

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

VALDELENA ALESSANDRA DA SILVA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA COMO PARÂMETRO DA EFICÁCIA
TERAPÊUTICA DA LEVOTIROXINA EM PACIENTES COM
HIPOTIROIDISMO PRIMÁRIO**

SÃO PAULO - SP
2016

VALDELENA ALESSANDRA DA SILVA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA COMO PARÂMETRO DA EFICÁCIA
TERAPÊUTICA DA LEVOTIROXINA EM PACIENTES 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 P. Camacho

**São Paulo - SP
2016**

Silva, Valdelena Alessandra da.

Análise da expressão gênica como parâmetro da eficácia terapêutica da levotiroxina em pacientes com hipotireoidismo primário. / Valdelena Alessandra da Silva. 2016.

105 f.

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

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

1. Hipotireoidismo primário. 2. Levotiroxina. 3. RNA-seq.
4. Eficácia terapêutica. 5. Expressão gênica.

I. Camacho, Cléber Pinto.

II. Título.

CDU 616

São Paulo, 12 de dezembro de 2016.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluna: **Valdelena Alessandra da Silva**

Título da Dissertação: **“Análise da expressão gênica como parâmetro da eficácia terapêutica da levotiroxina em pacientes com hipotireoidismo primário”**

Presidente: Prof. Dr. Cléber Pinto Camacho 

Membro: Prof. Dr. Adriano Namor Cury 

Membro: Prof. Dr. José Antonio Silva Júnior 

Dedico este trabalho a Deus, em primeiro lugar, que sempre esteve presente em minha vida e também nesta caminhada, ajudando-me a conquistar o que almejo.

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

Ao meu pai, Paulo César da Silva (*in memoriam*), pelo exemplo de amor, honestidade, força de trabalho e dedicação que levarei comigo por toda a vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Cléber P. Camacho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Nove de Julho (Uninove), pela oportunidade e suporte técnico e científico.

Ao Prof. Dr. Cléber P. Camacho, pela confiança e oportunidade de trabalhar ao seu lado, pela infinita disponibilidade e por ser o maior incentivador na superação dos meus limites, contribuindo para o meu engrandecimento profissional.

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

A Profa. Dra. Ivone Silva Duarte, pela ajuda que resultou no engrandecimento do meu trabalho, por todo o conhecimento compartilhado, pela tranquilidade e disposição no auxílio de minhas dúvidas.

A Profa. Dra. Stella Regina Zamuner, pelo apoio e incentivo no início desta caminhada.

Ao Prof. Dr. Humberto Dellê, por estar sempre disposto a me ajudar com seus sábios conselhos.

Ao Prof. Dr. Daniel Giannella Neto, pela paciência e ajuda nos momentos mais críticos, por inserir conhecimento intelectual na minha trajetória acadêmica.

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

Aos meus colegas de Mestrado, Robson José de Almeida e Lucas dos Santos Bacigalupo, pela parceria e pela certeza de uma revisão ímpar e imprescindível para a produção desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Marvulle por ter nos auxiliado e permitir o andamento deste trabalho.

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

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

À minha amiga, Andrea Harumy de Lima Hirata pela colaboração e apoio.

Ao Centro de Pesquisa e Diagnóstico Molecular de Doenças Genéticas da Escola Paulista de Medicina, departamento de biofísica, pela colaboração essencial neste trabalho. Cumprimento a todos, em especial ao Prof. Dr. João Bosco Pesquero, pela parceria e confiança em nossa pesquisa, assim como a Msc. Patrícia Varella Lima Teixeira e o Msc. Leonardo Martins Silva, pela solicitude e colaboração.

Ao Centro de Pesquisa e Diagnóstico de Doenças Endocrinológicas da Escola Paulista de Medicina, departamento de endocrinologia, especialmente à Msc. Teresa S. Kasamatsu, pela colaboração e auxílio técnico nas análises bioquímicas necessárias em nossa pesquisa.

À FAPESP, por ter acreditado em nosso trabalho e apoio financeiro.

À Brunna Bardez, por ter sido paciente, às suas sugestões primordiais e amizade incondicional.

À minha mãe, Clélia Maria Corrêa Silva, e meus irmãos, Paulo Fabian Filho Silva e Thiago Fabrício Corrêa Silva, que sempre me incentivaram e apoiaram nessa caminhada. Com todo amor, agradeço a todos vocês.

Ao meu pai, Paulo César da Silva (*in memoriam*), que me ensinou a acreditar em minha capacidade, pelo exemplo de amor e trabalho.

A família Ishizu, por sempre acreditar em mim e estar ao meu lado, apoiando-me sempre.

E finalmente, não menos importante, às funcionárias do ambulatório, Bianca Silva Costa, Priscilla Ozorio Alves da Silva e Taiselane Leobas de Alencar, que sempre tiveram à disposição para nos ajudar no que fosse preciso.

RESUMO

O hipotireoidismo é a produção inadequada de hormônio da glândula tireoide ou a ação inadequada de hormônio tireoideano em tecidos-alvo. Entre as disfunções da tireoide, o hipotireoidismo é o distúrbio mais frequente na população em geral, particularmente em mulheres. A levotiroxina sódica (L-T₄) é considerado o fármaco de escolha e mais eficaz como tratamento de reposição ou suplementação nos pacientes com hipotireoidismo em todo o mundo. O objetivo deste estudo foi o de originar um painel de expressão gênica para marcar a resposta terapêutica da levotiroxina em pacientes com hipotireoidismo primário. Foram selecionados 4 indivíduos controle e 8 indivíduos com terapia de levotiroxina, em que 4 são eutireoideanos com tratamento adequado, com TSH sérico entre 0,4mUI/L e 4,0mUI/L, e 4 hipotireoidismo subclínico com tratamento inadequado, com TSH entre 4,1mUI/L e 20,0mUI/L. Amostras de 5mL de sangue venoso foram recolhidas e armazenados em tubos de *PAXgene* RNA. A extração de RNA foi realizada com o kit de extração de RNA *PAXgene* (Qiagen). A biblioteca de transcriptoma foi criada em uma plataforma de NGS, *Ion AmpliSeq Gene human transcriptome*. Mann-Whitney foi usado para comparar os dois grupos. As variáveis contínuas são apresentadas como valores medianos, mínimos e máximos, e Kruskal-Wallis foi usado para comparar os três grupos. Correlação entre os transcritos, TSH e *Zulewski*: Método de *Spearman*. Os dados analisados usando o IBM SPSS *Statistics*. A análise computacional de dados foi realizada em *software* RStudio, Pacote EdgeR v 3.12.0 de *Bioconductor*. Os genes significativos são calculados após um ajuste de *False Discovery Response* (FDR). Foi considerado significativo um $p < 0,05$. A análise de expressão diferencial revelou 179 com aumento e 174 com diminuição na expressão, sendo 289 RNAm e 64 RNA não codificantes. Destes, 2 genes (*CXCR6* e *HTR4*) mostraram um valor absoluto dos *reads* relativamente alto. Construímos um painel capaz de identificar pacientes com resposta inadequada ao tratamento com levotiroxina. Identificamos transcritos, que poderão compor um painel para a avaliação da expressão gênica, servindo como biomarcadores para o diagnóstico do hipotireoidismo primário, mesmo em indivíduos com concentrações de TSH próximas dos valores de referência. Além de marcar a resposta ao uso de levotiroxina, *CXCR6* e *HTR4*, poderão ter utilidade na avaliação da repercussão tecidual do hipotireoidismo.

Palavras-chave: Tireoide. Hipotireoidismo primário. Levotiroxina. RNA-seq. Eficácia terapêutica. Expressão gênica.

ABSTRACT

Hypothyroidism is the inadequate production of thyroid hormone or the inappropriate action of thyroid hormone on target tissues. Among thyroid dysfunctions, hypothyroidism is the most common disorder in the general population, particularly in women. Levothyroxine sodium (L-T₄) is considered the drug of choice and most effective as a replacement or supplementation treatment in patients with hypothyroidism worldwide. The aim of this study was to provide a panel of gene expression to mark the therapeutic response of levothyroxine in patients with primary hypothyroidism. We selected 4 control subjects and 8 subjects with levothyroxine therapy, 4 of whom were euthyroid with adequate treatment, with serum TSH between 0.4mIU/L and 4.0mIU/L, and 4 subclinical hypothyroidism with inadequate treatment with TSH Between 4.1mIU/L and 20.0mIU/L. Samples of 5mL of venous blood were collected and stored in PAXgene RNA tubes. RNA extraction was performed with the PAXgene RNA extraction kit (Qiagen). The transcriptome library was created on an NGS platform, Ion AmpliSeq Gene human transcriptome. Mann-Whitney was used to compare the two groups. Continuous variables are presented as median, minimum and maximum values, and Kruskal-Wallis was used to compare the three groups. Correlation between transcripts, TSH and Zulewski: Spearman's method. The data analyzed using IBM SPSS Statistics. The computational data analysis was performed in software RStudio, Package EdgeR v 3.12.0 of Bioconductor. Significant genes are calculated after a False Discovery Response (FDR) setting. A $p < 0.05$ was considered significant. Differential expression analysis revealed 179 with increase and 174 with decrease in expression, being 289 mRNA and 64 non-coding RNA. Of these, 2 genes (*CXCR6* and *HTR4*) showed an absolute value of the reads relatively high. We constructed a panel capable of identifying patients with an inadequate response to levothyroxine treatment. We identified transcripts that could compose a panel for the evaluation of gene expression, serving as biomarkers for the diagnosis of primary hypothyroidism, even in individuals with TSH concentrations close to the reference values. In addition to marking the response to the use of levothyroxine, *CXCR6* and *HTR4*, they may be useful in evaluating the tissue repercussion of hypothyroidism.

Key-words: Thyroid. Primary hypothyroidism. Levothyroxine. RNA-Seq. therapeutic efficacy. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema representativo do eixo hipotálamo-hipófise-tiroide e regulação dos hormônios tireoidianos. SNC: Sistema Nervoso Central; TRH: Hormônio liberador de tireotrofina; TSH: hormônio estimulante da Tiroide (*Thyroid-stimulating hormone*); T₄: Tiroxina; T₃: Triiodotironina.....17
- Figura 2** – Esquema representativo da biossíntese dos hormônios tireoidianos e as principais vias de sinalização. TSH: Hormônio estimulante da Tiroide (*Thyroidstimulating hormone*); TSHR: Receptor de hormônio estimulante da Tiroide; DUOX: Dupla Oxidase; Tg: Tireoglobulina; H₂O₂: Peróxido de hidrogênio; TPO: Tireoperoxidase; DIT: Diiodotirosina; MIT: Monoiodotirosina; T₃: Triiodotironina; T₄: Tiroxina; I⁻: Iodeto.....19
- Figura 3** – Representação esquemática do mecanismo de ação do receptor do hormônio tireoidiano na presença de T₃. T₄: Tiroxina; T₃: Triiodotiroxina; RXR: Receptor de ácido retinoico; TR: Receptor nuclear de Triiodotironina; TRE: Elemento responsivo ao receptor de triiodotironina; CoA: Proteínas coativadoras; CoR: Proteínas correpressoras; MTB: Maquinaria de Transcrição Basal.....21
- Figura 4** – Estrutura química da levotiroxina sódica.....29
- Figura 5** – Fluxograma com o delineamento do estudo.....42
- Figura 6** – Fluxograma resumido das principais etapas da metodologia.....43
- Gráfico 1** - Correlação entre os valores de TSH (mUI/L) pelo Método A e os valores de TSH (mUI/L) pelo Método B.....51
- Gráfico 2** – Gráfico de expressão gênica, onde o eixo Y representa os valores de LogFC e o eixo X os valores logarítmicos da contagem por milhão (LogCPM), enquanto que os pontos vermelhos identificam os genes com expressão diferencial significativa. No gráfico podemos observar 353 genes diferencialmente expressos, em que 174 estão apresentaram ganho e 179 perda na expressão.....55

Gráfico 3 – Gráfico com o mapa de calor (*Heatmap*) mostrando a capacidade dos genes diferencialmente expressos em individualizar o grupo com eutiroidismo com tratamento adequado (E_TA) e do grupo de hipotireoidismo subclínico com tratamento inadequado (HSC_TI).....56

Gráfico 4 – Gráfico de expressão gênica, onde o eixo Y representa os valores de LogFC e o eixo X os valores logarítmicos da contagem por milhão (LogCPM), enquanto que os pontos vermelhos identificam os genes com expressão diferencial significativa. No gráfico podemos observar 64 genes diferencialmente expressos, em que 26 estão apresentaram ganho e 38 perda na expressão.....57

Gráfico 5 – Gráfico com o mapa de calor (*Heatmap*) mostrando a capacidade dos genes diferencialmente expressos em individualizar o grupo controle (CTL) e do grupo com eutiroidismo com tratamento adequado (E_TA).....58

Gráfico 6 – Classificação dos 21 genes pelo *Panther classification system*.....61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Regulação dos fatores fisiopatológicos por intermédio das desidases....21
- Tabela 2** – Valores medianos, mínimos e máximos, seguidos pelo valor de p das concentrações de TSH, T4L, anticorpos anti-Tg e anticorpos anti-TPO nos 3 grupos.....52
- Tabela 3** – Tempo de diagnóstico, doses de levotiroxina absoluta e dose por quilograma administradas pelos grupos: Controle (CTL), Eutiroidismo com tratamento adequado (E_TA), e Hipotiroidismo subclínico com tratamento inadequado (HSC_TI).....52
- Tabela 4** – Identificação gênica dos transcritos diferencialmente expressos, seus genes correspondentes e o LogFC no grupo eutiroidianos com tratamento adequado, e grupo com hipotiroidismo subclínico com tratamento inadequado.....54
- Tabela 5** – Correlação dos 353 transcritos diferencialmente expressos com os níveis de concentração de TSH, os seus respectivos coeficientes de correlação com a concentração de TSH, a localização citogenética, produto e a possível relação com os tecidos-alvo.....59
- Tabela 6** – Correlação dos 353 transcritos diferencialmente expressos com os valores resultantes do teste de Zulewisk, e respectivos: posição citogenética, Log FC e valor de correlação.....62
- Tabela 7** – Genes selecionados para validação por PCR-RT, com suas classes, LogFC, localização cromossômica, produto, classificação pelo *Panther classification system* e *reads* do grupo com eutiroidismo com tratamento adequado (E_TA) e do grupo com hipotiroidismo com tratamento inadequado (HSC_TI).....63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANDA: *Abbreviated New Drug Application*

Anti-Tg: Anticorpos anti-tireoglobulina

Anti-TPO: Anticorpos anti-tireoperoxidase

BR1: Tampão de ressuspensão 1

BR2: Tampão de ligação 2

BR3: Tampão de lavagem 1

BR4: Tampão de lavagem 2

BR5: Tampão de eluição

C.C.TSH: Coeficiente de correlação entre *reads* e concentração de TSH

C.C.Z: Coeficiente de correlação entre os genes diferencialmente expressos com os valores resultantes do teste de Zulewisk

CoA: Proteínas coativadoras

CoR: Proteínas correpressoras

CTL: Controle

D1: Iodotironina desiodase tipo I

D2: Iodotironina desiodase tipo II

D3: Iodotironina desiodase tipo III

DIT: Diiidotirosina

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DUOX: Dupla oxidase

E_TA: Eutiroidismo com Tratamento Adequado

FDA: *Food and Drug Administration*

FDR: *False Discovery Response*

FSH: Hormônio folículo

estimulante H₂O₂: Peróxido de

hidrogênio hCG: Gonadrotrofina

Coriônica Humana

HSC: Hipotireoidismo subclínico

HSC_TI: Hipotireoidismo com Tratamento Inadequado

I: Iodeto

I₂: Iodo

LAT1: Aminoácido permeasse tipo T1

L-T₄: Levotiroxina sódica

LH: Hormônio Luteinizante

LogFC: Logarítmicos de *Fold-change*

LogCPM: Logarítmicos de contagem por milhão

MCT: Microtubo

MIT:

Monoiodotirosina

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro

MTB: Maquinaria de Transcrição Basal

miRNA: Micro Ácido ribonucleico

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NDA: *New Drug Application*

NGS: *Next Generation Sequencing*

NHANES: *National Health and Nutrition Examination Survey*

NIS: Co-transportador de sódio-iodeto

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

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

PSD: Pendrina

PT: Tubo de processamento

PTH: Hormônios da paratiroide

RDD: Tampão de digestão de DNA

RNA: Ácido ribonucleico

RNFW: Água livre de

RNase Rpm: Rotações

Por Minuto rT₃: T₃ reverso

RXR: Receptor do ácido retinoico

SNC: Sistema Nervoso Central

T₂: 3,3'-diiodo-L-tironina

T₃: 3,5,3'-triiodo-L-tironina ou Triiodotironina

T₄: 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina ou Tiroxina

T₄L: Tiroxina Livre

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Tg: Tireoglobulina

TBG: *Thyroxine-Binding Globulin*

TPO: Tireoperoxidase

TR: Receptor nuclear de triiodotironina

TREs: Elementos responsivos aos hormônios tiroidianos

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

TSH: Hormônio estimulante da Tireoide (*Thyroid-stimulating hormone*)

TSHR: Receptor de Hormônio Estimulante da Tireoide

USP: *United States Pharmacopeia*

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	16
1.1 MECANISMOS DE AÇÃO DOS HORMÔNIOS TIROIDIANOS.....	17
1.1.1 Homeostase do eixo hipotálamo-hipófise-tiroide.....	17
1.1.2 Homeostase tecido específica.....	19
1.2 HIPOTIROIDISMO.....	22
1.2.1 Hipotiroidismo primário.....	23
1.2.2 Fármacos e compostos químicos antitiroidianos.....	25
1.2.3 Diagnóstico.....	25
1.2.4 Complicações clínicas.....	26
1.2.5 Farmacoterapia.....	28
1.3 MEDICINA PERSONALIZADA.....	33
1.4 TRANSCRIPTOMA.....	35
1.5 SEQUENCIADORES DE NOVA GERAÇÃO.....	36
2.0 JUSTIFICATIVA	39
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	40
3.1.1 Critérios de Inclusão.....	40
3.1.2 Critérios de Exclusão.....	41
3.1.3 Coleta e armazenamento.....	41
3.1.4 Delineamento do estudo.....	42
3.1.5 Análise bioquímica.....	43
3.1.6 Extração de RNA total.....	44
3.2 REALIZAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA.....	44
3.2.1 Quantificação de RNA total.....	45
3.2.2 Síntese de cDNA.....	45
3.2.3 Amplificação das sequências-alvo.....	46
3.2.4 Preparo das sequências iniciadoras.....	46
3.2.5 Ligação dos <i>barcodes</i> aos <i>amplicons</i>	46
3.2.6 Purificação da biblioteca.....	47
3.2.7 qPCR.....	47
3.2.8 PCR de emulsão.....	48
3.2.9 Hibridização das <i>beads</i> magnéticas.....	49

3.2.10 Preparo dos <i>chips</i>	49
3.3 BIOINFORMÁTICA.....	50
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
4.0 RESULTADOS.....	51
5.0 DISCUSSÃO.....	64
6.0 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
APÊNDICES.....	90

1.0 INTRODUÇÃO

A tireoide é a primeira glândula endócrina a se desenvolver no embrião humano, origina-se após vinte e dois dias da concepção, surgindo da invaginação e espessamento do assoalho da faringe primitiva, seguida pela migração em direção caudal até a base do pescoço e atinge a sua forma definitiva aos 51 dias [1,2,3]. A glândula tireoide está localizada na região inferior do pescoço e estende-se da quinta vértebra cervical até a primeira vértebra torácica, encontrando-se intensamente vascularizada. É uma glândula em formato de borboleta formada por lobos laterais alongados, direito e esquerdo, ligados por um istmo mediano [3].

A unidade funcional básica da glândula tireoide são os folículos, compostos por uma camada externa de células cuboides circundadas pela membrana basal, envolvendo um material amorfo denominado coloide. Uma proteína de elevado peso molecular é armazenada por este material, que é sintetizada pelas células da tireoide e secretada para o lúmen do folículo. Desde 1956, com a descrição precursora de Roitt *et al.* sabemos que a Tg apresenta variações significativas nas respostas autoimunes [5,6] e compõe a unidade base para a formação dos hormônios tireoidianos [4].

A tireoide sintetiza e secreta os hormônios tireoidianos, 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina ou Tiroxina (T_4) e 3,5,3'-triodo-L-tironina ou Triiodotironina (T_3), sendo a liberação do T_4 de 100 a 125nmol diariamente. A meia-vida do T_4 é de aproximadamente de 7 a 10 dias, sendo que a principal fonte de produção de T_3 advém da conversão do pró-hormônio T_4 em T_3 por meio da 5`desiodação de T_4 em tecidos periféricos promovida pelas desiodases [7].

Os hormônios tireoidianos têm a função de regular o consumo energético e são indispensáveis para o crescimento, desenvolvimento e maturação de vários órgãos. A atividade do sistema endócrino é regulada pelo mecanismo de *feedback*, que através do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide gera ação em diversos tecidos [8,10]. Entre outras funções, destaca-se o estímulo da frequência cardíaca, da síntese proteica e do metabolismo glicídico, tal como, o aumento da síntese de degradação do colesterol e triglicerídeos [8,9].

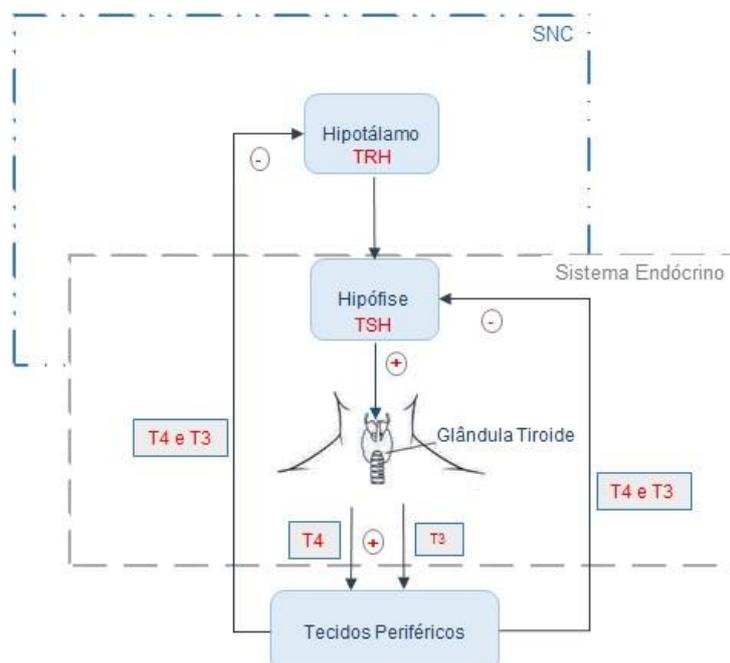
1.1 MECANISMOS DE AÇÃO DOS HORMÔNIOS TIROIDIANOS

1.1.1 Homeostase do eixo hipotálamo-hipófise-tiroide

A homeostase do eixo hipotálamo-hipófise-tiroide regula as concentrações dos hormônios tireoidianos produzidos pelas células tireoidianas até o seu transporte para os diversos tecidos. A regulação dos hormônios tireoidianos ocorre pelo eixo hipotálamo-hipófise-tiroide, onde o hipotálamo através do hormônio liberador de Tireotrofina (*Thyrotropin-releasing hormone*, TRH) estimula a hipófise anterior a liberar o hormônio estimulante da Tireoide (*Thyroid-stimulating hormone*, TSH), induzindo a glândula tiroide para gerar e secretar os hormônios tireoidianos para os tecidos periféricos (Figura 1). Essa regulação altera a taxa de secreção do TRH pelo hipotálamo e como tem principal efeito reduzir a resposta dos tirótrofos ^[11].

No processo do mecanismo de retroalimentação (*feedback*) quando a concentração de T₄ circulante está baixa, ocorre o aumento dos receptores de TRH e conseqüentemente um aumento de síntese de TSH circulante, tanto pelo hipotálamo como pela hipófise, o contrário também ocorre na presença de altas concentrações de hormônios tireoidianos ^[10,12,13].

Figura 1. Esquema representativo do eixo hipotálamo-hipófise-tiroide e regulação dos hormônios tireoidianos. SNC: Sistema Nervoso Central; TRH: Hormônio liberador de tireotrofina; TSH: hormônio estimulante da Tireoide (*Thyroid-stimulating hormone*); T₄: Tiroxina; T₃: Triiodotironina.

