a significativos avanços das amplas variedades de questões e problemas biológicos incluindo expressão gênica entre indivíduos saudáveis e doentes, respostas farmacogenômicas etc<sup>82; 83</sup>. No entanto a tecnologia dessa matriz possui muitas limitações entre elas; os níveis de hibridização de fundo compromete a precisão das medições da expressão, especialmente aos transcritos com baixa quantidade<sup>84; 85</sup>. Além disso, as sondas diferem consideravelmente nas suas propriedades de hibridização<sup>73; 86</sup>.

Durante os últimos anos a tecnologia utilizada para análise de expressão gênica mudou drasticamente. Os velhos *microarrays* vêm sendo substituídos por plataformas NGS, popularmente apelidadas de canivete suíço da análise gênica devido ao seu alto rendimento. O único aspecto negativo sobre a tendência NGS é a análise e interpretação dos resultados, pois pode ser extremamente morosa e dependente de uma alta tecnologia computacional normalmente não encontrado em laboratórios de biologia molecular. A alternativa de informatização dos dados em nuvens vem sendo a solução para resolver estes problemas<sup>87</sup>.

A investigação clínica por NGS fornece uma alta sensibilidade em uma plataforma de alto rendimento e baixo custo para a realização de análises genéticas de contexto clínico<sup>88; 89</sup>. Os custos de sequenciamento NGS despencaram nos últimos anos, ultrapassando o tradicional valor de referência para a diminuição dos custos de tecnologia conhecida como Lei de *Moore*. Todo sequenciamento do genoma e análise agora estão dentro das possibilidades dos custos dos exames médicos<sup>90</sup>. Centros de sequenciamento, como o *New York Genome Center*, *Broad*

*Institute* e o *Beijing Genomics Institute* são capazes de gerar *pentabytes* de dados de sequenciamento de forma rotineira<sup>91; 92</sup>. De acordo com *National Human Genome Research Institute*, os dados dos custos estimados de sequenciamentos até o ano de 2015 estão demonstrados nos gráficos de evolução de custos, figuras 4 e 5<sup>93</sup>.

Atualmente, muitas plataformas NGS estão comercialmente disponíveis para o sequenciamento de qualquer região genômica de interesse, ou genomas inteiros, para avaliar qualquer alteração incluindo mutações pontuais, inserções, deleções<sup>94</sup>. Cada tecnologia de sequenciamento possui metodologias diferentes, mas basicamente podemos identificar etapas comuns entre todas as plataformas como, por exemplo, o preparo da amostra, amplificação das bibliotecas e o sequenciamento<sup>95</sup>.

O *Ion Proton System* da *Thermo Fisher Scientific*, é uma plataforma NGS, que tem demonstrado excelentes resultados na formação de painéis de genes, com alta produtividade e desempenho<sup>96</sup>. O preparo da amostra nas plataformas NSG *Ion Proton System* segue basicamente o protocolo onde primeiramente o DNA é fragmentado por processos químicos, mecânicos ou enzimáticos. Individualmente cada fragmento é chamado de *template*. Independente do método de fragmentação, o objetivo primordial é que ele quebre o DNA de forma aleatória, de forma tal que todo genoma seja coberto uniformemente<sup>97</sup>. Após o processo de fragmentação, adaptadores que são sequências artificiais construídas e conhecidas, são conectados ao *template*. Podemos então misturar diferentes amostras em uma mesma reação de sequenciamento graças ao uso desses adaptadores, e após o termino do processo elas são separadas e identificadas individualmente no processo da análise da bioinformática<sup>98</sup>.

A próxima fase corresponde a amplificação das bibliotecas, onde se realiza milhares de cópias dos fragmentos para otimizar o sinal luminoso para a maioria dos sequenciadores, no caso o *Ion Proton System* melhorar o sinal iônico que será detectado no chip do sequenciador. Esse Processo de amplificação foi especialmente desenvolvido em uma PCR (reação da cadeia de polimerase) de emulsão. Na PCR emulsão são criados milhões de micro reatores em uma emulsão de óleo. Os reatores contêm todos os reagentes necessários para realização da PCR, e também pequenas esferas chamadas de beads cobertas com sequencia

complementar ao adaptador. Esses fragmentos têm a função de ligar os clones dos templates nas esferas juntamente com o primer da reação de PCR<sup>99; 100; 101</sup>. E por fim o sequenciamento propriamente dito. No NGS em especial a plataforma *Ion Proton System*, a leitura dos nucleotídeos acontece de forma diferente das demais plataformas. A reação de polimerização gera espontaneamente um íon H<sup>+</sup>, ou seja, um próton, e esse íon inevitavelmente irá alterar o pH do meio. Essa variação do pH é detectada por um transistor ISFET (transistor íon sensível de efeito de campo) que se encontra no chip de leitura das amostras, e é convertida em um sinal elétrico ao equipamento identificando assim qual base foi reconhecida, e armazenada a informação gerando arquivos de dados em formatos FASTA ou FASTAQ, BAM, SAM, VCF etc. para posterior análise na bioinformática<sup>102; 103</sup>.

Definitivamente, o NGS revolucionou a pesquisa genética e oferece um enorme potencial para aplicação clínica<sup>104</sup>.

## **2.0 Justificativa**

O objetivo deste trabalho foi identificar o padrão de expressão gênica no sangue periférico de pacientes com hipotireoidismo e encontrar um gene ou um painel de genes capazes de diferenciar os indivíduos eutiroidianos de pacientes com hipotireoidismo primário. A correlação com os tecidos mais afetados com a ausência ou deficiência do HT (coração, cérebro, pulmão, rim e pele) poderá ser um importante indicador da disfunção destes órgãos e manejo de futuras intervenções terapêuticas.

### **3.0 Materiais e métodos**

#### **3.1 Seleção de indivíduos saudáveis e com hipotireoidismo primário**

No período de 1 ano e meio foram atendidos no ambulatório de endocrinologia da Universidade Nove de Julho 320 pacientes, dos quais 120 se enquadraram no perfil da pesquisa e se voluntariaram ao estudo, obedecendo os trâmites legais de pesquisa, como a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

O critério de inclusão da pesquisa para o grupo controle (Controle) obedeceu à análise de exames laboratoriais e clínicos, sendo que necessariamente o voluntário deveria ter a dosagem do TSH dentro dos limites de referência do método em pelo menos duas dosagens em período inferior a 60 dias, ser saudável e não fazer uso de nenhuma medicação.

A exclusão do grupo Controle aconteceu mediante a presença de qualquer alteração nas dosagens de 25OH vitamina D, PTH, glicemia, perfil lipídico ou qualquer comorbidade que pudesse gerar dúvida sobre a perfeita saúde do indivíduo.

O critério de inclusão da pesquisa para o grupo de hipotireoidianos primários (Hipotireoidismo), que nunca foram tratadas com L-T4, obedeceu à análise de exames laboratoriais e clínicos, sendo que necessariamente tinham que obter a dosagem do TSH em valores superiores a 10  $\mu\text{UI/mL}$  do método, em duas dosagens em período inferior a 60 dias e não possuir nenhuma comorbidade.

Todos os pacientes do grupo Hipotireoidismo apresentavam hipotireoidismo por tireoidite de *Hashimoto*.

Após uma análise do perfil clínico e laboratorial de cada voluntário (120 indivíduos) chegamos a definição dos melhores indivíduos que atendiam o objetivo da pesquisa para a realização do transcriptoma, sendo 4 para o grupo eutireoidianos e 4 para o grupo hipotireoidianos primários que nunca foram tratados com L-T4, concretizando o número (n) de 8 indivíduos.

### 3.2 Coleta e exames complementares

O procedimento de coleta seguiu as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso, 2009, 2ª Edição. A venopunção foi realizada com escalpe de segurança *push button* em agulha 25G (Calibre 5) e canhão (tubo de vinil) de 7 polegadas de comprimento. Na perfeita punção venosa, a colheita dos tubos seguia a seguinte ordem: 1º tubo para preservação do sangue total, contendo EDTA K2 (Tampa roxa), colhidos 4mL de sangue; 2º tubo para ativação de coágulo e obtenção do soro sanguíneo, contendo ativador de coágulo e gel separador (Tampa amarelo ouro), colhidos 5mL de sangue; 3º tubo para preservação das moléculas de RNA (*PAXgene blood RNA*), contendo 6,9mL de aditivo de preservação de RNA, colhidos 2,5mL de sangue, em aspiração a vácuo.

A utilização de escalpe obedeceu a instrução do fabricante (*Qiagen, NL, DE*), para que o tubo *PAXgene blood RNA* ficasse em posição vertical durante o procedimento, afim de evitar refluir o aditivo na veia puncionada. O tubo com sangue total após suave homogeneização foi armazenado imediatamente em temperatura refrigerada (2º à 8ºC) a fim de mantermos material para uma eventual análise molecular do DNA. O tubo para obtenção do soro sanguíneo foi submetido à centrifugação a 1500 RPM (rotações por minuto) por 15 minutos, separando pelo gel a fase sólida (células e coágulo) da líquida (soro) e armazenado em congelamento de -20ºC para posterior realização dos exames TSH, T4 Livre, Anti TG, Anti TPO. No tubo *PAXgene blood RNA* após a aspiração por vácuo de 2,5mL de sangue, acondicionávamos por 24 horas em temperatura ambiente (15ºC à 25ºC), para que, segundo o fabricante, houvesse a completa lise celular, otimizando assim o rendimento das moléculas de RNA ao final da extração, e após esse período, foi armazenado em congelamento a -20ºC, para realização do transcriptoma.

