

TESIS DE MAESTRÍA

Autor

Bc. CAROLINA OSORIO LARROCHE

Director

Prof. Dra. CARINA M. RIVOLTA

“Nuevos Aportes a la Genética del Hipotiroidismo Congénito y de la Resistencia a Hormonas Tiroideas. Identificación y Caracterización Molecular de las Mutaciones Responsables”



Lab. de Genética y Biología Molecular,
Instituto de Inmunología, Genética y
Metabolismo INIGEM UBA-CONICET.
Cátedra de Genética y Biología Molecular,
Facultad De Farmacia y Bioquímica,
Universidad de Buenos.

2014

"...La búsqueda de las cosas perdidas está entorpecida por los hábitos rutinarios, y es por esto que cuestan tanto trabajo encontrarlas..."

*Cien Años de Soledad,
Gabriel García Márquez.
(1927-2014)*



A

Dios,

mis abuelos

desde lo eterno,

A mis padres amados,

A mi hermano incondicional,

A mis familiares y a mis amigos,

Todos aquellos que en mi camino dan luz,

y me permiten el andar desde el inicio hasta hoy.

*Por enseñarme a creer que todo es posible *Asiduamente*...*

Dedicatoria y gratitud especial a ustedes, mi fuerza, mi voluntad.

La realización de la presente tesis de maestría no hubiera sido factible sin todo el apoyo de la cátedra de Biología Molecular y Genética de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, y el instituto INIGEM perteneciente al CONICET, que con la aprobación de su director, el Dr. Hector Targovnik y junto a todo su equipo, abrieron sus puertas a este proyecto y permitieron durante el transcurso por los laboratorios el desarrollo experimental, así como la generación de un aprendizaje académico y humanístico invaluable.

Agradecimientos específicos:

Al Dr. Hector Targovnik por su decisión y confianza al momento de aceptarme como parte de su equipo y a la Dra. Carina Rivolta por su acertada dirección, constante respaldo y siempre amable trato.

A la Dra. Cecilia Olcese y la Dra. Fiorela Belforte por el motivante compromiso y entusiasmo en la transferencia de saberes a partir del compartir diario.

A Anita N., Masi V., Myr R., Ceci M., Gloria C., Viviana V., Irene S., Gustavo F., por su gran corazón y la transmisión de enseñanzas no solo académicas, sino de la vida misma, nacidas de la solidaridad inolvidable y el cariño. A Flor G., Silvia C., Karen S., Poli I., Gloria M., y Leo L. por el afecto y compañerismo. Igualmente a Mariana T., Ariel L., Maxi W., Caro B., Lili R., Diana P., Sebastian E., Osvaldo R., Liliana B., Marcela F., Cami C., Roci S., Gastón A., Cintia C., y Ezequiela A. por el intercambio y la calidez. A Romina, Adriana, Diego y Sandra por el soporte y la sonrisa al comienzo de cada jornada.

...a todos gracias por ser un gran Equipo Humano!

TABLA DE CONTENIDOS

<i>COMUNICACIÓN DE RESULTADOS</i>	I
<i>RESUMEN</i>	II
<i>ABSTRACT</i>	IV
<i>ABREVIATURAS</i>	1

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Aproximación a los Estudios Genéticos Tiroideos	4
1.2 Aspectos Embriológicos de la Tiroides	12
1.2.1 Genes que codifican para proteínas asociadas a embriogénesis tiroidea.	13
1.3 Aspectos Histológicos de la Tiroides	14
1.4 Aspectos Anatómicos de la Tiroides	15
1.5 Aspectos Fisiológicos de la Tiroides.	17
1.5.1 Biosíntesis de las Hormonas Tiroideas.	17
1.5.2 Genes que codifican proteínas asociadas a las distintas etapas de la biosíntesis de hormonas tiroideas.	20
1.5.3 Importancia de las Hormonas Tiroidea, su Interacción tisular y su Metabolismo.	30
1.5.4 Regulación de la Síntesis de Hormonas Tiroideas.	34
1.5.5 Algunos Genes asociados a la regulación y efecto de las Hormonas Tiroideas.	36
<i>OBJETIVOS</i>	44
Objetivos e hipótesis de la investigación	44
Objetivos Específicos	45

Capítulo 2

HIPOTIROIDISMO CONGENITO CON BOCIO POR DEFECTOS DE LA ORGANIFICACIÓN DE YODO.

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN DE LA TIROPEROXIDASA HUMANA (TPO).

2.1	INTRODUCCIÓN	46
	MÉTODOS MATERIALES	55
2.2	Caracterización Clínica - Bioquímica de Pacientes con posible presencia de mutaciones en el Gen de TPO.	55
2.2.1	Cuadro clínico-bioquímico de los casos analizados.	57
2.3	Identificación de mutaciones en el gen TPO.	60
2.3.1	Extracción y purificación de ADN genómico de sangre periférica.	60
2.3.2	Determinación de la integridad y semicuantificación del ADN genómico.	62
2.3.3	Amplificación de Fragmentos de ADN: Reacción en Cadena de la Polimerasa- PCR.	63
2.3.4	Validación por PCR-RFLP de la mutación descrita: p.R396fsX472	66
2.3.5	Purificación de productos de amplificación.	66
2.3.6	Secuenciación por Electroforesis capilar.	67
2.3.7	Búsqueda de variantes en la secuencia en bases de datos informáticas.	8
2.3.8	Clonado molecular en el sistema pGEM-T Easy Vector para la separación de alelos.	68
2.3.9	Estudio poblacional de variaciones de secuencia por <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i> (SSCP).	73
2.4	Estudio Bioinformático de las Mutaciones Identificadas.	77
	RESULTADOS	84
2.5	Identificación de mutaciones en el gen de TPO.	84
2.6	Análisis Bioinformáticos.	100
2.6.1	Análisis In Silico de sitios consenso de Splicig.	100
2.6.2	Análisis de Homología Proteica.	102
2.6.3	Predicción de las Estructuras Secundarias.	105
2.6.4	Predicción del impacto de una sustitución aminoacídica en la estructura y función proteica.	109
2.6.5	Modelaje de proteínas in <i>silico</i> por comparación con dominios homólogos a dominios de TPO.	111
	DISCUSIÓN	119

Capítulo 3

SÍNDROME DE RESISTENCIA A HORMONAS TIROIDEAS

3.1	INTRODUCCIÓN	127
	MÉTODOS MATERIALES	133
3.2	Caracterización Clínica - Bioquímica de Pacientes con posible presencia de mutaciones en el Gen de THR.	133
	3.2.1 Cuadro clínico-bioquímico de los casos analizados.	134
3.3	Identificación de mutaciones en el Gen del THRbeta.	141
	3.3.1 Extracción, purificación de ADN genómico de sangre periférica y cuantificación.	141
	3.3.2 Amplificación de Fragmentos de ADN: Reacción en Cadena de la Polimerasa- PCR.	141
	3.3.3 Purificación de productos de amplificación	146
	3.3.4 Secuenciación por Electroforesis capilar.	146
	3.3.5 Búsqueda de variantes en la secuencia en bases de datos informáticas.	146
	3.3.6 Estudio poblacional de variaciones de secuencia por <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i> (SSCP).	146
3.4	Estudio Bioinformático de las Mutaciones Identificadas.	144
	RESULTADOS	145
3.5	Identificación de mutaciones en el gen THRbeta.	145
3.6	Análisis Bioinformático de los Receptores de Hormonas Tiroideas Mutados.	154
	3.6.1 Análisis de Homología Proteica	154
	3.6.2 Predicción de las Estructuras Secundarias.	156
	3.6.3 Predicción del impacto de una sustitución aminoacídica en la estructura y función proteica.	164
	3.6.4 Predicción de las estructuras terciarias.	166
	DISCUSIÓN	181
	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	186
	BIBLIOGRAFIA	191
	REFERENCIAS ELECTRONICAS	198

Los resultados de la presente Tesis fueron publicados en los siguientes Resúmenes de Congresos:

1) ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN DE TPO EN DEFECTOS DE ORGANIFICACIÓN DEL YODO.

*Autores: Belforte F, **Osorio Larroche C**, Olcese C, Citterio C, Targovnik H, Rivolta C.
Reunión: LVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica.
Fuente: : MEDICINA - Volumen 73 (Supl. III) 2013 Buenos Aires,
<http://www.saic.org.ar/revista/2013/Vol73SuplIII.pdf>
PÁGINAS: 279
COMUNICACIÓN: 654
FECHA: 2013*

2) NUEVOS APORTES A LA GENÉTICA Y FENÓMICA DE LA RESISTENCIA A HORMONAS TIROIDEAS.

*Autores: **Osorio Larroche, Carolina**; Olcese, María Cecilia; Belforte, Fiorella S.; Morales, Cecilia M.; Targovnik, Héctor M.; Rivolta, Carina M.
Reunión: LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica.
Fuente: MEDICINA - Volumen 74 (Supl. III) 2014 Buenos Aires.
<http://www.saic.org.ar/revista/2014.pdf>
PAGINA: 116*

3) NUEVA MUTACIÓN EN EL TRHB EN UN PACIENTE CON BOCIO MULTINODULAR, GIGANTE Y DEFORMANTE SECUNDARIO AL TRATAMIENTO CON MEDICACIÓN ANTITIROIDEA.

*Autores: Di Palma MI, Dujovne N, Felipe L, Ayarzal V, Rivolta C, **Osorio Larroche C**, Gonzalez M, Rivarola MA, Belgorosky A, Dratler G, Herzovich V.
Reunión: XXIV Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Endocrinología Pediátrica & Sociedad Mexicana de Endocrinología Pediátrica 2014 Mexico.
Fuente: **Sociedad Latinoamericana de Endocrinología Pediátrica** & Sociedad Mexicana de Endocrinología Pediátrica 2014 Mexico.
<http://slepsmep2014.org/pdf/OralesSlepSmep2014.pdf>*

PAGINA: 57

RESUMEN

La tiroides es la primera glándula endócrina en aparecer en el desarrollo embrionario. Alrededor de la semana 11 de gestación, la glándula tiroides fetal ya tiene la capacidad de concentrar yoduro y aproximadamente en la semana 18, comienza a liberar hormonas tiroideas. Este aporte de hormonas endógenas es esencial para la maduración del cerebro y del esqueleto del feto. La deficiencia de hormonas tiroideas, aún durante cortos períodos podría conducir a daños cerebrales irreversibles cuyas consecuencias dependerán del momento de inicio y duración de dicha deficiencia. La prevalencia del hipotiroidismo neonatal es de 1/3.000-1/4000 recién nacidos según fue determinado a partir de programas de screening a nivel mundial. Dentro del hipotiroidismo varias entidades poseen características propias, el hipotiroidismo congénito sin bocio (disembriogénesis) debido a agenesias, ectopias o hipoplasias, correspondiendo al 80-85 % de los casos del hipotiroidismo neonatal. Se identificaron algunos casos donde la causa es una mutación en los genes TTF-1, TTF-2, Pax 8, NKH2-5 y Receptor de TSH. Un segundo grupo del hipotiroidismo neonatal lo constituyen los hipotiroidismos congénitos con bocio o bocios congénitos debido a alteraciones de unos de los componentes de la biosíntesis de hormonas tiroideas (dishormonogénesis): tiroperoxidasa (TPO), tiroglobulina (TG), DUOX2, NIS, Pendrina y dehalogenasa I. Dicho grupo corresponde al 15-20 % de los hipotiroidismos neonatales y se caracteriza por bajos niveles de hormonas tiroideas y como consecuencia aumento de TSH y mayor proliferación celular tiroidea. El bocio se presenta generalmente cuando la glándula tiroides es incapaz de producir suficiente cantidad de la hormona tiroidea para satisfacer las demandas del individuo. La glándula tiroides se agranda para compensar esta situación, con lo cual generalmente se corrigen las deficiencias leves de la hormona tiroidea pero no las severas.

La biosíntesis de hormonas tiroideas se realiza en la interfase célula-coloide, en la membrana apical de la célula tiroidea, sobre una glicoproteína estructural de elevado tamaño que es la tiroglobulina. Esta es la proteína con mayor eficiencia de formación de hormonas tiroideas en presencia de concentraciones fisiológicas de yoduro. Además de intervenir en la biosíntesis de hormonas tiroideas sirve también para el almacenamiento del yoduro. El yoduro ingresa en forma activa en la glándula tiroides y debe ser oxidado antes de actuar como agente efectivo de yodinación. Ingresando al citoplasma celular a través del transportador NIS, ubicado en la membrana basolateral del tirocito. Un segundo transportador localizado en la membrana apical, la pendrina, lleva al yoduro hacia la interfase célula-coloide. Las tres etapas de la organificación del yoduro: oxidación, incorporación del mismo a los residuos tirosílicos de la tiroglobulina y finalmente el acoplamiento de las monoyodotirosinas y diyodotirosinas para formar las hormonas tiroideas triyodotironina (T₃) y tetrayodotironina (T₄) son catalizadas por una misma

enzima microsomal, de membrana, la TPO y en presencia de una fuente de H_2O_2 . Dos enzimas están relacionadas a la síntesis de H_2O_2 , se trata de dos NADPH oxidasas unidas a la membrana apical denominadas Duox1 y Duox2, y dos factores de maduración de las mismas DuoxA1 y DuoxA2. La biosíntesis de las hormonas tiroideas está regulada por la TSH quien ejerce su acción estimuladora de la transcripción de los genes específicos tiroideos por interacción con su receptor. El efecto de las hormonas tiroideas, es ejercido a nivel transcripcional a través de la interacción de éstas con su receptor nuclear.

Mutaciones dispersas a lo largo del gen de TPO constituyen la causa más común de dishormonogénesis con hipotiroidismo congénito permanente con un patrón de herencia autosómico recesivo. El gen que codifica a la TPO humana, de 17 exones está localizado en el cromosoma 2 en el intervalo 2p24-p25. Los aminoácidos entre 149 y 711 que corresponden a los exones 5 a 12 en el gen de la TPO humana muestran una significativa similitud con el consenso denominado “*animal haem peroxidase*” (An peroxidase). Los exones 13 y 14 tienen homología con la familia de genes denominados “*complement control protein (CCP)-like*” (residuos 742-795) y “*calcium-binding epidermal growth factor (EGF)-like*” (residuos 796-839), respectivamente. El exón 15 codifica para el dominio de transmembrana y los exones 16 y 17 para la región intracitoplasmática⁴.

El conocimiento de la organización estructural del gen de la TPO humana permitió desarrollar las herramientas necesarias para identificar mutaciones que originan bocios congénitos por deficiencia de dicha proteína. Estos estudios permitieron diseñar primers intrónicos para amplificar por PCR cada uno de los 17 exones de la tiroperoxidasa y en consecuencia estudiar, a partir del ADN genómico, pacientes con bloqueo de la organificación del yoduro por defecto de la TPO. Hasta el momento, más de 80 mutaciones se han descrito en el gen de TPO las cuales se heredan de un modo autosómico recesivo¹². En alrededor del 20% de los casos de hipotiroidismo congénito permanente se han identificado defectos monoalélicos en dicho gen, presumiblemente debido a mutaciones crípticas no halladas en regiones intrónicas o regulatorias del gen. De esta manera, se ha reportado solamente la expresión monoalélica del alelo mutante. La necesidad actual es analizar cómo estas diferentes mutaciones ubicadas en diferentes dominios del gen de TPO alteran la funcionalidad de la respectiva proteína y originan el bocio congénito. Esto permitirá un gran adelanto en el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad y de la correlación clínica con la variabilidad fenotípica.

Una segunda entidad es la Resistencia a Hormonas Tiroideas (RTH) que se caracteriza por una disminución de la respuesta a la T_3 por parte de los tejidos. La incidencia de RTH es de 1 caso cada 50.000 nacidos vivos, con más de 600 casos conocidos. Existen dos genes que codifican a los receptores de hormonas tiroideas, el gen THRalfa se encuentra en el cromosoma 17 y el gen THRbeta, de 10 exones en el cromosoma 3. El 90% de las mutaciones se localizan en el dominio LBD (Ligand Binding Domain) del gen THRbeta y se heredan de modo autosómico dominante. Han sido descritas alrededor de 200

mutaciones dentro de las cuales predominan aquellas que originan cambio de aminoácido. Solo dos mutaciones han sido descritas recientemente en el gen *THR α* . Con respecto a los polimorfismos en dicho gen, no se conoce mucho aun respecto del rol de los mismos. Estudios recientes han demostrado la asociación de los mismos con los niveles de TSH, éste es el caso del polimorfismo *THR β -in9-G/A* el cual explica una concentración aumentada de TSH de manera alelo, dosis dependiente.

Con respecto al hipotiroidismo congénito con bocio, uno de nuestros objetivos consistió en la identificación de mutaciones en el gen de TPO siendo las que se presentan con mayor frecuencia en esta patología. A tal fin, se analizaron 5 pacientes con diagnóstico clínico-bioquímico de hipotiroidismo congénito con bocio por defectos en la organificación del yodo. En primer lugar se utilizó la técnica PCR-RFLP para identificar la posible presencia de la mutación p.R396fsX472 generada por la inserción-duplicación de GGCC en la posición 1277 de la secuencia de referencia del ARNm en el octavo exón del gen TPO la cual genera, un cambio en el marco de lectura dando como resultado un codón prematuro en el exón 9, con la producción de una proteína truncada sin actividad biológica. A continuación, luego de la puesta a punto de las condiciones para la amplificación por PCR del promotor y de cada uno de los 17 exones del gen se llevó a cabo la secuenciación de los mismos. Se identificaron en nuestros pacientes una mutación descrita en bibliografía, p.E799K y dos variantes raras de secuencia: p.V748M y la delección c.2007-11_2007-9del (-CTT). Se empleó el sistema de clonado pGEM-T Easy Vector para la caracterización de la delección heterocigota identificada. Se analizó la segregación alélica en las familias correspondientes a los pacientes portadores de las mutaciones. Por otra parte en los pacientes se identificaron y caracterizaron polimorfismos ya sea descriptos como no descriptos previamente.

Con respecto a la RTH, se estudiaron 11 pacientes con sospecha de estar afectados con dicha patología y sus grupos familiares. Para la Identificación y caracterización de nuevas mutaciones en el gen del *THR β* se amplificaron los exones que presentan habitualmente mutaciones. Se realizó PCR a partir de ADN genómico empleando primers intrónicos para los exones 7, 8, 9 y 10 del gen *THR β* . Se secuenciaron los productos de PCR y posteriormente fueron analizados los resultados. Se identificó así una mutación no descrita previamente, lo cual fue confirmado por estudios poblacionales para descartar un posible polimorfismo: p.P452L y dos mutaciones reportadas: p.A268G y p.G345R.

Las alteraciones identificadas ya sean en el gen de TPO como en el de *THR β* fueron caracterizadas mediante estudios bioinformáticos de actualidad. Se realizaron análisis evolutivos de homología proteica, de predicción de la estructura proteica secundaria, de predicción del impacto funcional de las sustituciones aminoacídicas identificadas y el efecto que las posibles mutaciones halladas en regiones consenso de *splicing* pudieran

ocasionar sobre dicho proceso. Por otra parte se incluyeron estudios “in silico” 3D siendo un gran aporte el modelado por homología llevado a cabo para la TPO humana.

Las técnicas de biología molecular empleadas constituyen una herramienta útil para la comprensión de la fisiopatología molecular del hipotiroidismo neonatal y de la RTH. Por otra parte contribuirán al diagnóstico temprano y la elección del tratamiento más conveniente haciendo posible también el adecuado asesoramiento genético a las familias afectadas.

ABSTRACT

The thyroid gland is the first endocrine gland to appear in embryonic development. About week 11 of gestation, fetal thyroid gland and has the ability to concentrate iodide and approximately 18 weeks, begins to release thyroid hormones. The contribution of endogenous hormones is essential for brain maturation and the fetal skeleton. Deficiency of thyroid hormones, even for short periods may lead to irreversible brain damage whose consequences depend on the time of onset and duration of the deficiency. The prevalence of neonatal hypothyroidism is 1/3000-1/4000 from neonatal screening programs. In hypothyroidism several entities have their own characteristics, congenital hypothyroidism without goitre (dysembriogenesis) due to agenesis, ectopia or hypoplasia, corresponding to 80-85% of cases of neonatal hypothyroidism. Some cases where the cause is a mutation in TTF-1, TTF-2 , Pax 8, NKH2-5 and TSH receptor genes were identified. A second group is made up of neonatal hypothyroidism Congenital hypothyroidism with goitre or goiter due to congenital abnormalities of some of the components of the biosynthesis of thyroid hormones (dyshormonogenesis): thyroid peroxidase (TPO), thyroglobulin (TG), DUOX2, NIS, pendrin and dehalogenase I. This group corresponds to the 15-20% of neonatal hypothyroidism and is characterized by low levels of thyroid hormones and consequently greater increase TSH and thyroid cell proliferation. Goitre usually occurs when the thyroid gland is unable to produce enough thyroid hormone to meet the demands of the individual. The thyroid gland enlarges to compensate for this situation, which usually overcomes mild deficiencies of thyroid hormone is correct but not severe.