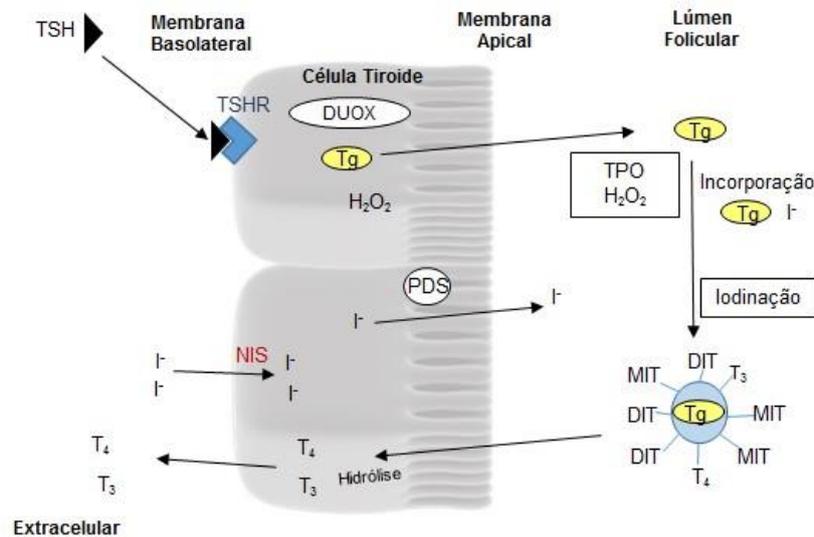


A autorregulação da tiroide é mais um mecanismo importante na regulação da síntese dos hormônios tireoidianos. Esse processo é fundamentado na alteração da sensibilidade da glândula tiroide ao TSH, onde o excesso de iodo reduz a produção de peróxido de hidrogênio impedindo a síntese de hormônios tireoidianos, conhecido como efeito Wolff-Chaikoff [14,15].

O TSH é uma glicoproteína heterodimérica, com massa molecular de 28kDa constituída por duas subunidades não covalentes denominadas α e β , no entanto, a subunidade α também é comum nos Hormônios Luteinizantes (LH), hormônio folículo estimulante (FSH) e Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG). A partir do estímulo do TSH que é sintetizado na hipófise anterior, o mecanismo de ação dos hormônios tireoidianos é iniciado (Figura 2) [16].

Por sua vez, o TSH ativa o seu receptor (TSHR) localizado na membrana basolateral do tirocito. Adiante o iodo (I_2) é convertido em iodeto (I^-) pela peroxidase, ocorrendo a captação do mesmo do líquido extracelular para as células foliculares tireoidianas, pelo co-transportador de sódio-iodeto (NIS) na membrana basolateral [14]. Simultaneamente ocorre o transporte dos iodetos do líquido extracelular para as células glandulares e os folículos da tiroide. A membrana basolateral da célula tireoidiana faz a captação de iodeto para o interior da célula. Por consequência, na membrana apical das células foliculares da tiroide a pendrina (PDS) medeia o efluxo de I^- para o lúmen folicular. Por invaginação, a Tg migra para o lúmen folicular na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é sintetizado pelo complexo sistema de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidases e Dupla Oxidase (DUOX). Nesse processo a Tireoperoxidase (TPO) é importante, trata-se de uma glicoproteína de membrana composta de 933 aminoácidos com peso molecular entre 220 e 230 kDa na forma dimérica funcional [17], e participa promovendo a oxidação e acoplamento do I^- na Tg. Deste modo, este acoplamento oxidativo é catalisado pela mesma peroxidase, formando as iodotirosinas, moniodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT) [14,15].

Figura 2. Esquema representativo da biossíntese dos hormônios tireoidianos e as principais vias de sinalização. TSH: Hormônio estimulante da Tireoide (*Thyroid-stimulating hormone*); TSHR: Receptor de hormônio estimulante da Tireoide; DUOX: Dupla Oxidase; Tg: Tireoglobulina; H₂O₂: Peróxido de hidrogênio; TPO: Tireoperoxidase; DIT: Diiodotirosina; MIT: Monoiodotirosina; T₃: Triiodotironina; T₄: Tiroxina; I⁻: Iodeto.



Além disso, ocorre a geração dos hormônios T₄ e T₃, que acoplados a Tg são recaptados pela célula e seguem com a proteólise. Após este processo, os hormônios são liberados na corrente sanguínea, e simultaneamente ocorre a devolução do iodo ao coloide, o que permite o reaproveitamento destas substâncias pela célula tireoideana [18].

1.1.2 Homeostase Tecido Específica

A homeostase tecido específica é composta pelos mecanismos de entrada dos hormônios nas células dos diversos tecidos, a conversão periférica intracitoplasmática do T₄ em T₃ pelas desidases (ou sua inativação, através da conversão para o T₃ reverso), o acoplamento aos receptores nucleares específicos (TRα₁, TRα₂, TRβ₁ e TRβ₂) e a regulação da expressão gênica através da ligação com os elementos responsivos aos hormônios tireoidianos (TREs) [7,19-21].

Na circulação, os hormônios tireoidianos ligam-se a uma variedade de proteínas plasmáticas, ainda que uma pequena parcela de ambos permaneça na sua forma livre. Enquanto o T₄ é produzido pela tireoide, a maioria do T₃ circulante é proveniente da

desiodação do T₄ nos tecidos não tiroidianos, como rim e fígado. No mecanismo de desiodação via anel fenólico ou tirosídico das iodotironinas, as desiodases agem eliminando de forma catalítica o iodo e podem fazê-lo em diferentes sítios via 5` desiodases convertendo T₄ em T₃ ou em metabólitos inativos como o T₃ reverso (rT₃) ou 3,3'-diiodo-L-tironina (T₂) [21-23].

As enzimas desiodases são: as iodotironinas desiodases tipo I, II e III (D1, D2 e D3 respectivamente). D1 e D2 convertem o T₄ em T₃ que é o hormônio biologicamente ativo enquanto, D1 e D3 convertem o T₄ em rT₃, D3 também é responsável pela inativação do T₃, convertendo-o a T₂ [22,24].

A indução de D1, D2 e D3 regula vários fatores fisiopatológicos que podem modificar a deiodinação em um determinado tecido (Tabela 1) [25-28].

Tabela 1. Regulação dos fatores fisiopatológicos por intermédio das desiodases.

Desiodases	D1	D2	D3
Tecidos-alvo	Fígado, Rim e Tireoide	Hipófise, Cérebro, Tecido adiposo marrom, Placenta, Tireoide, Músculos cardíaco e esquelético	Hipófise, Cérebro, Útero, Placenta, Tecidos fetais e Pele
Função Fisiológica	Supre T ₃ para o plasma	Supre T ₃ para o espaço intracelular	Inativa T ₄ e T ₃
Ação dos hormônios tiroidianos	Aumenta	Diminui	Aumenta

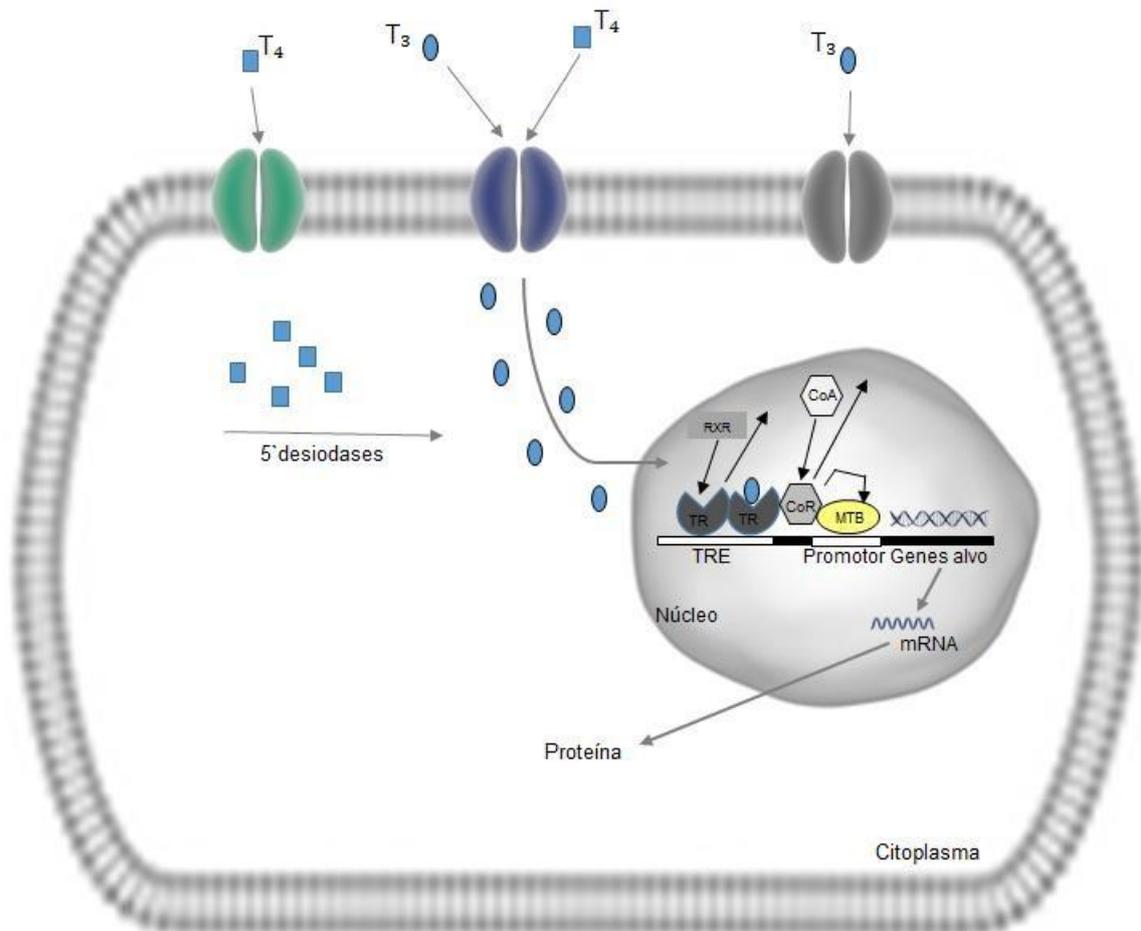
D1: Iodotiroina desiodase tipo I; D2: Iodotiroina desiodase tipo II; D3: Iodotironina desiodase tipo III; T₄: Tiroxina; T₃: Triiodotironina.

Assim, as vias de desiodação ocorrem no interior das células-alvo, entretanto Bianco *et al.* sustenta que a sinalização do hormônio tiroidiano em células não é refletida pelos níveis de hormônio da glândula tiroide no plasma [7].

Os efeitos dos hormônios tiroidianos são mediados por seus receptores, Receptores nucleares de Triiodotironina (TR), e estes são codificados por dois genes distintos, α (*TR α*) e β (*TR β*), localizados no cromossomo 17 e 3, respectivamente [8]. Em consequência ao *splicing* alternativo e utilização interpolada do promotor, o gene *TRH α* pode originar seis isoformas; TR α 1, TR α 2, TRD α 1, TRD α 2, P46 e P28. Da mesma maneira, o gene *TRH β* gerar as isoformas: TR β 1, TR β 2 e TRH β . Exclusivamente, TR β 1, TR β 2, TR α 1 são receptores efetivos na interação de um domínio ao DNA. Membros da superfamília dos receptores nucleares, essas isoformas

apresentam expressões específicas para cada tecido. Posto que, mutações no TR podem originar diversos sintomas clínicos, que são dependentes do TR afetado. Portanto, uma complexa rede de mecanismos de transcrição e alteração pós-transcricional medeiam a expressão do gene, propiciando que os receptores são fatores de transcrição modulares que se ligam em sequências específicas de DNA, chamados de elementos responsivos ao receptor de triiodotironina (TREs) (Figura 3) [11,29].

Figura 3. Representação esquemática do mecanismo de ação do receptor do hormônio tireoideano na presença de T_3 . T_4 : Tiroxina; T_3 : Triiodotiroxina; RXR: Receptor de ácido retinoico; TR: Receptor nuclear de Triiodotironina; TRE: Elemento responsivo ao receptor de triiodotironina; CoA: Proteínas coativadoras; CoR: Proteínas corepressororas; MTB: Maquinaria de Transcrição Basal.



O Receptor nuclear de Triiodotironina (TR) dependendo da ligação com o receptor de ácido retinoico (RXR) pode gerar um homodímero ou heterodímero [30].

Em vista disso, o TR encontra-se ligado ao TR, formando um homodímero. O acoplamento do T₃ ao TR gera uma mudança conformacional na estrutura do receptor formando um complexo, que dissocia o homodímero (TR-TR) e possibilita a associação do TR ao RXR (heterodímeros). Esta mudança conformacional estimula a liberação das proteínas corressoras (CoR) e a junção do TR as proteínas coativadoras (CoA). Assim, recrutam a Maquinaria de Transcrição Basal (MTB) e acionam a transcrição dos genes-alvo, modulando a expressão do gene [12,29,31,32].

1.2 HIPOTIROIDISMO

O hipotiroidismo é uma decorrência da produção inadequada de hormônio da glândula tireoide ou a ação inadequada de HT em tecidos-alvo. Entre as disfunções da tireoide, o hipotiroidismo é o distúrbio mais frequente na população em geral, particularmente em mulheres [33,34]. Segundo o *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES 1999-2002), 3,7% da população dos EUA tem hipotireoidismo, sendo mais comum em mulheres [35]. Na população mundial atinge cerca de 4% a 10% das pessoas [36]. Segundo Kajantie *et al.* as chances de uma mulher desenvolver hipotiroidismo aumenta 4,4 vezes em mulheres com baixo peso ao nascer e baixo índice de massa corporal durante a infância [37]. O estudo em Framingham numa população de homens e mulheres acima de 60 anos encontrou hipotiroidismo em 4,4% dos indivíduos com concentração de TSH maior que 10mUI/L, destes, 39% tinham baixos níveis Tiroxina Livre (T₄L) [38].

Em NHANES (1999-2002) foi demonstrado que as chances de possuir hipotiroidismo foram cinco vezes maiores em pessoas com idade superior a 80 anos, do que em indivíduos com idade inferior [35]. Surks e Hollowell *et al.* consideram que a elevação da concentração de TSH em indivíduos acima de 80 anos de idade é uma adaptação fisiológica ao envelhecimento, o que justifica a maior prevalência na população idosa [39].

A prevalência de hipotiroidismo no Brasil, na cidade do Rio de Janeiro foi de 12,3% em mulheres adultas. Na região metropolitana de São Paulo foi de 8% na população geral [36].

O risco de desenvolver hipotireoidismo, também aumenta com a idade avançada, anticorpos antitiroídicos e sexo feminino [37]. Segundo Vanderpump *et al.*, dentre o sexo feminino o risco para mulheres de 50 anos de idade com concentração de TSH de 6,0mUI/L e 9,0mUI/L é de 57% e 71%, respectivamente [40].

Em um ensaio longitudinal ao longo de 12 anos, Stuckey *et al.* e colaboradores descobriram que o hipotireoidismo foi desenvolvido em 38% das mulheres estudadas que tiveram um passado histórico de disfunção pós-parto da tireoide. Em comparação, apenas 4% das mulheres que não tiveram disfunção pós-parto da tireoide desenvolveram hipotireoidismo [41].

A prevalência de hipotireoidismo é muito variável nas diversas partes do mundo, sendo maior em locais com deficiência de iodo na dieta. Inversamente, o excesso de iodo tem sido observado, o qual pode ocorrer em consequência do uso de corantes de radiocontrastes, amiodarona, suplementos alimentares e algas [42].

O excesso de iodo pode inibir transitoriamente a organificação de iodeto e a síntese de hormônios tireoidianos, denominado de efeito Wolff-Chaikoff, fenômeno de resposta de curta duração porque o co-transportador de sódio-iodeto é capaz de regulação negativa (*downregulation*), inibindo a organificação da glândula tireoide [42]. Em indivíduos com hipotireoidismo, o excesso de iodo pode induzir o hipotireoidismo sustentado em indivíduos com tireoidite [43]. Conforme Pearce *et al.*, o solo em grandes áreas geográficas no mundo é deficiente em iodo e a estimativa de 29% da população mundial vive nessas áreas. Por exemplo, acontece em regiões montanhosas como o Himalaia, os Andes, Alpes europeus, onde o iodo é lavado pelas inundações e glaciação. Como também ocorre em regiões de planície distantes de oceano, tal como na Europa Ocidental, na África Central [44].

O hipotireoidismo pode ser primário quando decorre de falência da glândula tireoide [45,46].

1.2.1 Hipotireoidismo Primário

O hipotireoidismo primário é considerado a disfunção tireoidiana mais prevalente, manifesta-se mais frequentemente nas mulheres e aumenta a incidência com a idade [47,48].

Quando se observa no hipotiroidismo primário uma elevada concentração de TSH na presença de T₄L corresponde ao hipotiroidismo clínico, diferentemente, quando se percebe uma elevada concentração de TSH e T₄L dentro do valor de referência categoriza o hipotiroidismo subclínico (HSC) [35].

De acordo com o NHANES III, a prevalência do HSC em adultos nos Estados Unidos é de 4,3% da população [48], encontrando-se variância entre 4% e 20% em diferentes estudos [49].

A taxa de conversão de hipotiroidismo subclínico para hipotiroidismo clínico é de 2% a 6% [51]. Conforme Somwaru *et al.* a taxa foi maior para indivíduos que tinham concentração de TSH entre 4,5mUI/L e 10,0mUI/L com a presença de anticorpos positivos [52]. Semelhantemente, Fatourech *et al.* demonstrou que cerca de 80% dos pacientes com HSC e concentração de TSH menor que 10,0mUI/L apresentavam anticorpos positivos para TPO [53].

As causas de hipotiroidismo primário são: tiroidite linfocítica crônica (autoimune), tiroidite pós-parto, tireoidite subaguda (granulomatosa), anomalias congênitas, deficiência de iodo, doenças infiltrativas, sendo que, formas de iatrogenias de hipotiroidismo podem intercorrer de tireoidectomia, radioiodoterapia, hipotiroidismo induzido por fármacos antitiroidianos [33,35,37,54].

Dentre elas, a causa de hipotiroidismo primário mais frequente é a tiroidite linfocítica crônica, conhecida como tiroidite autoimune de Hashimoto [55]. Estes pacientes apresentam o processo crônico autoimune contra a glândula tiroide com infiltração linfocítica e destruição dos tirocitos. Na tiroidite autoimune de Hashimoto o corpo considera os antígenos da tiroide como estranhos, seguida de uma reação imune crônica e resulta em infiltração linfocítica da glândula e destruição progressiva do tecido funcional da tiroide. Inicialmente pode manifestar-se na forma de bócio, que na maioria dos casos, regride gradativamente de tamanho. Outra forma de apresentação é como tiroidite atrófica por processo fibrótico destrutivo da glândula. A maioria dos indivíduos afetados terão autoanticorpos circulantes contra a glândula tiroide, como o anticorpo anti-tireoperoxidase (anti-TPO), que é o mais específico, e anticorpo anti-tireoglobulina (anti-Tg) [16,55]. Os anticorpos podem não estar presentes no início da doença, podem variar e desaparecer ao longo do tempo, no entanto a sua ausência não exclui o diagnóstico de tiroidite linfocítica crônica [55].

Os anticorpos anti-TPO têm sido associados ao aumento do risco de aborto e infertilidade [56]. A investigação de anticorpos anti-Tg é indispensável no acompanhamento de pacientes com carcinoma de tireoide [57].

1.2.2 Fármacos e compostos químicos antitiroidianos

Uma variedade de medicamentos pode induzir o hipotireoidismo. Os fármacos antitiroidianos mais comuns, como os tioureílenos (carbimazol, metimazol, propiltiouracila), reduzem a liberação de hormônios tiroidianos. Os fármacos que interferem na concentração do TSH, como os glicocorticoides, amiodarona (antiarrítmico). Eles bloqueiam a conversão periférica de T_4 para T_3 nos tecidos, e consequentemente, na supressão do TSH. No entanto, a amiodarona, assim como os contrastes iodados, diminuem a concentração sérica de T_3 com moderada elevação de T_4 pela inibição de DI e DII. Isto também é possível no uso de suplementos de iodo ou alimentos naturais com alto teor de iodo. O lítio tem efeitos semelhantes ao iodeto [58,59].

Fármacos que contribuem para o metabolismo acelerado dos hormônios tiroidianos, como o fenobarbital (anticonvulsivante), ou a diminuição da absorção dos hormônios tiroidianos, como o sulfato ferroso [60].

Compostos orgânicos também podem apresentar ação antitiroidiana, como os derivados de fenol (resorcinol) e composto de ácido benzoico, por exemplo, o ácido p-aminosalicílico, sulfonilureia orais, fenilbutazona e aminoglutetimida [61]. Tal qual a poluição industrial com bifenilos policlorados e perclorato [62,63]. Também, os inibidores de tirosina quinase [64].

1.2.3 Diagnóstico

Para o diagnóstico de hipotireoidismo o ensaio de TSH é realizado com prontidão e a ferramenta mais sensível. Esse ensaio possui uma relação log-linear inversa que é estabelecida entre T_4L e TSH, devido ao aumento exponencial nas concentrações de TSH relacionados a reduções lineares dos T_4L [54,65,66]. O intervalo de referência geralmente aceito é de 0,40mUI/L a 4,2mUI/L. É importante salientar, que os valores

da concentração de TSH tanto em indivíduos saudáveis como em pacientes com HSC variam ao longo do dia, apresentando valores mais elevados a tarde e noite. Assim sendo, é recomendável repetir os testes de concentração de TSH, no mínimo, com três meses de intervalo para um diagnóstico preciso [51,67].

Se os níveis de TSH estiverem acima do intervalo de referência, o passo seguinte é medir T4L. O T4L é altamente ligado às proteínas (99,97%): aproximadamente, 85% ligado à *thyroxine-Binding Globulin* (TBG), 10% ligado à préalbumina de ligação à tiroide (transtirretina) e o restante ligado frouxamente à albumina [48].

Os ensaios para a detecção dos anticorpos anti-TPO e anticorpos anti-Tg, podem ser úteis na determinação da etiologia de hipotiroidismo ou de seu prognóstico, também nas doenças autoimunes [40,68]. No entanto, após identificação de anticorpos positivos, o teste de anticorpos pouco acrescenta para o quadro clínico, portanto não é mais recomendado [57].

1.2.4 Complicações clínicas

Os sintomas observados no hipotiroidismo são: bradicardia, reflexo de aquileu lentificado, pele seca, letargia, fala lentificada, fraqueza, adinamia, diminuição do volume de suor, pele fria, edema de pálpebras, intolerância ao frio, macroglossia, edema facial, mixedema, cabelo seco, unhas quebradiças, palidez da pele, perturbações da memória, constipação intestinal, ganho de peso, perda de cabelo, dispneia, rouquidão, nervosismo, menorragia, surdez, abafamento de bulhas cardíacas, dor precordial e baixa acuidade visual [69]. No hipotiroidismo subclínico, Joffe *et al.* percebeu que havia diferença nos sintomas de hipotiroidismo entre eutiroidianos e indivíduos com HSC, sendo ambos com concentração de TSH menor que 10,0mUI/L, apenas no cansaço [70].

A participação do hormônio tiroídiano com a homeostasia da fisiologia cardiovascular, assim como a modulação da contratilidade do miocárdio, frequência cardíaca, função diastólica e resistência periférica, promove possíveis alterações cardiovasculares, principalmente insuficiência cardíaca, principalmente no hipotiroidismo subclínico [50,71-74]. Estudos demonstraram que HSC com concentração de TSH maior que 10,0mUI/L pode provocar alterações cardíacas funcionais,

especificamente, função cardíaca sistólica e diastólica afetada, disfunção vascular com função endotelial alterada e aumento da rigidez vascular [50,75].

A associação entre a disfunção tiroídiana e perfil lipídico nos indivíduos com hipotireoidismo clínico ou subclínico está estreitamente relacionada à dislipidemia e consequentemente ao risco cardiovascular [76]. A relação entre anormalidades lipídicas e HSC foram investigadas por diversos estudos e descobriram que HSC está associado com a elevação de triglicérides, colesterol total e lipoproteínas de baixa densidade [77,78].

A ação do hormônio tiroídiano na ortopedia não está estabelecida, compreende-se que o T₃ estimula vias diretas e indiretas do ciclo da remodelação óssea, reabsorção, formação e proliferação de osteoclastos, aumenta a expressão de osteocalcina, colágeno tipo I, fosfatase alcalina, metaloproteínas, diferenciação celular. Inclusive, o T₃ se associa com os hormônios osteoclastogênicos, como os Hormônios da paratiroide (PTH) e vitamina D. A interação e alterações dos hormônios tiroídianos aos receptores tiroídianos ósseos α 1 pode dar indícios de problemas nesse metabolismo [79].

As manifestações de doenças renais e repercussões clínicas são evidentes no hipotireoidismo. O hormônio tiroídiano atua diretamente na expressão e atividade dos canais iônicos celulares e transportadores. Basu et al. relata o aumento dos níveis séricos de creatinina no hipotireoidismo [80].

O cuidadoso controle hormonal também é fundamental na gravidez. As suas repercussões podem levar às complicações gestacionais que incluem pré-eclâmpsia, diabetes gestacional, parto prematuro e abortamento. O excesso, mas também a falta do hormônio tiroídiano pode interferir sobre o desenvolvimento de estruturas neurológicas do feto e retardo mental. [81].

Similarmente evidenciado por Ashoor *et al.* e Lazarus *et al.* demonstram que mesmo com a concentração de TSH encontrando-se ligeiramente aumentada, está associada com risco aumentado de morte fetal e aborto [82,83]. Dois estudos chineses também correlacionam elevada concentração de TSH no início da gravidez com desenvolvimento neuropsicológico diminuído em recém-nascidos de 25 a 30 meses [84,85].