Os pacientes que atendiam aos critérios de inclusão da pesquisa e se voluntariam a participar do estudo, realizaram inicialmente a dosagem plasmática do hormônio estimulador da tireoide (TSH), dosagem plasmática do hormônio tiroxina (T4 Livre), dosagem plasmática dos anticorpos anti-tiroglobulina (Anti TG), dosagem plasmática dos anticorpos anti-peroxidase da tireoide (Anti TPO), e os melhores foram selecionados para a realização do transcriptoma.

### 3.3 Extração do RNA total

O RNA total foi obtido a partir do sangue periférico e extraído pelo *kit PAXgene blood RNA kit* (Qiagen, NL, DE) seguindo o protocolo do fabricante, conforme detalhado no o Anexo 1.

### 3.4 Análise bioquímica

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

1 - *Kit Roche Diagnostics* para dosagem de anticorpo dirigido contra a tiroglobulina (anticorpo anti-Tg) Referência: 6368697 190, resultados em UI/mL, detecção do *Kit*: 10.0-4000 UI/mL, valores teóricos normais: menor que 115 UI/mL

2 - *Kit Roche Diagnostics* para dosagem de anticorpos anti-peroxidase da tireoide Referência: 06368590 190, resultados em UI/mL, detecção do *Kit*: 5.00 - 600 UI/mL, valores teóricos normais: menor que 34 UI/mL.

3 - *Kit Roche Diagnostics* para dosagem do hormônio TSH, Referência: 11731459 122, resultados em  $\mu\text{UI/mL}$ , detecção do *Kit*: 0.005-100  $\mu\text{UI/mL}$ , valores teóricos normais: >20 anos 0.270-4.20  $\mu\text{UI/mL}$ .

4 - *Kit Roche Diagnostics* para dosagem do hormônio tiroxina livre T4, Referência: 06437281 190, valores em ng/dL, detecção do *Kit*: 0.3-100 pmol/L, factores de conversão das unidades:  $\text{pmol/L} \times 0.077688 = \text{ng/dL}$ ,  $\text{ng/dL} \times 12.872 = \text{pmol/L}$ , valores teóricos normais: 0.93 - 1.7 ng/dL.

### 3.5 Execução do transcriptoma

As bibliotecas do transcriptoma foram construídas pelo equipamento *Ion Proton System* (*Thermo Fisher Scientific*, MA, USA), através dos protocolos *Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Kit*. Todas as etapas: quantificação do RNA total, amplificação das sequências alvos, preparo das sequências iniciadoras, ligação dos adaptadores (*barcodes*) aos *amplicons*, purificação da biblioteca, quantificação da biblioteca (qPCR), realização da PCR emulsão, enriquecimento das bibliotecas com as esferas magnéticas (*beads*), calibração do sequenciador e preparo dos chips estão detalhadamente descritos no Anexo 2.

Toda biblioteca constituída nesse protocolo, como também as amostras extraídas de RNA total, estão armazenadas em nossa soroteca em *freezer* -80°C.

### 3.6 Análise de bioinformática

Os dados gerados pelo *Ion Proton System* são gravados em arquivos de extensão bam (*Binary Alignment Map*), e são armazenados por *upload* no servidor *online* do fabricante da plataforma NGS, em aproximadamente 6 horas para as 16 amostras corridas. Executamos o *download* dos dados e os arquivamos em plataformas locais de fácil acesso e em *hard disks* portáteis.

A análise dos dados foram realizadas pelo programa *RStudio* Versão 0.99.491, com o pacote adicional para análise de expressão diferencial gênica EDGER (Robinson, MD, and Smyth, GK (2008) disponibilizados pela *Bioconductor open source software for bioinformatics*<sup>105</sup>.

As conversões dos arquivos originalmente gerados na plataforma NGS tipo bam foram convertidos para formatos txt em *Linux* distribuição *Ubuntu*, versão 14.04 pelo *software Samtools* versão 1.2 pela ferramenta terminal.

Toda anotação dos dados genômicos foram obtidos através do banco de dados *GenBank* da *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) disponível no endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/gbench/>, GEO (*Gene Expression*



Omnibus) disponível no endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>, OMIM *Online Mendelian Inheritance in Man*, disponível no endereço: <http://www.omim.org/>.

### **3.7 Análise estatística**

Para o cálculo da correlação entre as variáveis contínuas foi utilizado o teste de *Spearman*. A análise estatística foi realizada em *software IBM SPSS Statistics* versão 23. Foi considerado significativo um  $p < 0,05$ .

## 4.0 Resultados

O grupo Controle (CTL) é constituído por 3 mulheres e 1 homem e o grupo Hipotireoidismo (HT) é constituído por 3 mulheres e 1 homem. Na tabela 1, visualizamos os dados descritivos dos grupos CTL e HT e os respectivos perfis bioquímicos.

Os dados das quantificações moleculares, RNA total extraído, *Barcodes*, qPCR, % de *beads* ligadas ao DNA e *Ion PI Chip* estão representados na tabela 2.

O valor mínimo de RNA extraído para iniciar o protocolo do transcriptoma é 10ng/μL. Valor mínimo de qPCR para continuar o protocolo de sequenciamento é de 100pM. O valor de *beads* ligadas ao DNA aceitável para executar o sequenciamento por *chip* é de 10 a 30%.

As análises iniciais revelaram que os indivíduos CTL1 e HT3 apresentam sugestivas repetições biológicas que indicam possíveis efeitos em lotes, visualizado no gráfico de superfície multidimensional (MDS), figura 1.

Na Tabela 3, temos os 21 transcritos diferencialmente expressos comparando os grupos HT e CTL, onde logFC (*Fold-change*), logCPM (contagens por milhão), *Pvalue* (valor de p) e FDR (*False Discovery rate*) .

Na tabela 4 temos a identificação gênica dos transcritos e suas respectivas localizações cromossômicas, tipo de RNA e produtos.

A figura 2, figura 3 apresenta os resultados das correlações dos genes diferencialmente expressos e os valores de TSH entre os grupos Controle e grupo Hipotireoidismo. Gráfico de pontos onde o eixo x representa o número de *reads* de cada gene, enquanto que o eixo y representa o nível de TSH. Os pontos pretos são a representação dos pacientes com hipotireoidismo e pontos brancos a representação dos controles.

Padrões estimados de expressão gênica relacionadas aos órgãos cérebro, coração, pulmão, rim e pele (UNIGene, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>) estão representados na tabela 6.

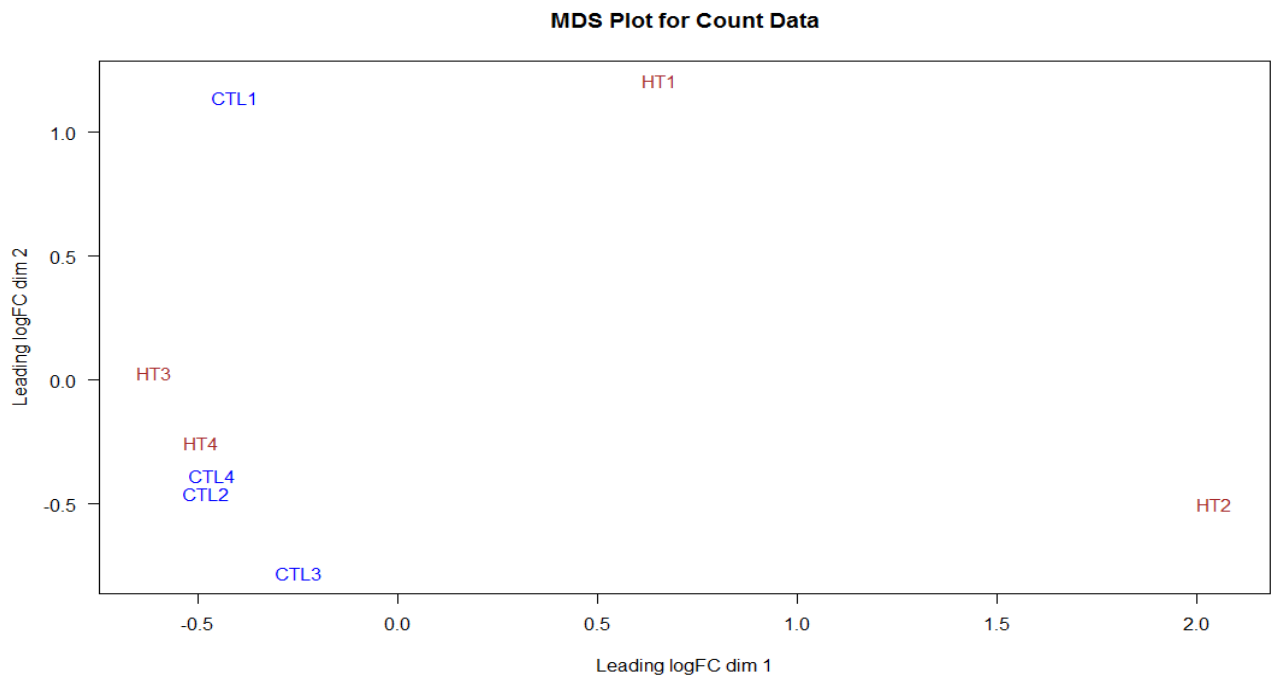
A forma de identificar esses genes e anotar suas características se fundamentou pela base de dados da NCBI e pelo comitê de nomenclatura de genes (HGNC – Disponível em: <http://www.genenames.org/>).