The biosynthesis of thyroid hormones is performed in cell-colloid interface in the apical membrane of the thyroid cell, on a structural glycoprotein of large size is TG. This is more efficient protein formation of thyroid hormones in the presence of physiological concentrations of iodide. In addition to intervening in the biosynthesis of thyroid hormones also serves for the storage of iodide. Iodide enters active thyroid gland and must be oxidized before acting as an effective agent iodination. Enter the cell cytoplasm through

the NIS transporter located in the basolateral membrane of the thyrocyte. A second conveyor located at the apical membrane, the pendrin leads to the interface iodide cell / colloid. The three stages of iodide organification: oxidation implement into the tirosilic residues of thyroglobulin and finally coupling the monoyodotirosinas and diyodotirosinas to form the thyroid hormones triiodothyronine (T₃) and tetraiodothyronine (T₄) are catalyzed by the same enzyme microsomal membrane, TPO and in the presence of a source of H₂O₂. Two enzymes are related to the synthesis of H₂O₂, these two NADPH oxidases bound to the apical membrane called DUOX1 and DUOX2, and two maturation factors and DuoxA DuoxA1. The biosynthesis of thyroid hormones is regulated by TSH who exerts its stimulatory action of thyroid transcription of specific genes by interacting with its receptor. The effect of thyroid hormones is exerted at the transcriptional level through their interaction with the nuclear receptor.

Dispersed throughout TPO gene mutations are the most common cause of congenital hypothyroidism dysmorphogenesis permanent. The gene encoding human TPO, exons 17 is located on chromosome 2 in the range 2p24-p25. Amino acids 149 to 711 corresponding to exons 5 to 12 in the human TPO gene show significant similarity to the consensus called "animal haem peroxidase" (An peroxidase). Exons 13 and 14 have homology to the family of genes called "Control complement protein (CCP) -like" (residues 742-795) and "calcium-binding epidermal growth factor (EGF) -like" (residues 796-839), respectively. Exon 15 encodes the transmembrane domain and exons 16 and 17 for the intracytoplasmic region.

Knowledge of the structural organization of the gene for human TPO allowed to develop the skills to identify mutations that cause congenital goiters that protein deficiency tools. These studies enabled the design primers to PCR amplify intron each of the 17 exons of thyroid peroxidase and consequently study, from the genomic DNA of patients with iodide organification default caused by TPO gene mutations. So far, more than 80 mutations have been described in the TPO gene which is inherited in an autosomal recessive manner. In about 20% of cases of permanent congenital hypothyroidism, monoallelic defects have been identified in this gene, presumably because of mutations not found in cryptic intron or

regulatory regions of the gene. Thus, it has been reported only monoallelic expression of the mutant allele. The present need to analyze how these different mutations located in different domains of TPO gene alter the functionality of the respective protein and cause congenital goiter. This will allow a breakthrough in the understanding of the pathophysiology of the disease and clinical correlation with phenotypic variability.

A second entity is resistance to Thyroid Hormone (RTH), characterized by a decreased response to T_3 by tissue. RTH incidence is 1 in every 50,000 live births, with over 600 known cases. There are two genes encoding a thyroid hormone receptor, the THR α gene is located on chromosome 17 and gene THR β of 10 exons on chromosome 3. 90% of the mutations are located in the LBD domain (Ligand Binding Domain) of THR β gene and are inherited in an autosomal dominant manner. Have been described about 200 mutations within those which predominate amino acid change. Only two mutations have been recently described in THR α gene. Regarding polymorphisms in the gene, is not known yet about the role much the same. Recent studies have shown the association of these with TSH levels, this is the case of polymorphism THR β -in9-G / A which explains an increased concentration of TSH allele manner dose dependent.

In relation with congenital hypothyroidism one of our objectives was identify mutations in the TPO gene because this mutations are present in the greatest frequency. Five patients with congenital hypothyroidism with goiter by defects in organification of iodine were analyzed. RFLP PCR-test was used to check the presence or absence of mutation p.R396fsX472 generated by insertion-duplication homozygous GGCC position 1277 in the eighth exon of TPO gene that generates a change in the reading frame resulting in a premature exon 9, with the production of a truncated protein with no biological activity codon. Then, PCR-sequencing technique of the promoter and 17 exons of TPO gene was carried out after of the pre-tuning the better conditions for amplification of each exon. A reported mutation was identified, p.E799K and two rare variants of sequence: P. V748M and c.2007-11_2007-9del (-CTT). Cloned system pGEM-T Easy Vector for the characterization of the heterozygous deletion identified. The allelic segregation was

studied in the familial groups of our patients. Also, reported and new polymorphisms were identified in the five patients.

With respect of RTH, 11 patients with suspected this pathology were studied. In order to identify new mutations we amplified by PCR and sequenced exons 7,8,9 and 10 of THRbeta gene using intronic primers. Two mutations described above p. A268G, p.G345R were identified and a de novo mutation p.P452L. The last mutation was confirmed by poblational studies to discard the presence of a polymorphism.

The identified alterations were analyzed with different bioinformatics tools. Protein homology analysis, prediction of protein secondary structure prediction of the functional impact of amino acid substitutions which are identified and the effect of possible consensus mutations found in regions cause splicing was performed on this process. Silico studies 3D were carried. We have to mention the importance of the homology modeling to this study.

The molecular biology techniques used here, are an important tool to the understanding of the molecular physiopathology of the neonatal hypothyroidism and RTH. They will contribute to the early diagnostic and the selection of the appropriate treatment enabling too, the adequate genetic counseling to affected families.

ABREVIATURAS *

*En los casos de abreviaturas, siglas y términos que no se tienen traducción adecuada al castellano, se mantuvo la versión correspondiente en Inglés destacada con letra Itálica

aa: Aminoácido/s

ABF: Azul de Bromo Fenol.

ACHE: Acetilcolinesterasa.

ADN: Acido Desoxirribonucleico.

ADNc: Acido Desoxirribonucleico sintetizado por retrotranscripción a partir de ARN Mensajero.

ADNg: Acido Desoxirribonucleico genómico.

ARN: Acido ribonucleico.

ARNasas: Ribonucleasas.

ARNm: ARN Mensajero.

ATB: Antibiótico.

BAC: Cromosoma Artificial de Bacterias.

BSA: Suero de albúmina bovina.

Buffer: Solución Tampón.

C.S.P. : Cantidad suficiente para.

CMV: Citomegalo Virus.

CTAB: Bromuro de cetil hexadeciltrimetil amonio.

ddNTP: Dideoxynucleotidos.

DMEM: Medio para cultivo de Células.

dNTPs: Denominación genérica para referirse a los 4 deoxirribonucleotidos(dATP, dTTP, dCTP y dGTP).

DOI: Defectos de Organización del Yodo

DTT: Ditioneitol.

Forward: Oligonucleótido sentido.

fT4: Tiroxina Libre.

H₂O: Agua bidestilada.

Hs: Horas

HT: Hormonas tiroideas

IGF 1: Factor de Crecimiento tipo insulina, o del inglés *Insulin-like Growth Factor*.

Kb: Kilobases.

kDa: Kilodaltons.

L: Litro.

LB: Caldo de Cultivo de Luria, o del inglés Luria Broth

L-glu: L-glutamina.

LT4: tiroxina libre

MCS: Sitio de Clonado multiple.

MIT: monoyodotirosinas

ml: mililitros.

mM: milimolar.

Ng: Nanogramos.

NIS: transportador sodio- Yodo, o del inglés *Na⁺/I Symporter*.

Nº: Número.

nt: Nucleotido/s

°C: grados Centigrados.

Pb: pares de Bases.

PCR: reacción en cadena de la Polimerasa, o del inglés *Polimerase Chain Reaction*.

pmol: Picomoles.

Primers: Cebadores, oligonucleótidos.

RE: Retículo endoplásmico *Reverse*: Oligonucleótido anti-sentido.

rpm: revoluciones por minuto.

RT-PCR: transcripción reversa seguida de PCR.

SDS: Dodecil Sulfato de sodio.

SFB: Suero fetal Bovino.

SM: Solución Salina con Magnesio.

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido, o del inglés *Single nucleotide polymorphisms*.

STR: Repeticiones en Tandem Cortas, o del inglés *Short Tandem Repeats*.

T3: 3-5-3' triyodotironina.

T4: 3-5-3'-5' tetrayodotironina o tiroxina.

TG: Tiroglobulina.

ThOX: Oxidasa Tiroidea.

TPO: Tiroperoxidasa.

TSH: Tirotrófina

U: unidades de actividad Enzimática.

UV: Luz Ultravioleta.

Xg: Gravedades

X²: Chi-Cuadrado.

μCi: MicroCurie.

μg: Microgramos.

μl: Microlitros.

Capítulo 1.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Aproximación a los Estudios Genéticos Tiroideos.

El estudio de la genética humana nos ha permitido acercarnos a la comprensión de nuestro paso histórico por la vida, los cambios ancestrales que hemos sufrido, la capacidad de adaptabilidad que hemos logrado generación tras generación, molecularmente ha dado, el que se podría considerar, el mayor impulso hacia el eficaz desarrollo del estudio de enfermedades y los trastornos asociados a la salud humana, como también el desarrollo de nuevos de sistemas diagnósticos y la implantación de los tratamientos terapéuticos adecuados.

Asombrosamente, dos seres humanos cualesquiera comparten el 99,9% de su genoma. En el 0,1% restante están grabados los rasgos de cada población, la diferenciación entre individuos y los cambios que posiblemente le generen predisposición a patologías. Estos últimos son reflejo a su vez de las migraciones de sus ancestros y la exposición a ambientes distintos históricamente.

Desde la expansión de los humanos modernos como con secuencia de movimientos migratorios desde África al continente asiático hace unos 65.000 años, los cambios sufridos por el *Homo sapiens* le han conferido al hombre moderno sus actuales ventajas evolutivas a través de cambios legibles en el ADN, para la adaptación a las condiciones ambientales y sociales a las que fue sometido. Se ha despertado por tanto hoy en día, con la facilidad que brindan las herramientas de estudios genéticos, un interesante rastreo de la huella Antropológica.

Como ejemplo, un equipo conjunto de investigadores australianos y de Indonesia a finales del 2004 curiosamente, anunció el descubrimiento de fósiles de homínidos y herramientas de piedra de tipo olduvayense en la cueva de *Liang Bua*, en la remota isla indonesia de Flores, el llamado *Homo floresiensis*. Posibles hipótesis han salido a ser debatidas actualmente, en cuanto si el *Homo floresiensis* es un descendiente de muy baja estatura del *Homo erectus* ó si pertenecían a algún grupo de humanos modernos que padeció algún tipo de Hipotiroidismo u otro tipo de patología que determinara la altura y ciertos rasgos encontrados en este homínido. Asombrosamente el proyecto desarrollado por investigadores del Instituto *Max Planck* de Antropología Evolutiva de Leipzig, en el que se intenta la secuenciación completa del genoma del *Neandertha* y del *Hominido de Denisova*, como el genoma de cualquier otro de ancestro homínido disponible, con el que se podrá realizar el estudio de las variaciones de secuencia en los genes asociados a los procesos tiroideos, nos hablan de nuestro pasado, y será posiblemente un viaje a través de la historia evolutiva de estos genes, permitiendo determinar en que difieren comparándolo con las características de genomas de referencia del hombre moderno.

Gracias a hombres y mujeres científicos con el deseo de no solo quedarse en la instancia del saber biológico, sino también en una amplia comprensión del fenómeno continuo de salud/enfermedad de los procesos humanos, se ha logrado la creación de iniciativas que dan lugar a soluciones de problemáticas de gran impacto en salud pública. El estudio del Hipotiroidismo Congénito ha dado lugar a la iniciativa de universalización de la aplicación la pesquisa neonatal por la OMS, debido a que se ha demostrado que las patologías tiroideas son la causa tratable más frecuente de retraso mental y de secuelas irreversibles en el crecimiento y desarrollo. El diagnóstico precoz favorece el tratamiento oportuno en los bebés y permite disminuir críticamente la prevalencia de los efectos permanentes.

Los avances de la Endocrinología han proporcionado un entendimiento de las características bioquímicas de la glándula tiroidea, de la biosíntesis hormonal, de la interacción de estas hormonas con los receptores celulares blancos y del efecto que éstas generan en todos los tejidos en los que ejercen su acción hormonal. El estudio de los genes que codifican las proteínas implicadas en estos procesos tiroideos determinados por los avances en endocrinología, ha dado la posibilidad de discernir tanto la organogénesis, la

hormonogénesis y las interacciones receptor-hormona tiroidea, concediendo el entendimiento de la base molecular de las alteraciones patológicas y la identificación de las variaciones genotípicas y fenotípicas y su correlación, fundamental diagnóstico molecular.

Todo esto no hubiese sido posible, sin el interés de explicar, los padecimientos en los que derivaban las anomalías de la glándula tiroides sufridos por los humanos históricamente.

Diversas manifestaciones artísticas en distintos periodos de tiempo pusieron en evidencia la alta prevalencia del bocio en el mundo. Se cree que en el Egipto de Cleopatra (69 -30 a.c.) el bocio tan frecuente, y al parecer en nada perturbó la imagen de belleza perfecta que destacaba a la misma soberana, como se observa en las monedas que tenían acuñado su rostro. Miguel Ángel Buonarroti (1475-1564), genio italiano del renacimiento, con la fatiga por la creación de una de las obras pictóricas más complejas y más bellas de toda la historia del arte, los fresco de la Capilla Sixtina, hizo referencia al bocio en un manuscrito a su amigo Giovanni da Pistoia hacia 1510: *“De afanarme en este trabajo me he ganado un bocio como las paperas que les produce el agua a los gatos de Lombardía”*

En la edad media y en el renacimiento, con la fabulosa intensión de creación artística, se comienza a estudiar el cuerpo y la anatomía humana. El maestro Leonardo da Vinci la incluyó en algunos de sus dibujos de anatomía a cada lado de la laringe (Figura 1).

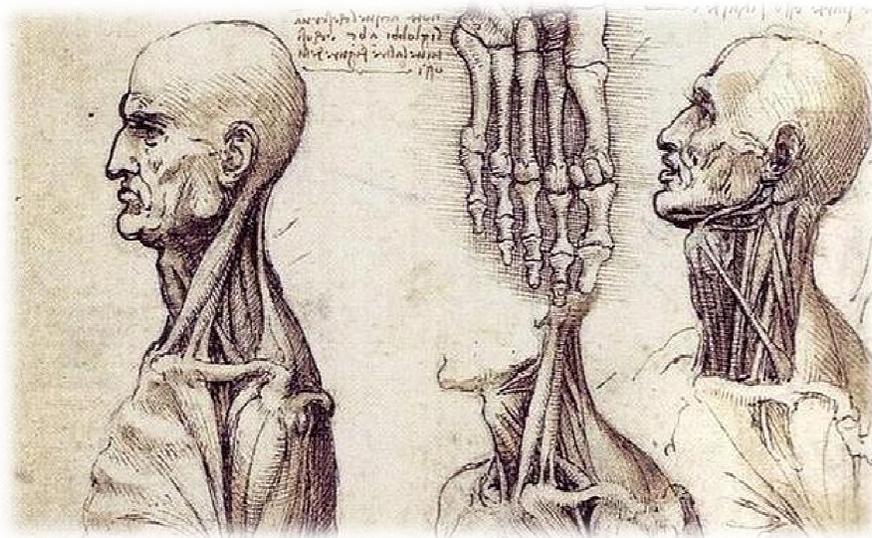


Figura 1. Glándula tiroides normal y bocio dibujados por Leonardo da Vinci en sus estudios anatómicos.

En la Obra el “Cristo después de la flagelación”, obra de 1628 del artista barroco Diego Velázquez, y expuesta en la “National Gallery de Londres”, se puede apreciar que el niño que mira a Cristo en la ilustración presenta bocio, muy probablemente el niño que modeló esta obra lo padecía (Figura 2). Otra obra de Velázquez, “Niño de Vallecas” (1645), destaca un posible Hipotiroidismo Congénito (Figura 3).



Figura 2. Niño con Bocio en la Obra “Cristo después de la flagelación” de Diego Velázquez (1628). National Gallery de Londres.



Figura 3. “Niño de Vallecas” de Diego Velázquez (1645) , destaca un posible Hipotiroidismo congénito. Museo del Prado de Madrid.

Así como en Europa en América las culturas precolombinas destacan con el realismo de sus obras, actualmente conservadas en museos como patrimonio arqueológico, la evidencia de la presencia de bocio en las poblaciones correspondientes, por ejemplo en los miembros de la población Tumaco (Cultura Precolombina La Tolita, 300 a.c. - 600 d.c. Colombia). Por otra parte, debido a los procesos de mestizaje y la transformación de los hábitos alimenticios, tal como ocurriera en ciertas regiones en la Nueva Granada, y en otras partes de toda América, parecen ser el origen de la aparición bocio y otras enfermedades endémicas a mediados del siglo XVII y XIX (Figuras 4 y 5). Los afectados por el bocio recurrían en la búsqueda de la causa, a diversas prácticas con la intención de encontrar su tratamiento. Dado el entendimiento empírico de los nativos sobre los alimentos y nutrientes ricos en compuestos yodados de la región, la tradición *Chamánica* tenía identificado el efecto benéfico que ejercía su consumo y la relación con la aparición de bocio, por lo que era común por la población recurrir a esta práctica tradicional nativa. (Sotomayor, Perez et al. 2001).



Figura 4. Cerámicas con aparente Bocio . Cultura Precolombina Tumaco La Tolita. (300 a.c. - 600 d.c.). Colección privada de Hugo Sotomayor.



Figura 5. “Carguero con Bocio”. Acuarela de Juan Francisco Mancera. Siglo XIX. Colección Etnográfica de Santiago Díaz.

El estudio anatómico de la glándula tiroides más allá del registro artístico advierte su importancia. La glándula tiroides inicia a ser descrita en trabajos académicos como el de anatomista Thomas Wharton en 1656 de nominado “*Adenographia*”. En Inglaterra en 1850 Thomas B. Curling presenta a la Sociedad Real Médica y Quirúrgica de Londres, una descripción de una patología denominada “Cretinismo Esporádico”, enfermedad en ese entonces sin etiología, observada en niños, la cual se manifestaba con alteraciones mentales y físicas, habitualmente relacionadas con bocio. En 1874, Sir William W. Gull observa asociación de casos similares en mujeres entre 30-40 años con síntomas característicos del padecimiento que hoy se conoce como Hipotiroidismo. En 1878, Ord aplicó el término Mixedema al síndrome clínico. En un encuentro de la Sociedad Clínica de Londres en 1888, se concluye que el Mixedema (enfermedad de la época e incurable en ese entonces) presenta asociación con la inflamación, destrucción o pérdida de la tiroides; lo que indicó que la glándula tiroides tenía funciones específicas y determinó que es un órgano de importancia médica, ya que previo a esto, la tiroides no tenía ninguna función e importancia médica reconocida.

En 1891, George R. Murray inyectó un extracto de tiroides de oveja a una mujer con mixedema, intentando suplantar lo que la tiroides producía como terapia. Magnus-Levy en 1895 descubrió el efecto de la tiroides sobre el índice metabólico; observó que el síndrome que describe William W. Gull, se caracterizaba por un índice metabólico bajo y que la administración de extracto de tiroides en individuos hipotiroideos o normales aumentaba el consumo de oxígeno. Algunos estudios realizados por Bauman en 1896 demostraron la presencia de yodo en la tiroides. Y estudios de Gudernatsch en 1912, permitieron conocer el impacto de función tiroidea en el ritmo metabólico, mediante la administración de extractos tiroideos a anfibios, los cuales inducen el cambio de estadio debido al control ejercido por las hormonas tiroideas en la metamorfosis.

En 1914 Kendall logró por primera vez el aislamiento y cristalización de la tiroxina, a partir de 6,500 libras de tiroides de cerdo. Posteriormente, el británico Sir Charles Robert Harington en 1927 sintetizó la tiroxina después de demostrar que se trataba del derivado tetrayodado de la tironina. Al parecer lo logró de la forma más difícil, pues la reducción del doble enlace del compuesto terminaba con la remoción de los átomos de yodo. En 1930, el mismo Harington y Salter, demostraron que la tiroxina está ligada a la molécula de tiroglobulina (TG) por una unión peptídica.

El conjunto de evidencias científicas histológicas, fisiopatológicas y bioquímicas a través de los años, dio origen a la biología molecular y la genética del proceso de biosíntesis de hormonas tiroideas y sus efectos. Esto amplió la visión sobre los eventos responsables de la mayoría de las enfermedades tiroideas y su clínica.

La información de los genes que codifican y modulan la expresión de proteínas implicadas en los procesos tiroideos, desvela mecanismos propios de la fisiopatología tiroidea, de gran valor tanto para el diagnóstico, el tratamiento y el estudio de las enfermedades asociadas a esta glándula.

Inicialmente los genes que participan en el desarrollo y función de la glándula tiroides fueron estudiados en ratones transgénicos *knock-out* en los cuales por sustitución dirigida de genes, se inactivaron funcionalmente las dos copias activas del gen en estudio. Las combinaciones de ratones *knock-out* heterocigotas, con un alelo inactivado para cada gen

de interés, permitieron identificar los genes candidatos involucrados en los estudios de la morfogénesis tiroidea.