Não obstante, alterações de humor são evidentes em pacientes com hipotireoidismo clínico e subclínico, assim como depressão, disfunções cognitivas, falta de memória [70,86-88].

Embora o hipotireoidismo subclínico, seja muitas vezes assintomático, numa população idosa foi observado um aumento de disfunção cognitiva [89].

O tratamento de escolha para os sintomas do hipotireoidismo é a Levotiroxina sódica (L-T₄), que dispõe de propriedades farmacocinéticas favoráveis e quando administrada na dose adequada assegura uma eminente eficácia terapêutica [90,91].

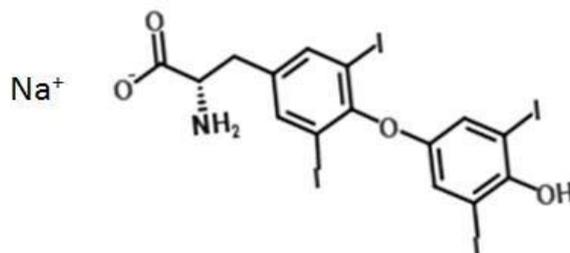
1.2.5. Farmacoterapia

A farmacoterapia tem como objetivo a redução da mortalidade e prevenção das complicações hormonais da tireoide, portanto é administrado para completar ou substituir a produção endógena dos hormônios tireoidianos. A reposição da monoterapia de Levotiroxina sódica (L-T₄) constitui-se no tratamento terapêutico consagrado do hipotireoidismo clínico e subclínico. A L-T₄ em doses individualizadas de acordo com a resposta do paciente, é considerado o fármaco de escolha e mais eficaz como tratamento de reposição ou suplementação nos pacientes com hipotireoidismo em todo o mundo [91,92]. Nos Estados Unidos é o quarto medicamento mais comum nos últimos anos [93].

A princípio, a tiroxina foi sintetizada em 1907 por Harington e Barger, e isolada na forma cristalina por Kendall em 1915 [94,95]. A levotiroxina sódica (L-T₄) é um levoisômero sintético idêntico ao hormônio tiroxina endógeno (T₄) produzido pela glândula tiroide [96]. Sua massa molecular é de aproximadamente 798,851807 dáltons e a sua fórmula estrutural é um sal inodoro, higroscópico, insípido, a qual é acrescentada apenas uma molécula de sódio para proporcionar maior absorção intestinal (Figura 4)

[38].

Figura 4. Estrutura química da levotiroxina sódica.



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

Nota-se que o uso terapêutico de L-T₄ no tratamento de hipotireoidismo ocorre na conversão periférica do pró-hormônio tiroxina (T₄), administrado via exógena, no seu hormônio de metabolismo ativo, o T₃ [77]. Esta ativação ocorre por intermédio de duas enzimas D1 e D2 [28].

O mecanismo de ação do T₄ sintético, aumenta a taxa metabólica basal, amplia a utilização e mobilização dos estoques de glicogênio, promove a gliconeogênese e estimula a síntese proteica [38]. Considera-se que seus principais efeitos ocorrem através do controle da transcrição de DNA e as síntese de proteínas [29,30,32].

Em adultos o tratamento de L-T₄ via oral é iniciado geralmente com uma dose aproximada de 1,5µg/kg ao dia, de preferência 30 minutos a 60 minutos antes do café da manhã. Pacientes idosos e pacientes com doença arterial coronariana iniciam com uma dose inferior, sendo ajustada gradativamente, de 12,5 a 50,0µg por dia. A recomendação de algumas diretrizes para o tratamento com L-T₄ é relacionada à concentração de TSH. As concentrações de TSH acima de 10,0mUI/L são habitualmente indicativas de tratamento, mas mesmo níveis abaixo de 10,0mUI/L serão associados com algumas condições clínicas, desde que estáveis por algumas semanas à meses [10,97]. Os pacientes com hipotireoidismo devem ser tratados com dose de L-T₄ adequada para manter o TSH dentro do intervalo de referência, a fim de reduzir ou eliminar os efeitos indesejáveis [98]. Os ajustes das doses devem ser realizados nas presenças significativas no peso corporal, com a gravidez e

envelhecimento [99]. Do ponto de vista legal, o método segundo a *Food and Drug Administration* (FDA) tem o objetivo de alcançar a biodisponibilidade de formulações individuais aprovadas [90].

L-T₄ é um composto anfótero com dois grupos ácidos e um básico que interferem na sua dissolução e conseqüentemente na absorção [18,100]. Contudo, a absorção gastrointestinal da formulação de comprimidos de L-T₄ administrado por via oral é de aproximadamente 60% a 90% em jejum. O tempo de pico plasmático é de 2 horas a 4 horas, ocorrendo a maior parte no jejuno e íleo superior [101].

O pH ácido no estômago, como ocorre no jejum, é importante para a absorção de uma dose de L-T₄ administrada via oral. Recomenda-se que L-T₄ deve ser administrada com o estômago vazio para que atinja a absorção máxima, o que reflete a influência da acidez gástrica no processo [102-104]. Do mesmo modo foi demonstrado por Centanni *et al* que a acidez gástrica desempenha um papel importante na absorção de L-T₄. Realmente, os pacientes com gastrite atrófica ou por relacionada com *Helicobacter pylori* exibem um aumento da dose de L-T₄ em comprimido [105].

Desta maneira, o mesmo estudo de Centanni *et al* demonstrou que em pacientes com distúrbios endócrinos que tomam L-T₄ em diferentes horários de ingestão, terão maior absorção intestinal do hormônio quando ingerido antes do café da manhã em jejum [105]. De fato, o aumento do pH gástrico pode alterar a dissolução e a solubilidade do fármaco [106], além de interferir na absorção, pode aumentar a sua depuração [92,105].

Na tentativa de minimizar o problema de má absorção do fármaco devido ao aumento do pH gástrico, um estudo recente realizado na Universidade de Brescia, na Itália, obtém resultados que confirmam pela primeira vez, em um duplo-cego, que a formulação líquida de L-T₄ pode ser administrada no café da manhã, demonstrando que uma normalização reversível dos níveis de TSH em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica [107].

Por outro lado, muitos fármacos têm sido relatados por interferir na absorção gastrointestinal de L-T₄ e minimizar a sua eficácia, sendo os mais usuais, sulfato ferroso, hidróxido de alumínio, carbonato de cálcio, colestiramina, sucralfato, inibidores de bomba de prótons, inibidores de tirosina quinase, carbonato de cálcio, indutores de enzimas, fenobarbital, fenitoína, carbamazepina, rifampicina, sertralina

[67,97,99,108,109]. O uso de contraceptivos e gravidez estão associados a mudanças na TGB, as quais também podem afetar a dosagem de hormônio da tireoide [102].

A absorção de L-T₄, também pode ser afetada por estados de má absorção, doença do intestino delgado, como a doença celíaca [102].

A meia-vida de tiroxina endógena é de aproximadamente 9 a 10 dias em pacientes hipotiroídianos e 6 a 7 dias em pacientes eutiroídianos, o que permite dosagem uma vez ao dia, entretanto, a sua atividade biológica pode ser mantida por um período mais longo. Os efeitos de L-T₄ administrado via oral são observados dentro do período de três a cinco dias. A meia-vida varia de acordo com o estado da tireoide, para hipotiroídiano de nove a dez dias e para eutiroídiano de três a quatro dias [97,98,103,104].

Os hormônios tireoidianos circulantes estão ligados em mais de 99% com as proteínas plasmáticas, principalmente à TBG, pré-albumina de ligação a tiroxina e menos ativamente à albumina, cujas capacidades e afinidades variam para cada hormônio. Os hormônios tireoidianos atravessam a barreira placentária nas primeiras semanas de gestação. Desse modo, a L-T₄ é secretada no leite materno, mas não o suficiente para corrigir o hipotiroidismo no lactente [110].

Os efeitos adversos em caso de sobredosagem são sinais de tireotoxicose ocasionando taquicardia, tremor, sudorese, similar em caso de ligeira sobredosagem que ocasiona risco de fraturas osteoporóticas e fibrilação atrial, especialmente em idosos [50,97]. Uma meta-análise de estudos randomizados e controlados para o tratamento de hipotiroidismo clínico com terapia combinada de T₄ e T₃ contra a monoterapia de T₄ não encontrou diferença na eficácia terapêutica entre as terapias em relação aos efeitos colaterais, como dor física, fadiga, peso corporal, ansiedade, depressão, qualidade de vida e outros [111]. Existe controvérsia no que se refere a terapia de combinação sobre sua segurança e eficácia, e um consenso de que não é melhor do que a monoterapia de T₄ [90,112,113].

A monitoração do tratamento com L-T₄ é sustentada com o ensaio de TSH no sangue, e o ajuste da dose deve ser considerado após 6 a 12 semanas, devido a meia-vida longa de L-T₄ [97].

De acordo com o estudo de Turner *et al.* e colaboradores foi demonstrado que um aumento em 3 vezes de fraturas em usuários de L-T₄ com idade superior a 70

anos [114]. No entanto, Negro *et al.* afirma que o tratamento com L-T₄ pode diminuir o risco de aborto [56].

A despeito de várias marcas disponíveis no mercado sejam consideradas bioequivalentes, o *US Department of Health and Human Services* da FDA e Green *et al.* nos Estados Unidos, acreditam que a bioequivalência terapêutica e a intercambiabilidade é questionável [90,115]. Do ponto de vista prático, existem várias descrições de casos em que pacientes sofreram efeitos deletérios produzidos pela intercambiabilidade entre marcas diferentes de L-T₄ sem a recomendação de um médico. Estudos relatam problemas de bioequivalência de fármacos, como marca que contém de 25% a 35% menos princípio ativo [116-120].

Segundo a FDA a diferença entre a biodisponibilidade entre os fármacos terapeuticamente equivalentes nunca deve exceder a 9% [123]. Na tentativa de reverter esse quadro, a FDA exigiu que a *New Drug Application* (NDA) e a *Abbreviated New Drug Application* (ANDA) fizessem a alteração das especificações de potência nos fármacos de levotiroxina sódica aprovados para uso em seres humanos, de 95% a 105% durante todo o seu período de vida determinado, e rever especificações de potência junto à *United States Pharmacopeia* (USP) para comprimidos de levotiroxina sódica [124].

O desenvolvimento de novas formulações orais, para a terapia de substituição do T₄, ocorre com preparações líquidas ou em cápsula de gel. A forma farmacêutica líquida é mais ativa do que o comprimido em pacientes hipotiroidianos com distúrbios gástricos, distúrbios de absorção e interação medicamentosa [121].

Para entender melhor a farmacocinética e vantagens potenciais de diferentes formas farmacêuticas de L-T₄, Yue *et al.* publicou que a biodisponibilidade da solução oral é maior do que em comprimido e cápsula, porque atinge a circulação sistêmica mais rápido, o que pode ser benéfica para minimizar as interações entre fármaco e alimentos [122].

A terapia farmacológica com L-T₄ é indiscutivelmente recomendada quando o nível de TSH é maior que 10,0mUI/L. Esta terapia é simples e segura quando administrada oralmente, tem uma meia vida longa no soro que permite uma administração diária, e resulta na resolução dos sinais e sintomas de hipotiroidismo na maioria dos pacientes. No entanto, as evidências disponíveis sobre os riscos e benefícios do tratamento para pacientes com nível de TSH sérico menor que

10,0mUI/L permanece controversa e ainda não há um consenso sobre a importância clínica de eventos adversos e os benefícios do tratamento com tiroxina exógena [126].

Vários estudos questionam a eficácia da terapia de L-T₄ em pacientes com hipotireoidismo, principalmente em pacientes com hipotireoidismo subclínico, que continuam a sofrer com os sintomas ainda que, tenham alcançado a correção bioquímica adequada [92,125-134]. Assim como, existe a necessidade de investigação quando os pacientes com hipotireoidismo primário requerem dosagens mais elevadas [91,97,98].

A medicina personalizada tem um papel importante no questionamento da eficácia de L-T₄ na normalização dos hormônios tireoidianos nos tecidos [125,135].

1.3 MEDICINA PERSONALIZADA

A medicina personalizada abrange o uso de biomarcadores, em sua maioria são marcadores moleculares para detectar traços genéticos específicos e orientar diferentes abordagens na prevenção e no tratamento de várias doenças. A começar da descoberta da estrutura do Ácido desoxirribonucleico (DNA) em 1952, em que fundamentos biológicos a respeito de genoma foram desenvolvidos e especificados por meio de técnicas experimentais, tais como, transcrição, tradução, código genético, modificações epigenéticas, entre outros [136].

Os ensaios de medicina personalizada, como exemplo, reação da cadeia de polimerase em tempo real (PCR-RT), sequenciadores de última geração, genotipagem, são concentrados na detecção de variações genéticas que modificam as interações de fármacos com os alvos ou as vias metabólicas dos fármacos (anabólicas ou catabólicas ou *upstream* e *downstream*, respectivamente) [137,138]. Mediante a isso, os ensaios de medicina personalizada são focados na detecção de variações genéticas que alteram as interações de fármacos com alvos ou as vias metabólicas dos fármacos (anabólicas e catabólicas ou *upstream* e *downstream*), podendo ser utilizados para a seleção de formulações de fármacos e percepção de diversas imunogenicidades de fármacos [137].

No progresso conquistado por uma percepção do genoma humano no decurso desses últimos anos proporciona um crescimento complexo em várias áreas da medicina, o que permitiu antecipar como algumas mutações iriam desenvolver

doenças, seus comportamentos em relação a sua agressividade e resposta ao tratamento [137]. Esse progresso combinado ao aprimoramento da tecnologia computacional no âmbito da bioinformática é significativo na prática da clínica médica em tratamentos personalizados [138].

Por conseguinte, essas ferramentas utilizadas na medicina personalizada, através da expressão gênica de cada indivíduo para diagnóstico e direcionamento em tratamentos, embora sejam beneficiadas em um reduzido número de indivíduos [139].

Atualmente, a farmacogenética estuda as influências sobre as respostas a medicamentos dando ênfase em efeitos de genes isolados [140]. Esta área da Farmacologia Clínica, visa otimizar o tratamento por meio da personalização terapêutica, uma vez que a resposta farmacológica a um tratamento medicamentoso não é a mesma em todos os indivíduos [138,141]. Particularmente, procura identificar genes que predisponham às doenças, afetem a farmacodinâmica e farmacocinética de medicamentos, modulem respostas aos medicamentos, estejam associados às reações adversas a medicamentos [140].

Outra diretriz da medicina personalizada é a medicina de precisão, que agrega uma análise de banco de dados contendo genealogias familiares, sensibilidade de fármacos, informações genômicas e histórico de doenças [142]. Partindo deste princípio, com a evolução da biologia molecular, a conduta do diagnóstico genético tem sido relevante na endocrinologia. No caso da tireoide, a medicina personalizada se destacará a partir da identificação dos polimorfismos das desidases [125]. Polimorfismos do gene *D1* afetam os níveis dos hormônios tireoidianos e estão associados com a depressão [143]. Polimorfismo em *UGT1A1*, *UGT1A3*, *D1* e *D2* estão relacionados com supressão de TSH nos pacientes com câncer diferenciado da tireoide em terapia de levotiroxina [144].

A técnica de testes moleculares que antes era dispendiosa, complicada e como consequência insuficiente para atender a população vem sendo substituída por novos métodos *next generation sequencing* (NGS) que contribuem para o declive significativo dessa alegação anterior. Atualmente a análise é realizada com os genesalvo para um determinado distúrbio [145].

A medicina personalizada compreende o uso de biomarcadores, por sua vez está considerando a metodologia diagnóstica com os marcadores moleculares para

identificar traços genéticos específicos e orientar diferentes abordagens na prevenção e no tratamento de doenças [125,145].

Há mais de trinta anos de história compreendendo inovações técnicas para a análise de ácidos nucleicos no sucesso do setor de biologia molecular. Podemos mencionar a descoberta das enzimas de restrição [146], transcriptase reversa [147], métodos de sequenciamento de DNA [148], entre várias outras inovações técnicas proporcionaram o princípio de testes moleculares praticáveis no início dos anos setenta [148]. No entanto, foi a descoberta da reação da cadeia de polimerase (PCR) e sua automação nos anos 80 que modificou a biologia e o diagnóstico molecular [149,150].

Na época atual os avanços da biologia molecular indicam que no mínimo 87,3% do genoma humano é transcrito, sendo que desse transcrito, menos que 3% codificam as proteínas. Esta afirmação sugere que a maior parte do transcriptoma é constituído por RNA não codificante [151,152].

Segundo Ferreira *et al.* e Wang *et al.* estudos demonstraram que a comunicação celular não é realizada somente pelas vias clássicas já conhecidas, como por exemplo os fatores de crescimento, as citocinas, neurotransmissores ou hormônios, e também através da troca de pequenas moléculas de RNA. As quais são organizadas em exossomos, estes constituídos de proteínas, mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) e miRNA (micro ácido ribonucleico), que podem ser utilizados como estratégia diagnóstica não invasiva com potencial de avaliar o funcionamento dos tecidos [153,154].

1.4 TRANSCRIPTOMA

O transcriptoma é o conjunto completo de RNA ou transcrito de um organismo, grupo de células ou ainda de uma célula específica em uma determinada condição fisiológica e abrange o sequenciamento de todos os tipos de moléculas de RNA, como miRNA, mRNA, RNA codificantes e não codificantes, assim como as formas de *splicing* alternativos poliadenilados. Reunidos na análise eles refletem os genes que estão ativamente expressos em um tecido particular [155,156]. O processo de transcrição ocorre através da síntese de RNA a partir do DNA. O RNA determina quais genes serão expressos e podem se modificar durante a vida do organismo. Uma das principais causas de modificações são as alterações ambientais, considerando que o organismo tenta se ajustar a estas mudanças para se manter vivo [155].

O transcriptoma tem como objetivo catalogar todas as espécies de transcritos, determinar as estruturas das transcrições de genes padrões de *splicing*, distintas modificações pós transcricionais e quantificar as alterações dos níveis de cada expressão de transcritos sob diferentes condições [155,156].

Bhartiya *et al.* relataram alterações funcionais ou traços da doença associada nas variações de mapeamento para RNA não-codificantes, incluindo miRNA, pequenos RNA nucleolares e longos RNA não-codificantes, e ainda, que as limitações na compreensão das funcionalidades dos RNA não-codificantes restringem o entendimento das consequências funcionais de variações nos mesmos [157].

O sequenciamento de alto desempenho de RNA denominado de RNA-seq possibilita além da compreensão do transcriptoma, também a quantificação dos genes [155,156]. O RNA-seq é realizado por *Next Generation Sequencing* (NGS) e tem sido largamente aplicado na investigação de diversas possibilidades de transcrição, também possibilita uma ampla visão do mapa do transcriptoma humano e um dos seus principais benefícios é que independe do conhecimento prévio sobre a sequência sob investigação [153]. Esse método consiste na conversão das moléculas de interesse de RNA em ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) conectado a adaptadores que geram uma quantidade bastante expressiva de sequências de DNA curtas, aproximadamente de 35 a 100 pares de bases [154]. Desse modo, o RNA-seq comparado às técnicas de *microarrays* ou sequenciamento *Sanger* possui inúmeras vantagens, como maior sensibilidade, o que favorece na utilização de uma pequena quantidade de RNA, baixa geração de falsos positivos originados de hibridização cruzada, permite uma série ilimitada de expressão dinâmica sem saturação de sinal, além da viabilidade de processar várias amostras em tecnologias de alto rendimento, amostras estas que podem ser multiplexadas e sequenciadas em paralelo [158].

1.5 SEQUENCIADORES DE NOVA GERAÇÃO

Após ter chegado ao mercado em 2005 [159], as plataformas *Next Generation Sequencing* (NGS) progressivamente foram obtendo domínio sobre *microarrays* em relação aos transcriptomas [160,161]. O primeiro sequenciamento completo do genoma humano demorou 12 anos para ser concluído, foi finalizado em 2002 a um valor de aproximadamente \$ 3.000,000,000, empenho que envolveu mundialmente vários

pesquisadores [162,163]. NGS é uma inserção ligeiramente modificada, digital e desenvolvida do sequenciamento *Sanger* [162-164].

O NGS proporciona uma investigação genética com alta sensibilidade, excelente rendimento, e nos últimos anos um ritmo exponencial marcado pela crescente análise tecnológica e a diminuição de custos, conhecido como Lei de Moore. Esses avanços permitiram testes baseados em NGS para uso na clínica, os quais são uma presença em crescimento exponencial no condutor de triagem [140-165,167]. As plataformas NGS conseguem sequenciar aproximadamente 5000 megabases por dia [165], centros de sequenciamentos como o *New York Genome Center*, *Broad Institute* e o *Beijing Genomics Institute* podem gerar rotineiramente *pentabytes* de dados em sequenciamento [168,169].

Contudo, o grande volume de dados gerados pelo NGS requer análises de dados e ferramentas computacionais como aos programas de bioinformática amplamente utilizados na avaliação de transcriptoma, tem sido uma alternativa para a resolução desses problemas a informatização dos dados em nuvens [170].

Atualmente, há muitas plataformas NGS disponíveis comercialmente para o sequenciamento de qualquer região genômica de interesse ou de genomas inteiros, que avaliam quaisquer alterações como mutações pontuais, inserções, deleções [171]. Cada tecnologia de sequenciamento possui metodologias diferentes, mas principalmente podemos identificar etapas comuns entre todas as plataformas como por exemplo: o preparo da amostra, amplificação das bibliotecas e o sequenciamento [172]. Essas ferramentas utilizadas para análise de genes permitem a identificação de novos genes, novas formas de genes bem como suas expressões diferenciais por meio de certificação de diferenças na quantidade de RNA transcrito. Dentre essas ferramentas a *Ion Proton™ System* da *Thermo Fisher Scientific* tem excelente resultado na formação de painéis de genes, com alta produtividade e desempenho [173]. A preparação da referida plataforma segue o protocolo que se inicia com a fragmentação do DNA por processos químicos, mecânicos ou enzimáticos. Individualmente cada fragmento é chamado de *template* e essa fragmentação tem como objetivo fundamental o fracionamento do DNA de maneira aleatória, de tal forma que todo o genoma seja coberto uniformemente [174]. Em seguida ao processo de fragmentação, adaptadores que são sequências artificiais construídas e conhecidas são conectados ao *template*. Sendo assim, logo após homogeneizamos diferentes

amostras em uma mesma reação de sequenciamento devido ao uso desses adaptadores e posteriormente ao término do processo são separadas e identificadas individualmente no processo de análise da bioinformática [175].

Dando seguimento com a amplificação das bibliotecas, onde se realiza milhares de cópias dos fragmentos para otimizar o sinal luminoso para a maioria dos sequenciadores, a *Ion Proton™ System* melhora o sinal iônico que será detectado no *chip* do sequenciador. Esse processo de amplificação foi especialmente desenvolvido em uma PCR 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 sequência complementar ao adaptador. Esses fragmentos têm a função de ligar os clones dos *templates* nas esferas juntamente com o primer da reação de PCR e finalmente o sequenciamento [176-178].

A seguir a leitura é realizada na plataforma *Ion Proton™ System* do NGS, onde a leitura dos nucleotídeos acontece de forma diferente das demais plataformas, na qual a reação de polimerização gera espontaneamente um íon H⁺, ou seja, um próton, e esse íon inevitavelmente irá alterar o pH do meio. Essa variação do pH é detectada por um transistor íon sensível de efeito de campo (ISFET) que se encontra no *chip* de leitura das amostras. Essa variação é convertida em um sinal elétrico ao equipamento e desta forma identifica qual base foi reconhecida. Assim, armazena a informação gerando arquivos de dados em formatos FASTA ou FASTAQ, BAM, SAM, VCF e outros para posterior análise na bioinformática [179,180].

Como mencionado anteriormente, definitivamente o NGS revolucionou a pesquisa genética e oferece um enorme potencial para aplicação clínica [181].

2.0 JUSTIFICATIVA

Apesar da L-T₄ ser o fármaco mais utilizado em terapia de substituição da tiroxina em pacientes com hipotireoidismo primário, autores têm questionado a eficácia desta terapia [91,92,97,98,125-134]. Embora estes pacientes possam ter atingido uma concentração de TSH considerada adequada, a presença de sintomas pode persistir, sendo que acreditamos que uma ferramenta, independente do TSH pituitário, pode ser um instrumento útil nesta situação.

O objetivo deste estudo foi o de identificar genes diferencialmente expressos em amostras de sangue de pacientes com hipotireoidismo primário, tratados com levotiroxina, que possam servir como instrumento para a avaliação de eficácia terapêutica.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o número IRB: 665.331 e 679.727). A pesquisa foi desenvolvida no Ambulatório de Promoção à Saúde e no Ambulatório de Endocrinologia, localizados na Universidade Nove de Julho, no Campus Vergueiro em São Paulo.