**Tabela 1** – Dados descritivos e bioquímicos.

<b>Grupo</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>TSH</b>	<b>T4 Livre</b>	<b>Anti TG</b>	<b>Anti TPO</b>	<b>PTH</b>
CTL1	F	40	2,97	1,24	10,2	32,41	44,92
CTL2	M	36	1,74	1,21	<10,0	<5,0	17,67
CLT3	F	36	1,34	1,33	<10,0	<5,0	57,79
CTL4	F	40	4,23	1,06	<10,0	13,61	57,65
HT1	F	38	64,52	0,36	668,4	27,17	40,55
HT2	M	34	>100,0	0,08	1195,0	514,6	46,25
HT3	F	52	58,65	0,46	<10,0	<5,0	59,02
HT4	F	51	>100,0	0,11	863,6	368,2	50,1

**Tabela 2** – Dados moleculares do transcriptoma.

<b>Grupo</b>	<b><i>Ion PI</i> Chip</b>	<b>RNA Total</b>	<b>Barcode</b>	<b>qPCR</b>	<b>Beads ligadas ao DNA</b>
CTL1	1	42,4ng/ $\mu$ L	26	9110pM	17%
CTL2	1	604,0ng/ $\mu$ L	33	2230pM	17%
CTL3	1	682,0ng/ $\mu$ L	34	750pM	17%
CTL4	1	882,0ng/ $\mu$ L	32	1350pM	17%
HT1	2	22,6ng/ $\mu$ L	25	1140pM	18%
HT2	2	13,9ng/ $\mu$ L	27	5830pM	18%
HT3	2	98,2ng/ $\mu$ L	36	790pM	18%
HT4	2	204,0ng/ $\mu$ L	35	2010pM	18%



**Figura 1** – Superfície multidimensional dos grupos CTL e HT.

**Tabela 3** - 21 transcritos diferencialmente expressos comparando os grupos HT e CTL.

<b>Transcritos</b>	<b>logFC</b>	<b>logCPM</b>	<b>Pvalue</b>	<b>FDR</b>
NM_024565	-2.50	5.018	2.26e-08	0.000291
NM_014214	-1.77	4.738	3.80e-07	0.001554
NM_005277	3.19	0.922	4.82e-07	0.001554
NM_022833	-2.23	3.381	4.88e-07	0.001554
NM_001174090	-3.00	0.849	6.02e-07	0.001554
NM_005514	-4.05	6.223	7.46e-07	0.001605
NM_004452	-3.44	0.472	1.81e-06	0.003344
NM_001040173	-2.22	3.848	2.31e-06	0.003722
NM_021965	-2.32	3.067	4.00e-06	0.005733
NM_014350	1.64	3.905	1.03e-05	0.013349
NM_002127	-2.23	3.620	1.22e-05	0.013667
NM_024624	1.72	4.744	1.27e-05	0.013667
NM_015571	1.69	4.163	2.50e-05	0.023475
NM_003489	2.24	5.127	2.55e-05	0.023475
NM_212502	-2.43	0.721	4.23e-05	0.036241
NR_028134	-2.05	2.709	4.83e-05	0.036241
NR_002989	1.54	4.276	4.93e-05	0.036241
NM_006190	1.79	3.921	5.06e-05	0.036241
NM_003004	-1.42	6.507	6.49e-05	0.044069
NM_005187	-1.48	5.719	6.98e-05	0.044998
NM_022173	1.58	5.383	7.98e-05	0.049047

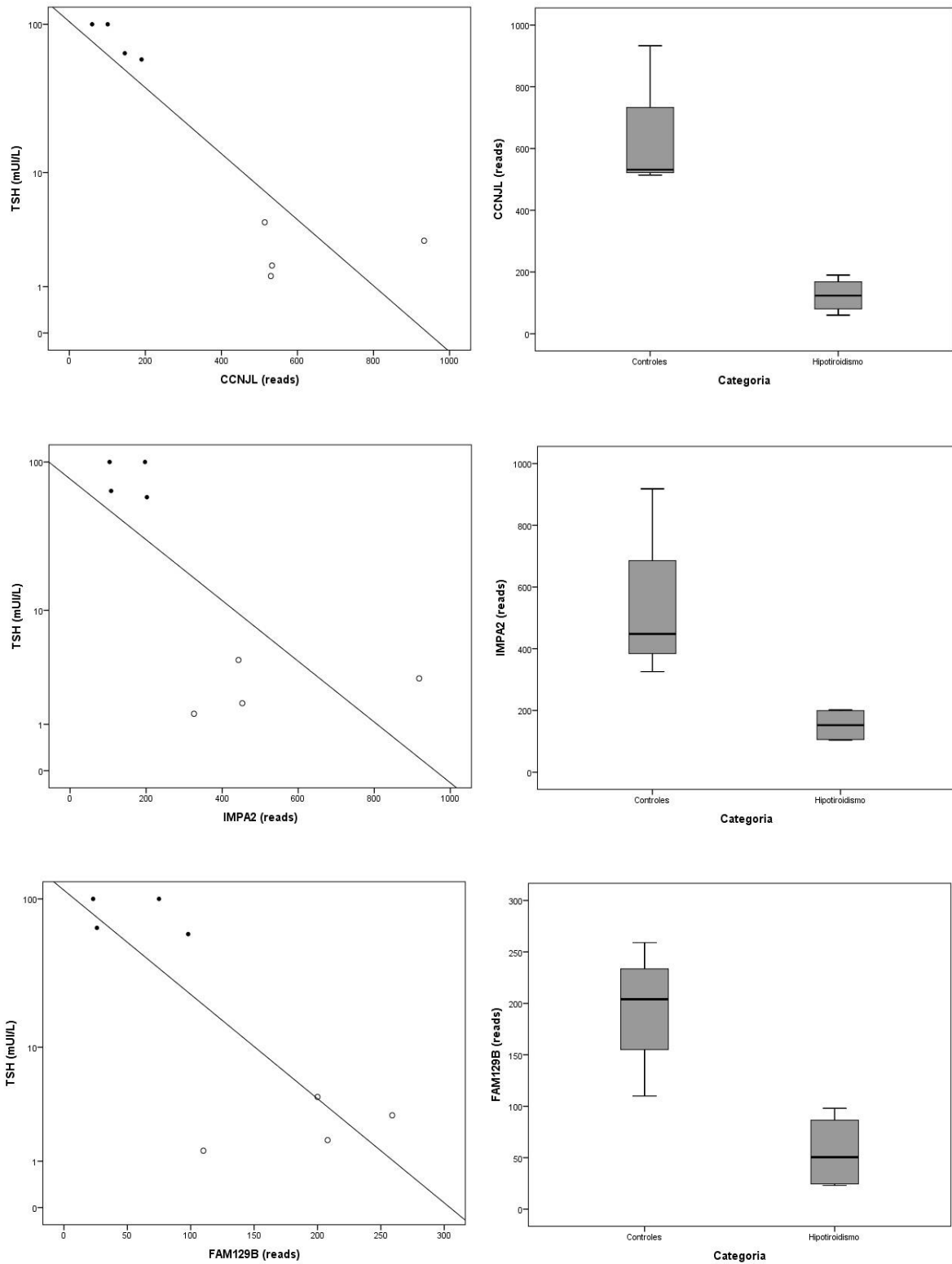
Transcrito	Tipo RNA	Gene	Cromossomo	Local	Molécula/Produto	Relação com o tecido
NM_024565	mRNA	CCNJL	5	5q33.3	<i>Cyclin-J-like protein isoform a</i>	Cérebro; pulmão; tireoide; coração; pele; rim.
NM_014214	mRNA	IMPA2	18	18p11.2	<i>Inositol monophosphatase 2</i>	Pulmão; cérebro; pele; rim; coração.
NM_005277	mRNA	GPM6A	4	4q34	<i>Neuronal membrane glycoprotein M6-a isoform 1</i>	Cérebro; rim; pulmão.
NM_022833	mRNA	FAM129B	9	9q34.13	<i>Niban-like protein 1 isoform 1</i>	Pulmão; pele; cérebro; tireoide; coração.
NM_001174090	mRNA	SLC4A11	20	20p12	<i>Sodium bicarbonate transporter-like protein 11 isoform 1</i>	Pele; cérebro; pulmão; rim.
NM_005514	mRNA	HLA-B	6	6p21.3	<i>Major histocompatibility complex, class I, B precursor</i>	Pulmão; cérebro; pele; tireoide; rim; coração; paratireoide.
NM_004452	mRNA	ESRRB	14	14q24.3	<i>Steroid hormone receptor ERR2</i>	Rim; cérebro; pulmão.
NM_001040173	mRNA	HTR4	5	5q31-q33	<i>5-hydroxytryptamine receptor 4 isoform i</i>	Cérebro; intestino; estômago; glândula adrenal; nervo.
NM_021965	mRNA	PGM5	9	9q13	<i>Phosphoglucomutase-like protein 5</i>	Pele; cérebro; pulmão; rim; coração.
NM_014350	mRNA	TNFAIP8	5	5q23.1	<i>Tumor necrosis factor alpha-induced protein 8 isoform a</i>	Pulmão; cérebro; rim; pele; coração.
NM_002127	mRNA	HLA-G	6	6p21.3	<i>HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain G precursor</i>	Pulmão; cérebro.
NM_024624	mRNA	SMC6	2	2p24.2	<i>Structural maintenance of chromosomes protein 6</i>	Cérebro; pulmão; pele; rim.
NM_015571	mRNA	SENPA6	6	6q14.1	<i>Sentrin-specific protease 6 isoform 1</i>	Cérebro; pulmão; paratireoide; pele; rim; coração; tireoide.
NM_003489	mRNA	NRIP1	21	21q11.2	<i>Nuclear receptor-interacting protein 1</i>	Cérebro; rim; pulmão; tireoide; pele; paratireoide.
NM_212502	mRNA	CDK18	1	1q31-q32	<i>Cyclin-dependent kinase 18 isoform b</i>	Cérebro; pulmão; rim; coração; pele; tireoide.
NR_028134	<i>non-coding RNA</i>	GUCY2GP	10	10q25.2	<i>Guanylate cyclase 2G, pseudogene</i>	Faringe.
NR_002989	<i>small nucleolar RNA</i>	SNORA81	3	3q27.3	<i>Small nucleolar RNA, H/ACA box 81</i>	Fígado; timo; traqueia
NM_006190	mRNA	ORC2	2	2q33	<i>Origin recognition complex subunit 2</i>	Cérebro; tireoide; paratireoide; pulmão; rim; pele.
NM_003004	mRNA	SECTM1	17	17q25	<i>Secreted and transmembrane protein 1 precursor</i>	Pulmão; tireoide; pele; rim; cérebro; coração.
NM_005187	mRNA	CBFA2T3	16	16q24	<i>Protein CBFA2T3 isoform 1</i>	Cérebro; pulmão; rim.
NM_022173	mRNA	TIA1	2	2p13	<i>Nucleolysin TIA-1 isoform p40 isoform 2</i>	Cérebro; pele; pulmão; rim; coração; paratireoide; tireoide.