Los aspectos morfológicos y moleculares investigados ampliamente en el desarrollo de tiroides de ratón se utilizaron para ser comparados con el desarrollo de la tiroide humana. (Fagman et al. 2006). De esta manera en el estudio del hipotiroidismo se han identificado diversos genes involucrados en los procesos tiroideos y se han caracterizado mutaciones asociadas al desarrollo de esta condición y sus diferentes manifestaciones. El primer cambio genético, que causa el síndrome de Pendred (sordera y Bocio) fue descrito en 1896. Este síndrome en 1958 fue considerado como un defecto parcial en la organización del yodo, asociado a 161 mutaciones en el Gen SLC26A4 en la actualidad.

Posteriormente, Niepomniszcze en 1971 con estudios enzimáticos “*in vitro*” en la universidad de Chicago, demostró en una paciente operada con Bocio que la tiroperoxidasa (TPO) era defectuosa. Este estudio fue pionero en identificar una falla enzimática en la biosíntesis de hormonas tiroidea. Más adelante en 1992, Abramowicz describió la primera mutación identificada en el gen de TPO, una inserción-duplicación GGCC homocigota en el exón 8 de este gen. Se ha identificado hasta el momento 80 mutaciones asociadas a este gen.

En 1991 se registró por primera vez en una familia de origen japonés una mutación en el gen de TG. Se han registrado hasta el momento 70 mutaciones en total. Fujiwara y Matsuta en 1997 describieron el primer cambio sin sentido homocigoto en el gen que codifica para el simportador Na/I (NIS).

Moreno y colaboradores en el año 2002, describieron la primera mutación para el gen de la dual oxidasa 2 (DUOX2) que forma parte del sistema de enzimas DUOX. Se han reportado 36 mutaciones diferentes desde entonces en DUOX2. Las primeras mutaciones en el gen que codifica para la enzima iodotirosina dehalogenasa tipo I (DEHAL1), fueron descritas también por Moreno y colaboradores en 2008. Alcanzándose un registro de 7 hasta hoy en total.

El Dr. Samuel Refetoff en el 1967, junto a colaboradores, publicaron el primer caso en el año de resistencia a hormonas tiroideas (RHT), describiendo en una familia de origen

portorriqueño a 2 de 6 hermanos que padecían de sordera congénita, bocio y disgenesias epifisarias (Refetoff et al. 1967). Constataron que los niveles de hormonas tiroideas se encontraban francamente elevados en los niños afectados, pero con ausencia de hipertiroidismo, y los autores postularon la existencia de RHT (Refetoff et al. 1967). Usala y colaboradores fueron los primeros en demostrar una relación estrecha entre el locus del Receptor de hormonas tiroideas beta ($THR\beta$) en el cromosoma 3 y el fenotipo de la RHT, 20 años posteriores a la descripción del síndrome RHT (Usala et al. 1991). La presencia de una mutación un alelo del gen $THR\beta$ genera un receptor de hormona tiroidea beta ($TR\beta$) defectuoso, que interfiere competitivamente con la función del $TR\beta$ normal expresado por el alelo no mutado; la mayoría son heterocigotos, es decir un solo alelo mutado (Refetoff et al. 2008). Actualmente existen un total de 150 mutaciones descriptas para este gen.

Los nuevos horizontes experimentales a nivel molecular como por ejemplo nivel epigenético, podrían ampliar el espectro de los conocimientos en campo clínico de las patologías tiroideas, permitiendo plantear nuevas hipótesis. La heterogeneidad de los genes implicados que codifican y controlan la expresión de proteínas asociadas a los procesos tiroideos, dadas no solo por la función sino también por la estructura de los mismos, convierte a la tiroides en un modelo experimental de gran valor para el entendimiento de patologías genéticas de distintas estirpes.

1.2- Aspectos Embriológicos de la Tiroides

La glándula tiroides aparece en forma de proliferación epitelial en el suelo de la faringe, en el sitio que en etapas posteriores corresponde al agujero ciego. Continúa por delante del intestino faríngeo en forma de un divertículo bilobulado. En esta migración se encuentra unida al músculo de la lengua por el conducto tirogloso el cual se hace macizo y desaparece posteriormente. Desciende entonces la glándula tiroides, por delante del hueso hioides y los cartílagos traqueales. En la séptima semana adopta su posición normal por delante de la tráquea presentando un istmo estrecho en la parte media y dos lóbulos laterales. Comienza a funcionar aproximadamente en el final del tercer mes, momento en el cual se pueden observar los primeros folículos que contienen coloide.

Varios genes importantes para la sobrevivencia, proliferación y migración de precursores de células tiroideas fueron identificados y se ha demostrado que los mismos actúan de modo integrado. Los genes involucrados en la morfogénesis tiroidea son NKX2.1, PAX8, FOXE1 y HHEX (Felice M et al. 2004).

1.2.1. Genes que codifican para proteínas asociadas a embriogénesis tiroidea.

Gen PAX8:

PAX8 es un miembro de la familia de factores de transcripción caracterizados por la presencia de un dominio de unión a ADN de 128 aa conocido como *Paired box domain*. Esta familia está compuesta por nueve miembros, PAX8 debido a su homología forma una subfamilia con PAX2 y PAX5.

PAX8 se expresa en riñón y en tiroides. La función de este factor en tiroides se relaciona con la formación de los folículos tiroideos, siendo uno de los factores de transcripción que controlan la diferenciación (Mansouri et al. 1996). Además de su función durante la embriogénesis, PAX8 se expresa en la tiroides del adulto en donde participa como factor de transcripción de los genes de TG (Mascia et al. 2002), TPO (Espósito et al. 1998) y NIS (Ohno et al. 1999) mediante la unión a sus respectivos promotores. En estudios con ratones *knock-out* para Pax8 se observa que estos nacen a término, pero presentan retraso en el crecimiento y mueren entre 2 y 3 semanas por hipotiroidismo. La administración de tiroxina T₄ les permite a los ratones sobrevivir (Mansouri et al. 1998). En humanos el gen PAX8 se localiza en el cromosoma 2 (2q13), comprende un ARNm de 4065 nucleótidos.

Gen NKX2.1

Pertenece a una familia de factores de transcripción que presentan un dominio de unión al ADN llamado homeodominio u *homeobox*. El gen que codifica para la proteína *NKX2.1* es el primero que se expresa durante la formación de la tiroides siendo esencial para el proceso de desarrollo. Este gen también se denomina TITF1 y se expresa en tiroides, en varias estructuras del prosencéfalo y en pulmones. Ratones con deficiencias en este gen carecen de glándula tiroides, pituitaria y pulmones, además de mostrar grandes alteraciones en el desarrollo del cerebro. TITF1 también es esencial para la supervivencia de precursores de

células tiroideas, sin embargo no es requerida para su formación inicial (Kimura et al. 1996). El gen del TITF1 se localiza en el cromosoma 14 (14q13), comprende dos exones, un ARNm de 2352 nucleótidos y se transcribe a partir de varios sitios (Hamdam et al. 1998). TITF.1 tiene varios sitios de unión a los promotores y *enhancers* distales de los genes de TG y TPO (Guazzi et al. 1990), controlando su expresión en la glándula tiroidea del adulto. (Damante et al. 1994).

Gen FOXE2:

Pertenece a la familia de los factores de transcripción con un dominio de unión al ADN denominado *forkhead*. Su función se relaciona con la correcta migración de la tiroides desde una posición sublingual a su posición definitiva en la tráquea. El gen humano también conocido como TITF2, mapea en el cromosoma 9 (9q22) (Macchia et al. 1999), comprende un ARNm de 3473 nucleótidos y codifica una proteína de 42 kDa. Este gen se expresa en tiroides, hipófisis (durante el desarrollo embrionario) y en regiones craneofaciales involucradas en la formación del paladar. El estudio de ratones *knock-out* permitió elucidar el rol de este gen en el desarrollo de la tiroides (De Felice et al. 1998). Los ratones *knock-out* nacen a término y mueren entre las 48 horas, presentan fisura paladar y mostraron hipotiroidismo severo debido a una tiroides completamente ausente o sublingual (De Felice et al. 1998). La proteína mutante mostraba una deteriorada unión al ADN y pérdida de la función transcripcional. TITF2 promueve la migración de células precursoras y estaría relacionado también con la sobrevida. Este gen también juega un rol esencial en la morfogénesis del folículo piloso (Brancaccio et al. 2004). En el síndrome de Bamforth Lazarus, los pacientes presentan alteraciones en el pelo. La expresión de Foxe1 en folículos pilosos es regulada por otro gen denominado “SHH”.

Gen HHEX:

El factor de transcripción HHEX contiene un dominio de unión a ADN *homeobox* y fue identificado en células hematopoyéticas (Crompton et al. 1992). El gen murino Hhex se encuentra en el cromosoma 19 y el gen HHEX en humanos mapea en 10q23.32. El gen está dividido en cuatro exones y codifica para una proteína de 270 aa con un dominio amino terminal rico en prolina.

Se expresa en el endodermo primitivo durante el desarrollo temprano y luego en la región ventral del intestino anterior o intestino faríngeo y desde el día 8 en adelante marca el primordio de numerosos órganos derivados del intestino anterior (como tiroides, hígado, timo, páncreas y pulmones). En tiroides se expresa tanto en desarrollo como tiroides adulta. El análisis de ratones Hhex $-/-$ demostraron que es esencial para la morfogénesis de la glándula (Martinez et al. 2000). En el primordio tiroideo se forma y se expresan los factores PAX8, FOXE1 y TITF1. Sin embargo, la expresión de los 3 factores se regula negativamente en ausencia de Hhex y el día 9 el primordio tiroideo está ausente o es hipoplásico (Parlato et al. 2004).

1.3 Aspectos Histológicos de la Tiroides

La glándula tiroides se encuentra incluida en una cápsula de tejido conectivo adyacente con la aponeurosis cervical profunda. Por debajo de ella se continúa con una cápsula verdadera que es más delgada y que se adhiere íntimamente a la glándula; prolongaciones finas de la cápsula interna se extienden en forma de tabique y la dividen en lóbulos y lobulillos poco precisos.

El folículo es la unidad estructural de la glándula tiroides, el cual compone a los lobulillos; estos folículos contienen en su interior una gelatina espesa denominada coloide, que tiene abundantes mucoproteínas, enzimas y TG. La forma de las células componentes varía, pero suele ser cuboide. El citoplasma de estas células es granuloso y básico. El aparato de Golgi y los centríolos están situados por encima del núcleo.

Además de las células principales de los folículos, existe una pequeña cantidad de células parafoliculares (Kluge et al. 2005).

1.4 Aspectos Anatómicos de la Tiroides

La glándula tiroides pesa de 20 a 40 g. Está constituida por dos lóbulos laterales, unidos por una porción central llamada istmo. Se localiza en el compartimiento anterior central del cuello, por delante de la tráquea, la cual se encuentra unida por tejido fibroso.

Los lóbulos laterales se encuentran situados en un espacio comprendido entre la tráquea y la laringe medialmente, las dos vainas carótidas y los músculos esternocleidomastoideos lateralmente.

La tiroides tiene una cápsula fibrosa que la cubre totalmente y envía tabiques interiormente que le dan el aspecto lobuloso a su parénquima. Además la aponeurosis cervical profunda se divide en dos capas cubriendo a la tiroides en sentido anterior y posterior dándole un aspecto de pseudocápsula, que es el plano de disección empleado por los cirujanos.

En sentido anterior se encuentra en relación con los músculos infrahiodeos, a través de los cuales se introduce en el compartimento visceral del cuello (Figura 6).

En sentido posterior se encuentran las paratiroides dentro de la llamada cápsula quirúrgica (cápsula de tejido conectivo que rodea a la tiroides) y los nervios laríngeos recurrentes. Estos últimos se encuentran en la parte baja en el surco traqueoesofágico, pasan por debajo de la arterias tiroideas inferiores y luego ascienden para introducirse en la laringe a través de la membrana cricotiroidea. (Bliss et al.2000)

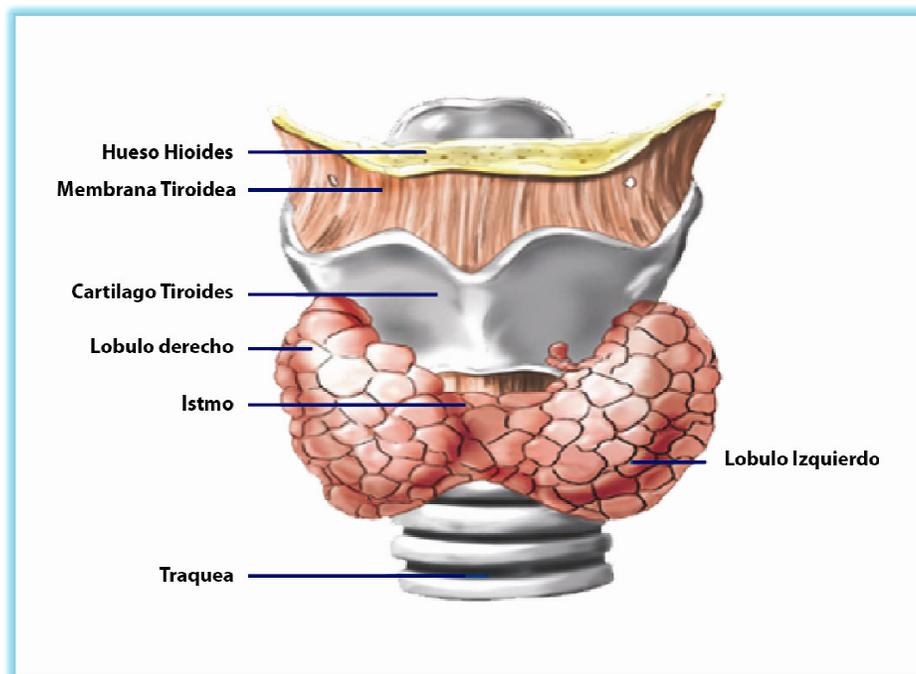


Figura 6. Localización de la Glándula Tiroides Normal en el Humano.

1.5 Aspectos Fisiológicos de la Tiroides.

La función de la glándula tiroides es sintetizar y secretar hormonas tiroideas las cuales necesarias para regular el metabolismo basal. El funcionamiento de esta glándula se basa en varios procesos como son: metabolismo del yodo y la producción, el almacenamiento y la secreción de hormonas tiroideas.

Su estructura folicular está muy relacionada con su dependencia funcional al yodo para la biosíntesis de hormonas, el cual es un oligoelemento escaso. Esto conlleva la necesidad de poder concentrar el yodo y almacenar la hormona yodada de forma tal que no sea inmediatamente accesible al torrente sanguíneo y poder controlar su secreción como hormona activa según las necesidades del organismo.

1.5.1 - Biosíntesis de las Hormonas Tiroideas.

Las principales hormonas son 3-5-3'-5' tetrayodotironina o tiroxina (T_4) y 3-5-3' triyodotironina (T_3) (Figura 7). Estas hormonas tienen una estructura química derivada del aminoácido tirosina y contienen yodo, cuya presencia es imprescindible para la actividad biológica (Zangheri et al 2000). Para la formación de las hormonas tiroideas se requiere yodo el cual ingresa al organismo con la dieta, en su mayor parte es transformado a yoduro antes de su absorción en el tubo digestivo y pasa al líquido extracelular. El yoduro circulante es captado por riñones, tiroides, células gástricas, glándulas salivares, glándula mamaria y placenta. La síntesis de una cantidad adecuada de hormonas tiroideas (HT) depende de un aporte adecuado de yodo exógeno.

La biosíntesis se lleva a cabo en los folículos, dentro de los cuales se encuentra el coloide conteniendo la TG producida por células epiteliales que limitan cada folículo. Una vez incorporado el yoduro en el folículo tiroideo, es oxidado por la TPO y luego fijado a los residuos aminoacídicos de tirosina de la TG en un proceso denominado organificación.

Cuando la glándula recibe el estímulo para secretar sus hormonas, cliva la TG para liberar T_3 y T_4 al plasma. El transporte y reservorio de estas hormonas en sangre depende de proteínas transportadoras. La mayor parte de T_4 y T_3 circulan en sangre en su forma ligada

inactiva y sólo en una proporción muy pequeña en su forma libre activa. La T_4 se secreta aproximadamente 10 veces más rápido que la T_3 , por lo tanto en órganos como hígado, riñón entre otros, la T_4 por monodesyodación se convierte en T_3 .

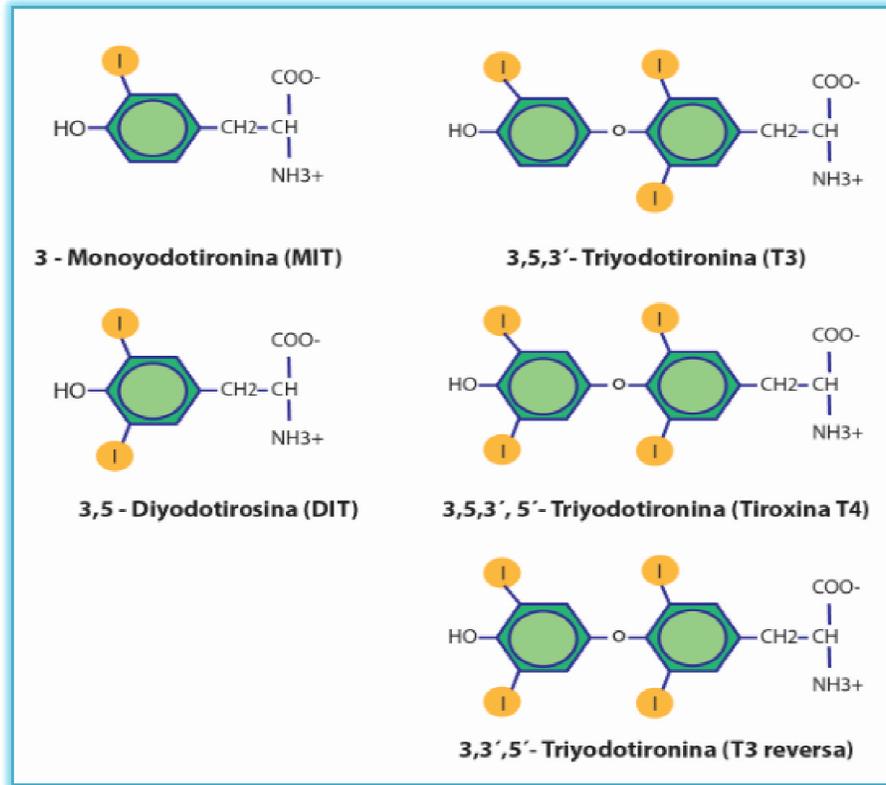


Figura 7. Fórmulas estructurales de los productos resultantes de la biosíntesis hormonal tiroidea: las HT (T_3 y T_4), sus precursores monoyodotirosina (MIT) y diiodotirosina (DIT), y el metabolito inactivo T_3 reversa (rT_3).

Etapas en la biosíntesis de hormonas tiroideas:

Captación de Yoduro: El yoduro incorporado a través de los alimentos es la fuente principal de yodo en el organismo. El mismo, luego de ser absorbido, se transporta vía sistémica hacia las arterias superiores tiroideas que desembocan en los capilares perifoliculares. En consecuencia la concentración intracelular de yoduro de la célula folicular supera a la extracelular, requiriéndose para su captación un mecanismo de transporte activo denominado “trampa de yoduros”, situada en la membrana basal en la cual interviene el transportador NIS. En este contexto celular se genera un flujo de yoduro hacia el lumen folicular propiciado por un transportador de membrana apical, la pendrina, que permite el transporte del yoduro a través de la membrana apical. Como fuente

secundaria, el tirocito cuenta con el yodo reciclado del proceso biosintético de hormonas tiroideas mediado por proteínas conocidas como DEHALs.

Organificación del yoduro y biosíntesis de Hormonas Tiroideas: La oxidación del yoduro, la incorporación del mismo a los residuos tirosílicos de la TG y finalmente el acoplamiento de los residuos yodotirosílicos: monoyodotirosinas (MIT) y diyodotirosinas (DIT) para formar las hormonas tiroideas T_3 y T_4 son catalizadas por una misma enzima, la TPO y en presencia de una fuente de H_2O_2 . Dos NADPH oxidasas que se encuentran unidas a la membrana apical denominadas DUOX1 y DUOX2 están relacionadas a la síntesis de H_2O_2 y requieren para su maduración los factores DUOXA1 y DUOXA2. En el proceso de acoplamiento intervienen dos tirosinas hormonogénicas, la aceptora, que aporta el anillo interno de la hormona que queda anclada a la TG y la dadora que aporta el anillo externo de la hormona. De las 66 tirosinas presentes en cada monómero de TG, aproximadamente 30 son transformadas en MIT ó DIT A su vez, 2 de estas yodotirosinas son acopladas para formar las yodotironinas T_3 y T_4 que aún no se encuentran biodisponibles sino que están en el interior del folículo tiroideo unidas covalentemente a la TG por un enlace peptídico (Figura 8).