3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram realizadas as elucidações sobre a pesquisa e adesão ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), seguidas pelas avaliações clínicas nas consultas médicas, dados antropométricos, dados clínicos, referindo-se a triagem para doenças tiroidianas pré-existentes e o teste de Zulewski (Apêndice 1).

Foram atendidos 320 indivíduos durante o período de março de 2014 a dezembro de 2015. Destes 320 indivíduos, 120 foram convidados a participar do estudo. Dos 120 indivíduos, 46 indivíduos estavam em tratamento com levotiroxina e 22 indivíduos estavam saudáveis.

A triagem dos indivíduos saudáveis foi realizada no Ambulatório de Promoção à Saúde e dos indivíduos com hipotireoidismo primário foi feita no Ambulatório de Endocrinologia.

3.1.1 Critérios de Inclusão

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

3.1.2 Critérios de Exclusão

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

3.1.3 Coleta e armazenamento

Posteriormente à assinatura do TCLE e avaliação médica, os pacientes foram acompanhados ao posto de coleta da enfermagem do AIS, onde a coleta foi realizada pela equipe de enfermagem, que seguiu o procedimento de coleta segundo 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, prosseguindo-se com a coleta da punção venosa de 5ml de sangue em tubo BD *Vacutainer SST II Advance Plus*[®] com ativador de coágulo e gel separador. Logo após, coletava-se 5ml de sangue em aspiração a vácuo em um tubo para preservação das moléculas de RNA (*PAXgene blood RNA*[®]), contendo 6,9mL de aditivo de preservação de RNA. A utilização do escalpe respeitou a instrução do fabricante (Qiagen, NL, DE), em que o tubo *PAXgene blood RNA*[®] ficasse em posição vertical durante o procedimento, afim de evitar refluir o aditivo na veia puncionada. Em seguida, homogeneizava-se o tubo em 180° por 10 vezes.

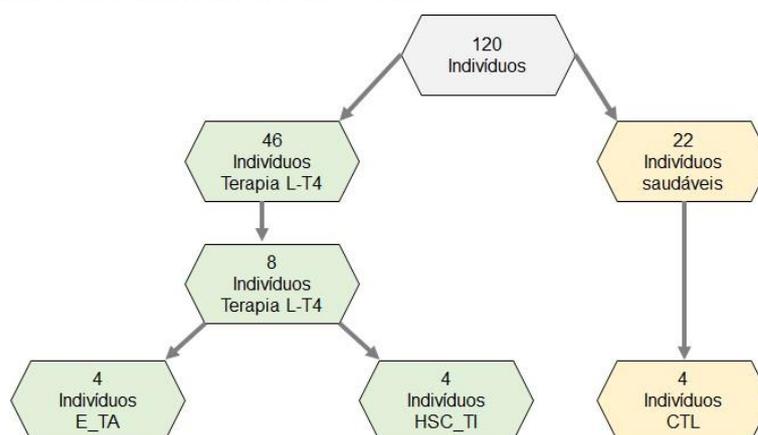
Posteriormente, o tubo para obtenção do soro sanguíneo, foi submetido à centrifugação de 1500rpm (rotações por minuto) durante 15 minutos, no qual havia a separação do gel na fase sólida contendo células e coágulo, da fase líquida contendo soro. Seguida da conservação em congelamento de -20°C para posterior realização das análises bioquímicas para dosagem plasmática de: TSH, T₄L, anticorpos anti-Tg, anticorpos anti-TPO. Concomitantemente, o tubo *PAXgene blood RNA*[®] era armazenado por 24 horas em temperatura ambiente (15°C a 25°C), com o propósito de garantir a completa lise celular e potencializar o rendimento das moléculas de RNA ao final da extração, de acordo com o fabricante. Após o tempo previsto, os tubos foram armazenados em congelamento a -20°C, para subsequente realização do transcriptoma.

3.1.4 Delineamento do estudo

Neste estudo foram incluídos 120 indivíduos, dos quais 46 indivíduos estavam em terapia com L-T₄ e 22 indivíduos estavam saudáveis. Destes 46 indivíduos foram selecionados 8 pacientes tratados com levotiroxina sódica. Dos quais são um grupo com 4 indivíduos, constituído por 4 mulheres com eutiroidismo com tratamento adequado (E_TA), definido como um TSH sérico entre 0,4mUI/L e 4,0mUI/L, e outro grupo com 4 indivíduos, constituído por 3 mulheres e 1 homem, com hipotireoidismo subclínico com tratamento inadequado (HSC_TI), definido como um TSH entre 4,1mUI/L e 20,0mUI/L, ambos com T₄L dentro dos valores de referência. Dos 22 indivíduos saudáveis, 4 foram selecionados (Controle: CTL), constituído por 3 mulheres e 1 homem. Vale salientar que os testes de TSH dos 120 indivíduos foram confrontados pelos resultados de 2 métodos: o Método A foi realizado pelo Kit *Roche Diagnostics*[®] e o Método B foi realizado pelo Kit Abbott Architect I 2000, detecção do kit: de 0,0038mUI/L, e valores de referência: 0,34-5,60mUI/L.

A seguir, o delineamento do estudo está representado pelo fluxograma da Figura 5, e os dados da análise bioquímica estão demonstrados na tabela 2.

Figura 5. Fluxograma com o delineamento do estudo.

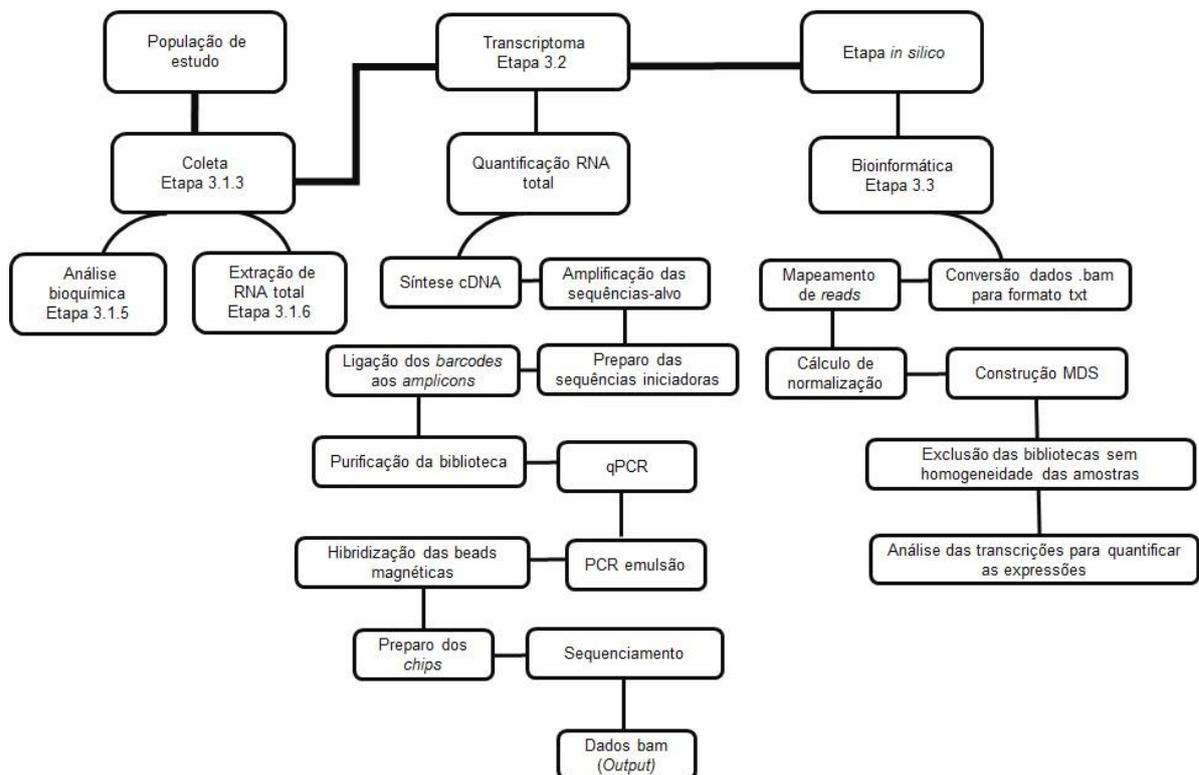


GRUPOS	TSH (mUI/L)
CTL	Dentro VR
E_TA	0,4 - 4,0
HSC_TI	4,1 - 20,0

Duas análises foram realizadas para resultados de gráficos de expressão gênica e mapa de calor, a Análise 1 com indivíduos E_TA e indivíduos HSC_TI, e Análise 2 com indivíduos E_TA e indivíduos CTL.

As principais etapas da metodologia estão representadas no fluxograma da Figura 6.

Figura 6. Fluxograma resumido das principais etapas da metodologia



3.1.5 Análise bioquímica

As análises bioquímicas de TSH sérico pelo Método A, T₄L, Anti-Tg e Anti-TPO foram realizadas no equipamento *Elecsys*[®] 2010 (*Roche Diagnostics*, IN, USA), no Centro de Pesquisa e Diagnóstico Molecular de Doenças no departamento de Biofísica na Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Os *Kits* e protocolos específicos automatizados foram utilizados para cada teste são:

- Kit *Roche Diagnostics*[®] para dosagem do hormônio TSH (Método A), referência: 11731459 122, detecção do *Kit*: 0,005-100,0mUI/L, e valores de referência: 0,27-4,20mUI/L.

- Kit *Roche Diagnostics*[®] para dosagem de T₄L, referência: 06437281 190, detecção do *Kit*: 0,3-100,0pmol/L, fatores de conversão das unidades: pmol/L x 0,077688 = ng/dL, ng/dL x 12.872 = pmol/L, e valores de referência: 0,931,7ng/dL.
- Kit *Roche Diagnostics*[®] para dosagem de anticorpos anti-Tg, referência: 6368697 190, detecção do *Kit*: 10,0-4000UI/L, e valores de referência: menor que 115,0UI/L
- Kit *Roche Diagnostics*[®] para dosagem de anticorpos anti-TPO, referência: 06368590 190, detecção do *Kit*: 5,00 - 600,0UI/L, e valores de referência: menor que 34,0UI/L.

3.1.6 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído a partir do sangue periférico e foi extraído pelo kit *PAXgene Blood RNA extraction*[®] (Qiagen, NL, DE) no Laboratório de Inovação Molecular e Biotecnologia do Programa da Pós-graduação em Medicina na Universidade Nove de Julho (Uninove), seguindo o protocolo do fabricante, conforme detalhado no apêndice 2.

3.2 REALIZAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA

Para o sequenciamento foi utilizado o equipamento *Ion Proton*[™] *System* (*Thermo Fisher Scientific*, MA, USA), do Centro de Pesquisa e Diagnóstico Molecular de Doenças no departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), mediante aos protocolos *Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression*[®], detalhadamente descrito no apêndice 3. E todo o material constituído nesse protocolo está armazenado em nossa biblioteca.

3.2.1 Quantificação do RNA total

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

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

3.2.2 Síntese de cDNA

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

3.2.3 Amplificação das sequências-alvo

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

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

3.2.4 Preparo das sequências iniciadoras

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

3.2.5 Ligação dos *barcodes* aos *amplicons*

Etapa que consiste em preparação para cada código de barras escolhido em um composto de adaptador *Ion P1* e *barcode Ion Xpress*, na qual envolveu uma diluição final de 1:4 para cada adaptador. Deu-se o seguimento com a reação de

ligação na transferência de: 2,0µL de adaptador *Ion P1*, 2,0µL *barcode Ion Xpress*, 4,0µL de *Nuclease-Free water*, resultando no total de 8,0µL, sendo que estes volumes foram referidos em, no máximo, 4 reações.

Na sequência foi realizada a reação de ligação em que foi transferido: 4,0µL *Switch Solution*, 2,0µL do composto anteriormente diluído, resultando no volume total de 28,0µL, incluindo os 22,0µL do *amplicon* (amostra). Seguida da agitação em vórtex para homogeneização e *spin*, após foi acrescentado 2,0mL de DNA ligase a cada MCT, atingindo 30,0µL de volume total, agitado posteriormente para homogeneização e novamente um *spin*. Logo depois os tubos MCT foram dispostos no termociclador com a programação de temperatura *versus* tempo: 22°C em 30 minutos; 72°C em 5 minutos e 10°C no tempo de espera.

3.2.6 Purificação da biblioteca

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

3.2.7 qPCR (Quantificação das bibliotecas)

A quantificação das bibliotecas iniciou com a retirada dos MCT da rack magnética os ímãs e pipetando 50,0µL de *Low TE*[®] ao *pellet* para dispensar as esferas e transportados para homogeneização em vórtex e posterior *spin*. Novamente, os MCT foram transportados para a *rack* magnética e aguardados 2 minutos. Logo depois do

tempo decorrido foram transferidos 45,0µL do sobrenadante para o poço de uma placa nova.

Enquanto isso, foram preparadas 5 diluições em séries de 10 vezes do *E. coli* DH10B *Ion Control Library*[®] a 6,8pM, 0,68pM, 0,068pM e 0,0068pM e 0,00068pM, em que marcados como padrão e usadas as concentrações no *software* do equipamento qPCR. Cada biblioteca *Ion AmpliSeq*[®] de RNA de entrada foi diluída na proporção de 1:10000 com concentração de 10,0ng. Em seguida, foram preparadas as misturas de reação em 3 poços para cada biblioteca padrão e cada amostra. Essas misturas foram realizadas na placa de 96 poços, em que foram transferidos 11,0µL de solução (10,0µL de *2X TaqMan*[®] e 1,0µL de *20X Ion TaqMan Assay*[®]) em cada poço e pipetado 9µL das bibliotecas padrão e das amostras. Continuando com a programação do equipamento *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System*[®] nas seguintes configurações: estágio em espera com temperatura de 50°C e 95°C nos períodos de 2 minutos e 20 segundos, respectivamente; e estágio de 40 ciclos com temperaturas de 95°C e 60°C nos períodos de 1 segundo e 20 segundos, respectivamente.

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

3.2.8 PCR de emulsão

No PCR de emulsão são criados milhões de micro reatores, os quais contêm todos os reagentes necessários para uma reação de PCR e pequenas esferas nomeadas por *beads* cobertas com a sequência complementar ao adaptador. Foi realizado no equipamento *Ion PI HI-Q OT2 200 Kit*[®], sob o catálogo: A26434, iniciando com o acoplamento dos reagentes necessários ao equipamento *Ion OneTouch Reaction Oil*[®] de 25,0mL e o *Nuclease-free Water*[®]. Onde foram preparados os reagentes: *Ion PI Master Mix*, *Ion PI Enzyme Mix*[®], *Ion PI Ion Sphere Particles*[®], e homogeneizados em vórtex seguido por *spin*. Continuando com a diluição das amostras em 100,0pM iniciais em volume e 8,0µL mais adição de 92,0µL de *Nuclease free Water*[®] para obtenção de volume final de 100,0µL, seguida da homogeneização

em vórtex e *spin*. Logo após foi transferido para MCT e foram pipetados reagentes na seguinte ordem e proporção: 80,0µL de *Nuclease-free Water*[®], 120,0µL de *Ion PI Enzyme Mix*[®], 100,0µL de *Ion PI ISPs*[®], 100,0µL da Biblioteca diluída, respectivamente, atingindo o volume total de 2400,0µL incluindo o *mastermix*. Imediatamente foi homogeneizado em vórtex e centrifugado por 2 minutos e o tubo de MCT foi disposto na posição adequada no equipamento. O referido equipamento, *Ion OneTouch 2 Instrument*[®], foi alimentado com o *Ion OneTouch Reaction Filter*[®], e configurado na opção *Proton: Ion PI Hi- Q OT2 200 Kit*[®] no período médio de 5 horas.

3.2.9 Hibridização das *beads* magnéticas

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

3.2.10 Preparo dos *chips*

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

3.3 BIOINFORMÁTICA

A análise *in silico* foi feita usando programas de bioinformática em que os dados foram gerados pelo *Ion Proton™ System*, gravados em arquivos de extensão bam (*Binary Alignment Map®*), e arquivados por *upload* no servidor *online* do fabricante da plataforma NGS, em aproximadamente 6 horas para as 16 amostras corridas. As análises 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) concedidos pela *Bioconductor Open Source Software for Bioinformatics* [157]. 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. Por fim, executamos o *download* dos dados e os arquivamos em plataformas locais de fácil acesso e em *hard disks* portáteis. A 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/>. Também foi utilizado o software para a classificação dos genes o *Panther classification system*, disponível no endereço: <http://www.pantherdb.org/>.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

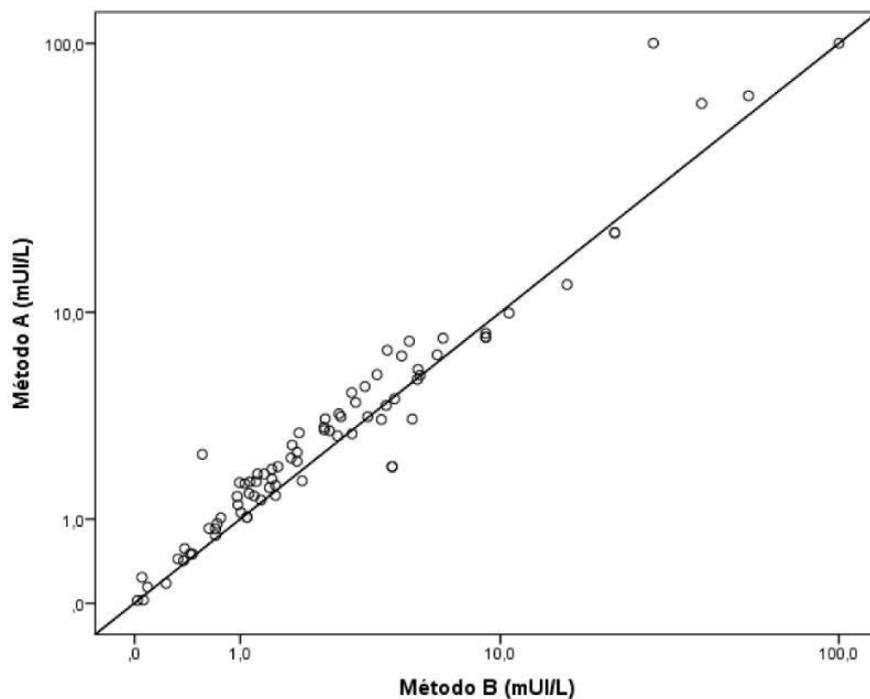
As variáveis contínuas são apresentadas como valores medianos, mínimos e máximos, enquanto que o teste de Kruskal-Wallis foi usado para comparar os valores entre os três grupos. A correlação entre os transcritos, TSH e o teste de Zulewski foi realizada com o método de *Spearman*. Os dados foram analisados pelo IBM SPSS *Statistics* (versão 23.0 Armonk, NY: IBM Corp., EUA).

A análise computacional de dados foi realizada em *software* *RStudio* (versão 0.99.491), pacote EdgeR v 3.12.0 de *Bioconductor*. Os genes significativos são calculados após um ajuste de *False Discovery Response* (FDR). Foi considerado significativo um $p < 0,05$.

4.0 RESULTADOS

A seguir, o gráfico 1 demonstra a correlação entre os resultados do TSH sérico no Método A (*Roche Diagnostics*[®]) com valor de referência: 0,270-4,20mUI/L e Método B (Abbott Architect I 2000) com valor de referência: 0,34-5,60mUI/L, indicando a boa correlação e concordância entre eles.

Gráfico 1. Correlação entre os valores de TSH (mUI/L) pelo Método A e os valores de TSH (mUI/L) pelo Método B.



A tabela 2 demonstra os resultados da análise bioquímica dos indivíduos que participaram do estudo, representados por 4 indivíduos no grupo controle (CTL), 4 indivíduos com eutiroidismo com tratamento adequado (E_TA) e 4 indivíduos com hipotireoidismo subclínico com tratamento (HSC_TI). Nesses resultados, o TSH e os anticorpos foram diferentes entre os três grupos e T₄L não teve diferença.

Tabela 2. Valores medianos, mínimos e máximos, seguidos pelo valor de p das concentrações de TSH, T4L, anticorpos anti-Tg e anticorpos anti-TPO nos 3 grupos.

	CTL	E_TA	HSC_TI	Sig.
TSH (mUI/L)	2,35 (1,34-4,20)	1,54 (0,85 – 2,08)	7,06 (5,55 – 12,82)	0,018
T4L (ng/dL)	1,22 (1,06-1,33)	1,20 (1,15 – 1,38)	1,29 (1,21 – 1,33)	0,593
Anti-Tg (UI/L)	9,00 (9,00-10,20)	346,1 (51,3 – 512,4)	311,6 (148,4 – 515,6)	0,024
Anti-TPO (UI/L)	8,80 (4,00 – 32,41)	326,2 (143,1 – 532,2)	417,6 (382,0 – 600,0)	0,025

CTL: Indivíduos controle; E_TA: Indivíduos com eutiroidismo com tratamento adequado; HSC_TI: Indivíduos com hipotiroidismo subclínico com tratamento inadequado. TSH: Hormônio estimulante da Tireoide; T4L: Tiroxina livre; Anti-Tg: Anticorpos anti-tireoglobulina; Anti-TPO: Anticorpos antitireoperoxidase. Referências: TSH (0,27-4,20mUI/L), T4L (0,93-1,70ng/dL), Anti-Tg (menor que 115,0UI/L), e Anti-TPO (menor que 34,0UI/L).

Todos os indivíduos foram selecionados de uma forma minuciosa para o presente estudo, onde as doses de levotiroxina e tempo de diagnóstico de hipotiroidismo primário estão expostos na tabela 3.

Tabela 3. Tempo de diagnóstico, doses de levotiroxina absoluta e dose por quilograma administradas pelos grupos: Controle (CTL), Eutiroidismo com tratamento adequado (E_TA), e Hipotiroidismo subclínico com tratamento inadequado (HSC_TI).

GRUPOS	L-T4 (µg)	DOSE POR KG DE L-4	TEMPO DE DIAGNÓSTICO (ANOS)
CTL	-	-	-
E_TA	106,00 (50,00-112,00)	1,20 (0,76-1,45)	7,00 (2,00-12,00)
HSC_TI	87,50 (25,00-150,00)	1,08 (0,37-1,42)	4,50 (1,00-18,00)

A seguir, foi realizada a análise do transcriptoma e consequentemente, o sequenciamento e a etapa *in silico*, o que evidenciou 353 transcritos diferencialmente expressos no grupo com eutiroidismo com tratamento adequado, e grupo com hipotiroidismo subclínico com tratamento inadequado, que são demonstrados na tabela 4 com seus respectivos genes e *Fold-change* (LogFc).

Tabela 4. Identificação gênica dos transcritos diferencialmente expressos, seus genes correspondentes e o LogFC no grupo eutiroidianos com tratamento adequado, e grupo com hipotireoidismo subclínico com tratamento inadequado.