**Tabela 4** – Identificação gênica dos transcritos e suas respectivas localizações cromossômicas, tipo de RNA e produtos.

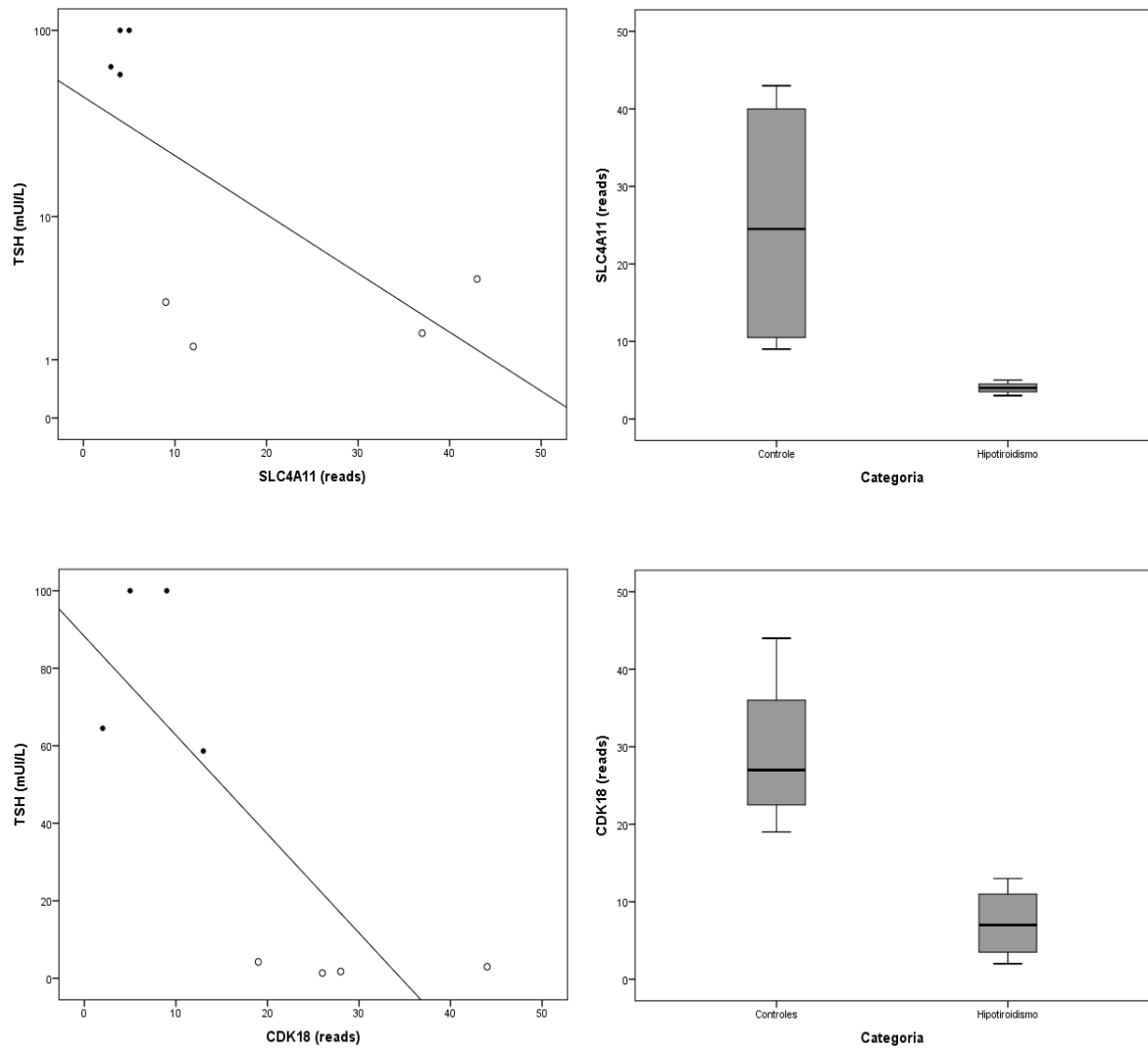
**Tabela 5 – Correlação entre os genes e os níveis de TSH.**

<b>Transcritos</b>	<b>Mediana do Controle</b>	<b>Mediana do Hipotireoidismo</b>	<b>r<sub>s</sub></b>	<b>p</b>
<b>CCNJL</b>	531,50	123,5	-0,898	0,002
<b>IMPA2</b>	448	152,5	-0,790	0,002
<b>GPM6A</b>	5	28,5	0,874	0,005
<b>FAM129B</b>	204	50,5	-0,790	0,020
<b>SLC4A11</b>	24,5	44	-0,669	0,070
<b>HLA-B</b>	1204,5	110,5	-0,228	0,588
<b>ESRRB</b>	19	3,5	-0,458	0,254
<b>HTR4</b>	208,5	62	-0,395	0,333
<b>PGM5</b>	111	39	-0,563	0,146
<b>TNFAIP8</b>	89,5	201	0,575	0,136
<b>HLA-G</b>	183,5	69,5	-0,647	0,083
<b>SMC6</b>	142,5	327,5	0,515	0,192
<b>SENP6</b>	102,5	261,5	0,455	0,257
<b>NRIP1</b>	118	307	0,755	0,031
<b>CDK18</b>	27	7	-0,826	0,011
<b>GUCY2GP</b>	92,5	27	-0,265	0,526
<b>SNORA81</b>	108	242,5	0,407	0,317
<b>ORC2</b>	87	210	0,542	0,165
<b>SECTM1</b>	1182	479,5	-0,587	0,126
<b>CBFA2T3</b>	920	360,5	-0,647	0,083
<b>TIA1</b>	216,5	531	0,383	0,349





























**Figura 2** – Gráfico de pontos 1. Os pontos pretos são a representação dos pacientes com hipotiroidismo e pontos brancos a representação dos controles.



**Figura 3** - Gráfico de pontos 2. Os pontos pretos são a representação dos pacientes com hipotiroidismo e pontos brancos a representação dos controles.