Clivaje proteolítico de la TG: Ante un requerimiento fisiológico de hormonas tiroideas, la TG depositada en la luz del folículo tiroideo es transportada por endocitosis al interior de la célula donde es hidrolizada en los lisosomas. Los residuos de MIT y DIT son dehalogenados por acción de la yodotirosina deydinasa, y el yoduro resultante ingresa a ser almacenado por la glándula, al mismo tiempo que la T_4 y la T_3 pasan a la circulación sanguínea. T_3 es la hormona activa y el 80% de ésta proviene de la desyodación de T_4 principalmente en hígado y riñón. Por medio de la enzima microsomal 5 desyodasa, se obtiene T_3 reversa (metabólicamente inactiva). Luego de que las hormonas tiroideas son secretadas por la tiroides se unen a proteínas séricas para ser conducidas a los tejidos donde ejercen su acción metabólica por interacción con su correspondiente receptor nuclear; las tres mayores proteínas transportadoras son: T_4 binding globulin (TBG), T_4 binding prealbumin (TBPA) y albúmina. La TBG transporta aproximadamente el 75% de la T_4 sérica y el aproximadamente 70% de la T_3 sérica, TBPA transporta un 15-20 % de la T_4 , y la albumina un 5-10% de T_4 . Las hormonas están asociadas con las proteínas de transporte por una unión no covalente y están en un equilibrio reversible con las hormonas libres.

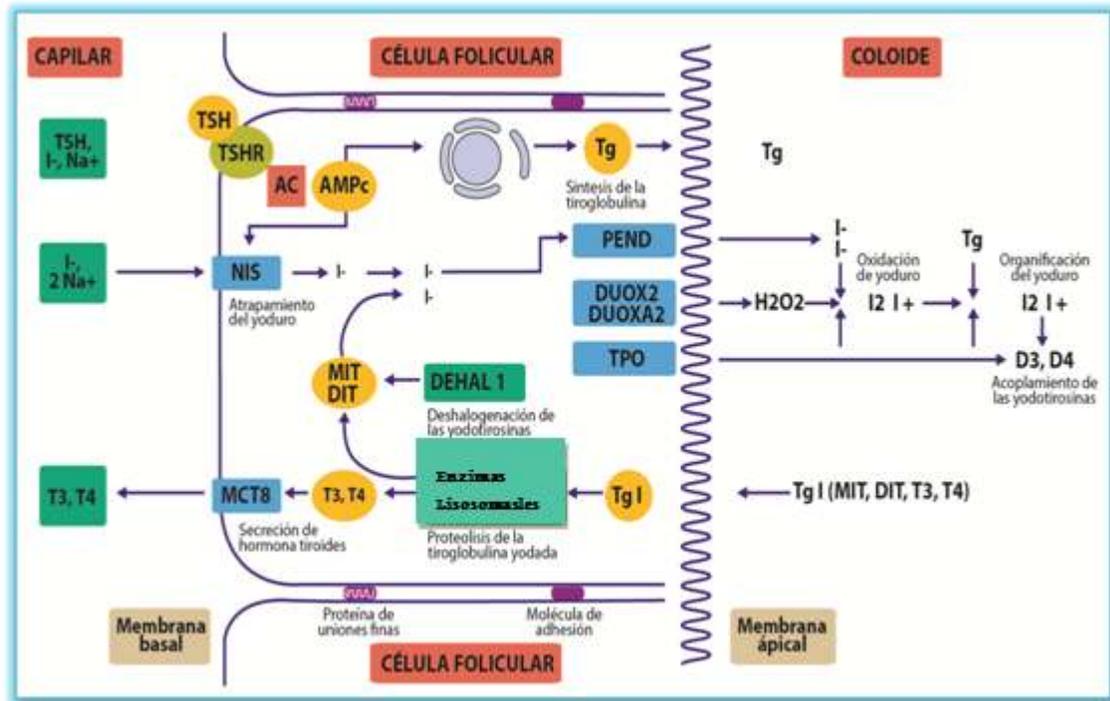


Figura 8. Esquema de los principales componentes de la fisiología tiroidea y ciclo del yoduro en el tirocito durante la formación y regulación de T_3 y T_4 .

1.5.2 - Genes que codifican proteínas asociadas a las distintas etapas de la biosíntesis de hormonas tiroideas.

Gen que codifica para la Tiroperoxidasa (TPO):

La TPO es una enzima microsomal, ubicada en la membrana apical de células foliculares tiroideas. Esta hemoglicoproteína está formada por 933 aminoácidos con un peso molecular de 102.937 Da y cuya función es catalizar la organificación del yoduro, por medio de la oxidación de éste y de su incorporación a los residuos tirosílicos de la TG y finalmente el acoplamiento de las MIT y las DIT para formar T_3 y T_4 . La enzima posee por lo menos dos sitios activos, uno para tirosina y otro para yoduro (Medeiros-Neto et al. 1993). El principal rol de la TPO en la biosíntesis de hormonas tiroideas sería la yodinación de la TG. Clásicamente la oxidación del yodo incorporado por la dieta, la yodinación de los residuos tirosílicos de la TG, y el acoplamiento de los residuos yodados para la formación de T_3 y T_4 son funciones atribuidas a la TPO, teniendo en cuenta que la actividad enzimática es

dependiente de la asociación con un grupo hemo (Degroot and Niepomnische et al. 1977). Durante el proceso de organificación, es imprescindible una fuente de H_2O_2 cuya síntesis se lleva a cabo mediante la acción de dos NADPH oxidasas unidas a la membrana apical denominadas dual oxidasa 1 (DUOX1) y dual oxidasa 2 (DUOX-2) (De Deken et al. 2000).

Se conoce que alrededor de 500 aminoácidos, hacia el extremo N-terminal de DUOX2, muestran un 43 % de homología con TPO. El rol de dicho dominio de DUOX2 no está claramente elucidado, pero está demostrado que presenta actividad peroxidasa al ser expresado en sistemas bacterianos. El dominio peroxidasa de DUOX podría ser capaz de acoplar residuos de tirosina yodados en la TG, reduciendo posiblemente la contribución de la TPO en el proceso de la hormonogénesis (Edens et al. 2001). Estos hallazgos se correlacionan con otros previos, en los cuales se describe la formación no enzimática de T4, proponiéndose entonces que la TPO no sería requerida necesariamente para el acoplamiento de yodotirosina (De Crombrughe et al. 1967).

El proceso general de síntesis de hormonas tiroideas es estimulado por la hormona pituitaria tirotrópica (TSH), que actúa vía receptor acoplado a proteína G (TSHR), localizado en la membrana basal del tirocito. El estímulo crónico con TSH estimula la síntesis de TPO y su transporte hacia la membrana apical (Penel et al. 1998). Si bien existen reportes de que el promotor de TPO humana tiene elementos respondedores a AMPc y tirotrófina (Abramowicz, Vassart, and Christophe et al. 1990), existen otros estudios que muestran que la transcripción del gen de TPO no se ve regulada por TSH o AMPc (Foti, Gestautas, and Rapoport et al. 1990). Se cree que la vía de señalización del TSHR, que involucra miembros de la familia de las proteínas G y la cascada de inositol trifosfato/ Ca^{2+} , podrían implicarse en la regulación de la expresión de TPO (Büch et al. 2008, De Deken et al. 2000, Laugwitz et al. 1996). La transcripción del gen de TPO se encuentra bajo el control de factores de transcripción conocidos como TITF1 o NKX2.1, TITF2 o FOXE1 y PAX 8, pudiéndose encontrar sitios de unión para estos factores en el promotor del gen de TPO. En particular, PAX8 parece tener un rol fundamental en la expresión tejido-específica de TPO (Esposito et al. 1998).

El gen que codifica a la TPO humana está localizado en el brazo corto del cromosoma 2, en el intervalo 2p24-p25. Éste posee un tamaño de 131 kpb de ADN genómico y está conformado por 17 exones, 16 de los cuales son codificantes (Kimura et al. 1987). El transcrito completo de 3.048 nucleótidos codifica para una proteína con un peso molecular equivalente a 102 kDa, denominada TPO-1 de 933 aminoácidos, compuesta por un péptido señal de 14 aminoácidos, un gran dominio extracelular, un dominio transmembrana y una corta cola intracelular (Figura9). La secuencia aminoacídica entre las posiciones 149 y 711, codificada por los exones 5-12 del gen de TPO humano, muestra significativas similitudes con la secuencia consenso de la peroxidasa animal *An peroxidase*. El dominio *An peroxidase* codifica para una parte importante y de gran tamaño de la TPO, la cual incluye los siguientes residuos D238, R396, H239 distal, E399 y H494 proximal. R396 participa en el mecanismo catalítico, H239 distal y H494 proximal están ligados al hierro central del grupo Hemo y D238 y E399 son sitios potenciales del proceso de unión covalente al hemo.

Los exones 13 y 14, presentan homología con las familias de los genes de la proteína de control de complemento (CCP) (residuos 742-795) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (residuos 796-839), respectivamente (Ruf and Carayon et al. 2006). La función del dominio de homología con el EGF no está clara. Dicho dominio está presente en un gran número de proteínas, muchas de las cuales requieren calcio para su función biológica. Sitios que unen calcio se han identificado en el extremo N terminal. El exón 15 codifica para la parte transmembrana de la proteína y los exones 16 y 17 para la cola citoplasmática de los dominios con homología al EGF (Ruf and Carayon et al. 2006). Dichos sitios podrían ser muy importantes para interacciones proteína-proteína. Se han encontrado en tejidos tiroideos normales varias especies de TPO de distintos pesos moleculares, originadas por *splicing* alternativo durante el proceso de maduración del transcrito primario: TPO-2 transcrito en el cual se produce la eliminación del exón 10 (171 bases) y TPO-3 (TPOzanelli en el cual se produce la pérdida del exón 16 (130 bases). TPO-2 y TPO-3 han sido hallados también en tejido de pacientes con la enfermedad de Graves (Kimura et al.1987, Elisei, Vassart, and Ludgate et al. 1991, Zanelli et al.1990).

Estas dos formas codifican proteínas de 876 y 929 residuos respectivamente. TPO-2 se degrada rápidamente luego de su síntesis, no alcanza la superficie celular y no tiene

actividad enzimática (Niccoli et al. 1997), mientras que TPO-3 es capaz de alcanzar la superficie y muestra actividad enzimática (Niccoli-Sire et al. 2001).

Se determinó posteriormente la existencia de cinco transcritos nuevos. TPO-4 y TPO-5, con la eliminación de los exones 14 y 8 codifican proteínas de 889 y 760 aminoácidos, respectivamente. Mediante estudios de transfección, en los cuales el ADNc de TPO-4 era introducido en células de ovario de hamster, se observó que TPO-4 era incapaz de alcanzar la superficie celular, era enzimáticamente activa y capaz de ser reconocida por un panel de 12 anticuerpos monoclonales dirigidos contra la TPO humana, mientras que TPO-5 no se plegó correctamente y fue incapaz de alcanzar la superficie celular. Las otras 3 variantes correspondían a la TPO-2/3 la cual pierde los exones 10 y 16, a la TPO-2/4 en la que se eliminan los exones 10 y 14, y a la TPO-6 correspondiente a la delección de los exones 10, 12, 13, 14 y 16. La TPO posee 5 sitios potenciales de N-glicosilación en los residuos de asparagina de las posiciones 129, 307, 342, 478 y 569.

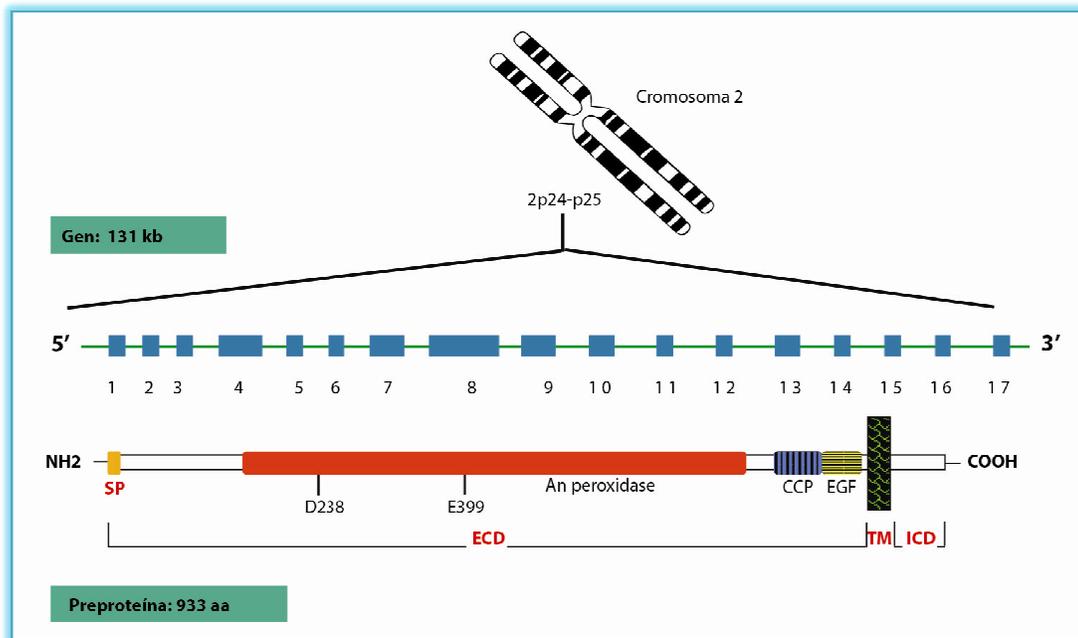


Figura 9. Esquema que muestra los dominios proteicos de la TPO. Péptido señal (SP). Dominio de proteína de control de complemento (CCP). Dominio Factor de crecimiento epidérmico que une calcio (EGF-Ca). Región consenso de la peroxidasa animal (*An peroxidasa*). Sitios de unión al hemo (histidina proximal (H) 494, histidina distal (H) 239, ácido aspártico (D) 238, ácido glutámico (E) 399; dominio extracelular (ECD); dominio transmembrana (TM); dominio intracelular (ICD).

La proteína TPO es sintetizada en polirribosomas e insertada en la membrana del retículo endoplasmico (RE) donde se realiza un primer paso de glicosilación. Luego la TPO es transportada junto con la TG mediante vesículas exocíticas hacia el aparato de Golgi, donde se produce el proceso final de glicosilación. Luego de ser distribuída en el polo apical del tirocito, la TPO expone su sitio catalítico (sitio de unión al hemo) hacia el lúmen folicular (Yokoyama and Tauro et al.1988). Si bien la TPO activa se localiza en la membrana apical, la mayor proporción de la TPO sintetizada se ubica en la zona peri nuclear del (RE) (Tice and Wollman et al. 1972, Alquier et al. 1989). Esta fracción intracelular, rica en manosa, se encuentra en su mayor parte mal plegada y, en consecuencia, es degradada. Sólo el 2 % de la TPO sintetizada es exportada a la membrana apical, la cual presenta una estructura tridimensional adecuada y es rica en N-glicanos. El plegado de la enzima parece ser un prerrequisito para su maduración, su almacenamiento en el RE y para su adecuada expresión en la superficie celular (Fayadat et al. 1998, 2000). La presencia del fragmento N-terminal, de alta homología al péptido señal de proteínas de exportación, es clave para el plegamiento, así como también la interacción con chaperonas intracelulares como son la calnexina y calreticulina. Es sabido que dicho fragmento es clivado por endopeptidasas como parte del procesado postraduccionnal de la proteína, y que la inserción del grupo hemo es esencial para que la TPO ingrese al RE. (L Fayadat.et al, 1999; Laurence Fayadat, Siffroi-fernandez.et al, 2000) (Figura 10).

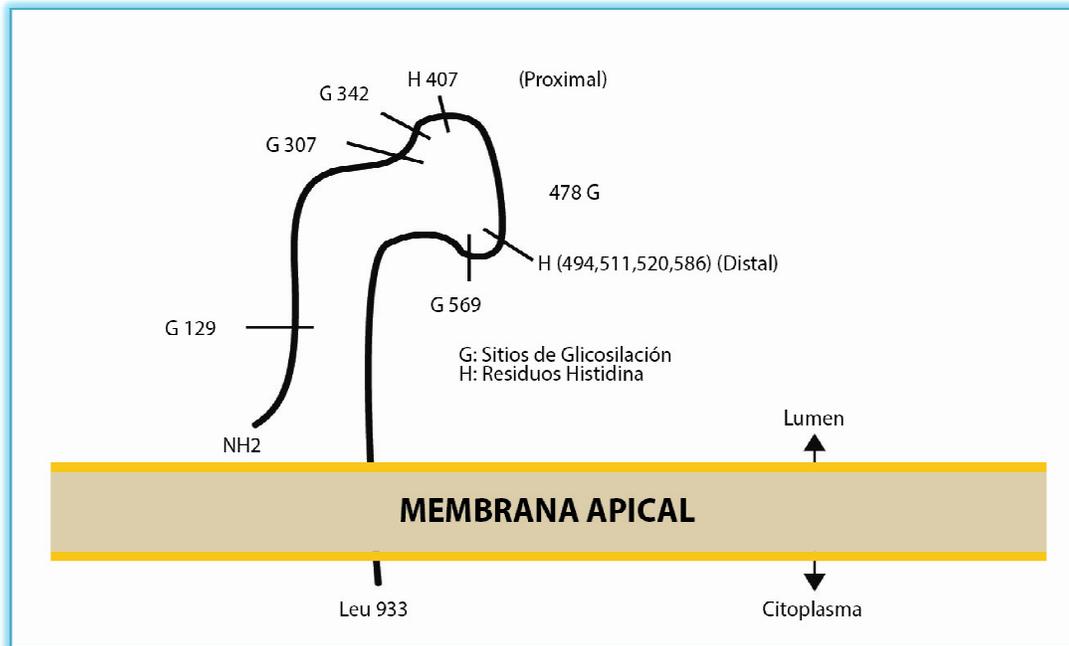


Figura10. Modelo propuesto para la proteína TPO humana. G: sitios de glicosilación.
H: residuos de histidina mediante los cuales la proteína se une al grupo hemo.

Gen que codifica para la Tiroglobulina Humana (TG):

El gen de la TG humana mapea en 8q24.2-8q24.3 y abarca una región de 270 kb de longitud. La información para el transcripto de mayor tamaño (8500 nt) está contenida en 48 exones y codifica para una proteína de 2749 aa (Figura 11). La TG es una gran glicoproteína dimérica (2 x 330 KDa) que juega un rol esencial en la biosíntesis de las hormonas tiroideas cumpliendo funciones de precursor hormonal y de sistema de almacenamiento de hormonas e yodo. En las dos últimas décadas cuarenta y dos mutaciones inactivantes en el gen de TG han sido identificadas (Citerio et al. 2013). Las mismas han clasificadas como mutaciones por cambio de aminoácidos, mutaciones por codones de terminación prematuro, mutaciones que originan cambio en el marco de lectura por delección de un nucleótido y mutaciones por error de *splicing* en los sitios de consenso exónico o intrónico (Targovnik et al. 2001; Gutnisky et al. 2004; Rivolta et al. 2005; Caputo et al.2007). El espectro clínico de los fenotipos resultantes se extiende de un hipotiroidismo con bocio de leve a severo. Se observó en pacientes de origen japonés mutaciones de la TG, que originan o eutiroidismo o un hipotiroidismo leve (Hishinuma et

al. 2006). El gen de la TG se ha asociado también con bocio simple endémico y no endémico (González-Sarmiento et al. 2001).

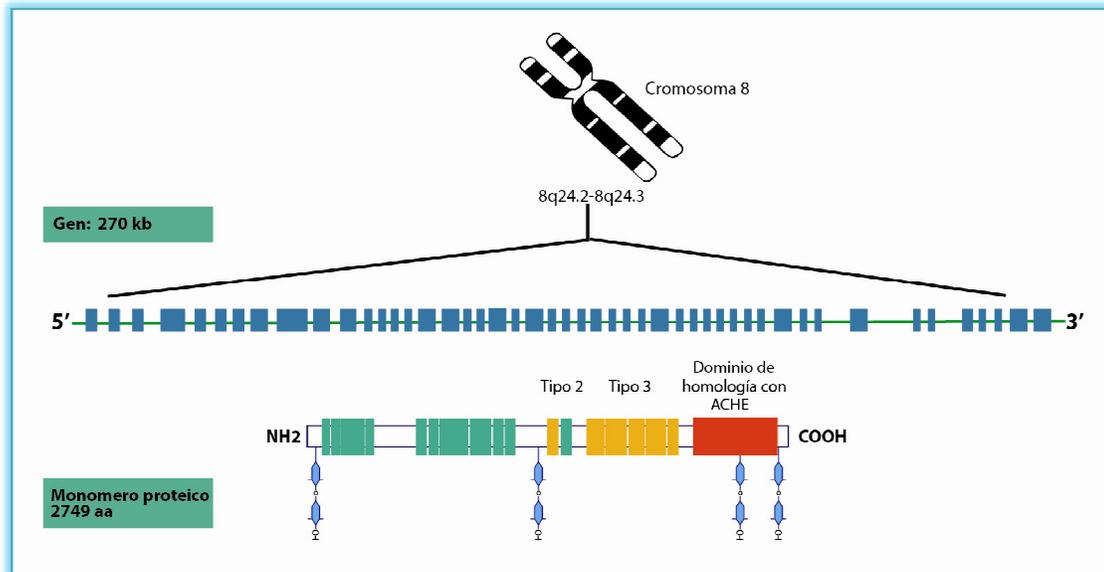


Figura 11. Representación esquemática del gen de TG y de la proteína correspondiente.