Transcrito	Gene	LogFC	Transcrito	Gene	LogFC
NM_017709	FAM46C	-2.18	NM_025208	PDGFD	-1.97
NM_021794	ADAM30	1.87	NM_015313	ARHGEF12	-1.58
NM_138959	VANGL1	-1.71	NM_005103	FEZ1	-1.35
NM_020440	PTGFRN	1.39	NR_038256	LINC00943	-1.55
NM_000561	GSTM1	-2.61	NM_001101339	C12orf77	1.79
NM_000850	GSTM4	-1.50	NR_036619	SKP1P2	1.57
NM_004675	DIRAS3	2.53	NM_013431	KLRC4	-1.41
NM_002303	LEPR	-2.29	NM_005810	KLRG1	-1.59
NM_006820	IFI44L	2.49	NM_004054	C3AR1	-1.48
NM_152697	SLC44A5	-2.40	NM_001173464	KIF21A	-1.52
NM_007034	Hsp40-DNAJB4	-2.39	NM_001029	RPS26	1.47
NM_006417	IFI44	1.80	NM_080747	KRT72	2.19
NM_021080	DAB1	2.91	NM_175068	KRT73	2.33
NM_001199081	PODN	-1.64	NM_021229	NTN4	-1.44
NM_005764	PDZK1IP1	-1.45	NM_174942	GAS2L3	-1.60
NM_147192	DMBX1	1.42	NM_006187	OAS3	1.89
NM_001852	COL9A2	2.22	NM_001085481	MAP1LC3B2	-1.46
NM_003243	TGFBR3	-1.88	NM_019086	VSIG10	3.51
NM_006004	UQCRH	1.77	NR_034132	LINC00939	1.42
NM_052896	CSMD2	2.84	NR_024563	LOC100130238	2.24
NM_022873	IFI6	1.74	NM_182488	USP12	-1.43
NR_027085	LINC01226	1.99	NM_000053	ATP7B	1.58
NM_022164	TINAGL1	1.46	NR_027701	LINC00346	1.62
NR_038404	LOC100506801	2.17	NM_032846	RAB2B	-2.24
NM_173574	ZNF683	-2.30	NM_001005466	OR10G2	2.24
NM_003196	TCEA3	1.39	NM_000953	PTGDR	-1.38
NR_024279	FLJ37453	1.51	NM_001107	ACYP1	1.47
NM_019089	HES2	1.43	NM_005532	IFI27	2.37
NR_024489	LOC100129534	1.63	NM_001823	CKB	-1.56
NR_003023	SCARNA2	1.64	NM_016417	GLRX5	-1.77
NM_001195388	FCRL5	1.82	NM_001077594	EXOC3L4	2.62
NM_002964	S100A8	1.68	NM_198400	NEDD4	-1.61
NM_182578	THEM5	-1.37	NM_001145004	GOLGA6L6	1.48
NM_002529	NTRK1	3.31	NM_002112	HDC	1.38
NM_198406	PAQR6	1.41	NM_001012338	NTRK3	2.08
NM_002995	XCL1	-2.13	NR_028330	ST20-AS1	1.52
NM_002001	FCER1A	1.81	NR_003083	SLC6A10P	1.63
NM_021181	SLAMF7	-1.53	NR_024034	CLUHP3	1.48
NM_001004310	FCRL6	-1.95	NM_002094	GSPT1	-1.60
NM_005684	GPR52	-1.56	NR_027274	SRRM2-AS1	1.88
NR_002578	GAS5	1.68	NM_005331	HBQ1	-1.84
NM_005562	LAMC2	-1.54	NM_001003938	HBM	-1.52
NM_002838	PTPRC	-1.38	NM_001103175	CCDC64B	1.48
NM_198149	SHISA4	-2.52	NM_016639	TNFRSF12A	1.40
NM_033102	SLC45A3	2.10	NM_145294	WDR90	1.37
NM_015999	ADIPOR1	-1.64	NM_014353	RAB26	1.36
NM_003582	DYRK3	-1.59	NM_001105663	NUDT7	-1.41
NM_018265	C1orf106	1.46	NR_026674	FLJ30679	1.39
NR_040064	LINC00862	1.46	NM_022818	MAP1LC3B	-1.39
NM_001017403	LGR6	-1.37	NM_153025	SPATA33	1.39
NM_018566	YOD1	-3.25	NM_001372	DNAH9	2.72
NR_026911	RPL21P28	2.45	NM_000934	SERPINF2	1.70
NM_004578	RAB4A	-1.62	NM_000987	RPL26	1.60
NR_027247	LOC100130331	1.47	NR_024447	LOC100128288	1.47
NM_001001821	OR2T34	1.92	NM_003585	DOC2B	1.45
NM_001005495	OR2T3	1.40	NM_000978	RPL23	1.66
NM_006257	PRKCO	-1.35	NM_032192	PPP1R1B	1.88
NM_018702	ADARB2	1.49	NM_000151	G6PC	1.51
NM_020975	RET	2.24	NR_033415	KRT42P	1.42
NM_001002266	MARCH8	-1.57	NM_012232	PTRF	1.40
NM_014000	VCL	-1.47	NM_001103154	ARL17B	1.46
NM_001613	ACTA2	-1.61	NM_001002841	MYL4	-1.71
NM_001548	IFIT1	1.69	NM_006039	MRC2	1.44
NM_001010987	IFIT1B	-1.46	NM_001050	SSTR2	1.36
NM_001031683	IFIT3	1.48	NM_001115152	CD300LD	2.53
NM_001195263	PDZD7	2.21	NM_018414	ST6GALNAC1	1.42
NM_130439	MXI1	-1.74	NM_001128626	SPIRE1	-1.42
NR_028134	GUCY2GP	1.66	NM_153000	APCDD1	2.60
NM_005574	LMO2	1.41	NR_036489	DLGAP1-AS5	1.42
NM_001145819	SOX6	-1.87	NM_004775	B4GALT6	-1.65
NM_018222	PARVA	1.36	NM_003831	RIOK3	-1.48
NM_176822	NLRP14	2.01	NM_001100619	CABLES1	-1.38
NM_001005289	OR52H1	1.45	NM_005071	SLC1A6	2.20
NM_005330	HBE1	4.45	NM_006563	KLF1	-1.67
NM_000559	HBG1	4.37	NM_001166215	S1PR5	-1.52
NM_000184	HBG2	4.35	NM_001136503	SMIM24	-1.54
NM_145008	YPEL4	-1.38	NM_001928	CFD	1.44
NR_033853	LOC283194	1.48	NM_182919	TICAM1	1.43
NM_177963	SYT12	1.81	NM_177417	KLC3	-1.60
NM_182969	XRRA1	1.49	NM_205834	LSR	2.29
NR_000005	SNORD15A	1.43	NM_006149	LGALS4	1.50
NM_022337	RAB38	-1.68	NM_018215	PNMAL1	-1.48
NM_001098816	TENM4	1.88	NR_002825	SIGLEC16	1.56
NM_007173	PRSS23	-1.40	NM_000641	IL11	1.40
NM_016403	CWC15	1.51	NM_001172654	LILRA3	-2.63
NM_152432	ARHGAP42	-1.58	NM_002288	LAIR2	2.12
NM_032930	C11orf70	1.41	NM_001126132	TNNT1	1.73

Transcrito	Gene	LogFC
NM_024330	SPACA6	1.64
NM_006433	GNLY	-2.13
NM_016170	TLX2	1.72
NM_014614	PSME4	-1.35
NM_080657	RSAD2	2.20
NM_004418	DUSP2	-1.46
NM_001450	FHL2	-1.87
NM_014568	GALNT5	-1.36
NM_006920	SCN1A	2.55
NM_004826	ECEL1	2.53
NM_020675	SPC25	2.25
NM_018571	STRADB	-1.46
NM_002157	HSPE1	1.41
NM_001098199	GPR1	1.47
NR_003008	SCARNA5	-1.45
NM_152783	D2HGDH	1.39
NR_024444	LOC100133985	-1.63
NM_001037663	EEF1B2	1.66
NM_130794	CST11	3.53
NM_003650	CST7	-1.47
NM_001174090	SLC4A11	1.71
NM_001080123	PRNP	2.15
NM_003908	EIF2S2	1.36
NM_001198838	RBM12	1.38
NR_026958	LINC00494	1.94
NM_080821	FAM210B	-1.71
NM_016276	SGK2	1.45
NM_173091	NFATC2	-1.40
NM_017495	RBM38	-1.45
NR_026755	CYP4F29P	-3.23
NR_003087	ABCC13	-1.92
NM_002240	KCNJ6	2.37
NM_006272	S100B	-2.57
NR_027292	SSR4P1	1.47
NM_001236	CBR3	1.48
NM_013387	UQCR10	1.37
NM_012179	FBXO7	-1.85
NM_025225	PNPLA3	1.36
NM_001014440	ODF3B	1.47
NM_006564	CXCR6	-2.21
NM_015444	TMEM158	-1.80
NM_147129	ALS2CL	2.59
NM_015933	TMA7	1.68
NM_001174136	TDGF1	1.55
NM_022842	CDCP1	1.48
NM_005875	EIF1B	-1.95
NM_004391	CYP8B1	1.55
NM_001162429	PDCD6IP	-2.04
NM_005442	EOMES	-1.62
NM_014463	LSM3	1.62
NM_005290	GPR15	1.80
NR_028301	DUBR	-1.57
NM_001134439	PHLDB2	-1.47
NM_005213	CSTA	1.85
NR_002992	SNORA7B	-1.36
NR_034032	LOC100289361	1.58
NM_001040100	SPTSSB	-2.75
NM_000996	RPL35A	1.73
NM_198565	NRROS	1.66
NR_027696	TAPT1-AS1	1.39
NR_027279	USP17L6P	1.57
NM_001242326	USP17L25	1.45
NM_001242327	USP17L24	1.38
NR_027481	ZNF876P	2.05
NM_001040101	NSG1	-1.98
NM_007100	ATP5I	1.46
NM_000584	CXCL8	1.88
NM_001134742	SLC4A4	-2.00
NM_004464	FGF5	2.00
NM_001201	BMP3	1.99
NM_000345	SNCA	-1.48
NM_001565	CXCL10	1.43
NM_005723	TSPAN5	-1.84
NR_026968	RPL34-AS1	1.50
NR_039978	SEC24B-AS1	1.50
NM_002100	GYPB	-1.89
NR_003675	GUSBP5	1.72
NM_002099	GYPB	-1.71
NM_003013	SFRP2	-1.36
NM_001134848	CCDC152	1.80
NM_001343	DAB2	-1.37
NM_004932	CDH6	1.39
NR_026578	LOC647859	-2.35
NM_001038603	MARVELD2	1.89
NM_180991	SLCO4C1	-1.35
NM_001204199	SRP19	-1.96
NM_182761	FAM170A	2.10
NM_020957	PCDHB16	1.77
NM_005859	PURA	-1.39

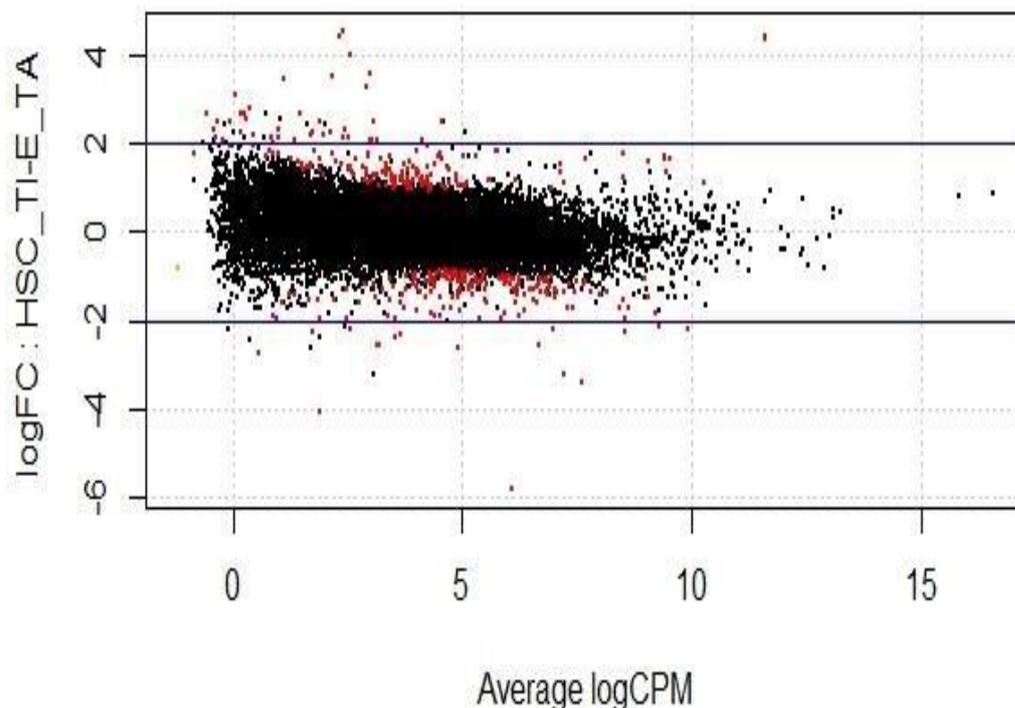
Transcrito	Gene	LogFC
NR_037895	C5orf66-AS2	1.56
NM_001040173	HTR4	2.13
NM_002609	PDGFRB	2.26
NM_001129891	FAM196B	-1.48
NM_015111	N4BP3	1.49
NR_001447	MT1L	-4.01
NM_001498	GCLC	-1.40
NR_002794	TREML5P	2.32
NR_026938	ADCY10P1	1.81
NM_001010873	TSPO2	-1.51
NM_002098	GUCA1B	1.48
NM_005514	HLA-B	-5.78
NM_001623	AIF1	1.50
NM_152753	SCUBE3	1.48
NM_002117	HLA-C	-1.47
NM_002127	HLA-G	-1.44
NR_027908	LINC00336	1.98
NM_138700	TRIM40	-1.61
NM_006877	GMPT	-1.93
NM_001069	TUBB2A	-1.36
NM_001455	FOXO3	-1.41
NM_001010919	FAM26F	1.48
NM_001012279	SOGA3	1.37
NM_000426	LAMA2	-1.37
NR_026773	LINC01558	1.46
NM_001003806	TARP	-1.76
NM_212460	ARL4A	-1.63
NM_138445	GPR146	-1.76
NM_001098201	GPER1	1.48
NM_001172438	PEG10	-1.68
NM_001742	CALCR	2.93
NM_002612	PDK4	-1.39
NM_001145268	FAM185A	1.38
NM_080385	CPA5	2.27
NM_001195243	SMKR1	-1.41
NM_001130929	C7orf73	-2.19
NM_001724	BPGM	-1.45
NM_000603	NOS3	1.41
NM_001101312	TMEM176B	1.85
NM_004331	BNIP3L	-1.50
NM_030795	STMN4	1.96
NM_024790	CSPP1	1.41
NM_005098	MSC	-1.67
NM_000971	RPL7	1.66
NM_015364	LY96	1.44
NR_003594	REXO1L2P	1.42
NM_001190972	C8orf88	-1.85
NM_001199975	UQCRB	1.67
NR_034034	LOC100288748	1.38
NM_001040627	NCALD	-1.41
NM_020189	ENY2	1.54
NM_207414	MROH5	1.86
NM_001201380	CNTNAP3B	1.99
NM_030940	ISCA1	-1.73
NM_004938	LGALS4	-1.50
NM_000035	ALDOB	2.87
NM_197978	HEMGN	-2.56
NM_001101338	ZNF883	1.47
NM_032552	DAB2IP	-1.44
NM_004408	DNM1	2.41
NM_016219	MAN1B1	2.14
NM_014286	NCS1	-2.07
NM_004099	STOM	-1.39
NM_003863	DPM2	-1.41
NR_034016	LINC01502	1.68
NM_000032	ALAS2	-1.49
NR_002226	INGX	1.37
NR_024582	JPX	1.52
NM_014496	RPS6KA6	1.47
NM_001939	DRP2	2.68
NM_173494	PIH1D3	1.44
NM_001000	RPL39	1.75
NM_018388	MBNL3	-3.41
NM_001289	CLIC2	-1.79
NM_002436	MPP1	-1.72
NM_032512	PDZD4	-1.58
NM_001146705	KDM5D	4.38
NR_028062	PRKY	3.87
NR_001545	TTY15	3.44
NM_004202	TMSB4Y	2.05
NM_001012515	FECH	-1.73
NR_036536	SNHG4	-1.73
NM_181351	NCAM1	-1.88
NM_016316	REV1	1.70
NM_032899	FAM83A	-1.64
NM_206927	SYTL2	-1.52
NM_001127388	DUX4L6	1.51
NM_001127389	DUX4L5	1.50
NM_014987	IGSF9B	1.43
NR_002927	HSP90AB4P	1.38

LogFC: Fold-change.

A tabela 4 identifica os transcritos diferencialmente expressos, seus respectivos genes e regulações gênicas pelo *Fold-change* (LogFC) que apresenta os genes com ganho e perda de expressão.

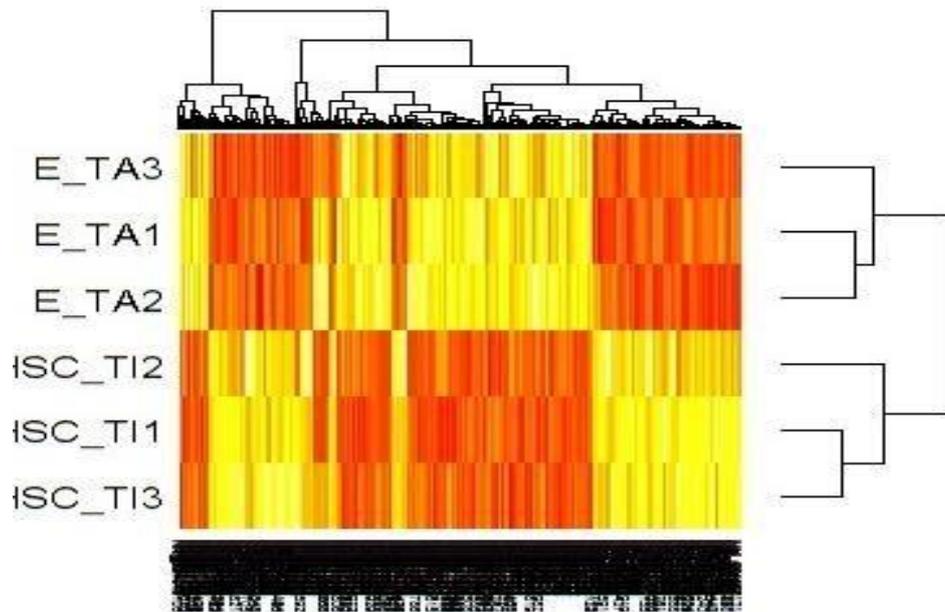
Com a base de dados desenhada à partir da análise 1 e as principais funcionalidades do programa já definida, foi gerado o gráfico a seguir, que revela a expressão gênica, onde o eixo Y representa os valores de LogFC e o eixo X os valores logarítmicos da contagem por milhão (LogCPM), enquanto que os pontos vermelhos identificam os genes com expressão diferencial significativa. No gráfico podemos observar 353 genes diferencialmente expressos, em que 174 apresentaram ganho e 179 perda na expressão (Gráfico 2).

Gráfico 2. Gráfico de expressão gênica, onde o eixo Y representa os valores de LogFC e o eixo X os valores logarítmicos da contagem por milhão (LogCPM), enquanto que os pontos vermelhos identificam os genes com expressão diferencial significativa. No gráfico podemos observar 353 genes diferencialmente expressos, em que 174 estão apresentaram ganho e 179 perda na expressão.



Na análise 1, o gráfico seguinte indica o mapa de calor (*Heatmap*) mostrando a capacidade dos genes diferencialmente expressos em individualizar o grupo com eutiroidismo com tratamento adequado (E_TA) e do grupo com HSC com tratamento inadequado (HSC_TI) (Gráfico 3).

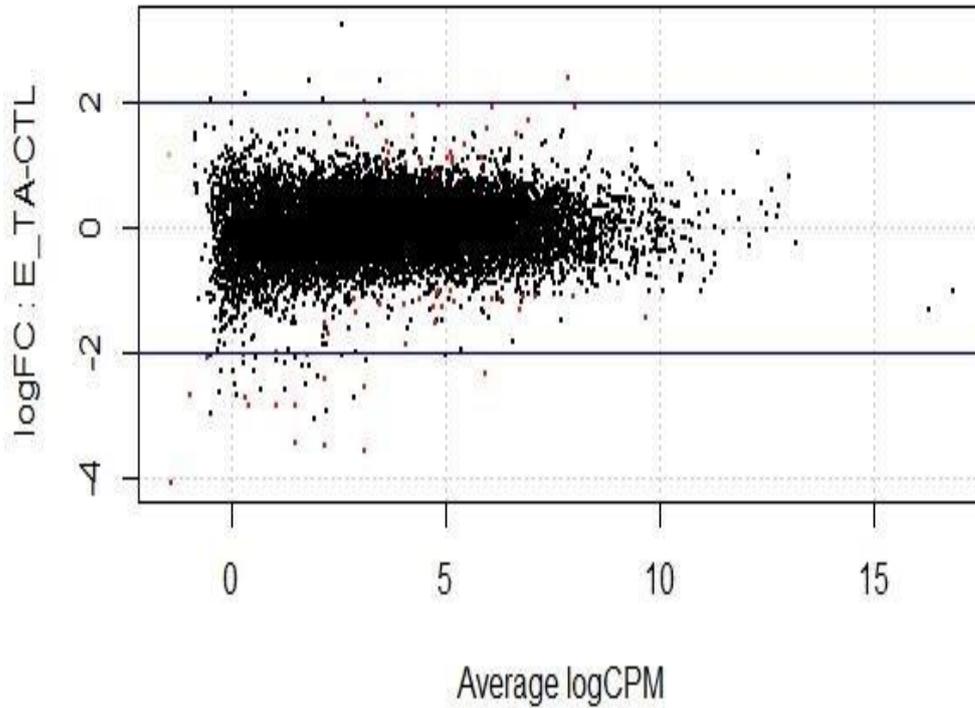
Gráfico 3. Gráfico com o mapa de calor (*Heatmap*) mostrando a capacidade dos genes diferencialmente expressos em individualizar o grupo com eutiroidismo com tratamento adequado (E_TA) e do grupo de hipotireoidismo subclínico com tratamento inadequado (HSC_TI).



O gráfico 3 diferencia potencialmente o paciente com tratamento adequado do paciente com tratamento inadequado.

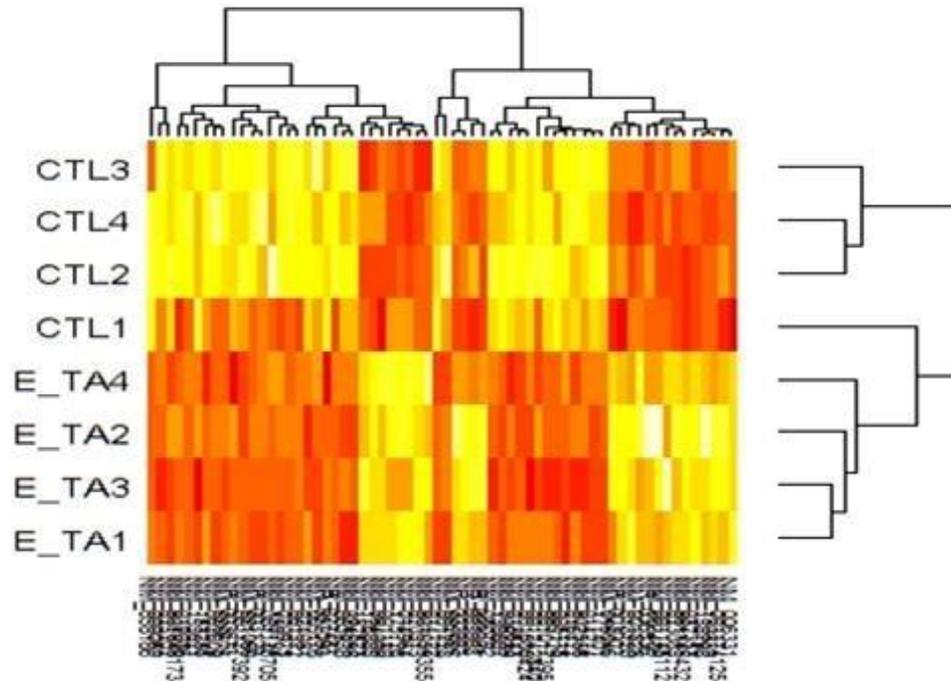
O gráfico a seguir, foi gerado a partir da análise 2, de transcritos diferencialmente expressos do grupo controle (CTL) com os transcritos do grupo com eutiroidismo com tratamento adequado (E_TA). Este gráfico revela a expressão gênica, onde o eixo Y representa os valores de LogFC e o eixo X os valores logarítmicos da contagem por milhão (LogCPM), enquanto que os pontos vermelhos identificam os genes com expressão diferencial significativa. No gráfico podemos observar 64 genes diferencialmente expressos, em que 26 apresentaram ganho e 38 perda na expressão (Gráfico 4).

Gráfico 4. Gráfico de expressão gênica, onde o eixo Y representa os valores de LogFC e o eixo X os valores logarítmicos da contagem por milhão (LogCPM), enquanto que os pontos vermelhos identificam os genes com expressão diferencial significativa. No gráfico podemos observar 64 genes diferencialmente expressos, em que 26 estão apresentaram ganho e 38 perda na expressão.



Na análise 2, o gráfico seguinte indica o mapa de calor (*Heatmap*) mostrando a capacidade dos genes diferencialmente expressos em individualizar o grupo controle (CTL) e do grupo com eutiroidismo com tratamento adequado (E_TA) (Gráfico 5).

Gráfico 5. Gráfico com o mapa de calor (*Heatmap*) mostrando a capacidade dos genes diferencialmente expressos em individualizar o grupo controle (CTL) e do grupo com eutiroidismo com tratamento adequado (E_TA).



Resumidamente, a análise *in silico* processou a DGE entre o grupo controle e o grupo com eutiroidismo com tratamento adequado, o que evidenciou 64 genes diferencialmente expressos. O mesmo foi realizado entre o grupo com eutiroidismo com tratamento adequado e o grupo com hipotiroidismo subclínico com tratamento inadequado, evidenciando 353 genes diferencialmente expressos. O ranking desses genes foi desenvolvido pelo valor da significância para cada gene e sua correção estatística foi apresentada pelo valor de FDR.

Posteriormente a tabela 5 apresenta a correlação dos *reads* dos 353 transcritos diferencialmente expressos com a concentração de TSH no grupo com eutiroidismo com tratamento adequado, e grupo com hipotiroidismo subclínico com tratamento inadequado. Seus respectivos LogFc, o coeficiente de correlação com a concentração de TSH, a localização citogenética, produto e a possível relação com os tecidos-alvo.

Tabela 5. Correlação dos 353 transcritos diferencialmente expressos com os níveis de concentração de TSH, e seus respectivos coeficientes de correlação, localização citogenética, produto e a possível relação com os tecidos-alvo.