**Tabela 6** - Padrões estimados de expressão gênicas (UNIGene , disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>). Legenda: TPM – Transcritos por milhão na literatura, EST – Estimativa do transcrito no sangue e no próprio tecido.

<b>Gene</b>	<b>Órgão</b>	<b>TPM</b>	<b>Intensidade</b>	<b>Gene EST</b>		<b>Total EST no órgão</b>
<i>CCNJL</i>	cérebro	9		10	/	1092688
<i>CCNJL</i>	coração	11		1	/	89524
<i>CCNJL</i>	rim	14		3	/	210778
<i>CCNJL</i>	pulmão	20		7	/	334815
<i>CCNJL</i>	pele	14		3	/	210759
<i>IMPA2</i>	cérebro	11		13	/	1092688
<i>IMPA2</i>	coração	22		2	/	89524
<i>IMPA2</i>	rim	61		13	/	210778
<i>IMPA2</i>	pulmão	62		21	/	334815
<i>IMPA2</i>	pele	66		14	/	210759
<i>FAM129B</i>	cérebro	33		37	/	1092688
<i>FAM129B</i>	coração	44		4	/	89524
<i>FAM129B</i>	rim	90		19	/	210778
<i>FAM129B</i>	pulmão	206		69	/	334815
<i>FAM129B</i>	pele	227		48	/	210759
<i>SLC4A11</i>	cérebro	8		9	/	1092688
<i>SLC4A11</i>	coração	0		0	/	89524
<i>SLC4A11</i>	rim	4		1	/	210778
<i>SLC4A11</i>	pulmão	17		6	/	334815
<i>SLC4A11</i>	pele	4		1	/	210759
<i>CDK18</i>	cérebro	169		185	/	1092688
<i>CDK18</i>	coração	67		6	/	89524
<i>CDK18</i>	rim	52		11	/	210778
<i>CDK18</i>	pulmão	35		12	/	334815
<i>CDK18</i>	pele	23		5	/	210759

## 5.0 Discussão

O desafio para evitar erros nas fases pré-analíticas e analíticas foi uma preocupação constante nesse estudo. Na fase pré-analítica, a coleta do material biológico foi realizada em tubos especiais para a preservação completa do RNA. A conservação e estabilização do RNA são um passo crucial, sendo que uma conservação inadequada pode alterar o resultado de um estudo de expressão modificando a qualidade e quantidade do RNA analisado<sup>106; 107</sup>. O processo de extração do RNA foi realizada visando a extração de todo o RNA, garantindo um alto rendimento para todos os subtipos de RNA e tentando evitar ao máximo a degradação do material. Apesar do custo e do tempo gastos no processo de extração, a utilização de um método padrão ouro para a extração garante a qualidade e a quantidade dos transcritos<sup>108; 109</sup>.

O uso da estratégia de sequenciamento através do RNA-Seq foi uma escolha adequada devido à facilidade na construção das bibliotecas, sendo que a técnica apresenta resultado comparável com outras técnicas de NGS<sup>110; 111</sup>.

A análise computacional processou a DGE entre os grupos HT e CTL, pelo pacote EDGER, revelando 21 genes diferencialmente expressos. O *ranking* desses 21 genes foi confeccionado pelo valor da significância para cada gene e sua correção estatística apresentada pelo valor de FDR<sup>105</sup>.

Em condições de deleção do gene *CCNJL* (*cyclin J like*) seu fenótipo apresenta atraso do desenvolvimento global ou anormalidade comportamental psiquiátrica. O gene *CCNJL* produz uma proteína que atua no ciclo celular e no controle da transcrição (Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79616>). O atraso do desenvolvimento global é claramente reconhecido no hipotireoidismo.

Duplicações do gene *IMPA2* (*inositol monophosphatase 2*) apresenta fenótipos de atraso no desenvolvimento global, comprometimento cognitivo, baixa estatura, deficiência auditiva. O atraso no desenvolvimento global, o comprometimento cognitivo e a baixa estatura são sinais bem conhecidos de hipotireoidismo. As alterações no gene *IMPA2* que codifica mio-inositol monofosfatase 2 também está associado à susceptibilidade em doenças psiquiátricas como doença de transtorno bipolar e esquizofrenia, o que fundamenta a presença de doenças de origem depressivas no hipotireoidismo<sup>112</sup>.

Deleções do gene *FAM129B* (*Family with sequence similarity 129 member B*) acarretam fenótipos patogênicos definidos em retardo do crescimento fetal intra-uterino, deficiência auditiva, atraso motor. Os estudos do gene *FAM129B* indicam uma forte ligação em regulação de transdução nas vias da  $\beta$ -catenina, importante processo de estimulação apoptótica nos melanomas<sup>113</sup>. O hipotiroidismo pode ocasionar retardo do crescimento intra-uterino (gestantes).

Duplicações do gene *SLC4A11* (*solute carrier family 4 member*) manifestam fenótipos de atraso na fala e desenvolvimento da linguagem, hipotonia generalizada, atraso global de desenvolvimento. Mutações do gene apontam distrofia corneana endotelial, ocasionando degeneração do endotélio da córnea, fazendo um aumento da opacidade da córnea e perda gradual de visão, processo que pode se acelerado no hipotiroidismo<sup>114</sup>. Atraso global de desenvolvimento, hiporreflexia são bem observadas no hipotiroidismo.

O gene *CDK18* (*cyclin-dependent kinase 18*) quando duplicado se caracteriza em fenótipos de hipotonia generalizada, insuficiência respiratória, anormalidades no ouvido e atraso no desenvolvimento global. O gene *CDK18* está envolvido no ciclo celular. Em estudo se constatou a elevação em sua expressão em diabéticos tipo 2<sup>115</sup>.

De forma direta e indireta, os 5 genes que formam esse painel para discriminar hipotiroidismo primário possuem fortes relação de sinais e sintomas clássicos do hipotiroidismo. Uma nova etapa de validação desses genes pela técnica de reação de cadeia da polimerase (PCR) em uma população maior será a estratégia para confirmarmos o papel destes 5 genes como um instrumento confiável para a identificação do hipotiroidismo primário.

## 6.0 Conclusão

Conseguimos identificar 5 genes (*CCNJL*, *IMPA2*, *FAM129B*, *SLC4A11* e *CDK18*) que podem ser úteis formando um painel de biomarcadores pela capacidade de diferenciar o eutiroidismo do hipotireoidismo primário e também correlacioná-los com os níveis séricos de TSH. Repercussões clínicas correlacionadas a alterações desses genes em variadas situações são compatíveis com as observadas nos pacientes hipotireoideos. A validação desses genes em um número maior de indivíduos eutiroidianos e hipotireoidianos primários por técnica de PCR em Tempo Real será a próxima etapa deste trabalho.

## Anexo 1

### Extração do RNA total

- 1- Centrifugação dos tubos *PAXgene blood RNA*, por 10 minutos à 3500 Rotações por minutos (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 4mL de água livre de RNase (RNFV), 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 350µL de tampão de ressuspensão (BR1), fornecido pelo *Kit*.
- 8- Agitação ao vórtex até a visível dissolução do *pellet*.
- 9- Transferência da amostra (350µL) para um microtubo (MCT) de 1,5mL.
- 10- Adição de 300µL de tampão de ligação (BR2), e 40µL 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 2mL, 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 350µL 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 700µL da amostra para outra coluna de rotação de RNA *PAXgene* (coluna de cor vermelha PRC), colocada em um tubo de processamento (PT) de 2mL.
- 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 2mL, e eliminado o PT antigo contendo o produto residual.
- 25- T Transferência de 350µL 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 2mL, 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 10µL de solução de DNase com 70µL de tampão de digestão de DNA (RDD) por amostra, totalizando um volume de *mix* de 80µL. Homogeneizando suavemente com a mão, pois a DNase I é especialmente sensível a desnaturação física.
- 29- Transferência dos 80µL do *mix* diretamente para a membrana da coluna PRC e aguardar por 15 minutos, com a amostra em temperatura ambiente.
- 30- Transferência de 350µL 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 2mL, e eliminação o PT antigo contendo o produto residual.
- 33- Transferência de 500µL 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 2mL, e eliminação do PT antigo contendo o produto residual.
- 36- Transferência mais 500µL 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 2mL, 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 40µL 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 40µL 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.

## Anexo 2

### 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 200µL 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>	190µL	180 - 199µL
<b>Amostra padrão</b>	10µL	---
<b>Amostra</b>	----	1 - 20µL
<b>Total em cada tubo</b>	200µL	200µL

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 5µL.

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 5µL
<b>Total</b>	5µL

2 – Homogeneização no vórtex e spin de 2 segundos.