Genes que codifican para las proteínas DUOX1 y DUOX2:

Los genes DUOX 1 y 2 codifican para 2 proteínas muy similares que se insertan en la membrana apical de la célula folicular tiroidea. La estructura de estas proteínas incluye 7 dominios transmembrana, 4 sitios de unión al NADPH, un sitio de unión al FAD y, a diferencia de otras oxidasas humanas, posee motivos *EF-hand*. DUOX1 y 2 poseen, adicionalmente, una arginina conservada y 4 histidinas específicas consideradas sitios de coordinación para dos grupos prostéticos Hemo no idénticos (De Deken et.al 2000, Xavier De Deken et al. 2002, K.-H. Krause 2004). Los genes del sistema DUOX se encuentran localizados en el brazo largo del cromosoma 15 en el intervalo 15q15.3, separados por una distancia de 16 kpb (Figura 12). El gen DUOX2 posee 21.5 Kb de ADN genómico, incluye 34 exones siendo el primero no codificante (De Deken et.al 2000). El ARNm tiene una longitud de 6376 nucleótidos y la preproteína está compuesta por un péptido señal de 25 aminoácidos, seguido de un polipéptido de 1523 aminoácidos (De Deken et.al 2000).

El gen DUOX1 de 36 kpb está constituido por 35 exones, siendo los dos primeros no codificantes y da origen a una proteína de 1551 aminoácidos, correspondiendo los primeros

21 aminoácidos al péptido señal. Dicha cadena polipeptídica corresponde a la variante 1. Adicionalmente, se ha identificado una variante 2 generada por *splicing* alternativo, correspondiendo a una proteína de 1197 aminoácidos. El análisis de secuencia reveló que DUOX1 y DUOX2 poseen un 83 % de homología (De Deken et.al 2000). La existencia de genes DUOX diferentes, presentando promotores no relacionados, obliga a cuestionarse el respectivo rol de los mismos, la diferencia notable en la expresión de DUOX2 (5 veces mayor) respecto a la de DUOX1, como así también la detección, hasta el momento, de mutaciones inactivantes con fenotipo patológico sólo en el gen de DUOX2 (J C Moreno et al. 2001, JC Moreno et al. 2002).

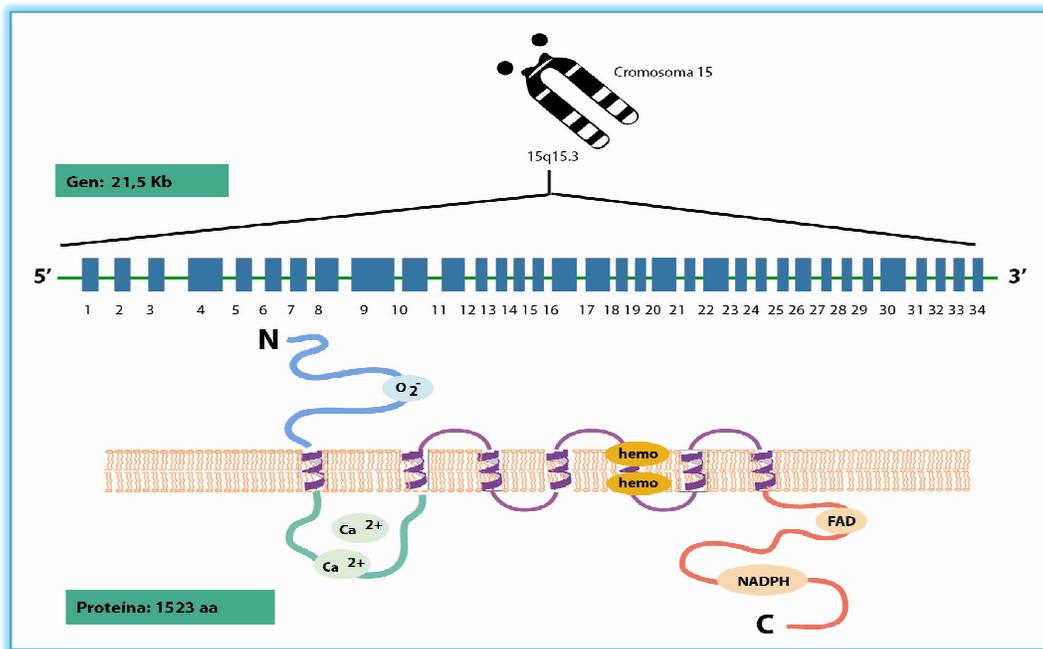


Figura 12. Representación esquemática del gen y de la proteína DUOX 2. Localización en la membrana apical del tirocito. Se indica dominio oxidasa, sitios de unión a calcio, 7 segmentos transmembrana, sitios de unión al NADPH y FAD.

Gen SLC5A5

El gen SLC5A5 codifica para el transportador sodio-yoduro (NIS), que se expresa en la membrana basal de las células de la tiroides y es el encargado de la captación de yodo. También se expresa en glándulas salivales, mucosa gástrica, colon, placenta, mama y plexo coroideo. El gen mapea en el cromosoma 19, en el intervalo (19p12-13,2). Posee 15

exones y codifica para una glicoproteína de 643 aa con 13 dominios transmembrana, un dominio amino terminal extracelular y el carboxilo terminal intracelular (Figura 13).

Se ha observado que la TSH induce la síntesis de NIS, modula su vida media y participa del tránsito de este transportador hacia la membrana y su permanencia en ella. Se ha demostrado que NIS es una fosfoproteína y que la TSH modula su patrón de fosforilación (Riedel, Levy et al. 2001).

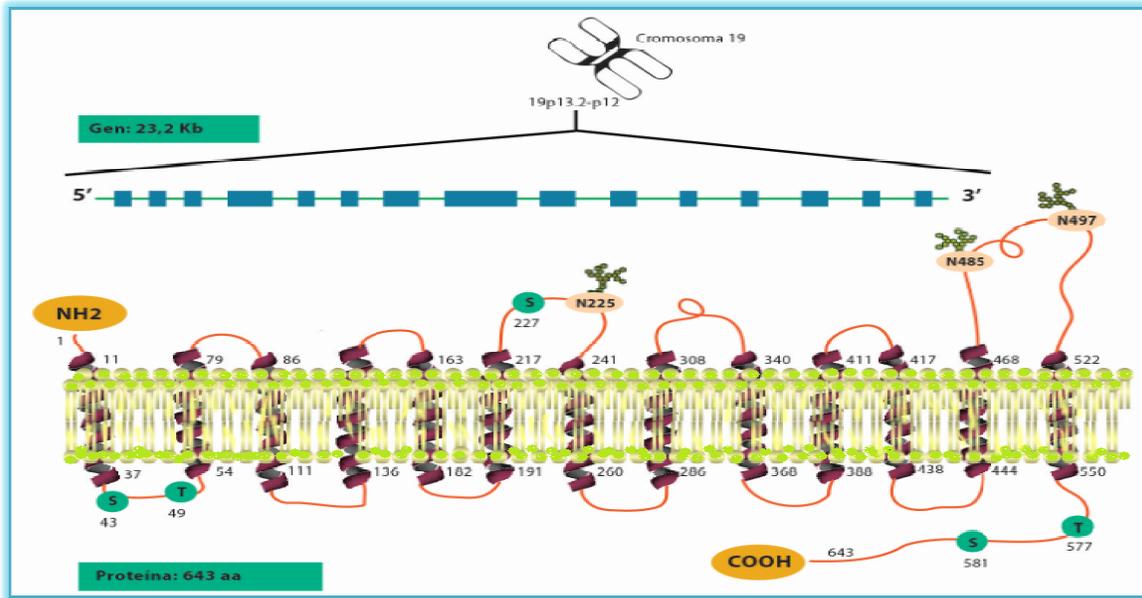


Figura 13. Representación esquemática del gen y de la proteína NIS.

Gen SLC26A4

El gen SLC26A4 que codifica para a proteína pendrina se ubica en el cromosoma 7 (7q31), contiene 21 exones. Codifica para una proteína de 780 aa. Se predice que posee entre 11 y 12 dominios transmembrana que se instalan en la membrana apical de la célula folicular. Esta proteína es un miembro de la gran familia de transportadores de iones y presumiblemente, su actividad funcional se relaciona con el aumento en la entrada de yodo a la célula tiroidea (Figura13).

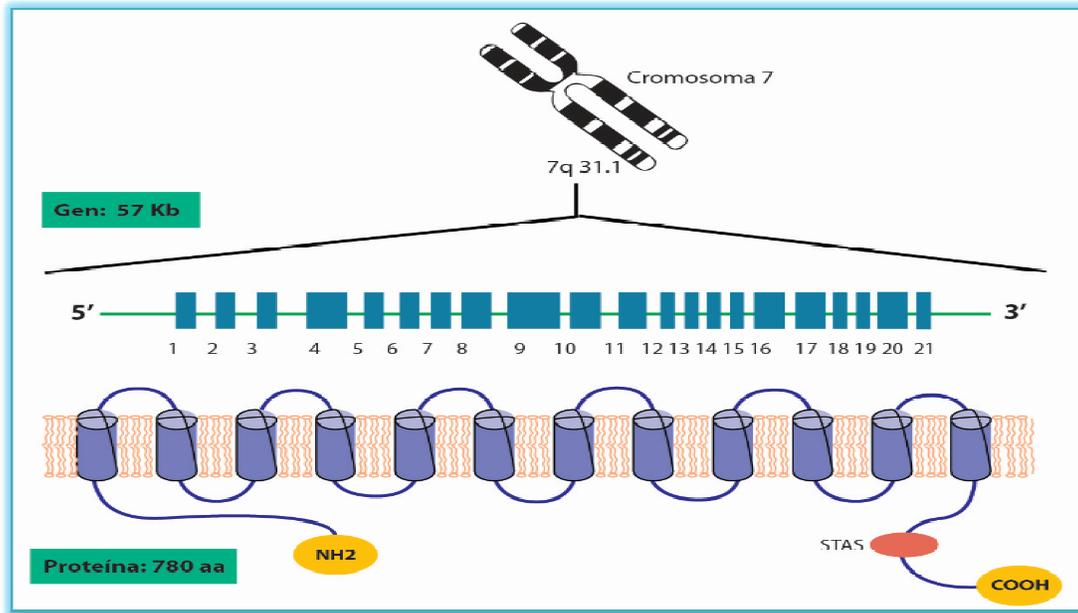


Figura. Representación esquemática del gen y de la proteína Pendrina.

Gen (DEHAL-1):

El gen DEHAL codifica la la Iodotirosina, s est representan dos tercios del yodo en la TG y sirven como precursores en la formación de T_3 y T_4 . La secreción de T_3 y T_4 por la tiroides requiere la proteólisis de la TG, en el curso de la cual se liberan del enlace peptídico MIT y DIT. MIT y DIT no pueden ser reutilizadas como tales para la síntesis de hormonas tiroideas. Ambas son deiodinadas enzimáticamente a través de DEHAL-1. Es un proceso reductivo que lleva a la formación de yoduro y tirosina, los cuales pueden ser reutilizados para la hormonogénesis. Se pensaba que la desyodación de MIT y DIT ocurría principalmente después de la formación de gotas de coloide en los fagolisosomas, y que migraban hacia la superficie basal de la célula. DEHAL-1 es una proteína transmembrana presente en la membrana plasmática de la célula y localizada principalmente en el polo apical de tirocito (Gnidehou et al.2004). La desyodinación de MIT y DIT puede ocurrir durante la proteólisis de la TG antes o después de la endocitosis. DEHAL-1 es el primer miembro dentro de los mamíferos en pertenecer a la superfamilia de las NADH oxidasa/flavina reductasas. Esta enzima presenta una zona de unión putativa al grupo prostético, la flavina mononucleótido (FMN), un dominio nitroreductasa y una zona

putativa de unión transmembrana (Gnidehou et al. 2004). Las nitroreductasas son proteínas que pueden reducir un rango amplio de compuestos nitroaromáticos con el uso de flavina mononucleótidos como cofactor. El gen de la DEHAL-1 se encuentra ubicado en el cromosoma humano 6 (6q25.1) y mide 35737 pb presentando 6 exones. El gen DEHAL-1 dá lugar a transcritos diferentes, como resultado del *splicing* alternativo de los exones 5 y 6. Las isoformas de DEHAL-1 identificadas comparten el mismo péptido señal y los dominios extracitoplasmáticos y transmembrana codificados por exactamente los mismos exones 1 a 4, pero tienen diferentes colas citoplasmáticas codificadas por el exón 5 y/o 6. DEHAL-1 carece del exón 5. DEHAL-1B es una variante resultante del empalme de parte del exón 5 con el exón 6. La región terminal de la isoforma DEHAL-1C corresponde al quinto exón del gen de DEHAL-1. En tiroides, se encontraron niveles de ARNm de DEHAL-1B y DEHAL-1C más bajos que los de DEHAL-1. La isoforma DEHAL-1 resultó ser la única isoforma activa en presencia de NADPH (Friedman, Watson, Lam, Rokita et al. 2006)

1.5.3 - Importancia de las Hormonas Tiroidea, su Interacción tisular y su Metabolismo.

Efecto e Interacción de las Hormonas Tiroideas:

Las hormonas tiroideas son las responsables de regular la síntesis de determinadas proteínas, así como la actividad enzimática, y numerosos procesos metabólicos en prácticamente todos los tejidos del organismo siendo fundamentales para el desarrollo del sistema nervioso central del feto, del niño en crecimiento, así como de controlar la tasa metabólica basal en el adulto.

Las hormonas tiroideas tienen acciones estimulantes e inhibitorias sobre un cierto número de genes. Estas acciones están mediadas por receptores nucleares que se unen a T_3 . Existen 2 tipos de receptores de hormonas tiroideas $TR\alpha$ y el $TR\beta$ codificados en los genes $THR\alpha$ y $THR\beta$ respectivamente por expresión diferencial a partir de distintos promotores por *splicing* alternativo se irrigan las isoformas $TR\alpha_1$, $TR\alpha_2$, $TR\beta_1$, $TR\beta_2$ y $TR\beta_3$ a partir de $THR\alpha$ y $THR\beta$.

Las hormonas tiroideas actúan a través de un elemento de respuesta tras fijarse a sus receptores nucleares. El resultado de la interacción puede ser tanto un aumento como una disminución de la transcripción del gen, lo que ocasiona las consiguientes modificaciones en las concentraciones de las proteínas implicadas en la respuesta de una célula determinada a la acción de las hormonas tiroideas. Este receptor nuclear tiene la capacidad de unirse al ADN en ciertas regiones conocidas como "elementos respondedores a hormonas tiroideas" ubicados en los promotores de los genes regulados por hormonas tiroideas. Los receptores de hormona tiroidea tienen patrones específicos de expresión según los tejidos. TR α 1 se expresa predominantemente en corazón, hueso y cerebro, regulan posiblemente la función cardíaca y el metabolismo energético. La expresión de TR β 1 es más abundante en hígado, riñón y tiroides mientras que la expresión de TR β 2 se limita a pituitaria, hipotálamo, retina y oído interno. La expresión de TR β 3 ocurre principalmente en el corazón y riñón. TR- α 2 es también expresado en diversos tejidos pero incapaz de unir la hormona (Cheng et al. 2005). La T₃, con una afinidad 15 veces mayor que la T₄ por los receptores de las hormonas tiroideas, y siendo la hormona tiroidea activa, ejerce las acciones fundamentales en la activación de los genes dependientes de las hormonas tiroideas, mientras que la T₄ funciona principalmente como una prohormona. Por su parte, la T₄ tiene, además, a concentraciones fisiológicas de T₄ libre, un efecto epigenético, no genómico, el de iniciar la ubiquitinización de la desyodasa D2 (Salvatore et al. 2011).

Efectos sobre sistema nervioso central: Los receptores que se encuentran en el sistema nervioso central presentan muy baja Km y por lo tanto tiene muy alta afinidad y rápida saturabilidad lo que provoca que este tejido sea muy sensible a la acción hormonal, sobre todo en etapas del desarrollo. Las HT en este tejido regulan el crecimiento dendrítico y axonal, la sinaptogénesis, la migración neuronal y la mielinización. Una de las proteínas reguladas por T₃ es el factor de crecimiento neural (NGF), que es mediador del desarrollo psicomotor, como así también de otras proteínas y glucósidos del axón que participan de la mielinización. Durante la neurogénesis aparecen los receptores funcionales unidos a la cromatina. Si durante esta etapa de neurogénesis activa, hay carencia de esta hormona, aparecerá un retraso mental irreversible (cretinismo). El déficit de HT durante las primeras

semanas de nacimiento, produce daños severos en el desarrollo estructural del cerebro y en su organización.

Sistema cardíaco: Sobre la función cardíaca, pueden provocar un aumento en la síntesis de piruvato-deshidrogenasa, aumento de la actividad de las mitocondrias, estimulan la respiración celular al igual que la bomba de Na^+/K^+ , y favorecen el yodotropismo, con el aumento en la frecuencia cardíaca y en el consumo de oxígeno en el volumen/minuto. T_3 mantiene la contractilidad del miocardio estimulando a la miosina ATPasa y regula la actividad del sistema simpático promoviendo la síntesis de receptores β -adrenérgicos.

Efectos sobre el tejido óseo: T_3 es un determinante primario del crecimiento somático normal postnatal, del desarrollo del esqueleto y un importante regulador del metabolismo óseo en el adulto. La presencia de receptores para T_3 en osteoblastos y en osteoclastos, regula el balance óseo.

Efectos sobre la termogénesis: Las HT aumentan el consumo de oxígeno en casi todos los tejidos periféricos, siendo particularmente notorio en el caso del corazón, músculo esquelético, hígado y riñones. Entre el 30% y el 40% del incremento total se atribuye a la estimulación de la contractilidad cardíaca. Los órganos que no muestran respuesta a estos efectos calorigénicos de las HT son el cerebro, las gónadas y el bazo.

Efectos sobre el metabolismo: Las HT disminuyen la concentración del colesterol plasmático pues estimulan el metabolismo de éste, y su conversión hacia ácidos biliares. Aceleran el recambio de lipoproteína de baja densidad LDL por las células hepáticas, posiblemente a través de la estimulación de la síntesis de receptores de LDL y de la degradación de dicha lipoproteína. Estimulan la lipólisis en el tejido adiposo en forma directa, actuando sobre enzimas lipolíticas, y en forma indirecta potenciando los estímulos β -adrenérgicos. De esta manera se favorece la β -oxidación de ácidos grasos en el músculo y en el hígado por aumento de la disponibilidad. Las HT influyen sobre el metabolismo de vitaminas liposolubles, por ejemplo de “vitamina A” a partir de caroteno, y la conversión de ésta en retineno (pigmento necesario para la adaptación de la visión a la oscuridad). En

cuanto al metabolismo de hidratos de carbono, T_3 favorece la captación de glucosa en intestino, músculo y tejido adiposo potenciando el efecto de la insulina. También participan en el metabolismo proteico estimulando la síntesis proteica con diferente especificidad por tejido, así como la incorporación de aminoácidos a la célula.

Metabolismo de las Hormonas Tiroideas:

La T_4 plasmática es de origen exclusivamente tiroideo, mientras la T_3 circulante lo es sólo una pequeña parte. Aproximadamente el 80% de la T_3 de la circulación procede de la monodesyodación de la T_4 en los tejidos periféricos.

La vía principal del metabolismo de la T_4 es la monodesyodación del átomo de yodo de la posición 5' de su anillo externo, una reacción catalizada por las desyodasas D1 y, en menor grado, por las desyodasas D2, y cuyo resultado es la formación de T_3 , que es la hormona tiroidea activa. La desyodasa D3 cataliza la desyodación del anillo interno de las yodotironinas, un proceso que, por una parte, impide la activación de la T_4 al trasformarla en T_3 inversa, e inactiva la T_3 .

Las desyodasas son proteínas de membrana que contienen seleniocisteína. La D1 se localiza en hígado, riñón, tiroides (y posiblemente, en la hipófisis), la D2 en SNC, hipófisis, tiroides, tejido adiposo marrón, músculo esquelético, corazón y placenta, mientras que la D3 se encuentra en SNC, placenta, endometrio e hígado fetal (Salvatore et al. 2011) (Figura14).