Transcrito	Gene	Classe RNA	C.C.TSH	Cromossomo	Local	Produto	Tecidos-alvo
NM_198149	SHISA4	mRNA	-,952 ^{**}	1	1q32.1	protein shisa-4 precursor	tiroide, paratiroide, cérebro, coração, estômago, glândula salivar, ossos, ovários, nervos, pele, placenta, pulmão, útero.
NM_014286	NCS1	mRNA	-,934 ^{**}	9	9q34	neuronal calcium sensor 1 isoform 1	tiroide, paratiroide, cérebro, coração, estômago, intestino, nervos, olhos, ossos, ovários, pele, pulmão, tecido adiposo, útero, vascular.
NM_174942	GAS2L3	mRNA	-,881 ^{**}	12	12q23.1	GAS2-like protein 3 isoform a	cérebro, nervos, olhos, pele, pulmão, vascular.
NM_012179	FBXO7	mRNA	-,881 ^{**}	22	22q12.3	F-box only protein 7 isoform 1	tiroide, paratiroide, cérebro, coração, estômago, intestino, nervos, olhos, ossos, ovários, pele, pulmão, tecido adiposo, útero, vascular.
NM_001204199	SRP19	mRNA	-,881 ^{**}	5	5q21-q22	signal recognition particle 19 kDa protein isoform 6	tiroide, paratiroide, cérebro, coração, estômago, intestino, nervos, olhos, ossos, ovários, pele, pulmão, útero.
NM_001190972	C8orf88	mRNA	-,868 ^{**}	8	8q21.3	uncharacterized protein C8orf88	cérebro, estômago, olhos, ovários, pele, pulmão, tecido adiposo, útero.
NM_001145819	SOX6	mRNA	-,857 ^{**}	11	11p15.3	transcription factor SOX-6 isoform 4	cérebro, coração, intestino, nervos, olhos, ossos, pele, placenta, pulmão, tecido adiposo, útero.
NM_182488	USP12	mRNA	-,857 ^{**}	13	13q12.13	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 12	tiroide, cérebro, coração, intestino, olhos, ossos, ovários, pele, placenta, pulmão, tecido adiposo, útero, vascular.
NM_005875	EIF1B	mRNA	-,857 ^{**}	3	3p22.1	eukaryotic translation initiation factor 1b	tiroide, paratiroide, cérebro, coração, estômago, intestino, olhos, ossos, ouvidos, ovários, pele, placenta, pulmão, útero, vascular.
NM_018414	ST6GALNAC1	mRNA	0,807	17	17q25.1	alpha-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 1 isoform 1	cérebro, estômago, intestino, ovários, placenta, pulmão, útero.
NM_004826	ECEL1	mRNA	0,762	2	2q24.3	endothelin-converting enzyme-like 1 isoform 1	cérebro, intestino, nervos, olhos, ovários, pulmão, útero.
NM_130794	CST11	mRNA	0,755	20	20p11.21	cystatin-11 isoform 1 precursor	
NM_005764	PDZK1IP1	mRNA	-0,714	1	1p33	PDZK1-interacting protein 1 precursor	cérebro, estômago, intestino, olhos, pele, pulmão, útero.
NM_003243	TGFBR3	mRNA	-0,714	1	1p33-p32	transforming growth factor beta receptor type 3 isoform a precursor	paratiroide, cérebro, coração, estômago, intestino, nervos, olhos, ossos, ouvidos, ovários, pele, placenta, pulmão, tecido adiposo, útero, vascular.
NM_002838	PTPRC	mRNA	-0,714	1	1q31-q32	receptor-type tyrosine-protein phosphatase C isoform 1 precursor	cérebro, estômago, intestino, olhos, ossos, ovários, placenta, pele, pulmão, tecido adiposo, útero, vascular.
NR_038256	LINC00943	ncRNA	-0,714	12	12	long intergenic non-protein coding RNA 943	testículo; cérebro; tecido não caracterizado; rim, misturado
NM_032846	RAB2B	mRNA	-0,714	14	14q11.2	ras-related protein Rab-2B isoform 1	tiróide, cérebro, coração, intestino, nervos, olhos, ossos, ovários, pele, placenta, pulmão, tecido adiposo, útero, vascular.
NM_080821	FAM210B	mRNA	-0,714	20	20q13.2	protein FAM210B	tiroide, cérebro, coração, estômago, intestino, nervos, olhos, ossos, ovários, pele, placenta, pulmão, útero, vascular.
NM_002099	GYPA	mRNA	-0,714	4	4q31.21	glycophorin-A isoform 1 precursor	coração, olhos, placenta.
NM_001289	CLIC2	mRNA	-0,714	X	Xq28	chloride intracellular channel protein 2	paratiroide, cérebro, coração, intestino, músculo, nervos, olhos, ossos, ovários, placenta, pulmão, tecido adiposo.
NM_000561	GSTM1	mRNA	-0,719	1	1p13.3	glutathione S-transferase Mu 1 isoform 1	cérebro, coração, estômago, nervos, olhos, ossos, ovários, pulmão, útero.
NM_021229	NTN4	mRNA	-0,719	12	12q22	netrin-4 precursor	paratiroide, cérebro, coração, estômago, nervos, olhos, ossos, ouvidos, ovários, pele, placenta, pulmão, útero, vascular.
NM_001199081	PODN	mRNA	-0,738	1	1p32.3	podocan isoform 2	cérebro, coração, estômago, intestino, nervos, olhos, ossos, pele, placenta, pulmão, útero, tecido adiposo, vascular.

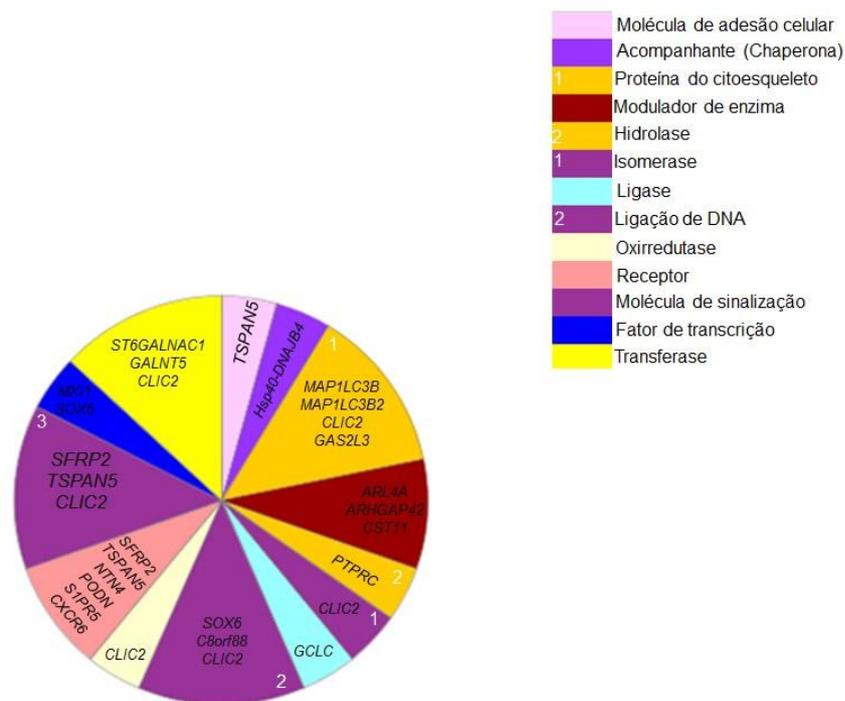
Transcrito	Gene	Classe RNA	C.C.TSH	Cromossomo	Local	Produto	Tecidos-alvo
NM_001128626	<i>SPIRE1</i>	mRNA	-0,738	18	18p11.21	protein spire homolog 1 isoform a	tiroide, paratiroide, cérebro, coração, estômago, intestino, nervos, olhos, ossos, ovários, ouvidos, pele, placenta, pulmão, útero, vascular.
NM_005723	<i>TSPAN5</i>	mRNA	-0,738	4	4q23	tetraspanin-5	tiroide, cérebro, coração, estômago, intestino, nervos, olhos, ossos, ovários, pele, placenta, pulmão, útero, vascular.
NM_004331	<i>BNIP3L</i>	mRNA	-0,738	8	8p21	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like	paratiroide, cérebro, coração, estômago, intestino, nervos, olhos, ossos, ouvidos, ovários, pele, placenta, pulmão, tecido adiposo, útero, vascular.
NM_130439	<i>MX11</i>	mRNA	-0,762	10	10q24-q25	max-interacting protein 1 isoform b	tiroide, paratiroide, cérebro, coração, estômago, intestino, nervos, olhos, ossos, ouvidos, ovários, pele, placenta, pulmão, tecido adiposo, útero.
NM_001085481	<i>MAP1LC3B2</i>	mRNA	-0,762	12	12q24.22	microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3 beta 2 precursor	cérebro, coração, intestino, olhos, ossos, pele, placenta, pulmão, útero, vascular.
NM_022818	<i>MAP1LC3B</i>	mRNA	-0,762	16	16q24.2	microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B	tiroide, paratiroide, cérebro, coração, estômago, intestino, nervos, olhos, ossos, ouvidos, ovários, pele, placenta, pulmão, tecido adiposo, útero, vascular.
NM_003831	<i>RIOK3</i>	mRNA	-0,762	18	18q11.2	serine/threonine-protein kinase RIO3	tiroide, cérebro, coração, estômago, intestino, olhos, ossos, pele, placenta, útero, vascular.
NM_001166215	<i>S1PR5</i>	mRNA	-0,762	19	19p13.2	sphingosine 1-phosphate receptor 5	tiroide, cérebro, intestino, olhos, ossos, pele, placenta, pulmão.
NM_177417	<i>KLC3</i>	mRNA	-0,762	19	19q13	kinesin light chain 3	cérebro, ovários, placenta, útero.
NM_014568	<i>GALNT5</i>	mRNA	-0,762	2	2q24.1	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5	paratiroide, cérebro, intestino, pele, placenta, pulmão, vascular.
NM_000345	<i>SNCA</i>	mRNA	-0,762	4	4q21	alpha-synuclein isoform NACP140	cérebro, coração, intestino, nervos, olhos, ossos, ouvidos, ovários, pele, placenta, pulmão, útero, vascular.
NM_001129891	<i>FAM196B</i>	mRNA	-0,762	5	5q35.1	protein FAM196B	cérebro, estômago, pulmão, útero, vascular.
NM_001130929	<i>C7orf73</i>	mRNA	-0,762	7	7q33	uncharacterized protein C7orf73 precursor	cérebro, coração, intestino, nervos, olhos, ovários, pele, placenta, pulmão, útero, vascular.
NM_197978	<i>HEMGN</i>	mRNA	-0,762	9	9q22.33	hemogen	cérebro, coração, placenta, pulmão.
NM_152432	<i>ARHGAP42</i>	mRNA	-0,778	11	11q22.1	rho GTPase-activating protein 42	tiroide, paratiroide, cérebro, estômago, intestino, nervos, olhos, pele, placenta, pulmão, útero.
NM_007034	<i>Hsp40-DNAJB4</i>	mRNA	-0,786	1	1p31.1	dnaJ homolog subfamily B member 4 isoform a	tiroide, cérebro, coração, estômago, intestino, nervos, olhos, ossos, ovários, pele, placenta, pulmão, tecido adiposo, útero, vascular.
NM_015313	<i>ARHGEF12</i>	mRNA	-0,786	11	11q23.3	rho guanine nucleotide exchange factor 12 isoform 1	tiroide, paratiroide, cérebro, coração, estômago, intestino, olhos, ovários, ouvidos, pele, placenta, pulmão, tecido adiposo, útero, vascular.
NM_014614	<i>PSME4</i>	mRNA	-0,786	2	2p16.2	proteasome activator complex subunit 4	tiroide, cérebro, coração, estômago, intestino, nervos, olhos, ossos, ovários, pele, placenta, pulmão, tecido adiposo, útero, vascular.
NM_001162429	<i>PDCD6IP</i>	mRNA	-0,786	3	3p22.3	programmed cell death 6-interacting protein isoform 2	tiroide, paratiroide, cérebro, coração, estômago, intestino, nervos, olhos, ouvidos, ovários, pele, placenta, pulmão, útero, vascular.

Transcrito	Gene	Classe RNA	C.C.TSH	Cromossomo	Local	Produto	Tecidos-alvo
NM_003013	SFRP2	mRNA	-0,786	4	4q31.3	secreted frizzled-related protein 2 precursor	tiroide, cérebro, coração, estômago, intestino, nervos, olhos, ossos, ovários, pele, placenta, pulmão, útero, vascular.
NM_030940	ISCA1	mRNA	-0,786	9	9q21.33	iron-sulfur cluster assembly 1 homolog, mitochondrial precursor	tiroide, cérebro, coração, estômago, intestino, olhos, ossos, ouvidos, ovários, pele, placenta, pulmão, útero, vascular.
NM_004938	LGALS4	mRNA	-0,786	9	9q21.33	death-associated protein kinase 1	paratiroide, cérebro, coração, estômago, intestino, olhos, ossos, ovários, pele, placenta, pulmão, útero, vascular.
NM_001498	GCLC	mRNA	-0,81	6	6p12	glutamate--cysteine ligase catalytic subunit isoform a	paratiroide, tiroide, cérebro, estômago, intestino, nervos, ossos, ouvidos, ovários, pele, placenta, pulmão, útero.
NM_000850	GSTM4	mRNA	-0,826	1	1p13.3	glutathione S-transferase Mu 4 isoform 1	
NM_212460	ARL4A	mRNA	-0,833	7	7p21.3	ADP-ribosylation factor-like protein 4A	tiroide, paratiroide, cérebro, coração, estômago, intestino, nervos, olhos, ossos, ouvido, ovários, pele, placenta, pulmão, tecido adiposo, útero, vascular.

C.C.TSH: Coeficiente de correlação entre reads dos transcritos e concentração de TSH.

A partir do resultado da correlação entre os 353 transcritos e a concentração de TSH, que originou 48 genes diferencialmente expressos, 21 genes foram classificados pelo *Panther classification system* quanto a função destes genes, demonstrado no gráfico 6.

Gráfico 6. Classificação dos 21 genes pelo *Panther classification system*.



Após ser realizada a correlação dos transcritos diferencialmente expressos com a concentração de TSH, foi efetuada outra correlação dos 353 transcritos diferencialmente expressos com os resultados do teste de Zulewisk. O que resultou em 13 genes diferencialmente expressos. A seguir, a tabela 6 identifica os genes, classe de RNA, valor de correlação com os valores do teste de Zulewski, LogFC e localização citogenética.

Tabela 6. Correlação dos 353 transcritos diferencialmente expressos com os valores resultantes do teste de Zulewski, e respectivos: posição citogenética, Log FC e valor de correlação.

Transcrito	Gene	Classe RNA	C.C.Z	LogFC	Cromossomo	Local
NM_147129	<i>ALS2CL</i>	mRNA	0,939	2.59	3	3p21.31
NM_015933	<i>TMA7</i>	mRNA	0,939	1.68	3	3p21.31
NM_177963	<i>SYT12</i>	mRNA	0,824	1.81	11	11q13.2
NM_000603	<i>NOS3</i>	mRNA	0,812	1.41	7	7q36
NM_182761	<i>FAM170A</i>	mRNA	0,788	2.10	5	5q23.1
NM_014987	<i>IGSF9B</i>	mRNA	0,783	1.43	26	11q25
NM_016170	<i>TLX2</i>	mRNA	0,764	1.72	2	2p13.1
NR_000005	<i>SNORD15A</i>	ncRNA	0,759	1.43	11	11q13.4
NM_001029	<i>RPS26</i>	mRNA	0,747	1.47	12	12q13
NM_000559	<i>HBG1</i>	mRNA	0,735	4.37	11	11p15.5
NM_000184	<i>HBG2</i>	mRNA	0,735	4.35	11	11p15.5
NM_001242327	<i>USP17L24</i>	mRNA	0,733	1.38	4	4p16.1
NR_026968	<i>RPL34-AS1</i>	ncRNA	0,727	1.50	4	4q25

C.C.Z: Coeficiente de correlação entre os genes diferencialmente expressos com os valores resultantes do teste de Zulewski; ncRNA: RNA não codificante; LogFC: *Fold-change*.

Com base nesses resultados, selecionamos 2 genes para validar em PCR-RT. Os quais estão representados na tabela 7 com suas respectivas classes, LogFC, localização citogenética, classificação pelo *Panther classification system* e *reads* do grupo com eutiroidismo com tratamento adequado (E_TA) e do grupo com HSC com tratamento inadequado (HSC_TI).

Tabela 7. Genes selecionados para validação por PCR-RT, com suas classes, LogFC, localização cromossômica, produto, classificação pelo *Panther classification system* e reads do grupo com eutiroidismo com tratamento adequado (E_TA) e do grupo com hipotiroidismo com tratamento inadequado (HSC_TI).

Gene		<i>CXCR6</i>	<i>HTR4</i>
Classe RNA		mRNA	mRNA
LogFC		-2.00	2.13
Cromossomo		3	5
Local		3p21	5q31-q33
Produto		"CXC tipo de receptor de quimiocina 6" protein_id="NP_006555.1"	"5-hydroxytryptamine receptor 4 isoform i" protein_id="NP_00103526.3.1"
Análise Panther		Receptor Resposta ao estímulo	Receptor
Reads	E_TA1	159	72
	E_TA2	78	37
	E_TA3	143	20
	E_TA4	103	31
Reads	HSC_TI1	8	22
	HSC_TI2	27	103
	HSC_TI3	20	126
	HSC_TI4	21	246

LogFC: *Fold-change*; Panther: *Panther classification system*; E_TA (1,2,3 e 4): grupo com eutiroidismo com tratamento adequado; HSC_TI (1,2,3 e 4): grupo com hipotiroidismo com tratamento inadequado.

5.0 DISCUSSÃO

Embora não haja nenhuma dúvida sobre o tratamento de pacientes com concentração de TSH acima de 10,0 mUI/L, a decisão de tratar pacientes com hipotireoidismo subclínico com L-T₄ é controversa. A discussão da eficácia da terapia de reposição de L-T₄ tem mostrado resultados convergentes nas publicações [91,92,97,98,125-134]. A dificuldade do tratamento terapêutico em estabelecer a concentração bioquímica adequada atinge 30 a 50% dos usuários de L-T₄ [132]. Esta percentagem apresenta um valor bastante expressivo de indivíduos que continuam a sofrer com os sintomas de hipotireoidismo.

Nas últimas décadas observamos melhorias nas estratégias de gestão de pacientes conduzidos por uma melhor apreciação da farmacocinética da L-T₄. No entanto, aspectos da terapia, como o momento ideal de medicação é uma estratégia para superar o tratamento de não-adesão e direcionar as concentrações exatas a serem prescritas. Além disso, existe agora um conjunto substancial de literatura sobre variações genéticas comuns nas desidases, transportadores de hormônios da tireoide e seu papel na regulação local. Apesar da disponibilidade de reposição de T₄ sintético, ainda existem desafios para melhorar os resultados desta terapia.

Na prática clínica, é necessário distinguir esses indivíduos não satisfeitos do percentual do percentual dos pacientes inadequadamente tratados, seja porque o diagnóstico ou a indicação de uso de L-T₄ foi equivocado, seja porque o paciente não aderiu ao tratamento recomendado, ou porque esses indivíduos apresentam fatores que interferem na ação de T₄ sintético.

A dificuldade da monoterapia de L-T₄ para normalizar universalmente a sinalização de hormônios tireoidianos [125] e a medicina personalizada não só irá esclarecer o papel do hipotireoidismo subclínico, mas também ajudar a identificar para quais pacientes o tratamento com L-T₄ irá proporcionar o máximo efeito e consequentemente, que irá proporcionar o maior benefício.

Assim sendo, o uso da estratégia de sequenciamento de alto desempenho através do RNA-Seq foi uma escolha adequada devido a esse processo permitir não só a compreensão do transcriptoma, mas também a quantificação de todos os genes, a obtenção de suas isoformas (*splicing* alternativo) e a facilidade na construção das

bibliotecas. Além desta técnica apresentar resultado compatível com outras técnicas de NGS [182,183].

Nesse estudo tivemos o cuidado para evitar erros nas fases pré-analíticas e analíticas. Na fase pré-analítica, a coleta de sangue periférico foi realizada em tubos especiais, que possibilitavam a preservação completa do RNA. Uma vez que, a conservação e a estabilização do RNA são um passo de extrema importância, sendo que uma conservação inadequada pode alterar o resultado de um estudo de expressão gênica, modificando a quantidade e a qualidade do RNA analisado [184,185].

O processo de extração do RNA garantiu um alto rendimento para todos os subtipos de RNA, evitando a degradação do material. Ainda que o processo de extração tenha custo e tempo gastos significativos, a utilização de um método padrão ouro para a extração garante a qualidade e a quantidade dos transcritos [186,187].

Dentre os dois genes selecionados, o gene *CXCR6* é um receptor de superfície acoplado a proteína G, um receptor de quimiocina presente em pequeno subconjunto de células Th1 e Tc1 circulantes. O *CXCR6* pode ser um marcador para células que migraram para o tecido tireoideano [188]. Desempenha um papel fundamental de lesão renal induzida por angiotensina II e fibrose através da regulação de infiltração de macrófagos e a acumulação de fibroblastos derivados da medula óssea e seus órgãos-alvo relacionados ao hipotireoidismo, sendo eles, a placenta, útero e cérebro (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clone/order/unigene/136272>) [189].

O gene *HTR4* é o segundo gene selecionado, trata-se de um membro da família de receptores de serotonina, esses receptores são acoplados a proteínas G e estimulam a produção de cAMP em resposta à serotonina (5-hidroxitriptamina). O produto gênico é uma proteína transmembranar glicosilada que funciona tanto no sistema nervoso periférico como central para modular a liberação de vários neurotransmissores. O *HTR4* está relacionado com pacientes com hipotireoidismo gestacional, e fibrose cardíaca por meio de TNF- α , e está relacionado com tecidosalvo, nervos periféricos, cérebro e intestino (Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3360>).

Os hormônios tireoideanos atuam em células-alvo através de receptores acoplados à proteína G. O hipotireoidismo e nódulos tireoideanos tem associação causal a mutações em receptores acoplados à proteína G [190]. Esses dois genes, *CXCR6* e

HTR4, possuem uma alta afinidade pelos órgãos relacionados a distúrbio endócrino, valor absoluto relativamente alto, e ambos são receptores acoplados a proteína G.

Estes resultados sugerem que variantes genéticas podem desempenhar um papel importante na efetividade do tratamento com levotiroxina. A análise da expressão gênica permite determinar estado metabólico do indivíduo e saber se este apresentará o risco de ineficácia a um determinado fármaco. Dentro da prática médica, a nossa perspectiva é de uma individualização do tratamento com levotiroxina e melhora na resposta terapêutica.

6.0 CONCLUSÃO

Identificamos transcritos, que poderão compor um painel para a avaliação da expressão gênica, servindo como biomarcadores para o diagnóstico do hipotireoidismo primário, mesmo em indivíduos com concentrações de TSH próximas dos valores de referência. Além de marcar a resposta ao uso de levotiroxina, *CXCR6* e *HTR4*, poderão ter utilidade na avaliação da repercussão tecidual do hipotireoidismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MOORE, K. L. Fundamentos de anatomia clínica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 501. 2004.
2. VILLACORTE, M. et al. Thyroid follicle development requires Smad1/5- and endothelial cell-dependent basement membrane assembly. *Development*, v. 143, n. 11, p. 1958-70, Jun 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27068110> >.
3. VAN VLIET, G. Development of the thyroid gland: lessons from congenitally hypothyroid mice and men. *Clin Genet*, v. 63, n. 6, p. 445-55, Jun 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12786749> >.
4. PEARCE, E. N.; CALDWELL, K. L. Urinary iodine, thyroid function, and thyroglobulin as biomarkers of iodine status. *Am J Clin Nutr*, v. 104 Suppl 3, p. 898S-901S, Sep 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27534636> >.
5. Roitt IM, Doniach D, Campbell PN, Hudson RV. Auto antibodies in Hashimoto's disease (lymphadenoid goitre). *Lancet* 1956; 2: 820-1.
6. ESTIENNE, V. et al. Multicenter study on TGPO autoantibody prevalence in various thyroid and non-thyroid diseases; relationships with thyroglobulin and thyroperoxidase autoantibody parameters. *Eur J Endocrinol*, v. 141, n. 6, p. 563-9, Dec 1999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10601957> >.
7. BIANCO, A. C. Cracking the code for thyroid hormone signaling. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, v. 124, p. 26-35, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23874007> >.
8. 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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22986150> >.
9. BUNEVICIUS, R. et al. Effects of thyroxine as compared with thyroxine plus triiodothyronine in patients with hypothyroidism. *N Engl J Med*, v. 340, n. 6, p. 4249, Feb 1999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9971866> >.