3 – 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>
<i>5X Ion AmpliSeq HiFi Mix (red cap)</i>	4µL
<i>Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Core Panel</i>	8µL
<i>Nuclease-Free Water</i>	3µL
<b>Total</b>	15µL

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

4 – Transferência 15µL 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

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

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

1 – Transferência de 2mL 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 $\mu$ L
<i>Ion Xpress Barcode X</i>	2 $\mu$ L
<i>Nuclease-Free water</i>	4 $\mu$ L
Total	8 $\mu$ L

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 $\mu$ L
<i>Mix adaptador Barcode diluído</i>	2 $\mu$ L
Total: incluindo os 22 $\mu$ L do <i>amplicon</i> (amostra)	28 $\mu$ L

3 – Homogeneização

4 – Transferência de 2mL de DNA ligase a cada MCT (30 $\mu$ L 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 $\mu$ L 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* imã e incubado por 2 minutos . Após os 2 minutos retirado e desprezado o sobrenadante sem interferir com o sedimento.

4 – Adicionado 150µL 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 20µL, mantendo os MCT na *rack* com imã 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 imã e adicionado 50µL 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 45µL 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>	10µL	5µL
<i>20X Ion TaqMan Assay</i>	1µL	0,5µL
Total	11µL	5,5µL

6 – Realizado na placa de 96 poços, transferido 11µL do *mastermix* em cada poço e adicionado 9µL 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 100pM, efetuado diluição com *Nuclease-Free water* para o valor de 100pM em volume de 8µL.

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* (25mL) 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 100pM iniciais em volume de 8µL adicionando 92µL de *Nuclease free Water*, para volume total de 100µL.

4 – Homogeneização em vórtex e *spin*

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

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

	Volume total incluindo <i>mastermix</i>	2400µL
--	--	--------

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 termino 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 - Preparado 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 liquido 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 hipotiroidianos 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.



## Bibliografia

- 1 LONGO, D. L. et al. **Harrison. Principios de Medicina Interna**. 19. U.S.: 2012, 2008, 2005, 2001, 1998, 1994, 1991, 1987, 1983, 1980, 1977, 1974, 1970, 1966, 1962, 1958. 3983 ISBN 978-0-07-180216-1.
- 2 MULLUR, R.; LIU, Y. Y.; BRENT, G. A. Thyroid hormone regulation of metabolism. **Physiol Rev**, v. 94, n. 2, p. 355-82, Apr 2014. ISSN 1522-1210. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24692351> >.
- 3 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. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22986150> >.
- 4 DUARTE, G. C. et al. Associação entre aumento da concentração de tirotropina e longevos: o que sabemos? **Einstein**, v. 13, n. 1, p. 117-121, Jun 2014.
- 5 CAMPBELL, N. R. et al. Need for coordinated programs to improve global health by optimizing salt and iodine intake. **Rev Panam Salud Publica**, v. 32, n. 4, p. 281-6, Oct 2012. ISSN 1680-5348. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23299289> >.
- 6 SANTANA LOPES, M. et al. Iodine and thyroid: what a clinic should know. **Acta Med Port**, v. 25, n. 3, p. 174-8, 2012 May-Jun 2012. ISSN 1646-0758. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23069238> >.
- 7 BRENT, G. A. Mechanisms of thyroid hormone action. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 9, p. 3035–3043, Sep 2012. Disponível em: < <http://www.jci.org> >.
- 8 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. ISSN 1898-2263. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24364444> >.
- 9 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. ISSN 1479-683X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23184912> >.
- 10 GALTONDE, D. Y.; ROWLEY, K. D.; SWEENEY, L. B. Hypothyroidism: An Update. **American Family Physician**, v. 86, n. 3, p. 244-251, Aug 2012. Disponível em: < [www.aafp.org/afp](http://www.aafp.org/afp) >.
- 11 BRENTA, G. et al. Diretrizes clínicas práticas para o manejo do hipotireoidismo. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 57, p. 265-299, Abr 2013.

- 12 MORSHED, S. A. et al. How one TSH receptor antibody induces thyrocyte proliferation while another induces apoptosis. **J Autoimmun**, v. 47, p. 17-24, Dec 2013. ISSN 1095-9157. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23958398> >.
- 13 DONG, Y. H.; FU, D. G. Autoimmune thyroid disease: mechanism, genetics and current knowledge. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 18, n. 23, p. 3611-8, 2014. ISSN 2284-0729. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25535130> >.
- 14 CARTER, Y.; SIPPEL, R. S.; CHEN, H. Hypothyroidism after a cancer diagnosis: etiology, diagnosis, complications, and management. **Oncologist**, v. 19, n. 1, p. 34-43, Jan 2014. ISSN 1549-490X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24309982> >.
- 15 GIERACH, M.; GIERACH, J.; JUNIK, R. Insulin resistance and thyroid disorders. **Endokrynol Pol**, v. 65, n. 1, p. 70-6, 2014. ISSN 0423-104X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24549605> >.
- 16 KARMISHOLT, J.; ANDERSEN, S.; LAURBERG, P. Variation in thyroid function in subclinical hypothyroidism: importance of clinical follow-up and therapy. **Eur J Endocrinol**, v. 164, n. 3, p. 317-23, Mar 2011. ISSN 1479-683X (Electronic) 0804-4643 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21208994> >.
- 17 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. ISSN 1677-9487. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23681265> >.
- 18 GULLO, D. et al. Levothyroxine monotherapy cannot guarantee euthyroidism in all athyreotic patients. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e22552, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21829633> >.
- 19 BAUMGARTNER, C.; BLUM, M. R.; RODONDI, N. Subclinical hypothyroidism: summary of evidence in 2014. **Swiss Med Wkly**, v. 144, p. w14058, 2014. ISSN 1424-3997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25536449> >.
- 20 BIONDI, B. Mechanisms in endocrinology: Heart failure and thyroid dysfunction. **Eur J Endocrinol**, v. 167, n. 5, p. 609-18, Nov 2012. ISSN 1479-683X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22956554> >.
- 21 NING, N. et al. Prognostic Role of Hypothyroidism in Heart Failure: A Meta-Analysis. **Medicine (Baltimore)**, v. 94, n. 30, p. e1159, Jul 2015. ISSN 1536-5964. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26222845> >.

- 22 LIOUDAKI, E. et al. Subclinical hypothyroidism and vascular risk: an update. **Hormones (Athens)**, v. 12, n. 4, p. 495-506, 2013 Oct-Dec 2013. ISSN 1109-3099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24457397> >.
- 23 COCEANI, M. Heart disease in patients with thyroid dysfunction: hyperthyroidism, hypothyroidism and beyond. **Anadolu Kardiyol Derg**, v. 13, n. 1, p. 62-6, Feb 2013. ISSN 1308-0032. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23086805> >.
- 24 JOFFE, R. T. et al. Subclinical Hypothyroidism, Mood, and Cognition in the Elderly: A Review. **Int J Geriatr Psychiatry**, v. 28, n. 2, p. 111-118, Feb 2013.
- 25 SAMUELS, M. H. Psychiatric and cognitive manifestations of hypothyroidism. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 21, n. 5, p. 377-83, Oct 2014. ISSN 1752-2978. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25122491> >.
- 26 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. ISSN 1677-9487. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25166035> >.
- 27 WIRTH, C. D. et al. Subclinical thyroid dysfunction and the risk for fractures: a systematic review and meta-analysis. **Ann Intern Med**, v. 161, n. 3, p. 189-99, Aug 2014. ISSN 1539-3704. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25089863> >.
- 28 PAPALEONTIOU, M.; HAYMART, M. R. Approach to and treatment of thyroid disorders in the elderly. **Med Clin North Am**, v. 96, n. 2, p. 297-310, Mar 2012. ISSN 1557-9859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22443977> >.
- 29 BENSENOR, I. M.; OLMOS, R. D.; LOTUFO, P. A. Hypothyroidism in the elderly: diagnosis and management. **Clinical Interventions in Aging**, v. 7, p. 97-111, Apr 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2147/CIA.S23966> >.
- 30 MARIANI, L. H.; BERNIS, J. S. The renal manifestations of thyroid disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 23, n. 1, p. 22-6, Jan 2012. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22021708> >.
- 31 ALVES, M. et al. Abordagem da orbitopatia associada à tiroide. **Acta Med Port.**, v. 24, n. 6, p. 1041-1050, Ago 2010. Disponível em: < [www.actamedicaportuguesa.com](http://www.actamedicaportuguesa.com) >.
- 32 LUCA, F. D. et al. Hashimoto's thyroiditis in childhood: presentation modes and evolution over time. **Italian Journal of Pediatrics**, v. 39, p. 8, Jan 2013. Disponível em: < <http://www.ijponline.net/content/39/1/8> >.