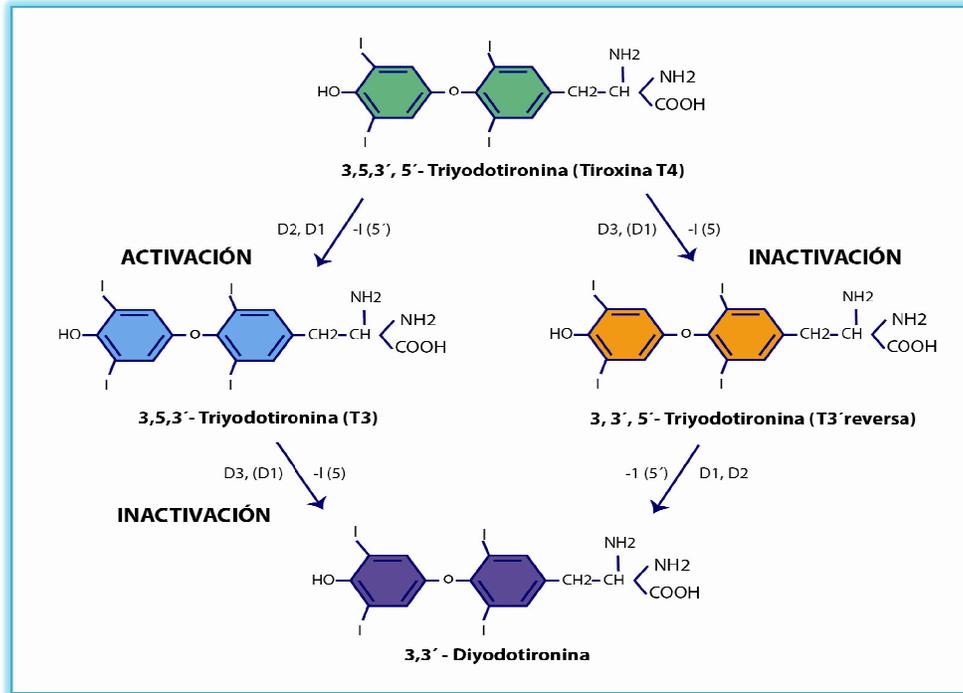


Figura 14. Estructura de las hormonas tiroideas y desyodación de T₄ para generara la T₃ (activa) y a la T₃ reversa (inactiva).

1.5.4 - Regulación de la Síntesis de Hormonas Tiroideas.

El principal sistema de regulación funcional está relacionada al eje hipotálamo hipofisario a través de un control de retroalimentación o *feed-back* negativo (Figura 15). La biosíntesis de las hormonas tiroideas está modulada por la TSH, por medio de su acción estimuladora de la transcripción de los genes de la TG, de la TPO y de NIS por interacción con su receptor. La TSH controla el crecimiento de la tiroides así como su función, por regulación de los niveles de AMPc intracelulares por vía de su unión con el receptor de TSH (TSHR) en la superficie celular que se encuentra acoplado a la proteína G que al igual que esta última, se ubica en la membrana basolateral del tirocito. La TSH como primer mensajero, se fija a su receptor y se activa la enzima adenilatociclasa que genera el AMPc. La TSH induce la activación de fosfolipasa C, generando la hidrólisis de fosfatidil-inositoles, aumento del calcio citoplasmático y activación de proteinquinasa C. La activación de la cascada adenilciclasa-AMPc dispara las señales intracelulares que dan lugar a las modificaciones relacionadas con la acción de la TSH sobre el funcionamiento y el

crecimiento tiroideo. La proteína G es el intermediario que cumple la función de transducción entre el receptor y la activación de la adenilatociclasa. La activación de la cascada adenilatociclasa-AMPC produce los efectos fisiológicos conocidos de la TSH: estimulación de la captación del yoduro por parte de la célula tiroidea, la biosíntesis y la secreción de las hormonas tiroideas. El AMPC estimula la expresión de los genes de TG, TPO y NIS por la acción sobre los factores de transcripción específicos: TITF-1, TITF-2 y PAX8 (Vassart et al. 1995).

A su vez, la síntesis y secreción de TSH es estimulada mediante la hormona TRH que es un tripéptido hipotalámico. La TRH, sintetizada en las neuronas hipotalámicas, se libera al sistema porta hipotálamo/hipofisario y es transportado por éste hasta la hipófisis, estimulando entonces la descarga de TSH que, al actuar sobre receptores específicos en la glándula tiroidea, promueve la liberación de T_3 y T_4 . Luego de alcanzado un nivel adecuado de T_3 y T_4 , estas hormonas ejercen un control negativo sobre hipófisis e hipotálamo.

La TG folicular también actúa como retroalimentación negativa de la señalización transcripcional suprimiendo la expresión de TITF-1, TITF2 y PAX8 y consecuentemente, para reducir su propia expresión y la de TPO, NIS y TSHR.

Algunas de las moléculas de TG internalizadas desde la luz del folículo no son sometidas a la degradación lisosomal. El receptor denominado Megalina, presente en la membrana apical del tirocito media la transcitosis de la TG al coloide.

Existe otro proceso el “transporte transepitelial”, que consiste en la internalización y el pasaje de la TG intacta desde el coloide a través del tirocito, hacia la circulación, para reducir la cantidad de hormonas tiroideas liberadas. La TG internalizada escapa a la degradación lisosomal. Este mecanismo, ejerce un control en la biodisponibilidad de hormonas tiroideas. (Marino et al. 2001).

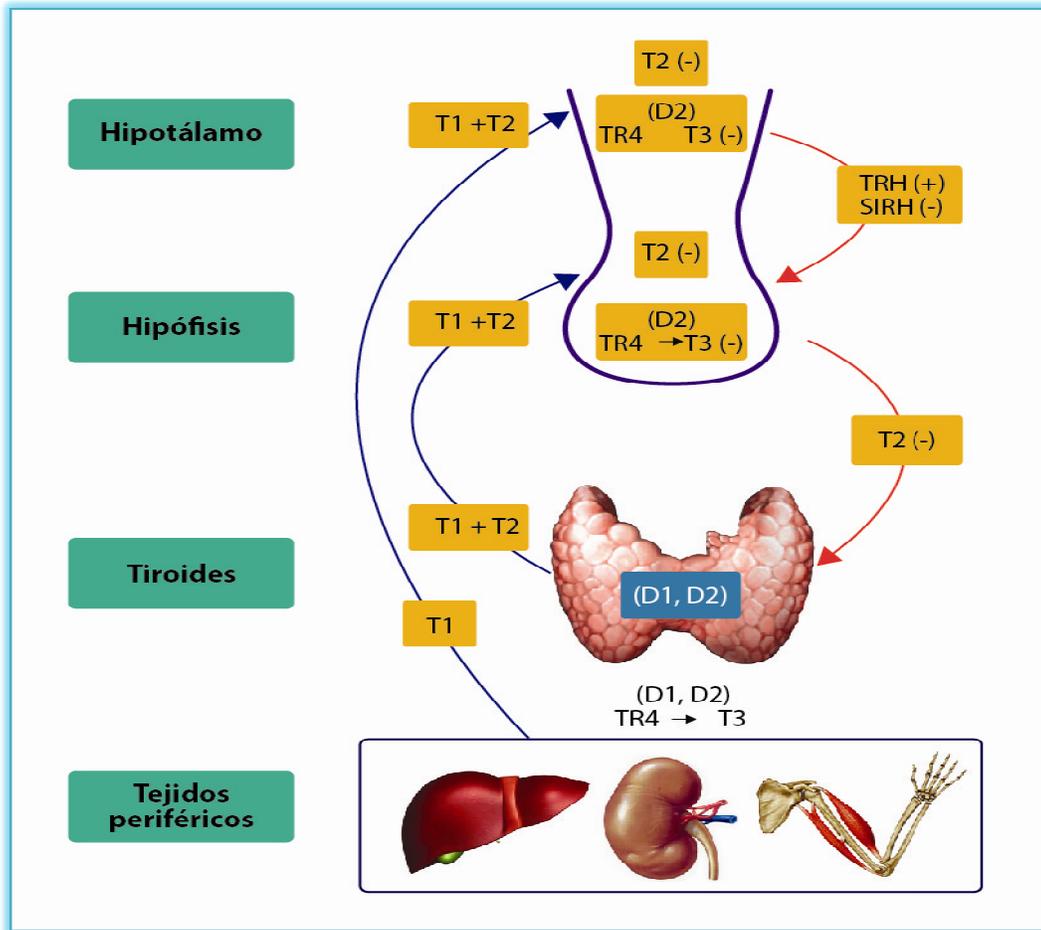


Figura 15. Esquema general de la Regulación de la Función Tiroidea.

1.5.5- Algunos Genes asociados a la regulación y efecto de las Hormonas Tiroideas.

Gen que codifica para el Receptor de la Hormona Estimulante de Tiroides (TSHR):

El gen de TSHR se localiza en el cromosoma 14 (14q31) (Libert et al.1990). Su tamaño es de aproximadamente 60 Kb y contiene 10 exones (Parmentier et al. 1989; Libert et al. 1989). Los exones 1-9 codifican al dominio extracelular mientras que el extenso exón 10 a un tercio del dominio extracelular, a la totalidad del intracelular y a la región transmembrana. El TSHR es una cadena glicoproteica de 744 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 100 kDa (Vassart et al. 1992) que se ubica en la membrana basolateral de la célula tiroidea. Pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G. Se caracterizado por un largo dominio amino-terminal extracelular de 398 aa con función de reconocimiento y unión específica a TSH como a otros estimuladores

patológicos; siete segmentos transmembrana conectados por tres *loops* intracelulares y otros tres extracelulares que en conjunto portan 270 aa; y adicionalmente un corto dominio carboxi-terminal intracelular de 76 aminoácidos cuya función es conducir la señal hacia el interior de la célula (Figura16).

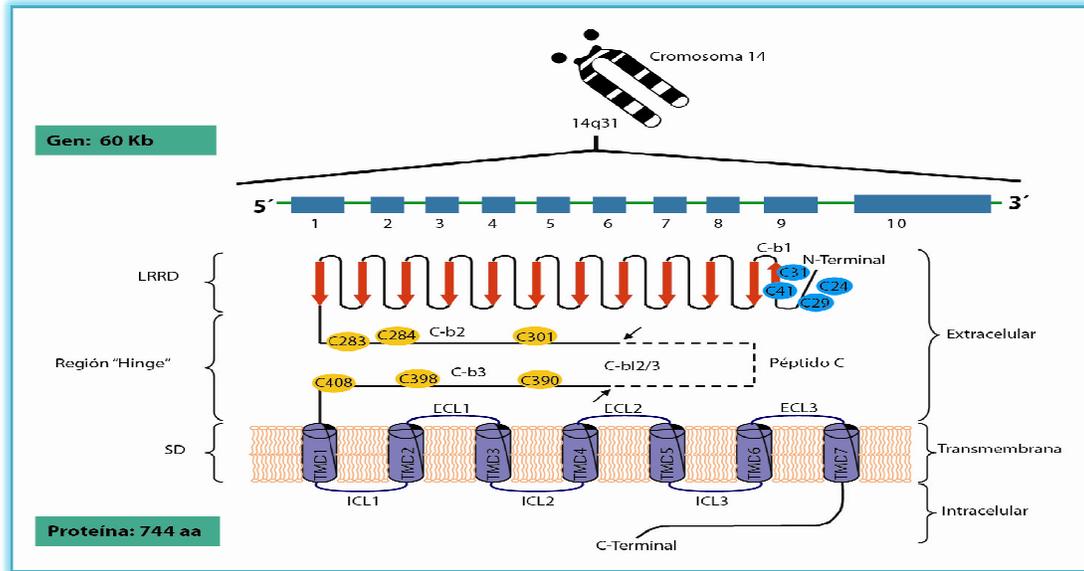


Figura 16. Representación esquemática del gen de TSHR y de la proteína correspondiente

Gen que codifica para el Receptor de Hormonas Tiroideas (THR):

Existen dos genes que codifican los receptores de Hormonas Tiroideas, el gen THRalfa (THR α) de 27 Kb que se localiza en el cromosoma 17(17q11 2-21) y el gen THRbeta (THR β) de 372 Kb que se localiza en el cromosoma 3 (3p 22-24) (figura17). El *splicing* alternativo de los transcritos primarios dá origen a 4 tipos de Receptores de T₃ diferentes (TR β 1, TR β 2, TR β 3 y TR α 1) y dos proteínas mas que no unen T₃ (TR α 2 y TR α 3). Todas las isoformas tienen en común el dominio de unión al ADN (DBD) y el dominio de unión al Ligando (LBD), con excepción del TR α 2 y TR α 3, razón por lo cual TR α 2 y TR α 3 carecen de función como receptores hormonales pero sí se unen al ADN. (Refetoff et al. 1993, Chaterjee et al. 1996, Sap et al. 1986, Weinburger et al. 1986, Sakurai et al. 1990).

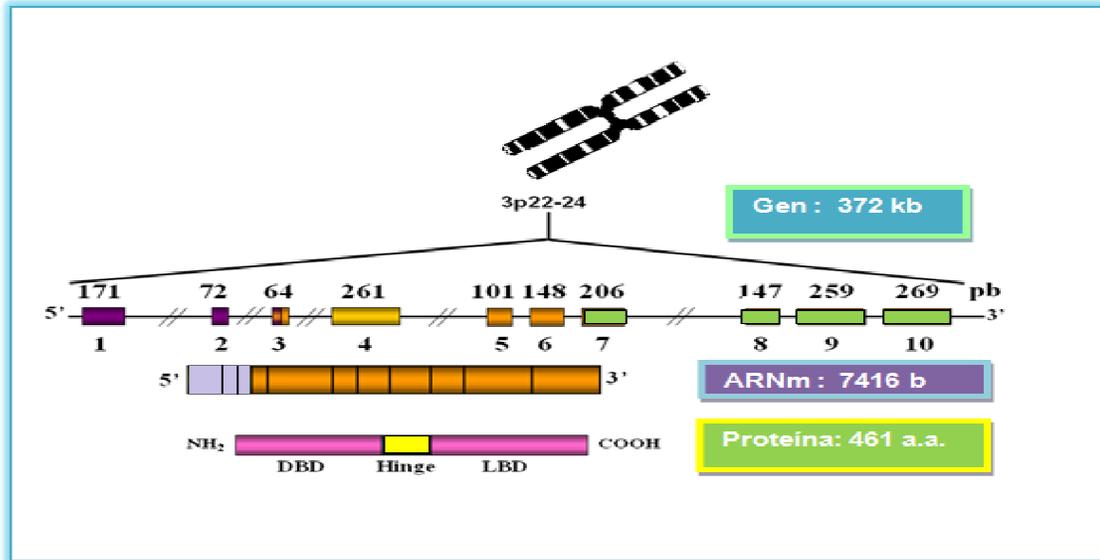


Figura 17: Representación esquemática del gen THR β y su proteína TR β 1.

Estos receptores son altamente homólogos excepto en la región amino terminal. (Figura18). La tasa de expresión de los dos genes y la distribución de sus productos varía entre tejidos y durante las diversas etapas del desarrollo. Si bien TR α 1 y TR β 1 se expresan ubicuamente, TR α 1 se expresa predominantemente en corazón, hueso y cerebro mientras que TR β 1 es más abundante en hígado, riñón y tiroides. La expresión de TR β 2 se limita a pituitaria, hipotálamo, retina y oído interno y la de TR β 3 ocurre principalmente en el corazón y riñón. (Cheng et al. 2005). El THR α contiene 10 exones siendo el primero no codificante. El ARNm del TR α 1 está integrado por 9 exones, contiene 4767 nucleótidos y codifica una proteína de 410 aminoácidos. THR β contiene 10 exones siendo los dos primeros no codificantes, un mensajero de 7416 bases que codifica a THR β 1 de distribución generalizada de 461 aminoácidos (Secuencias de referencia: NG_009159.1; NM_000461.4; NP_000452.2).

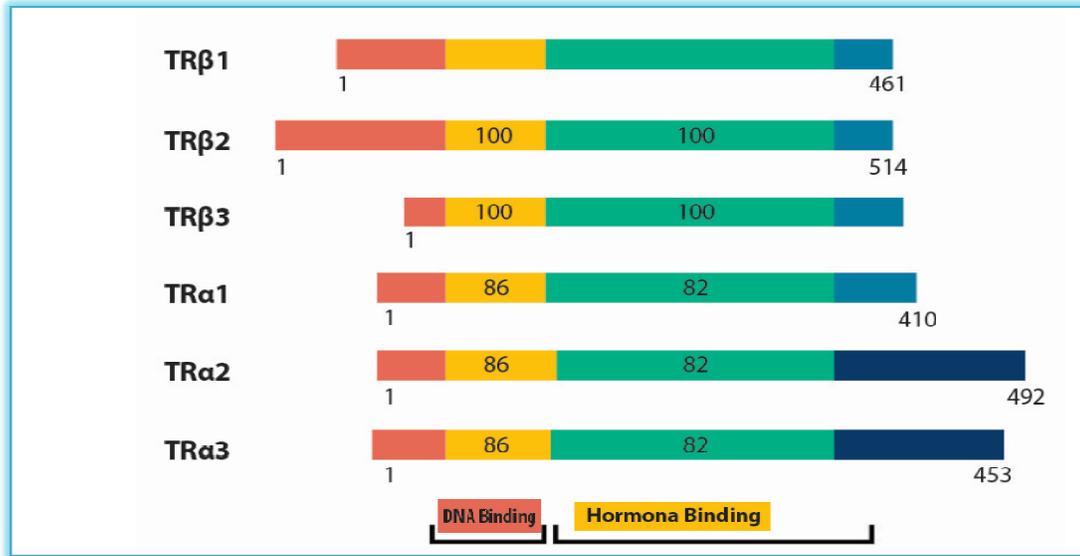


Figura 18: Comparación esquemática de las isoformas del Receptor de hormonas tiroideas TR

Las HT tienen acciones estimulantes e inhibitorias sobre un cierto número de genes. Estas acciones están mediadas por receptores nucleares que se unen a T₃. El TR pertenece a la superfamilia de proteínas c-erb A, que incluye a los receptores para glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógenos, vitamina D y ácido retinoico (Sap J, 1986; Weinberg C, 1986). Los diferentes miembros de esta familia de proteínas presentan homología estructural, en la secuencia aminoacídica, y también similitudes funcionales. Este tipo de receptores se caracteriza por poseer dos dominios bien diferenciados: un dominio en el centro de la molécula para la unión al ADN denominado DBD y un dominio carboxilo terminal para unir al ligando conocido como LBD. Ambos dominios están separados por una región conocida como “*hinge*” o bisagra.

Se requiere de una concentración óptima intracelular de HT en su forma activa “T₃” para la expresión de la acción de ésta. Una acción no genómica rápida, que involucra canales iónicos, fosforilación oxidativa y segundos mensajeros, se ejerce a nivel de la membrana plasmática y citoplasma. (Bassett JH, 2003). El efecto genómico principal y mejor estudiado, requiere de la traslocación de T₃ al núcleo, donde interacciona con el receptor de HT para activar o reprimir la transcripción de genes blanco (Dumitrescu AM, 2013).

La región para la unión al ADN contiene pares de residuos de cisteína que se unen a zinc formando dos “*loops*” que se proyectan desde la superficie de la proteína e interactúa con secuencias específicas en el ADN, son los llamados “dedos de zinc”.

Estos receptores se unen con secuencias específicas de ADN llamadas “*thyroid hormone response elements*” (TRE), usualmente localizados cerca del sitio de inicio de transcripción de los genes regulados por T₃.

El TR puede formar un homodímero o un heterodímero con el Receptor de Acido Retinoico (RXR) y a su vez el complejo se une al TRE. En ausencia de ligando, el receptor está unido a correpresores tales como “*nuclear corepressor*” (NcoR) y “*silencing mediator of retinoic acid and TH receptors*” (SMRT) (Figura 19).

LDB está constituido por 12 hélices alfa y 4 láminas beta (Darimont BD, 1998) que en conjunto le permiten los cambios conformacionales característicos luego de la unión de T₃, resultando en la disociación de correpresores, y permitiendo el posicionamiento de la hélice 12 en el cuerpo del TRβ, junto a las hélices 3 y 5 (Renaud JP, 2000; Feng WJ, 1998) y consecuentemente la unión de coactivadores (Wagner RL, 1995). Estos cambios estructurales dinámicos resultan en la formación de un surco hidrofóbico que permite la unión de coactivadores mediante su dominio de interacción con receptores nucleares (“*NR box*”) que contienen el motivo de LXXLL (Darimont BD, 1998).

Esta mecánica de liberación de correpresores y posterior reclutamiento de coactivadores se debe a que comparten al menos en buena medida la superficie de interacción (Hu X, 1999; Webb P, 2000; Glass CK, 2000; Rachez C, 2001) y es indispensable para la activación dependiente de ligando que reside en el extremo carboxilo terminal del LBD y es conocido como “*activating function 2*” (AF-2). Esta región es una pequeña superficie cóncava formada por 6 aminoácidos (V284, K288, I302, K306, L454, E457) implicados en la unión de dominios cortos de coactivadores (motivos LXXLL) (Feng W, 1998) y en la función de transactivación.

Posiblemente sustituciones en aminoácidos cercanos al surco puedan alterar el correcto intercambio de corre reguladores. Tal es el caso de la posición P453 en la que se han identificado diferentes sustituciones naturales (p.P453A, p.P453H, p.P453S, p.P453T). En todos los casos se ha determinado una deficiente transactivación junto con un grado mayor o menor de disminución de afinidad por T₃ (Collingwood TN, 1997).