10. LUO, Y. et al. A novel role for flotillin-containing lipid rafts in negative-feedback regulation of thyroid-specific gene expression by thyroglobulin. *Thyroid*, Sep 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27676653> >.
11. 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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25005935> >.
12. SASAKI, S. et al. Ligand-induced recruitment of a histone deacetylase in the negative-feedback regulation of the thyrotropin beta gene. *EMBO J*, v. 18, n. 19, p. 5389-98, Oct 1999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10508171> >.
13. VASSART, G.; DUMONT, J. E. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev*, v. 13, n. 3, p. 596-611, Aug 1992. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1425489> >.
14. CAVALIERI, R. R. Iodine metabolism and thyroid physiology: current concepts. *Thyroid*, v. 7, n. 2, p. 177-81, Apr 1997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9133680> >.
15. VAISMAN, M.; ROSENTHAL, D.; CARVALHO, D. P. [Enzymes involved in thyroid iodide organification]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v. 48, n. 1, p. 9-15, Feb 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15611814> >.
16. 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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23681265> >.
17. Sawin CS. The heritage of the thyroid: a brief history. In Werner & Ingbar's, editores. *The thyroid: a Fundamental and Clinical text*. 10 ed. Philadelphia. PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
18. SENESE, R. et al. Thyroid: biological actions of 'nonclassical' thyroid hormones. *J Endocrinol*, v. 221, n. 2, p. R1-12, May 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24464019> >.

19. BERRY, M. J.; BANU, L.; LARSEN, P. R. Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature*, v. 349, n. 6308, p. 438-40, Jan 1991. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1825132> >.
20. BERRY, M. J.; LARSEN, P. R. Molecular cloning of the selenocysteine-containing enzyme type I iodothyronine deiodinase. *Am J Clin Nutr*, v. 57, n. 2 Suppl, p. 249S255S, Feb 1993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8427198> >.
21. SAGAR, G. D. et al. The thyroid hormone-inactivating deiodinase functions as a homodimer. *Mol Endocrinol*, v. 22, n. 6, p. 1382-93, Jun 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18356288> >.
22. CURCIO-MORELLI, C. et al. In vivo dimerization of types 1, 2, and 3 iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrinology*, v. 144, n. 3, p. 937-46, Mar 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12586771> >.
23. BAQUI, M. et al. Human type 3 iodothyronine selenodeiodinase is located in the plasma membrane and undergoes rapid internalization to endosomes. *J Biol Chem*, v. 278, n. 2, p. 1206-11, Jan 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12419801> >.
24. CALLEBAUT, I. et al. The iodothyronine selenodeiodinases are thioredoxin-fold family proteins containing a glycoside hydrolase clan GH-A-like structure. *J Biol Chem*, v. 278, n. 38, p. 36887-96, Sep 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12847093> >.
25. SALVATORE, D. et al. Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in human thyroid. *J Clin Invest*, v. 98, n. 4, p. 962-8, Aug 1996. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8770868> >.
26. 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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22634734> >.
27. 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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21679772> >.

28. BIANCO, A. C. et al. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev*, v. 23, n. 1, p. 38-89, Feb 2002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11844744> >.
29. WU, Y.; KOENIG, R. J. Gene regulation by thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab*, v. 11, n. 6, p. 207-11, Aug 2000. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10878749> >.
30. CHIN, W. W. et al. Thyroid hormone regulation of thyrotropin gene expression. *Recent Prog Horm Res*, v. 48, p. 393-414, 1993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8441852> >.
31. TAGAMI, T.; PARK, Y.; JAMESON, J. L. Mechanisms that mediate negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by the thyroid hormone receptor. *J Biol Chem*, v. 274, n. 32, p. 22345-53, Aug 1999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10428804> >.
32. FONDELL, J. D. et al. Unliganded thyroid hormone receptor alpha can target TATA-binding protein for transcriptional repression. *Mol Cell Biol*, v. 16, n. 1, p. 281-7, Jan 1996. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8524305> >.
33. 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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23184912> >.
34. GAITONDE, D. Y.; ROWLEY, K. D.; SWEENEY, L. B. Hypothyroidism: an update. *Am Fam Physician*, v. 86, n. 3, p. 244-51, Aug 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22962987> >.
35. AOKI, Y. et al. Serum TSH and total T4 in the United States population and their association with participant characteristics: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES 1999-2002). *Thyroid*, v. 17, n. 12, p. 1211-23, Dec 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18177256> >.

36. SGARBI, J. A. et al. The Brazilian consensus for the clinical approach and treatment of subclinical hypothyroidism in adults: recommendations of the thyroid Department of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v. 57, n. 3, p. 166-83, Apr 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23681263> >.
37. KAJANTIE, E. et al. Spontaneous hypothyroidism in adult women is predicted by small body size at birth and during childhood. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 91, n. 12, p. 4953-6, Dec 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16984989> >.
38. SAWIN, C. T. et al. The aging thyroid. Thyroid deficiency in the Framingham Study. *Arch Intern Med*, v. 145, n. 8, p. 1386-8, Aug 1985. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4026469> >.
39. SURKS, M. I.; HOLLOWELL, J. G. Age-specific distribution of serum thyrotropin and antithyroid antibodies in the US population: implications for the prevalence of subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 92, n. 12, p. 4575-82, Dec 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17911171> >.
40. VANDERPUMP, M. P. et al. The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham Survey. *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 43, n. 1, p. 55-68, Jul 1995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7641412> >.
41. STUCKEY, B. G. et al. Postpartum thyroid dysfunction and the long-term risk of hypothyroidism: results from a 12-year follow-up study of women with and without postpartum thyroid dysfunction. *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 73, n. 3, p. 389-95, Sep 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20184598> >.
42. REINERS, C. et al. The First Meeting of the WHO Guideline Development Group for the Revision of the WHO 1999 Guidelines for Iodine Thyroid Blocking. *Radiat Prot Dosimetry*, v. 171, n. 1, p. 47-56, Sep 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27664997> >.
43. WOEBER, K. A. Iodine and thyroid disease. *Med Clin North Am*, v. 75, n. 1, p. 169-78, Jan 1991. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1987441> >.

44. PEARCE, E. N.; ANDERSSON, M.; ZIMMERMANN, M. B. Global iodine nutrition: Where do we stand in 2013? *Thyroid*, v. 23, n. 5, p. 523-8, May 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23472655> >.
45. Chiamolera MI, Maciel R, Andreoni D. Regulação neuroendócrina da tireóide. In Cukiert A, Liberman B. *Neuroendocrinologia Clínica e Cirúrgica*. São Paulo: Lemos, 2002. p. 129-138.
46. Moura E, Paiva R, Botelho CA, Egito C. Doenças funcionais da tireóide. In Filgueira NA et al. *Conduas em Clínica Médica*, 4ª edição. Rio de Janeiro 2007. p. 540-60.
47. GOLDEN, S. H. et al. Clinical review: Prevalence and incidence of endocrine and metabolic disorders in the United States: a comprehensive review. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 94, n. 6, p. 1853-78, Jun 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19494161> >.
48. HOLLOWELL, J. G. et al. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab*, v. 87, n. 2, p. 489-99, Feb 2002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11836274> >.
49. COOPER, D. S.; BIONDI, B. Subclinical thyroid disease. *Lancet*, v. 379, n. 9821, p. 1142-54, Mar 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22273398> >.
50. BAUMGARTNER, C.; BLUM, M. R.; RODONDI, N. Subclinical hypothyroidism: summary of evidence in 2014. *Swiss Med Wkly*, v. 144, p. w14058, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25536449> >.
51. PEARCE, S. H. et al. 2013 ETA Guideline: Management of Subclinical Hypothyroidism. *Eur Thyroid J*, v. 2, n. 4, p. 215-28, Dec 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24783053> >.
52. SOMWARU, L. L. et al. The natural history of subclinical hypothyroidism in the elderly: the cardiovascular health study. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 97, n. 6, p. 1962-9, Jun 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22438233> >.

53. FATOURECHI, V. Subclinical hypothyroidism: an update for primary care physicians. *Mayo Clin Proc*, v. 84, n. 1, p. 65-71, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19121255> >.
54. 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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24364444> >.
55. SURKS, M. I. et al. Subclinical thyroid disease: scientific review and guidelines for diagnosis and management. *JAMA*, v. 291, n. 2, p. 228-38, Jan 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14722150> >.
56. NEGRO, R. et al. Levothyroxine treatment in euthyroid pregnant women with autoimmune thyroid disease: effects on obstetrical complications. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 91, n. 7, p. 2587-91, Jul 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16621910> >.
57. AJJAN, R. A. et al. Detection of binding and blocking autoantibodies to the human sodium-iodide symporter in patients with autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 85, n. 5, p. 2020-7, May 2000. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10843191> >.
58. Samuels MH, McDaniel PA. Thyrotrophin levels during hydrocortisone infusions that mimic fasting-induced cortisol elevations: a clinical research study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3700-4.
59. Bartalena L, Brogioni S, Grasso L, Bogazzi F, Burelli A, Martino E. Treatment of amiodarone-induced thyrotoxicosis, a difficult challenge: results of a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2930-3.
60. Campbell NR, Hasinoff BB, Stalts H, Rao B, Wong, NC. Ferrous sulfate reduces thyroxine efficacy in patients with hypothyroidism. *Ann Intern Med* 1992;117:1010-3.
61. Gaitan E, Cooksey RC, Legan J, et al. : antitireoidiano e efeitos goitrogenic de extratos de água de carvão de áreas de bócio iodo-suficiente. *Tiróide* 1993; 3 4953.

62. Langer P, Tajtakova M, Fodor G, et al. : Aumento do volume da tireóide e prevalência de distúrbios da tireóide em uma área fortemente poluídas por bifenilos policlorados. *Eur J Endocrinol* 1998; 139: 402-409.
63. Braverman LE, Ele X, Pino S et al. O efeito do perclorato, tiocianato, e nitrato em função da tireóide em trabalhadores expostos ao perclorato de longo prazo. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 700-706.
64. ILLOUZ, F. et al. Tyrosine kinase inhibitors and modifications of thyroid function tests: a review. *Eur J Endocrinol*, v. 160, n. 3, p. 331-6, Mar 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19103722> >.
65. Chami, R.; Moreno-Reyes, R.; Corvilain, B. TSH measurement is not an appropriate screening test for autonomous functioning thyroid nodules: a retrospective study of 368 patients. *European Journal of Endocrinology*, v. 170, n. 4, p. 593-599, 2014.
66. SPENCER, C. A. et al. Applications of a new chemiluminometric thyrotropin assay to subnormal measurement. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 70, n. 2, p. 453-60, Feb 1990. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2105333> >.
67. GARBER, J. R. et al. Clinical practice guidelines for hypothyroidism in adults: cosponsored by the American Association of Clinical Endocrinologists and the American Thyroid Association. *Thyroid*, v. 22, n. 12, p. 1200-35, Dec 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22954017> >.
68. HUBER, G. et al. Prospective study of the spontaneous course of subclinical hypothyroidism: prognostic value of thyrotropin, thyroid reserve, and thyroid antibodies. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 87, n. 7, p. 3221-6, Jul 2002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12107228> >.
69. BRENTA, G. et al. Clinical practice guidelines for the management of hypothyroidism. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v. 57, n. 4, p. 265-91, Jun 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23828433> >.
70. JOFFE, R. T. et al. Subclinical hypothyroidism, mood, and cognition in older adults: a review. *Int J Geriatr Psychiatry*, v. 28, n. 2, p. 111-8, Feb 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22410877> >.

71. BIONDI, B. Mechanisms in endocrinology: Heart failure and thyroid dysfunction. *Eur J Endocrinol*, v. 167, n. 5, p. 609-18, Nov 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22956554> >.
72. NING, N. et al. Prognostic Role of Hypothyroidism in Heart Failure: A MetaAnalysis. *Medicine (Baltimore)*, v. 94, n. 30, p. e1159, Jul 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26222845> >.
73. ANDERSEN, M. N. et al. Long-term Outcome in Levothyroxine Treated Patients with Subclinical Hypothyroidism and Concomitant Heart Disease. *J Clin Endocrinol Metab*, p. jc20162226, Aug 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27571183> >.
74. RODONDI, N. et al. Subclinical hypothyroidism and the risk of coronary heart disease and mortality. *JAMA*, v. 304, n. 12, p. 1365-74, Sep 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20858880> >.
75. RAZVI, S. et al. Levothyroxine treatment of subclinical hypothyroidism, fatal and nonfatal cardiovascular events, and mortality. *Arch Intern Med*, v. 172, n. 10, p. 811-7, May 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22529180> >.
76. LIOUDAKI, E. et al. Subclinical hypothyroidism and vascular risk: an update. *Hormones (Athens)*, v. 12, n. 4, p. 495-506, 2013 Oct-Dec 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24457397> >.
77. MULLUR, R.; LIU, Y. Y.; BRENT, G. A. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol Rev*, v. 94, n. 2, p. 355-82, Apr 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24692351> >.
78. CANARIS, G. J. et al. The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch Intern Med*, v. 160, n. 4, p. 526-34, Feb 2000. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10695693> >.
79. 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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25166035> >.

80. BASU, G.; MOHAPATRA, A. Interactions between thyroid disorders and kidney disease. *Indian J Endocrinol Metab*, v. 16, n. 2, p. 204-13, Mar 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22470856> >.
81. DE GROOT, L. et al. Management of thyroid dysfunction during pregnancy and postpartum: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 97, n. 8, p. 2543-65, Aug 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22869843> >.
82. ASHOOR, G. et al. Maternal thyroid function at 11 to 13 weeks of gestation and subsequent fetal death. *Thyroid*, v. 20, n. 9, p. 989-93, Sep 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20718684> >.
83. LAZARUS, J. H. et al. Antenatal thyroid screening and childhood cognitive function. *N Engl J Med*, v. 366, n. 6, p. 493-501, Feb 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22316443> >.
84. LI, Y. et al. Abnormalities of maternal thyroid function during pregnancy affect neuropsychological development of their children at 25-30 months. *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 72, n. 6, p. 825-9, Jun 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19878506> >.
85. SU, P. Y. et al. Maternal thyroid function in the first twenty weeks of pregnancy and subsequent fetal and infant development: a prospective population-based cohort study in China. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 96, n. 10, p. 3234-41, Oct 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21832110> >.
86. ANDRADE JUNIOR, N. E.; PIRES, M. L.; THULER, L. C. [Depression and anxiety symptoms in hypothyroid women]. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 32, n. 7, p. 321-6, Jul 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21152840> >.
87. SAMUELS, M. H. Psychiatric and cognitive manifestations of hypothyroidism. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, v. 21, n. 5, p. 377-83, Oct 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25122491> >.
88. FU, J.; WEI, H.; LI, X. [Analysis on clinical characteristics of primary hypothyroidism-induced mental disorder]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, v. 41, n. 7, p. 711-4, Jul 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27592576> >.

89. BAJAJ, S. et al. Cognitive function in subclinical hypothyroidism in elderly. *Indian J Endocrinol Metab*, v. 18, n. 6, p. 811-4, Nov 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25364675> >.
90. US Department of Health and Human Services, FDA, and Center for Drug Evaluation and Research (2002) Guidance for industry: bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products—general considerations [<http://www.fda.gov/cder/guidance/4964dft.pdf>] (acessado dia 29/09/2016).
91. VAN MOLL, C. C.; SUSANTO, C. R.; KOX-VAN GASTEL, P. [A pitfall in the treatment of hypothyroidism]. *Ned Tijdschr Geneesk*, v. 159, p. A9064, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26443114> >.
92. 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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25266247> >.
93. IMS National prescription audit. Use of Meds in the U.S. review of 2010. Disponível em: < <http://www.imshealth.com>>.
94. KENDALL, E. C. Landmark article, June 19, 1915. The isolation in crystalline form of the compound containing iodine, which occurs in the thyroid. Its chemical nature and physiologic activity. By E.C. Kendall. *JAMA*, v. 250, n. 15, p. 2045-6, Oct 1983. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6352971> >.
95. HARRINGTON, C. R.; BARGER, G. Chemistry of Thyroxine: Constitution and Synthesis of Thyroxine. *Biochem J*, v. 21, n. 1, p. 169-83, 1927. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16743801> >.
96. U.S. Food and Drug Administration 2007 Pharmacy compounding/compounding of bio-identical hormone replacement therapies. Available at: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Testimony/ucm154031.htm>.
97. Hypothyroidism in adults. Levothyroxine if warranted by clinical and laboratory findings, not for simple TSH elevation. *Prescrire Int*, v. 24, n. 164, p. 241-4, 246, Oct 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26594730> >.

98. VIGÁRIO, P. O. S. et al. Inadequate levothyroxine replacement for primary hypothyroidism is associated with poor health-related quality of life-a Brazilian multicentre study. *Endocrine*, v. 44, n. 2, p. 434-40, Oct 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23371817> >.
99. WOLTER, P.; DUMEZ, H.; SCHÖFFSKI, P. Sunitinib and hypothyroidism. *N Engl J Med*, v. 356, n. 15, p. 1580; author reply 1580-1, Apr 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17429091> >.
100. Kocic I, et al. An investigation into the influence of experimental conditions on in vitro drug release from immediate-release tablets of levothyroxine sodium and its relation to oral bioavailability. *AAPS PharmSciTech*, v. 12, n. 3, p. 938-48, Sep 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21748540> >.
101. GKOTSINA, M. et al. Improved levothyroxine pharmacokinetics after bariatric surgery. *Thyroid*, v. 23, n. 4, p. 414-9, Apr 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23110329> >.
102. ZAMFIRESCU, I.; CARLSON, H. E. Absorption of levothyroxine when coadministered with various calcium formulations. *Thyroid*, v. 21, n. 5, p. 483-6, May 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21595516> >.
103. Lamson MJ. Pamplin CL. Rolleri RL. Klein I. Quantitation of a substantial reduction in levothyroxine (T4) absorption by food. *Thyroid*. 2004; 14: 876.
104. BENVENGA, S. et al. Altered intestinal absorption of L-thyroxine caused by coffee. *Thyroid*, v. 18, n. 3, p. 293-301, Mar 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18341376> >.
105. CENTANNI, M. et al. Thyroxine in goiter, *Helicobacter pylori* infection, and chronic gastritis. *N Engl J Med*, v. 354, n. 17, p. 1787-95, Apr 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16641395> >.
106. BACH-HUYNH, T. G. et al. Timing of levothyroxine administration affects serum thyrotropin concentration. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 94, n. 10, p. 3905-12, Oct 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19584184> >.

107. CAPPELLI, C. et al. Oral liquid levothyroxine treatment at breakfast: a mistake? *Eur J Endocrinol*, v. 170, n. 1, p. 95-9, Jan 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24123095> >.
108. TRIFIRÒ, G. et al. Drug interactions with levothyroxine therapy in patients with hypothyroidism: observational study in general practice. *Clin Drug Investig*, v. 35, n. 3, p. 187-95, Mar 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25643810> >.
109. IRVING, S. A.; VADIVELLOO, T.; LEESE, G. P. Drugs that interact with levothyroxine: an observational study from the Thyroid Epidemiology, Audit and Research Study (TEARS). *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 82, n. 1, p. 136-41, Jan 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25040647> >.
110. MARAKA, S. et al. Effects of Levothyroxine Therapy on Pregnancy Outcomes in Women with Subclinical Hypothyroidism. *Thyroid*, v. 26, n. 7, p. 980-6, Jul 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27112035> >.
111. GROZINSKY-GLASBERG, S. et al. Thyroxine-triiodothyronine combination therapy versus thyroxine monotherapy for clinical hypothyroidism: meta-analysis of randomized controlled trials. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 91, n. 7, p. 2592-9, Jul 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16670166> >.
112. HENNESSEY, J. V. Levothyroxine dosage and the limitations of current bioequivalence standards. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, v. 2, n. 9, p. 474-5, Sep 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16957756> >.
113. Melville N. No Thyroid-Function Benefits With T4/T3 Combo in Crossover Study. 2015 International Thyroid Congress and Annual Meeting of the American Thyroid Association; Orlando, Florida. Abstract 7, presented October 19, 2015.
114. TURNER, M. R. et al. Levothyroxine dose and risk of fractures in older adults: nested case-control study. *BMJ*, v. 342, p. d2238, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21527461> >.
115. GREEN, W. L. New questions regarding bioequivalence of levothyroxine preparations: a clinician's response. *AAPS J*, v. 7, n. 1, p. E54-8, 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16146330> >.

116. Sawin CT, et al. Oral thyroxine: variation in biologic action and tablet content. *Ann Intern Med*, v. 100, n. 5, p. 641-5, May 1984. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6546843> >.
117. DONG, B. J.; BROWN, C. H. Hypothyroidism resulting from generic levothyroxine failure. *J Am Board Fam Pract*, v. 4, n. 3, p. 167-70, 1991 May-Jun 1991. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2053456> >.
118. COPELAND, P. M. Two cases of therapeutic failure associated with levothyroxine brand interchange. *Ann Pharmacother*, v. 29, n. 5, p. 482-5, May 1995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7655130> >.
119. KHAN, M.; HALPIN, R. Possible increased potency of current levothyroxine. *Br J Gen Pract*, v. 62, n. 605, p. 628-9, Dec 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23211241> >.
120. HENNESSEY, J. V. et al. Adverse event reporting in patients treated with levothyroxine: results of the pharmacovigilance task force survey of the american thyroid association, american association of clinical endocrinologists, and the endocrine society. *Endocr Pract*, v. 16, n. 3, p. 357-70, 2010 May-Jun 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20551006> >.
121. FALLAHI, P. et al. Advancements in the treatment of hypothyroidism with L-T4 liquid formulation or soft gel capsule: an update. *Expert Opin Drug Deliv*, p. 1-9, Aug 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27552635> >.
122. Yue CS, Scarsi C & Ducharme MP. Pharmacokinetics and potential advantages of a new oral solution of levothyroxine vs. other available dosage forms. *Arzneimittelforschung* 2012 62 631–636.
123. Department of Health and Human Services, FDA, and Center for Drug Evaluation and Research (2002). Guidance for the industry: bioavailability and bioequivalence studies for general oral drug considerations considerations oral [<http://www.fda.gov/cder/guidance/4964dft.pdf>] (acessado em 02 de setembro de 2016).
124. Department of Drug Safety and Availability, FDA, and Center for Drug Evaluation and Research (2002). Sample Letter to NDA and ANDA Holders of Levothyroxine Sodium products [<http://www.fda.gov/cder/guidance/4964dft.pdf>] (acessado em 02 de setembro de 2016).

125. 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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26747302> >.]
126. JAVED, Z.; SATHYAPALAN, T. Levothyroxine treatment of mild subclinical hypothyroidism: a review of potential risks and benefits. *Ther Adv Endocrinol Metab*, v. 7, n. 1, p. 12-23, Feb 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26885359> >.
127. ROSARIO, P. W.; CALSOLARI, M. R. Levothyroxine therapy in the subclinical hypothyroidism: a lifelong therapy? A long-term study. *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 85, n. 5, p. 819-820, Nov 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27515774> >.
128. GULLU, S.; SAV, H.; KAMEL, N. Effects of levothyroxine treatment on biochemical and hemostasis parameters in patients with hypothyroidism. *Eur J Endocrinol*, v. 152, n. 3, p. 355-61, Mar 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15757851> >.
129. BURNS, R. B. et al. Should We Treat for Subclinical Hypothyroidism?: Grand Rounds Discussion From Beth Israel Deaconess Medical Center. *Ann Intern Med*, v. 164, n. 11, p. 764-70, Jun 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27270659> >.
130. VAISMAN, F. et al. How good is the levothyroxine replacement in primary hypothyroidism patients in Brazil? Data of a multicentre study. *J Endocrinol Invest*, v. 36, n. 7, p. 485-8, 2013 Jul-Aug 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23324400> >.
131. OKOSIEME, O. E. Thyroid hormone replacement: current status and challenges. *Expert Opin Pharmacother*, v. 12, n. 15, p. 2315-28, Oct 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21762038> >.
132. GULLO, D. et al. Levothyroxine monotherapy cannot guarantee euthyroidism in all athyreotic patients. *PLoS One*, v. 6, n. 8, p. e22552, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21829633> >.

133. OKOSIEME, O. et al. Management of primary hypothyroidism: statement by the British Thyroid Association Executive Committee. *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 84, n. 6, p. 799-808, Jun 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26010808> >.
134. BENVENGA, S. When thyroid hormone replacement is ineffective? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, v. 20, n. 5, p. 467-77, Oct 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23974777> >.
135. BIELINSKI, S. J. et al. Preemptive genotyping for personalized medicine: design of the right drug, right dose, right time-using genomic data to individualize treatment protocol. *Mayo Clin Proc*, v. 89, n. 1, p. 25-33, Jan 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24388019> >.
136. MA, D.; LIU, F. Genome Editing and Its Applications in Model Organisms. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, v. 13, n. 6, p. 336-44, Dec 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26762955> >.
137. KREJSA, C.; ROGGE, M.; SADEE, W. Protein therapeutics: new applications for pharmacogenetics. *Nat Rev Drug Discov*, v. 5, n. 6, p. 507-21, Jun 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16763661> >.
138. COCCA, M. et al. Pharmacogenetics driving personalized medicine: analysis of genetic polymorphisms related to breast cancer medications in Italian isolated populations. *J Transl Med*, v. 14, p. 22, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26801900> >.
139. DELANEY, S. K. et al. Toward clinical genomics in everyday medicine: perspectives and recommendations. *Expert Rev Mol Diagn*, v. 16, n. 5, p. 521-32, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26810587> >.
140. CHOWBAY, B.; ZHOU, S.; LEE, E. J. An interethnic comparison of polymorphisms of the genes encoding drug-metabolizing enzymes and drug transporters: experience in Singapore. *Drug Metab Rev*, v. 37, n. 2, p. 327-78, 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15931768> >.
141. SHASTRY, B. S. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. *Pharmacogenomics J*, v. 6, n. 1, p. 16-21, 2006 Jan-Feb 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16302022> >.