- 33 BROWN, R. S. Autoimmune Thyroiditis in Childhood. **Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology**, v. 5, p. 45-49, Oct 2013.
- 34 BONA, G.; PRODAM, F.; MONZANI, A. Subclinical Hypothyroidism in Children: Natural History and When to Treat. **Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology**, v. 5, p. 23-28, Oct 2012.
- 35 LÉGER, J. Congenital hypothyroidism: a clinical update of long-term outcome in young adults. **Eur J Endocrinol**, v. 172, n. 2, p. R67-77, Feb 2015. ISSN 1479-683X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25225479> >.
- 36 MACIEL, L. M. et al. Congenital hypothyroidism: recommendations of the Thyroid Department of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 57, n. 3, p. 184-92, Apr 2013. ISSN 1677-9487. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23681264> >.
- 37 BÜYÜKGEBİZ, A. Newborn screening for congenital hypothyroidism. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v. 19, n. 11, p. 1291-8, Nov 2006. ISSN 0334-018X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17220056> >.
- 38 MEDENICA, S. et al. Thyroid dysfunction and thyroid autoimmunity in euthyroid women in achieving fertility. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 19, n. 6, p. 977-87, 2015. ISSN 2284-0729. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25855922> >.
- 39 CARNEY, L. A.; QUINLAN, J. D.; WEST, J. M. Thyroid disease in pregnancy. **Am Fam Physician**, v. 89, n. 4, p. 273-8, Feb 2014. ISSN 1532-0650. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24695447> >.
- 40 LEUNG, A. M. Thyroid function in pregnancy. **J Trace Elem Med Biol**, v. 26, n. 2-3, p. 137-40, Jun 2012. ISSN 1878-3252. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22658718> >.
- 41 BRABANT, G. et al. Management of subclinical hypothyroidism in pregnancy: are we too simplistic? **Eur J Endocrinol**, v. 173, n. 1, p. P1-P11, Jul 2015. ISSN 1479-683X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25650404> >.
- 42 CHAKERA, A. J.; PEARCE, S. H. S.; VAIDYA, B. Treatment for primary hypothyroidism: current approaches and future possibilities. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 6, p. 1-11, Dec 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S12894> >.
- 43 IANIRO, G. et al. Levothyroxine absorption in health and disease, and new therapeutic perspectives. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 18, n. 4, p. 451-6, 2014. ISSN 2284-0729. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24610609> >.

- 44 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. ISSN 1557-9077. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25266247> >.
- 45 MASEEH-UZ-ZAMAN; FATIMA, N.; SAJJAD, Z. Amiodarone therapy: don't forget thyroid. **J Pak Med Assoc**, v. 62, n. 3, p. 268-72, Mar 2012. ISSN 0030-9982. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22764462> >.
- 46 ESTRADA, J. M. et al. Thyrotropin isoforms: implications for thyrotropin analysis and clinical practice. **Thyroid**, v. 24, n. 3, p. 411-23, Mar 2014. ISSN 1557-9077. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24073798> >.
- 47 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. ISSN 1479-683X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25005935> >.
- 48 SENESE, R. et al. Thyroid: biological actions of 'nonclassical' thyroid hormones. **J Endocrinol**, v. 221, n. 2, p. R1-12, May 2014. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24464019> >.
- 49 COSTA-E-SOUSA, R. H.; HOLLENBERG, A. N. Minireview: The neural regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. **Endocrinology**, v. 153, n. 9, p. 4128-35, Sep 2012. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22759379> >.
- 50 KOULOURI, O. et al. Pitfalls in the measurement and interpretation of thyroid function tests. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 27, n. 6, p. 745-62, Dec 2013. ISSN 1878-1594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24275187> >.
- 51 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. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22634734> >.
- 52 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. ISSN 1878-5875. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21679772> >.
- 53 FILHO, H. C. et al. Novel mutation in MCT8 gene in a Brazilian boy with thyroid hormone resistance and severe neurologic abnormalities. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 55, n. 1, p. 60-6, Feb 2011. ISSN 1677-9487. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21468521> >.

- 54 TONDUTI, D. et al. MCT8 deficiency: extrapyramidal symptoms and delayed myelination as prominent features. **J Child Neurol**, v. 28, n. 6, p. 795-800, Jun 2013. ISSN 1708-8283 (Electronic) 0883-0738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22805248> >.
- 55 DENTICE, M.; SALVATORE, D. Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local impact of thyroid hormone inactivation. **J Endocrinol**, v. 209, n. 3, p. 273-82, Jun 2011. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21398344> >.
- 56 MAIA, A. L. et al. Deiodinases: the balance of thyroid hormone Type 1 iodothyronine deiodinase in human physiology and disease. **Journal of Endocrinology**, v. 209, p. 283-297, 2011. Disponível em: < <http://www.endocrinology-journals.org> >.
- 57 WILLIAMS, G. R.; BASSETT, J. H. D. Deiodinases: the balance of thyroid hormone Local control of thyroid hormone action: role of type 2 deiodinase. **Journal of Endocrinology**, v. 209, p. 261-272, 2011. Disponível em: < <http://www.endocrinology-journals.org> >.
- 58 KARAPANOU, O.; PAPADIMITRIOU, A. Thyroid hormone transporters in the human. **Hormones (Athens)**, v. 10, n. 4, p. 270-9, 2011 Oct-Dec 2011. ISSN 1109-3099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22281883> >.
- 59 MA, D.; LIU, F. Genome Editing and Its Applications in Model Organisms. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, Jan 2016. ISSN 2210-3244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26762955> >.
- 60 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, n. 1, p. 22, 2016. ISSN 1479-5876. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26801900> >.
- 61 DELANEY, S. K. et al. Toward clinical genomics in everyday medicine: perspectives and recommendations. **Expert Rev Mol Diagn**, Jan 2016. ISSN 1744-8352. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26810587> >.
- 62 MCGONIGLE, I. V. The collective nature of personalized medicine. **Genet Res (Camb)**, v. 98, p. e3, 2016. ISSN 1469-5073. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26792757> >.
- 63 FORLENZA, G. P. et al. Next generation sequencing in endocrine practice. **Mol Genet Metab**, v. 115, n. 2-3, p. 61-71, 2015 Jun-Jul 2015. ISSN 1096-7206. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25958132> >.



- 64 JÁCOME, A. A. et al. Personalized medicine in gastric cancer: Where are we and where are we going? **World J Gastroenterol**, v. 22, n. 3, p. 1160-71, Jan 2016. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26811654> >.
- 65 MCANINCH, E. A.; BIANCO, A. C. The History and Future of Treatment of Hypothyroidism. **Ann Intern Med**, v. 164, n. 1, p. 50-6, Jan 2016. ISSN 1539-3704. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26747302> >.
- 66 SINGH, M. S.; PEER, D. RNA nanomedicines: the next generation drugs? **Curr Opin Biotechnol**, v. 39, p. 28-34, Jan 2016. ISSN 1879-0429. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26773301> >.
- 67 ARONSON, S. et al. Information Technology Support for Clinical Genetic Testing within an Academic Medical Center. **J Pers Med**, v. 6, n. 1, 2016. ISSN 2075-4426. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26805890> >.
- 68 RICCIUTI, B. et al. Long noncoding RNAs: new insights into non-small cell lung cancer biology, diagnosis and therapy. **Med Oncol**, v. 33, n. 2, p. 18, Feb 2016. ISSN 1559-131X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26786153> >.
- 69 SAISELET, M. et al. New global analysis of the microRNA transcriptome of primary tumors and lymph node metastases of papillary thyroid cancer. **BMC Genomics**, v. 16, p. 828, 2015. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26487287> >.
- 70 BHATIA, P. et al. The utility of molecular markers in pre-operative assessment of thyroid nodules. **Future Oncol**, v. 11, n. 16, p. 2343-50, 2015. ISSN 1744-8301 (Electronic) 1479-6694 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26260812> >.
- 71 MITTELBRUNN, M.; SANCHEZ-MADRID, F. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 5, p. 328-35, May 2012. ISSN 1471-0080 (Electronic) 1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22510790> >.
- 72 ALVAREZ, M. L. et al. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. **Kidney Int**, v. 82, n. 9, p. 1024-32, Nov 2012. ISSN 1523-1755 (Electronic) 0085-2538 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22785172> >.
- 73 WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 1, p. 57-63, Jan 2009. ISSN 1471-0064 (Electronic) 1471-0056 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19015660> >.

- 74 MORETON, J.; IZQUIERDO, A.; EMES, R. D. Assembly, Assessment, and Availability of De novo Generated Eukaryotic Transcriptomes. **Front Genet**, v. 6, p. 361, 2015. ISSN 1664-8021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26793234> >.
- 75 LEE, J. W. RNA sequencing of the nephron transcriptome: a technical note. **Kidney Res Clin Pract**, v. 34, n. 4, p. 219-27, Dec 2015. ISSN 2211-9132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26779425> >.
- 76 BHARTIYA, D.; SCARIA, V. Genomic variations in non-coding RNAs: Structure, function and regulation. **Genomics**, Jan 2016. ISSN 1089-8646. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26790601> >.
- 77 PASQUIER, L. et al. Karyotype is not dead (yet)! **Eur J Med Genet**, v. 59, n. 1, p. 11-5, Jan 2016. ISSN 1878-0849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26691665> >.
- 78 RUDDLE, F. H. Mapping and sequencing of the human genome. **Jpn J Cancer Res**, v. 89, n. 12, p. inside front cover, Dec 1998. ISSN 0910-5050 (Print) 0910-5050 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10081483> >.
- 79 LANDER, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860-921, Feb 15 2001. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11237011> >.
- 80 INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING, C. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. **Nature**, v. 431, n. 7011, p. 931-45, Oct 21 2004. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15496913> >.
- 81 MUZZEY, D.; EVANS, E. A.; LIEBER, C. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. **Curr Genet Med Rep**, v. 3, n. 4, p. 158-165, 2015 2015. ISSN 2167-4876. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26566462> >.
- 82 PASSADOR-GURGEL, G. et al. Quantitative trait transcripts for nicotine resistance in *Drosophila melanogaster*. **Nat Genet**, v. 39, n. 2, p. 264-8, Feb 2007. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237783> >.
- 83 RIFKIN, S. A.; KIM, J.; WHITE, K. P. Evolution of gene expression in the *Drosophila melanogaster* subgroup. **Nat Genet**, v. 33, n. 2, p. 138-44, Feb 2003. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12548287> >.