De esta manera, los TR inhiben la expresión constitutiva de genes que son regulados positivamente por HT. La unión del ligando produce un cambio conformacional que desplaza a los correpresores (Figura 20), permitiendo entonces la unión de coactivadores tales como SRC-1/NcoA-1, TIF-2/GRIP- 1/NCoA-2/SRC-2 y AIB1/pCIP/ACTR/RAC3/TRAM-1/SRC-3 (Onate SA, 1995) pudiendo mediar los efectos transcripcionales del receptor (Chatterjee V, 1996) al actuar sobre el complejo de iniciación de la transcripción formado por “*transcription factor IIB*” (TFIIB), “*TATA binding protein*” (TBP) y ARNpol, asociados al promotor TATA box.

Se han aislado complejos multiproteicos denominados “*thyroid receptor associated proteins*” (TRAP), “*vitamin D receptor interacting proteins*” (DRIP) y “*activator recruited cofactor*” (ARC) que interactúan con el dominio AF-2 de los receptores nucleares (Fondell JD, 1996; Rachez C, 1998). Se ha visto que el complejo DRIP/TRAP es capaz de aumentar la activación dependiente de ligando del TR en un sistema celular sobre moldes de cromatina, lo cual sólo se había demostrado que ocurría con SRC-1 (Liu Z, 1999). También se ha demostrado que este complejo es capaz de potenciar la acción de otros receptores nucleares y esto ha sido interpretado como una regla general en la señalización mediada por receptores nucleares.

Estos complejos favorecen el reclutamiento de componentes de la maquinaria basal de transcripción, incluida la ARN polimerasa y de esta manera favorecerían la inducción de la transcripción por los correspondientes receptores nucleares.

La activación ocurre por la unión de T_3 al dominio LBD del receptor (Figura 20). Esta unión provoca modificaciones en la conformación del receptor que permiten finalmente la modulación de la transcripción del gen efector. La acción final puede ser de activación de los genes regulados positivamente o la represión de la transcripción de los genes regulados negativamente. Los correpresores interactúan con complejos con actividad deacetilasa que modifican la estructura de la cromatina y limitan el acceso de la maquinaria transcripcional basal. Los complejos coactivadores, en cambio, interactúan con moléculas con actividad acetiltransferasa y metiltransferasa histónicas que facilitan la transcripción haciendo a la cromatina más accesible a otros factores proteicos. La expresión dependiente del tiempo y del tejido, de proteínas corregulatorias provee un nivel adicional de regulación para el intercambio dinámico de correpresores y coactivadores sobre los TR gatillado por

T₃ (Cheng SY, 2005). En los últimos años se ha logrado una comprensión más profunda acerca del modo de acción de los receptores nucleares de la mano de la cristalografía, la resonancia magnética nuclear y la dinámica molecular. En particular, la profundización en el conocimiento de las interacciones de los TR ha dado un nuevo enfoque a la comprensión de la dinámica de estas proteínas así como también al diseño de fármacos específicos análogos de HT capaces de seleccionar la unión a los diferentes tipos de receptores. Tal es el caso de la definición precisa del bolsillo de unión a HT y de sus interacciones. Esta zona puede clasificarse en tres regiones. La región I es en gran parte hidrofóbica, pero contiene un único residuo polar (His435), que forma un puente de hidrógeno con un grupo hidroxilo de las HT. La región II se compone principalmente de residuos apolares que interactúan con los anillos de las HT, y la región III es principalmente polar y alberga el único residuo selectivo que distingue en esta zona tan conservada a los TR β de los TR α . Esta posición está ocupada por Asn 331 en el primer caso y por Ser 277 en el segundo y es blanco de análisis en el diseño de fármacos (Wagner RL, 2001). Estas herramientas, también han hecho posible la comprensión de las diferentes vías de entrada y escape de HT (Martínez L, 2005) y la dinámica de las 12 hélices que constituyen el LBD al momento de establecer las correctas superficies de interacción con correpresores y coactivadores así como integrar las diferentes estructuras involucradas en la función de transactivación del TR. Hasta 1998, dicha función parecía reposar únicamente en la hélice 12. La cristalización de la región LBD concomitantemente al coactivador GRIP demostró que la interfaz TR β -coactivador se compone de una ranura hidrofóbica formada por residuos conservados de las hélices 3, 5 y 12 y que la afinidad y especificidad de esta interacción puede ser modulada por secuencias fuera de esta ranura hidrofóbica (Darimont BD, 1998). En conjunto, todos estos estudios sugieren diferentes mecanismos mediante los cuales el correcto funcionamiento de estos receptores puede verse afectado y por lo tanto, proporcionarían explicaciones racionales para el comportamiento diferencial de los TR mutados.

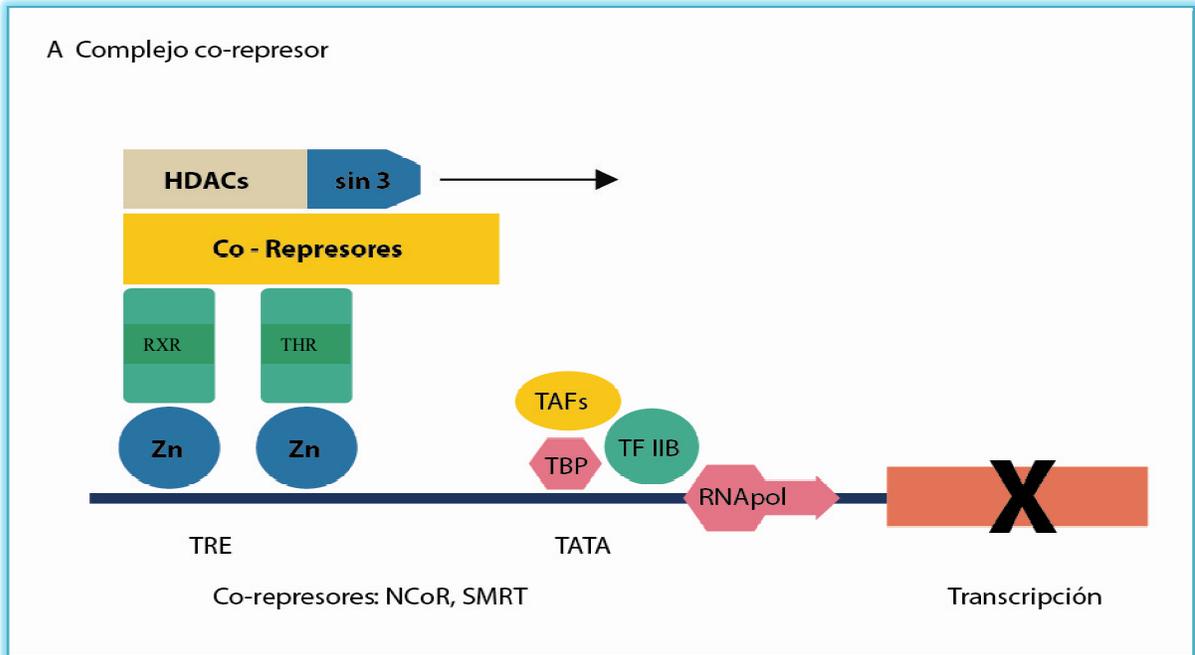


Figura 19: Modelo molecular para la represión basal de TR por correpresores en la ausencia de T_3 .

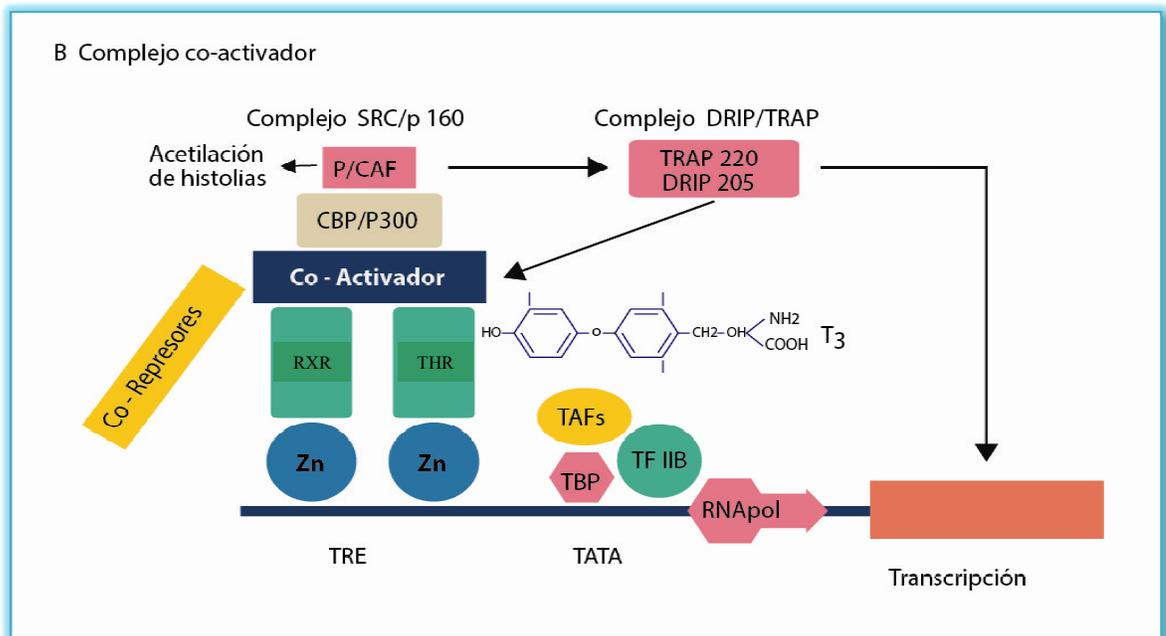


Figura 20: Activación transcripcional de TR por coactivadores en la presencia de T_3 .

OBJETIVOS

Objetivos e hipótesis de la investigación

La tiroides constituye un modelo ideal para estudios genéticos moleculares básicos y aplicados porque en el mismo se combinan genes del más variado origen que expresan proteínas de la más variada naturaleza lo cual permite extrapolar los hallazgos a otros campos de la genética molecular.

El actual proyecto está encuadrado en el campo de la investigación médica experimental básica y aplicada en el área de la genética humana en general y de la endocrinología molecular en particular.

El hipotiroidismo congénito es la endocrinopatía congénita más frecuente. Dado que en pacientes no tratados puede causar crecimiento y desarrollo anormales y retraso mental severo, el diagnóstico temprano y tratamiento con L-tiroxina son de suma importancia, conduciendo al desarrollo normal en casi todos los casos. Nuestro laboratorio fue pionero en la determinación de las primeras mutaciones en los genes de la tiroperoxidasa y tiroglobulina.

Luego de establecer la organización estructural de dichos genes y de diseñar las herramientas moleculares necesarias para la identificación de mutaciones inactivantes y polimorfismos en los mismos, es necesario dirigir nuestras investigaciones hacia el estudio funcional de cada una de las mutaciones identificadas, como así también hacia la caracterización molecular de ciertos mecanismos fisiopatológicos básicos.

Por otra parte se estudiará una patología “rara” tal como la Resistencia a Hormonas Tiroideas. El gen afectado es el THRbeta. Resulta muy confuso elaborar el diagnóstico clínico de estas patología por lo cual la identificación de las mutaciones responsables permitirá efectuar un diagnóstico preciso y la instauración del tratamiento adecuado.

El presente plan incrementará nuestros conocimientos sobre los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de las enfermedades tiroideas, ampliará, por medio del desarrollo de nuevas herramientas moleculares, las técnicas de diagnóstico molecular con una mayor aplicación clínica tanto de pacientes como de portadores asintomáticos y facilitará el asesoramiento genético a familias que padecen este tipo de enfermedades.

Objetivos Específicos**Objetivo 1.**

Identificación y caracterización de nuevas mutaciones, variantes raras de secuencia y polimorfismos en el gen de TPO en pacientes con hipotiroidismo congénito y bocio por bloqueo de organificación del yodo.

Objetivo 2.

Identificación y caracterización de nuevas mutaciones en el gen THRbeta en pacientes con resistencia a hormonas tiroideas.

Objetivo 3.

Realización de estudios poblacionales con el objeto de determinar la naturaleza de las alteraciones nuevas identificadas en los genes de TPO y THRbeta: polimorfismo o mutación.

Objetivo 4

Determinar una relación geno-fenotípica en los casos portadores de mutaciones. Estudios familiares para determinar la segregación alélica. Un aporte al consejo genético.

Objetivo 5.

Clonado y caracterización de las mutaciones heterocigotas identificadas en el gen de TPO.

Objetivo 6.

Análisis bioinformáticos de las mutaciones identificadas en los distintos genes, TPO y THRbeta. ;Análisis evolutivos. Predicción de estructura secundaria. Predicción del impacto funcional de las variantes identificadas. Estudios “in silico” 3D. Modelaje por homología de la TPO.

Capítulo 2.

HIPOTIROIDISMO CONGENITO CON BOCIO POR DEFECTOS DE LA ORGANIFICACIÓN DE YODO.

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN DE LA TIROPEROXIDASA HUMANA (TPO).

2.1 INTRODUCCIÓN

El hipotiroidismo congénito se define como la situación resultante de una disminución congénita de la actividad biológica tisular de las hormonas tiroideas, bien por producción deficiente, ya sea a nivel hipotálamo-hipofisiario (hipotiroidismo central), o a nivel tiroideo (hipotiroidismo primario), o bien por resistencia a su acción o alteración de su transporte en los tejidos diana (hipotiroidismo periférico).

El hipotiroidismo congénito tiene una gran importancia en el niño por su potencial repercusión sobre su desarrollo intelectual, dado que las hormonas tiroideas son imprescindibles para el desarrollo cerebral durante las etapas prenatal y posnatal. Durante la primera mitad de la gestación las hormonas tiroideas son de procedencia exclusivamente materna a través de su transferencia placentaria. Durante la segunda mitad, a partir de la semana 20 de gestación, momento en el cual la tiroides comienza a sintetizar hormonas tiroideas, su procedencia es mixta, materna y fetal. Si el feto padece un hipotiroidismo, las hormonas tiroideas maternas siguen protegiendo el desarrollo cerebral de la mayoría de los fetos hasta el nacimiento, momento en el que desaparece la protección materna (Magashayo et al.2000).

La ausencia de sintomatología clínica en la mayoría de los niños hipotiroideos durante los primeros meses de vida impide su sospecha y en consecuencia, el diagnóstico clínico es

sinónimo de diagnóstico tardío ya que el tratamiento con L-tiroxina no logra evitar el retraso mental.

Uno de los avances más importantes en el manejo del hipotiroidismo congénito ha sido la puesta en marcha de los programas de *screening* neonatal para el hipotiroidismo primario, a partir de la segunda mitad de la década de los 70, ya que está permitiendo instaurar el tratamiento precozmente y evitar el retraso mental de los niños detectados.

El otro avance experimentado en los últimos años, lo está aportando la biología molecular ya que está identificando la base de los trastornos genéticos causantes del hipotiroidismo. La acumulación de informes de casos presentando mutaciones específicas, ha conducido a la observación de amplias variaciones fenotípicas para una misma mutación. El diagnóstico genético apropiado junto con el consejo genético correspondiente deben ser considerados en todos los casos de hipotiroidismo congénito. En los recién nacidos un diagnóstico completo de esta patología debería incluir la examinación clínica, los ensayos bioquímicos tiroideos, ultrasonido de la tiroides, gammagrafía con yodo radioactivo o tecnecio y test de descarga de perclorato. En relación al hipotiroidismo congénito primario, los programas de *screening* han señalado una incidencia de 1 caso por cada 2000 a 4000 recién nacidos (Park et al.2005). Alrededor del 90 % de los casos son hipotiroidismos permanentes y el resto son hipotiroidismos transitorios. La causa más frecuentemente del hipotiroidismo permanente corresponde a las disgenesias tiroideas (ectopía, agenesia, hipoplasia) que representan el 85 % de los casos (Park et al. 2005). Dichas disgenesias son habitualmente esporádicas, pero recientemente se está descubriendo que algunos casos tienen una causa genética, por mutaciones de genes que codifican factores de transcripción tiroideos como Pax 8, factor de transcripción tiroideo 2 (FOXE2), factor de transcripción tiroideo 1 (NKX2.1). El 15 % restante de los hipotiroidismos congénitos primarios permanentes corresponden a dishormonogénesis, que es un grupo heterogéneo de errores congénitos que resultan del bloqueo total o parcial de cualquiera de los procesos bioquímicos implicados en la síntesis y secreción de hormonas tiroideas, y que siempre tienen una causa genética. En la actualidad ya se han identificado todos los genes responsables, y algunos de los defectos de dichos genes muy recientemente; los defectos afectan a los genes que codifican para el TSHR, NIS, TPO, TG), DUOX2, DUOXA2, SLC26A4 y DEHAL 1.

En cuanto al hipotiroidismo transitorio se ha considerado clásicamente una variedad de hipotiroidismo con base ambiental (falta de yodo), inmunológica (paso trasplacentario de anticuerpos antitiroideos maternos al feto) o iatrogénica (intoxicación de yodo con povidona yodada utilizada como antiséptico en el período neonatal). Pero en la mayoría de las grandes series de hipotiroidismo en distintos países, en un porcentaje variable entre el 15 y 20 % del hipotiroidismo congénito transitorio no se puede identificar ninguna de las causas conocidas etiquetándose como idiopático. Recientemente, Moreno y colaboradores han caracterizado mutaciones heterocigotas inactivantes de la proteína DUOX2 en pacientes con hipotiroidismo congénito transitorio con un defecto parcial de organificación del yodo. Dicho estudio demuestra el carácter genético de los casos de hipotiroidismo congénito transitorio que eran catalogados anteriormente de idiopáticos.



Figura 21: Niño con signos físicos Hipotiroidismo congénito.

Defectos de Organificación de Yodo

Los defectos de organificación del yodo (DOI) son un grupo particular entre los casos de bocio congénito, en los cuales se observan niveles elevados de TSH ($>8,8$ mU/l), niveles de T_3 y T_4 totales disminuidos ($<1,61$ nmol/l de T_3 y $<92,68$ nmol/l de T_4), y en particular niveles elevados de TG ($>262,1$ pmol/l)), pudiéndose en algunos casos determinar el nivel de captación de yodo insuficiente mediante el Test de Descarga de Perclorato (ClO_4^-).

La administración de ClO_4^- inhibe competitivamente la captación de yodo tiroideo por el transportador sodio/yodo (NIS). En el caso que los procesos de yodinación y acoplamiento

no se vean afectados, el radio-yodo administrado al paciente es captado por la tiroides y organificado, siendo menos del 10% lo que vuelve a circulación. En caso de un defecto de organificación de yodo total (TIOD), más del 90% es descargado desde el pool de yodo intratiroideo, indicando que el yodo captado no fue incorporado a la TG. Niveles de descarga entre el 10 y el 90% son clasificados como defectos de organificación parcial de yodo (PIOD) (Hagen et al. 1971; Niepomniszcze, Degroot, and Hagen et al.1972).

En términos generales, las bases moleculares de TIOD son mutaciones inactivantes bialélicas en el gen de TPO, o mutaciones inactivantes bialélicas en el gen de DUOX2, siendo la primeras mucho más frecuentes que las segundas alteraciones.

La base genética de PIOD es a la inversa dado que son más frecuentes las mutaciones descritas en el gen DUOX2 (Grasberger y Refetoff et al. 2006) y solo unas esporádicas mutaciones en TPO. Resulta también posible la presencia de mutaciones inactivantes monoalélicas en DUOX2 reportadas en relación a formas transientes de hipotiroidismo relativamente leve (José C Moreno et al. 2002). Adicionalmente, mutaciones en DUOXA2 (Ilaria Zamproni et al. 2008) y Pendrina han sido reportadas como la base molecular del PIOD. Mutaciones en Pendrina causan Síndrome de Pendred, una combinación de pérdida de audición y un PIOD, con grados variables en ambas características clínicas.

Alteraciones en TPO

Los defectos en TPO se heredan comúnmente de manera autosómica recesiva, dado que los pacientes presentan alelos afectados provenientes de ambos progenitores. Dichas mutaciones pueden presentarse en forma homocigota, o bien identificarse como variantes heterocigotas, que conforman individuos compuestos heterocigotas (S. M. Park y Chatterjee et al. 2005).

La primera mutación identificada en el gen de TPO fue una inserción-duplicación de GGCC homocigota en la posición 1277 en el octavo exón del gen de TPO (Abramowicz, H M Targovnik, V Varela, Cochaux, Krawiec, M. A. Pisarev et al. 1992). El cambio de marco de lectura genera un codón prematuro de terminación en el exón 9, que originaría una proteína truncada sin actividad biológica. Un *splicing* alternativo por un sitio aceptor críptico, en el exón 9, restablece el marco de lectura interrumpido por la mutación saltando

el codón de terminación de la traducción, obteniéndose como resultado una proteína de secuencia anómala.

Se han identificado hasta el momento más de 80 mutaciones en el gen de TPO (Tabla 1). La mayoría corresponde a mutaciones localizadas en los exones 8 y 9, que codifican el dominio catalítico de la enzima, correspondiente al sitio de unión al hemo de la proteína. Del total de mutaciones encontradas, 15 corresponden a variantes que generan un corrimiento en el marco de lectura (*frameshift*), generando 14 de ellas, mensajeros con codones stop prematuros (Shyu et al. 2008). Otras 3 mutaciones afectan el “splicing”, dos porque involucran el sitio consenso dador o aceptor, y otra que, según evidencia su análisis *in silico*, también afecta el procesamiento del mensajero. Se reportaron, a su vez, 10 mutaciones sin sentido (*nonsense*) como así también 2 pequeñas deleciones que conservan el marco de lectura. La mayoría de las mutaciones descritas (52) son mutaciones con cambio de sentido (*missense*).