142. MCGONIGLE, I. V. The collective nature of personalized medicine. *Genet Res (Camb)*, v. 98, p. e3, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26792757> >.
143. GAŁECKA, E. et al. Polymorphisms of iodothyronine deiodinases (DIO1, DIO3) genes are not associated with recurrent depressive disorder. *Pharmacol Rep*, v. 68, n. 5, p. 913-7, Oct 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27351946> >.
144. SANTORO, A. B. et al. Effect of UGT1A1, UGT1A3, DIO1 and DIO2 polymorphisms on L-thyroxine doses required for TSH suppression in patients with differentiated thyroid cancer. *Br J Clin Pharmacol*, v. 78, n. 5, p. 1067-75, Nov 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24910925> >.
145. 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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25958132> >.
146. ARBER, W. DNA modification and restriction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, v. 14, n. 0, p. 1-37, 1974. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4602489> >.
147. BALTIMORE, D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*, v. 226, n. 5252, p. 1209-11, Jun 1970. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4316300> >.
148. MAXAM, A. M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 74, n. 2, p. 560-4, Feb 1977. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/265521> >.
149. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987;155: 335-50.
150. SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v. 230, n. 4732, p. 1350-4, Dec 1985. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2999980> >.

151. RICCIUTI, B. et al. Long noncoding RNAs: new insight into thyroid cancer biology, diagnosis and therapy. *Med Oncol*, v. 33, n. 2, p. 18, Feb 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26786153> >.
152. 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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26260812> >.
153. FERREIRA, E. N. et al. Linear mRNA amplification approach for RNAseq from limited amount of RNA. *Gene*, v. 564, n. 2, p. 220-7, Jun 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25827286> >.
154. 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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19015660> >.
155. GARBER, M. et al. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nat Methods*, v. 8, n. 6, p. 469-77, Jun 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21623353> >.
156. TRAPNELL, C. et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNAseq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc*, v. 7, n. 3, p. 562-78, Mar 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22383036> >.
157. BHARTIYA, D.; SCARIA, V. Genomic variations in non-coding RNAs: Structure, function and regulation. *Genomics*, v. 107, n. 2-3, p. 59-68, Mar 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26790601> >.
158. 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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26779425> >.
159. MARGULIES, M. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, v. 437, n. 7057, p. 376-80, Sep 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16056220> >.

160. SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*, v. 26, n. 10, p. 1135-45, Oct 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18846087> >.
161. MORTAZAVI, A. et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*, v. 5, n. 7, p. 621-8, Jul 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18516045> >.
162. CONSORTIUM, I. H. G. S. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, v. 431, n. 7011, p. 931-45, Oct 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15496913> >.
163. 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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26566462> >.
164. RUDDLE, F. H. Mapping and sequencing of the human genome. *Jpn J Cancer Res*, v. 89, n. 12, p. inside front cover, Dec 1998. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10081483> >.
165. KIRCHER, M.; KELSO, J. High-throughput DNA sequencing--concepts and limitations. *Bioessays*, v. 32, n. 6, p. 524-36, Jun 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20486139> >.
166. 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, p. 33, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26666243> >.
167. 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. e 009532, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26747035> >.
168. 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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24920863> >.

169. SOUILMI, Y. et al. Scalable and cost-effective NGS genotyping in the cloud. *BMC Med Genomics*, v. 8, p. 64, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26470712> >.
170. 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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26667455> >.
171. METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*, v. 11, n. 1, p. 31-46, Jan 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19997069> >.
172. 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>>.
173. 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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25378536> >.
174. 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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22506599> >.
175. GORBACHEVA, T. et al. Improved transposon-based library preparation for the Ion Torrent platform. *Biotechniques*, v. 58, n. 4, p. 200-2, Apr 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25861933> >.
176. 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 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26671010> >.
177. 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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23231371> >.

178. MARTH, G. T. et al. The functional spectrum of low-frequency coding variation. *Genome Biol*, v. 12, n. 9, p. R84, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21917140> >.
179. BERGVELD, P. Thirty years of IS FETOLOGY: 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> >.
180. ROTHBERG, J. M. et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, v. 475, n. 7356, p. 348-52, Jul 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21776081> >.
181. XUAN, J. et al. Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. *Cancer Lett*, v. 340, n. 2, p. 284-95, Nov 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23174106> >.
182. 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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24676093> >.
183. 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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24020486> >.
184. FRANKEN, C. et al. Peripheral blood collection: the first step towards gene expression profiling. *Biomarkers*, p. 1-8, Mar 17 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26984061> >.
185. 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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26886447> >.
186. MAERKEDAHN, R. B. et al. Evaluation of a low-cost procedure for sampling, longterm storage, and extraction of RNA from blood for qPCR analyses. *Clin Chem Lab Med*, v. 53, n. 8, p. 1181-8, Jul 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25720080> >.

- ¹⁸⁷. 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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25394494> >.
- ¹⁸⁸. AUST, G. et al. CXCR6 within T-helper (Th) and T-cytotoxic (Tc) type 1 lymphocytes in Graves' disease (GD). *Eur J Endocrinol*, v. 152, n. 4, p. 635-43, Apr 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15817921> >.
- ¹⁸⁹. XIA, Y. et al. CXCR6 plays a critical role in angiotensin II-induced renal injury and fibrosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 34, n. 7, p. 1422-8, Jul 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24855055> >.
- ¹⁹⁰. BRATTELID, T. et al. Cloning, pharmacological characterisation and tissue distribution of a novel 5-HT4 receptor splice variant, 5-HT4(i). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v. 369, n. 6, p. 616-28, Jun 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15118808> >.

Apêndice 1 – Índice de Zulewski

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

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

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

Apêndice 2 - Extração do RNA total

- 1- Centrifugação dos tubos *PAXgene blood RNA*, por 10 minutos à 3500rpm (rpm, sempre utilizando um rotor de balanço exterior com adaptadores de tubos de mesmo volume (balanceamento da centrífuga).
- 2- Eliminação do sobrenadante por meio de decantação e visualizado o *pellet* ao fundo do tubo.
- 3- Transferência de 4,0mL de água livre de RNase (RNFW), e fechado o tubo com uma nova tampa *Hemogard BD* secundária, fornecidos pelo *Kit*.
- 4- Agitação ao vórtex até a visível dissolução do *pellet*.
- 5- Centrifugação dos tubos *PAXgene blood RNA*, por 10 minutos à 3500RPM, sempre utilizando um rotor de balanço exterior com adaptadores de tubos de mesmo volume (balanceamento da centrífuga).
- 6- Eliminação do sobrenadante, sem interferir com o *pellet*.
- 7- Transferência de 350,0µL de tampão de ressuspensão (BR1), fornecido pelo *Kit*.
- 8- Agitação ao vórtex até a visível dissolução do *pellet*.
- 9- Transferência da amostra (350,0µL) para um microtubo (MCT) de 1,5mL.
- 10- Adição de 300,0µL de tampão de ligação (BR2), e 40,0µL proteinase K (PK), fornecidos pelo *Kit*.
- 11- Agitação ao vórtex por 5 segundos.
- 12- Incubação por 10 minutos à 55°C em agitador incubador, sob velocidade de aproximadamente 400rpm.
- 13- Transferência do lisado diretamente para uma coluna de rotação do homogeneizador *PAXgene* (coluna de cor lilás PSC) e transferido em um tubo de processamento (PT) de 2,0mL, fornecidos pelo *Kit*.
- 14- Centrifugação por 3 minutos à 15000RPM em microcentrífuga, adequadamente balanceada.
- 15- Transferência da totalidade do sobrenadante da fração residual para um MCT de 1,5mL, sem interferir com o *pellet* do PT.
- 16- Adição de 350,0µL de etanol 99% grau de pureza.
- 17- Agitação ao vórtex por 5 segundos.

- 18- Centrifugação para remover as gotas presentes no interior da tampa do MCT.
Centrifugado em microcentrífuga por 3 segundos (SPIN).
- 19- Transferência de 700,0µL da amostra para outra coluna de rotação de RNA *PAXgene* (coluna de cor vermelha PRC), colocada em um tubo de processamento (PT) de 2,0mL.
- 20- Centrifugação por 1 minuto à 15000rpm em microcentrífuga, adequadamente balanceada.
- 21- Transferência para coluna (PRC) em um novo tubo de processamento (PT) de 2mL e eliminado o PT antigo contendo o produto residual.
- 22- Transferido a amostra restante à coluna PRC.
- 23- Centrifugação por 1 minuto à 15000rpm em microcentrífuga, adequadamente balanceada.
- 24- Transferência para coluna PRC em um novo PT de 2,0mL, e eliminado o PT antigo contendo o produto residual.
- 25- T Transferência de 350,0µL de tampão de lavagem 1 (BR3) para a coluna PRC.
- 26- Centrifugação por 1 minuto à 15000RPM em microcentrífuga, adequadamente balanceada.
- 27- Transferência para a coluna PRC em um novo PT de 2,0mL, e eliminado o PT antigo contendo o produto residual.
- 28- Preparação do *mix* de DNase I e tampão de digestão de DNA (RDD), fornecidos pelo *Kit*. Em um MCT de 1,5mL transferimos 10,0µL de solução de DNase com 70,0µL de tampão de digestão de DNA (RDD) por amostra, totalizando um volume de *mix* de 80,0µL. Homogeneizando suavemente com a mão, pois a DNase I é especialmente sensível a desnaturação física.
- 29- Transferência dos 80,0µL do *mix* diretamente para a membrana da coluna PRC e aguardar por 15 minutos, com a amostra em temperatura ambiente.
- 30- Transferência de 350,0µL de tampão de lavagem 1 (BR3) para a coluna PRC, fornecidos pelo *Kit*.
- 31- Centrifugação por 1 minuto à 15000RPM em microcentrífuga, adequadamente balanceada.
- 32- Transferência para a coluna PRC em um novo PT de 2,0mL, e eliminação o PT antigo contendo o produto residual.
- 33- Transferência de 500,0µL de tampão de lavagem 2 (BR4) para a coluna de rotação PRC, fornecidos pelo *Kit*.

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

Apêndice 3 – Realização do transcriptoma - Sequenciamento plataforma NGS

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

- 1 – Preparo de dois microtubos para as amostras padrões e um microtubo para cada amostra dos RNA a serem quantificados.
- 2 – Preparação da solução de trabalho diluindo o *Qubit RNA* reagente 1:200 em tampão *Qubit RNA*. Preparado 200,0mL de solução de trabalho para cada padrão e para cada amostra de RNA a ser quantificada.
- 3 – Preparado os microtubos transferindo os volumes de acordo com as seguintes recomendações:

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

- 4 – Homogeneização no vórtex e incubação por 2 minutos em temperatura ambiente, todas as amostras e os padrões.
- 5 – Leitura das amostras padrões e as amostras de RNA no equipamento *Qubit Fluorometer 2.0*, de acordo com as normas de calibração.

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

- 1 – Diluição das amostras de RNA para uma concentração final de 10ng em volume final de 5,0µL.
- 2 – Preparação do *maxter mix* para a quantidade de amostras adicionando os seguintes volumes conforme as recomendações para cada amostra:

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

3 – Homogeneização no vórtex e spin de 2 segundos.

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

Temperatura	Tempo
42°C	30 minutos
85°C	5 minutos
4°C	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:

Componente	Volume por reação
5X Ion AmpliSeq HiFi Mix (red cap)	4,0µL
Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Core Panel	8,0µL
Nuclease-Free Water	3,0µL
Total	15,0µL

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

-
- 4 Transferência 15,0- μ L de *mastermix* em cada amostra da reação de transcrição.
 - 5 - Homogeneização no vórtex e *spin*.
 - 6 – Transferências das amostras no termociclador obedecendo as seguintes programações:

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

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

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

- 1 – Transferência de 2,0mL do reagente *FuPa Reagent* para cada amostra amplificada.
- 2 – Homogeneização no vórtex e *spin*.
- 3 – Transferências das amostras ao termociclador e efetuado a seguinte programação:

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

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

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

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

Realizado a reação de ligação seguindo as seguintes recomendações:

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

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

3 – Homogeneização

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

5 – Homogeneização

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

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

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

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

-
- 2 – Incubado por 5 minutos em temperatura ambiente
 - 3 Transferido os MCT em uma rack magnética com o *DynaMag* ímã e incubado por 2 minutos. Após os 2 minutos retirado e desprezado o sobrenadante sem interferir com o sedimento.
 - 4 – Adicionado 150,0µL de etanol 70%, movendo os MCT em um giro de 180° de sua posição inicial para lavar o *pellet*, após desprezado o sobrenadante sem interferir com o sedimento.
 - 5 – Repetido novamente o passo anterior para uma segunda lavagem.
 - 6 – Removido todo etanol com pipeta de 20,0µL, mantendo os MCT na *rack* com ímã abertos por 2 minutos para secagem em temperatura ambiente.

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

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

RNA de entrada	Concentração	Diluição recomendada
	10ng	1:10.000

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

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

6 – Realizado na placa de 96 poços, transferido 11,0µL do *mastermix* em cada poço e adicionado 9,0µL da das bibliotecas padrão e as amostras.

7 – Programado o equipamento da *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System* nas seguintes configurações:

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

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

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

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

- 1 – Acoplado os reagentes necessários no equipamento; *Ion OneTouch Reaction Oil* (25,0mL) e *Nuclease-free Water*.
- 2 – Preparado os reagentes de trabalho; *Ion PI Master Mix*, *Ion PI Enzyme Mix*, *Ion PI Ion Sphere Particles*, agitados em vórtex e efetuado spin.
- 3 – Diluído as amostras conforme orientação de 100,0pM iniciais em volume de 8,0µL adicionando 92,0µL de *Nuclease free Water*, para volume total de 100,0µL.

-
- 4 Homogeneização em vórtex e *spin*
- 5 – Transferido em MCT de 2,0mL, adicionado os seguintes reagentes na seguinte ordem:

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

- 6 – Agitado em vórtex e centrifugado por 2 segundos e acondicionado o tubo na sua posição no equipamento.
- 7 – Alimentado o equipamento com o *Ion OneTouch Reaction Filter*.
- 8 – Inicializado a configuração do *Ion OneTouch 2 Instrument*, obedecendo as seguintes configurações na tela *touch*; seleciona *run*, selecionado a opção *Proton: Ion PI Hi- Q OT2 200 Kit*, selecionado *next*, selecionado *assisted*, selecionado *yes*, e esperado o 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 - Preparados os *chips* que receberam as bibliotecas com as *beads*. A solução produto de todos os protocolos anteriores foi injetada no *Ion PI Chip Kit V3* de

forma que o líquido se espalhasse por toda matriz do componente e por consequência nos poços microscópicos do *chip*. Utilizamos 1 *chip* para sequenciar 4 amostras do grupo controle e outro *chip* para sequenciar 4 amostras do grupo hipotiroídianos clínicos sem de tratamento com L-T4.

- 1 – Centrifugado o *Ion Chip Kit V3* por 5 minutos em centrífuga especial para *Ion PI Chip*, eliminando toda bolha de ar que existia na matriz.
- 2 – Acondicionado o *Ion PI Chip* no soquete do equipamento *Ion Proton™ System*, efetuado o cadastro da corrida e o protocolo utilizado RNA-seq. O sequenciamento do transcriptoma levou em média 3 horas e meia.

Apêndice 4 – Certificado de publicação em Congresso: XVII Encontro Brasileiro de Tiroide (EBT)



XVII Encontro Brasileiro de Tiroide
21 a 23 de abril 2016

CERTIFICADO

Conferimos o presente certificado a

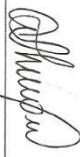
Valdelena Alessandra da Silva, Robson José de Almeida; Marcelle Pimenta Cavalcante, Lucio Antonio Pereira Junior, Francine Machado Reis, Mariana Fabbris Pereira; Teresa Kasamatsu, Cléber Pinto Camacho.

pela sua participação, na qualidade de

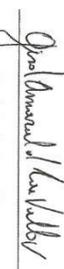
Autor do científico – Poster digital:

CONCORDÂNCIA DE DOIS ENSAIOS PARA A DOSAGEM DO TSH EM INDIVÍDUOS EUTIREOIDIANOS E COM HIPOTIREOIDISMO.

Gramado/RS, 21 a 23 de Abril de 2016.



Ana Luiza Maia
Presidente EBT 2016



Gisah A. de Carvalho
Presidente Departamento de Tiroide



Célia Regina Nogueira
Presidente da Comissão Científica

REALIZAÇÃO




ESPECIALIDADES:

Endocrinologia e Metabologia - 10 pontos
 Cirurgia de Cabeça e Pescoço - 10 pontos
 Cancerologia Clínica - 10 pontos
 Cancerologia Cirúrgica - 10 pontos
 Cancerologia Pediátrica - 10 pontos
 Clínica Médica - 10 pontos

ÁREAS DE ATUAÇÃO:

Endocrinologia Pediátrica - 10 pontos



CNA

PO.069

Apêndice 5 – Certificado de publicação em Congresso: European Thyroid Journal (ETA)

European Thyroid Journal

Official Journal of the European Thyroid Association

39th Annual Meeting of the European Thyroid Association

Programme and Abstracts
Copenhagen, Denmark
September 3–6, 2016

Guest Editors
Furio Pacini, Siena, Italy
Birte Nygaard, Copenhagen, Denmark

S. Karger
Medical and Scientific Publishers
Basel Freiburg Paris
London New York Chennai
New Delhi Bangkok Beijing
Shanghai Tokyo Kuala Lumpur
Singapore Sydney

KARGER

ETA
European
Thyroid
Association

www.eurothyroid.com

P3-02-04

GENE EXPRESSION PANEL TO MARK THERAPEUTIC EFFICACY ON LEVOTHYROXINE-TREATED PATIENTS WITH PRIMARY HYPOTHYROIDISM

*Valdelena Alessandra da Silva*¹ *Robson José de Almeida*¹
*Patrícia Varella Lima Teixeira*² *Leonardo Martins da Silva*²
*João Bosco Pesquero*² *Cleber Pinto Camacho*³

¹Universidade Nove de Julho (Uninove), São Paulo, Brazil,

²Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), São Paulo, Brazil,

³Laboratory of Molecular Medicine Technology, Universidade Nove de Julho (Uninove), São Paulo, Brazil

Background: The primary hypothyroidism is characterized by the dysfunction of the thyroid gland. The available therapy is the treatment with levothyroxine, which has synthetic conformation of the hormone thyroxine. The aim of the study is to create a gene panel to mark the response to the levothyroxine use.

Methods: We evaluated 320 individuals and selected 8 patients with levothyroxine therapy to RNA-Seq Transcriptome analysis. They are divided into two groups. The first group has 4 hypothyroid patients with Thyroid Stimulant Hormone (TSH) between 0.5 mU/l and 2.0 mU/l and 4 patients with TSH between 4.0 mU/l and 20.0 mU/l. Venous blood samples were collected (5 L) and stored in PAXgene RNA tubes. The RNA extraction was realized with PAXgene RNA extraction kit (Qiagen). The transcriptome library was created in an NGS platform, Ion Proton System, following the kit protocols of Ion AmpliSeq Gene human transcriptome (Thermo Fisher Scientific Manufacturer). The computational analysis of data was performed in 0.99.491 rstudio software, Package Edger 3.12.0 of Bioconductor (Robinson MD, DJ McCarthy and Smyth GK, 2010).

Results: We sequenced 22,786 transcripts in the eight individuals. Differential analysis revealed 353 genes (a hundred and seventy-nine genes understated and one hundred and seventy-four genes overexpressed) were explored. The panel was constructed with 289 mRNA and 64 non-coding genes.

Conclusion: We constructed a panel to characterize the response to levothyroxine treatment in Hypothyroid patients. The panel may be useful in future studies as a tool to correctly measure the levothyroxine response.

P3-02-07

DIFFERENTIAL EXPRESSION PANEL AS BIOMARKER IN HYPOTHYROIDISM. AN RNA-SEQ TRANSCRIPTOME IN INDIVIDUALS WITH PRIMARY HYPOTHYROIDISM

Robson José de Almeida¹ Valdelena Alessandra da Silva¹
 Patrícia Varella Lima Teixeira² Leonardo Martins da Silva²
 João Bosco Pesquero² Cleber Pinto Camacho³

¹Universidade Nove de Julho (Uninove), São Paulo, Brazil,

²Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), São Paulo, Brazil,

³Laboratory of Molecular Medicine Technology, Universidade Nove de Julho (Uninove), São Paulo, Brazil

Objectives: The thyroid hormone modulates the primary physiological processes in the development and maintenance of the human body. Hypothyroidism is defined as the inability of the thyroid gland to produce enough thyroid hormone to meet the metabolic needs of the body. However, the diagnostic accuracy for detection of primary hypothyroidism with TSH still has limitations. The aim of this work was to create a differential gene expression panel to function as a biomarker in primary hypothyroidism.

Methods: The eight individuals (four euthyroid and four with clinical hypothyroidism with TSH above 10 mU/l) were selected for transcriptome analysis from a total population of 320 volunteers. The collection and extraction of total RNA in peripheral blood were made in RNA preservation tubes PAXgene blood RNA and their respective extraction kit (PAXgene Blood

Eur Thyroid J 2016;5(suppl 1):57-176

151

RNA kit) (Qiagen). The transcriptome was performed on the NGS platform Ion Proton System, following the Ion AmpliSeq transcriptome Human Gene Kit protocols (Thermo Fisher Scientific Manufacturer). Computational analysis of the data was performed in rstudio 0.99.491 software, Package Edger 3.12.0 of Bioconductor (Robinson MD, DJ McCarthy and Smyth GK, 2010). **Results:** We sequenced 22,879 transcripts in the eight individuals. Differential expression analysis revealed 20 genes (thirteen under expressed and seven overexpressed genes). The panel was constructed with 13 mRNA and 7 non-coding genes. **Conclusion:** These are the first study to develop a genetic panel to diagnose the hypothyroidism independently of the TSH.

P1-08-06

DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN PREGNANCY AS A TOOL FOR PRIMARY HYPOTHYROIDISM DIAGNOSIS

Lucas dos Santos Bacigalupo¹, Robson José de Almeida¹,
 Valdelena Alessandra da Silva¹ Patrícia Varella Lima Teixeira²
 Leonardo Martins da Silva² Juliana de Almeida Pires¹
 Mariana Fabbris Pereira¹ João Bosco Pesquero²
 Cleber Pinto Camacho³

¹Universidade Nove de Julho (Uninove), São Paulo, Brazil,

²Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), São Paulo, Brazil,

³Laboratory of Molecular Medicine Technology, Universidade Nove de Julho (Uninove), São Paulo, Brazil

Background: Thyroid hormone evaluation during pregnancy is a complex situation. Pregnancy modifies the normal physiology and difficult the use of thyroid hormones for diagnostic purposes. The aim of this work was to analyse the differential gene expression to find a transcript or a panel of transcripts with diagnostic utility during pregnancy.

Methods: We selected eight pregnant women (four euthyroid and four with hypothyroidism) for transcriptome analysis. The peripheral blood was collected in RNA preservation tubes (PAXgene blood RNA). The extraction was performed by PAXgene Blood RNA kit (Qiagen). NGS platform Ion Proton System was used for transcriptome analysis following the Ion AmpliSeq transcriptome Human Gene Kit protocols (Thermo Fisher Scientific Manufacturer). We analyzed the library data in rstudio 0.99.491 software, Package Edger 3.12.0 of Bioconductor (Robinson MD, DJ McCarthy and Smyth GK, 2010).

Results: We sequenced 22,786 transcripts in the eight pregnant women. The differential expression analysis revealed 27 genes (twenty-one under expressed and six overexpressed genes). The panel was constructed with 24 mRNA and 3 non-coding genes.

Conclusion: These genes may become an alternative diagnostic tool in pregnancy where free T4, total T4 or TSH are less useful.

Apêndice 6 - Certificado de publicação em Congresso: 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics e 21th Latin American Congress of Pharmacology (LATINFARMA)


48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics


and


21th Latin American Congress of Pharmacology (LATINFARMA)

CERTIFICATE



We certify that the poster number **07.013**, Use of gene expression as a marker of efficacy in the pharmacological treatment of levothyroxine in hypothroid individuals by **Silva VA, Almeida RJ, Teixeira PVL, Silva LM, Pesquero JB, Camacho CP** was presented at the 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics and the 21st Latin American Congress of Pharmacology (SBFTE) held in Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil, from October 04 to 07, 2016.


 Maria Christina W. de Avellar
 Congress President

04-07 October 2016
Rafain Palace Hotel

Foz do Iguaçu, PR, Brazil