- 84 WHITE, K. P. Functional genomics and the study of development, variation and evolution. **Nat Rev Genet**, v. 2, n. 7, p. 528-37, Jul 2001. ISSN 1471-0056 (Print) 1471-0056 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11433359> >.
- 85 SCHERF, U. et al. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. **Nat Genet**, v. 24, n. 3, p. 236-44, Mar 2000. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10700175> >.
- 86 GAUTIER, L. et al. affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. **Bioinformatics**, v. 20, n. 3, p. 307-15, Feb 12 2004. ISSN 1367-4803 (Print) 1367-4803 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14960456> >.
- 87 PILARSKY, C.; NANDURI, L. K.; ROY, J. Gene Expression Analysis in the Age of Mass Sequencing: An Introduction. **Methods Mol Biol**, v. 1381, p. 67-73, 2016. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26667455> >.
- 88 LIM, E. C. et al. Next-generation sequencing using a pre-designed gene panel for the molecular diagnosis of congenital disorders in pediatric patients. **Hum Genomics**, v. 9, n. 1, p. 33, 2015. ISSN 1479-7364. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26666243> >.
- 89 GAO, J. et al. Validation of targeted next-generation sequencing for RAS mutation detection in FFPE colorectal cancer tissues: comparison with Sanger sequencing and ARMS-Scorpion real-time PCR. **BMJ Open**, v. 6, n. 1, p. e009532, 2016. ISSN 2044-6055. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26747035> >.
- 90 KIRCHER, M.; KELSO, J. High-throughput DNA sequencing--concepts and limitations. **Bioessays**, v. 32, n. 6, p. 524-36, Jun 2010. ISSN 1521-1878 (Electronic) 0265-9247 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20486139> >.
- 91 SCHATZ, M. C.; LANGMEAD, B. The DNA Data Deluge: Fast, efficient genome sequencing machines are spewing out more data than geneticists can analyze. **IEEE Spectr**, v. 50, n. 7, p. 26-33, Jul 2013. ISSN 0018-9235 (Print) 0018-9235 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24920863> >.
- 92 SOUILMI, Y. et al. Scalable and cost-effective NGS genotyping in the cloud. **BMC Med Genomics**, v. 8, p. 64, 2015. ISSN 1755-8794. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26470712> >.
- 93 KA, W. DNA Sequencing Costs. US, 2016. Disponível em: < [www.genome.gov/sequencingcosts](http://www.genome.gov/sequencingcosts) >. Acesso em: 31/01/2016.

- 94 METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nat Rev Genet**, v. 11, n. 1, p. 31-46, Jan 2010. ISSN 1471-0064 (Electronic) 1471-0056 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19997069> >.
- 95 ANDERS, S.; HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biol**, v. 11, n. 10, p. R106, 2010. ISSN 1474-760X (Electronic) 1474-7596 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20979621> >.
- 96 MALAPELLE, U. et al. Ion Torrent next-generation sequencing for routine identification of clinically relevant mutations in colorectal cancer patients. **J Clin Pathol**, v. 68, n. 1, p. 64-8, Jan 2015. ISSN 1472-4146 (Electronic) 0021-9746 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25378536> >.
- 97 BANKEVICH, A. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **J Comput Biol**, v. 19, n. 5, p. 455-77, May 2012. ISSN 1557-8666 (Electronic) 1066-5277 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22506599> >.
- 98 GORBACHEVA, T. et al. Improved transposon-based library preparation for the Ion Torrent platform. **Biotechniques**, v. 58, n. 4, p. 200-2, Apr 2015. ISSN 1940-9818 (Electronic) 0736-6205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25861933> >.
- 99 SHAO, K. et al. Construction and optimization of an efficient amplification method of a random ssDNA library by asymmetric emulsion PCR. **Biotechnol Appl Biochem**, Dec 16 2015. ISSN 1470-8744 (Electronic) 0885-4513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26671010> >.
- 100 LIU, Q. et al. Exome-assistant: a rapid and easy detection of disease-related genes and genetic variations from exome sequencing. **BMC Genomics**, v. 13, p. 692, 2012. ISSN 1471-2164 (Electronic) 1471-2164 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23231371> >.
- 101 MARTH, G. T. et al. The functional spectrum of low-frequency coding variation. **Genome Biol**, v. 12, n. 9, p. R84, 2011. ISSN 1474-760X (Electronic) 1474-7596 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21917140> >.
- 102 BERGVELD, P. Thirty years of ISFETOLOGY: What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years. *Sensors and Actuators B: Chemical*. **Elsevier Science B.V.**, v. 88, n. 8, 2003. ISSN 0925-4005. Disponível em: < URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400502003015> >.

- 103 ROTHBERG, J. M. et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 348-52, Jul 21 2011. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21776081> >.
- 104 XUAN, J. et al. Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. **Cancer Lett**, v. 340, n. 2, p. 284-95, Nov 1 2013. ISSN 1872-7980 (Electronic) 0304-3835 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23174106> >.
- 105 ROBINSON, M. D.; SMYTH, G. K. Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. **Biostatistics**, v. 9, n. 2, p. 321-32, Apr 2008. ISSN 1465-4644 (Print) 1465-4644 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17728317> >.
- 106 FRANKEN, C. et al. Peripheral blood collection: the first step towards gene expression profiling. **Biomarkers**, p. 1-8, Mar 17 2016. ISSN 1366-5804 (Electronic) 1354-750X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26984061> >.
- 107 MALENTACCHI, F. et al. Effects of Transport and Storage Conditions on Gene Expression in Blood Samples. **Biopreserv Biobank**, v. 14, n. 2, p. 122-8, Apr 2016. ISSN 1947-5543 (Electronic) 1947-5543 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26886447> >.
- 108 MAERKEDAHL, R. B. et al. Evaluation of a low-cost procedure for sampling, long-term storage, and extraction of RNA from blood for qPCR analyses. **Clin Chem Lab Med**, v. 53, n. 8, p. 1181-8, Jul 2015. ISSN 1437-4331 (Electronic) 1434-6621 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25720080> >.
- 109 SELLIN JEFFRIES, M. K. et al. A comparison of commercially-available automated and manual extraction kits for the isolation of total RNA from small tissue samples. **BMC Biotechnol**, v. 14, p. 94, 2014. ISSN 1472-6750 (Electronic) 1472-6750 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25394494> >.
- 110 KAWAJI, H. et al. Comparison of CAGE and RNA-seq transcriptome profiling using clonally amplified and single-molecule next-generation sequencing. **Genome Res**, v. 24, n. 4, p. 708-17, Apr 2014. ISSN 1549-5469 (Electronic) 1088-9051 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24676093> >.

- 111 RAPAPORT, F. et al. Comprehensive evaluation of differential gene expression analysis methods for RNA-seq data. **Genome Biol**, v. 14, n. 9, p. R95, 2013. ISSN 1474-760X (Electronic)  
1474-7596 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24020486> >.
- 112 ARAI, R. et al. Crystal structure of human myo-inositol monophosphatase 2, the product of the putative susceptibility gene for bipolar disorder, schizophrenia, and febrile seizures. **Proteins**, v. 67, n. 3, p. 732-42, May 15 2007. ISSN 1097-0134 (Electronic)  
0887-3585 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17340635> >.
- 113 CONRAD, W. et al. FAM129B is a novel regulator of Wnt/beta-catenin signal transduction in melanoma cells. **F1000Res**, v. 2, p. 134, 2013. ISSN 2046-1402 (Electronic)  
2046-1402 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24358901> >.
- 114 ROY, S.; PRANEETHA, D. C.; VENDRA, V. P. Mutations in the Corneal Endothelial Dystrophy-Associated Gene SLC4A11 Render the Cells More Vulnerable to Oxidative Insults. **Cornea**, v. 34, n. 6, p. 668-74, Jun 2015. ISSN 1536-4798 (Electronic)  
0277-3740 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25811729> >.
- 115 TANEERA, J. et al. Expression profiling of cell cycle genes in human pancreatic islets with and without type 2 diabetes. **Mol Cell Endocrinol**, v. 375, n. 1-2, p. 35-42, Aug 15 2013. ISSN 1872-8057 (Electronic)  
0303-7207 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23707792> >.