Bikker ha reportado que la expresión de una TPO portadora de un codón stop prematuro se encuentra reducida, estimando que la presencia de una mutación sin sentido causaría inestabilidad en el mensajero (H Bikker et al. 1996). Existen antecedentes que explicarían cómo proteínas mal plegadas, expresadas a partir de mensajeros portadores de este tipo de mutaciones, intentan repetidamente ser replegadas de manera adecuada o bien son degradadas por mecanismos de control del retículo endoplásmico (RE), de manera tal de prevenir la retención intracelular de las proteínas anormales o su secreción anómala (Ellgaard et al. 1999, Haynes et al. 2002). Se ha reportado que la calnexina y la calreticulina son chaperonas moleculares necesarias para los pasos iniciales de plegamiento de la TPO (Fayadat et al. 2000).

Si bien se conoce que el modo de herencia de este desorden primario es autosómico recesivo, existen antecedentes de mutaciones en un único alelo de la TPO, en pacientes con defecto total de organificación de yodo. Fugazzola reportó el caso de una familia en la cual los tres hermanos afectados tenían una mutación simple en el gen de TPO (c.2167C>T, p.R693W) heredada a partir de su padre no afectado (Fugazzola et al. 2003a). El fenotipo del defecto de organificación en esta familia fue el resultado de la expresión del alelo paterno mutado, asociado con la pérdida de transcritos del alelo materno. El defecto materno no pudo ser identificado, pero se confirmó la falta de expresión del alelo materno

por análisis de polimorfismos a nivel de ARNm de la TPO. Se desconoce la causa de la falta de expresión del alelo materno en este caso y no se descarta la posible presencia de mutaciones en regiones alejadas del promotor que alteren la expresión.

Se han reportado, otros casos en los que se identifica una única mutación en TPO en pacientes con TIOD. La aparente ausencia de la segunda mutación podría, ser explicada por limitaciones técnicas de secuenciación directa y análisis de haplotipos (deleción de un exón simple que no contiene polimorfismos informativos, pequeñas deleciones entre sitios polimórficos, mutaciones en regiones no codificantes o bien regulatorias distantes del gen de TPO, y hasta en regiones intrónicas alejadas). Así mismo, existe la posibilidad de encontrar mutaciones en genes que codifican para proteínas relacionadas con la síntesis de hormonas tiroideas, determinando una combinación de variantes en genes diferentes pero metabólicamente relacionados. Tener en cuenta estas alternativas podría esclarecer las bases moleculares de los defectos de organificación del yodo en pacientes afectados, favoreciendo así la interpretación diagnóstica de los mismos.

Tabla 1. Mutaciones en el gen de la Tiroperoxidasa (TPO).

Exón	Posición Nucleotídica	Posición aminoacídica	Referencias
1	NE	p.A5T	Cangul et al. 2013
2	c.31_50dup	p.E17fsX93	Bikker et al. 1994
3	c.157G>C	p.A53P	Niu et al. 2002
	NE	p.Y55X	Cangul et al. 2013
4	c.215delA	p.Q72fsX86	Rivolta et al. 2007
	c.349G>C	p.D117H	Bakker et al. 2000
5	c.387delC	p.N129fsX208	Rivolta et al. 2003
			Rivolta et al. 2007
	c.391T>C	p.S131P	Rodriguez et al. 2005
6	c.524G>A	p.R175Q	Kotani et al. 2003
			Umeki et al. 2004
	c.523C>T	p.R175X	Avbelj et al. 2007
	c.566G > A	p.R189Q	Lee et al. 2011
7	c.703C>T	p.Q235X	Pfarr et al. 2006
	c.718G>A	p.D240N	Kotani et al. 1999
	c.796 C>T	p.Q266X	Belforte et al. 2012
8	c.843delC	p.A282fsX317	Wu et al. 2002

	c.875C>T	p.S292F	Tenenbaum et al. 2007
	c.920A>C	p.N307T	Rivolta et al. 2003
	c.940C>T	p.R314W	Fuchs et al. 2008 Turkkahraman et al. 2010
	NE	p.R314Q	Narumi et al. 2011
	c.943 C>T	p.Q315X	Turkkahraman et al. 2010
		p.G319R	Ozbek et al. 2009
	c.961 A>G		Li et al. 2011
	c.976G>A	p.A326T	Bakker et al. 2000
	c.1132G>A	p.E378K	Tajima et al. 2005
	c.1152G>T	p.E384D	Nascimento et al. 2003
	c.1159G>A	p.G387R	Rivolta et al. 2007
	c.1186_1187insGGCC	p.A396fsX472	Abramowicz et al. 1992 Bikker et al. 1995 Nascimento et al. 2003 Rivolta et al. 2003 Neves et al. 2010 Narumi et.al. 2011 Belforte et.al. 2012
	c.1274A>G	p.N425S	Rodriguez et al. 2005
	c.1297G>A	p.V433M	Rivolta et al. 2003
	c.1315A > G	p.K439E	Lee et al. 2011
	c.1335delC	p.Q446fsX450	Bakker et al. 2000
	c.1338G>C	p.Q446H	Simm et al. 2009
9	c.1339A>T	p.I447F	Bikker et al. 1997 Bakker et al. 2000
	c.1357T>G	p.Y453D	Bikker et al. 1995 Bakker et al. 2000 Börgel et al. 2005 Pfarr et al. 2006
	c.1373T>C	p.L458P	Ambrugger et al. 2001
	c.1430_1450del	p.A477_N483del	Avbelj et al. 2007
	c.1472G>A	p.R491H	Ambrugger et al. 2001
	c.1477G>A	p.G493S	Wu et al. 2002 Sriphrapadang et al. 2011
	c.1496C>T	p.P499L	Rivolta et al. 2003 Tenenbaum et al. 2007
	c.1496 del C	p.P499 fs X501	Deladoëy et al. 2008
	c.1502 T>G	p.V501G	Lee et al. 2013
	c.1581G>T	p.W527C	Bakker et al. 2000 Simm et al. 2009

	c.1597G>T	p.G533C	Kotani et al. 2003
			Nascimento et al. 2003
10	c.1618C>T	p.R540X	Bikker et al. 1995
			Umeki et al. 2004
			Tenenbaum et al. 2007
			Sriphrapadang et.al. 2011
	c.1690C>A	p.L564I	Nascimento et al. 2003
	c.1718_1723del	p.D574_Leu575del	Kotani et al. 2003
	c.1768G>A	p.G590S	Bikker et al. 1995
intrón 10	c.1768+1G>A	Afecta el splicing?	Bakker et al. 2000
11	c.1784 G>A	p.R595K	Belforte et.al. 2012
	NE	p.E596X	Cangul et.al. 2013
	NE	p.D633N	Cangul et.al. 2013
	c.1943G>A	p.R648Q	Pannain et al. 1999
	c.1955 insT	p.F653fsX668	Deladoey et al. 2008
	c.1978C>G	p.Q660E	Santos et al. 1999
			Deladoey et al. 2008
	c.1993C>T	p.R665W	Umeki et al. 2002
	c.1994G>A	p.R665Q	Nascimento et al. 2003
	c.1999G>A	p.G667S	Avbelj et al. 2007
			Ma et al. 2012
	c.2000 G>A	p.G667D	Belforte et.al. 2012
12	c.2077C>T	p.R693W	Avbelj et al. 2007
	c.2153_2154delT	p.F718X	Bakker et al. 2000
13	c.2243delT	p.V748fsX797	Niu et al. 2002
		p.C756R	Altman et.al. 2013
	c.2268_2269insT	p.E757X	Wu et al. 2002
			Niu et al. 2002
			Niu et al. 2005
			Ma et.al. 2012
	c.2311G>A	p.G771R	Umeki et al. 2004
	c.2386G>T	p.D796Y	Wu et al. 2002
14	c.2395G>A	p.E799K	Bikker et al. 1995
			Pannain et al. 1999
			Bakker et al. 2000
		p.C800R	Borgel et al. 2005
	c.2413delC	p.H805fsX831	Wu et al. 2002
	c.2415-2421 insC	p.C808fsX879	Bikker et al. 1995
	c.2421 dupC	p.C808fsX872	Lee et.al. 2011
	c.2422delT	p.C808fsX831	Bakker et al. 2000
	c.2422T>C	p.C808R	Rivolta et al. 2003

	c.2512T>A	p.C838S	Rodriguez et al. 2005
	c.2578G>A	p.G860R	Avbelj et al. 2007
			Narumi et.al. 2011
			Hashemipour et al. 2012
15	c.2587G > A	p.A863T	Lee et.al. 2011
	c.2619G>A	p.W873X	Simm et al. 2009
Int15-Ex16	c.2619-6_2622del	Afecta el splicing?	Tajima et al. 2005
16	c.2622_2638del17	p.R875Hfs	Lee et.al. 2011
	c.2647C > T	p.P883S	Lee et.al. 2011
	c.2722_2731del	p.R908fsX970	Pfarr et al. 2006
	c.2748G>A	p.Q916Q	Rodriguez et al. 2005

**NE: No Especifica*

MÉTODOS MATERIALES

2.2 Caracterización Clínica - Bioquímica de Pacientes con posible presencia de mutaciones en el Gen de TPO.

Aspectos Éticos

El protocolo de estudio fue aprobado por los Comités de Ética, Investigación y Docencia del Hospital de Niños —Ricardo Gutiérrez de Buenos Aires. Las familias participantes en la presente tesis firmaron el correspondiente consentimiento informado, luego de ser debidamente asesoradas por el personal médico responsable del diagnóstico, haciendo referencia a los alcances y limitaciones del protocolo utilizado. Así mismo asumimos el compromiso de observar y hacer observar la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (última versión y sus modificaciones), las Guías Operacionales para Comités de Ética que evalúan Investigación Biomédica de la Organización Mundial de la Salud (2000), la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos (UNESCO - 1997), la Declaración Internacional sobre los Datos Genéticos Humanos (UNESCO - 2003) y la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos (UNESCO - 2005); la Disposición 6677/10 de ANMAT, la Ley Nacional N° 25.326 de Protección de Datos Personales (Ley de Habeas Data), todos los documentos del derecho internacional de los derechos humanos incorporados a la Constitución Nacional por el artículo 75 inciso 22, todos los documentos de las Naciones Unidas que hacen referencia explícita o comparada a las investigaciones biomédicas, y todos los documentos normativos comparados de organismos nacionales e internacionales que en modo complementario aseguren el estándar de mayor protección a las personas en el respeto de la ética y los derechos humanos en las investigaciones biomédicas.

Población analizada:

Se estudiaron cinco familias, provenientes del Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE) del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez de Buenos Aires. Los pacientes fueron estudiados al momento de nacer según Ley Nacional 26.279 de Pesquisa Neonatal Obligatoria, que incluye entre otras determinaciones la detección temprana de Hipotiroidismo Congénito. La misma propone la detección de TSH en sangre entera para muestras colectadas en papel de filtro entre las 48 hs y los 5 días del nacimiento, para la identificación de niños potencialmente afectados. Una vez detectados los casos que superaron el valor de corte recomendado de TSH de 10 μ UI/ml, las familias fueron convocadas para una nueva visita y se procedió a la confección de las historias clínicas incluyendo estado tiroideo materno (drogas y medicamentos), historia familiar y examen clínico completo. Así mismo se indicó el nivel de TSH, T4, T4L. Con el objeto de evaluar posible DOI se dosó el nivel de TG y se realizó el testes de descarga de perclorato. Los pacientes seleccionados presentaron evidencias clínicas y bioquímicas de hipotiroidismo primario compatibles con defectos de organificación de yodo (DOI), como ser la presencia de bocio, valores de TG sérica aumentados (o bien en algunos casos test de descarga de perclorato positivas, T4 Total sérica (TT4), T3 Total sérica (TT3) y niveles de TSH plasmáticos se determinaron por ECLIA ELECSYSTEM system (Roche, Mannheim, Germany). Las concentraciones séricas de TG se midieron utilizando IFMA Delfia (Perkin Elmer, Turku, Finland). Los anticuerpos anti-TPO y anti-TG se determinaron por ICMA Immulite (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). En la Tabla 2 se indican los datos bioquímicos correspondientes a los 5 pacientes seleccionados.

Se recibieron muestras de sangre periférica conteniendo EDTA al 5% de los pacientes mencionados a nuestro laboratorio de Genética y Biología Molecular perteneciente a la Cátedra de Genética y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, actualmente grupo integrante del Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM UBA-CONICET), con el objeto de estudiar genéticamente tanto a los pacientes como a sus familias de manera de brindar el diagnóstico molecular y el consejo genético y profundizar sobre las bases moleculares de la patología.

2.2.1- Cuadro clínico-bioquímico de los casos analizados.

Caso 1:

Paciente **AM**

Hospital Gutiérrez

TSH (mUI/l)	T₃ libre (pg/dl)	T₄ total (ug/dl)	T₄ libre (ng/dl)	TG (ng/dl)
> 100	1,41	3,9	0.45	481
VN: 0,5-5,7	VN: 2,3-4,2	VN: 6-14	VN:0,8-1,8	VN:11-98 (menor a un año); 2-30 (mayor a un año)

Paciente nacida del noveno embarazo de una pareja no consanguínea. La madre tenía 41 años de edad. Nació a término después de un embarazo controlado y de cesárea. La paciente presenta síndrome de Down con cardiopatía y dificultad respiratoria. Se determinó un valor elevado de TSH en el *screening* neonatal.

Caso 2:

Paciente **ABS**

Hospital Gutiérrez

TSH (uUI/ml)	T₃ libre (pg/dl)	T₄ total (ug/dl)	T₄ libre (ng/dl)	TG (ng/l)
> 100	0,90	1.6	0,18	4650
VN: 0,5-5,7	VN: 2,3-4,2	VN: 6-14	VN:0,8-1,8	VN:11-98 (menor a un año); 2-30 (mayor a un año)

El paciente es el tercer hijo de una pareja no consanguínea y presentó un alto nivel de TSH en la pesquisa neonatal en el tercer día de vida. Él nació a las 37 semanas de edad gestacional luego de un embarazo complicado y parto por cesárea, con un peso al nacer

de 3,2 Kg. A los 13 días de vida tenía una fontanela posterior e ictericia persistentes. Presentaba bocio en la gammagrafía con Tc y ultrasonido. Después del diagnóstico se comenzó con la suplementación con levotiroxina (LT4). Su crecimiento y desarrollo fueron normales.

Caso 3:

Paciente **PLL**.

Hospital Gutiérrez

TSH (uUI/ml)	T₃ libre (pg/dl)	T₄ total (ug/dl)	T₄ libre (ng/dl)	TG (ng/dl)	Descarga de perclorato (%)
> 100	0,20	<1,0	<0,1	3160	33
> 100	0,25	<1	<0,1	1216	
VN: 0,5-5,7	VN: 2,3-4,2	VN: 6-14	VN:0,8-1,8	VN:11-98 (menor a un año); 2-30 (mayor a un año)	

El paciente es el primer hijo de una pareja no consanguínea. Presentó un valor de TSH sérica elevada en la pesquisa neonatal a los 2 días de vida. Nació a término después de un embarazo sin problemas con un peso al nacer de 3,37 Kg. Mostró una gran fontanela posterior y retraso en la caída del cordón umbilical. Tejido de la tiroides no era palpable. Las determinaciones hormonales que se detallan a continuación permitieron confirmar el hipotiroidismo. Adicionalmente se determinó la presencia de bocio por valoración con technetium -99m.

TSH (uUI/ml)	T₃ libre (pg/dl)	T₄ total (ug/dl)	T₄ libre (ng/dl)	TG (ng/dl)
> 100	0,20	<1,0	<0,1	3160
VN: 0,5-5,7	VN: 2,3-4,2	VN: 6-14	VN:0,8-1,8	VN:11-98 (menor a un año); 2-30 (mayor a un año)

Luego se inició el tratamiento con LT4. A los tres años de edad se interrumpió la suplementación hormonal para realizar nuevas determinaciones hormonales que figuran en la tabla a continuación. El valor de descarga de perclorato indicó un defecto de organificación del yoduro.

TSH (uUI/ml)	T₃ libre (pg/dl)	T₄ total (ug/dl)	T₄ libre (ng/dl)	TG (ng/dl)	Descarga de perclorato (%)
> 100	0,25	<1	<0,1	1216	33
VN: 0,5-5,7	VN: 2,3-4,2	VN: 6-14	VN:0,8-1,8	VN:11-98 (menor a un año); 2-30 (mayor a un año)	

Se reinició el tratamiento alcanzando el paciente un crecimiento y desarrollo normales.

Caso 4:

Paciente **RM**.

Hospital Gutiérrez.

La paciente es el quinta hija de una pareja no consanguínea. La pesquisa neonatal evidenció niveles elevados de TSH. La paciente nació a término después de un embarazo normal y un parto por cesárea. Mostró una fontanela posterior persistente y tejido tiroideo no era palpable. Se muestran a continuación las determinaciones hormonales. Por otra parte se detectó presencia de bocio por ecografía y ultrasonido.

TSH (uUI/ml)	T₃ libre (pg/dl)	T₄ total (ug/dl)	T₄ libre (ng/dl)	TG (ng/dl)
> 100	0,80	1,4	0,12	1144
VN: 0,5-5,7	VN: 2,3-4,2	VN: 6-14	VN:0,8-1,8	VN:11-98 (menor a un año); 2-30 (mayor a un año)

Luego comenzó con la suplementación de LT4. La paciente tuvo crecimiento y desarrollo normales.

Caso 5:

Paciente **ZSL**.

Hospital Gutiérrez

El paciente es el primer hijo de una pareja no consanguínea. Nació después de un embarazo sin complicaciones y el parto con un peso al nacer de 2.745 Kg a las 38 semanas GA. Se detectó un alto nivel de TSH en el cribado neonatal a los 3 días de vida. El paciente tenía una gran fontanela anterior y posterior y tejido tiroideo no era palpable. Se confirmó hipotiroidismo por determinaciones hormonales que se muestran a continuación. La gammagrafía tiroidea mostró un bocio por lo cual se comenzó con la suplementación de LT4.

TSH (uUI/ml)	T₃ libre (pg/dl)	T₄ total (ug/dl)	T₄ libre (ng/dl)	TG pmoles/l
> 100	1,88	2.0	0,25	4049
VN: 0,5-5,7	VN: 2,3-4,2	VN: 6-14	VN:0,8-1,8	VN:11-98 (menor a un año); 2-30 (mayor a un año)

2.3 Identificación de mutaciones en el gen TPO.

2.3.1. Extracción y purificación de ADN genómico de sangre periférica.

El ADN genómico de linfocitos de sangre periférica se obtuvo usando la técnica de purificación por CTAB (Bromuro de cetil hexadecil trimetil amonio).

Soluciones para la extracción de ADN:**CTAB 2%:**

NaCL 3M	233 ml
EDTA 0,5 M	20 ml
Tris 1M	50 ml
Beta Mercaptoetanol	1 ml
CTAB	10 g
H ₂ O destilada csp	500 ml

Tris 10 EDTA 10 (T10 E10)

EDTA 0,5M	20 ml
Tris/ HCL 1M	10 ml
H ₂ O destilada csp	1000 ml

Procedimiento de extracción de ADN:

- Se agregaron 600 µl de sangre entera anticoagulada con EDTA 5% en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
- Se realizaron 2 lavados con Tris10EDTA10, 5 minutos a 12000 g (descartando el sobrenadante por volcado).
- Se agregó 600 ul de CTAB y se incubó durante 2 hs hasta terminar de disgregar el precipitado a 60 °C, agitando cada 15 min. o durante toda la noche a 37°C.
- Se realizaron dos extracciones con un volumen de IAC (Isoamílico/cloroformo 1: 24), 5 min. a 12000 g.
- Se precipitó con un volumen de isopropanol frío e incubó 2hs a -20°C. Luego se centrifugó 15 minutos a 12000 g y descartó el sobrenadante por volcado.
- El precipitado de ADN se secó en estufa a 37°C, o por vacío para eliminar todo el alcohol y resuspendió en 200 ul de H₂O bidestilada.

2.3.2 Determinación de la integridad y semicuantificación del ADN genómico.

Soluciones soluciones para electroforesis en geles de agarosa:

Buffer de corrida: TBE 10 X

Tris- Base	108 g
Acido Bórico	55g
EDTA 2 mM pH 8.0	40 ml
H ₂ O destilada csp	1000 ml

Buffer de siembra

Glicerol 30 % (P/V)	300 ul
Azul de bromfenol (ABF) 0.0025% (P/V)	Punta de espátula
H ₂ O destilada csp	1ml

Colorante Bromuro de Etidio (BrEt)

Bromuro de etidio	10 mg
H ₂ O destilada csp	1 ml

Procedimiento para preparación de geles de agarosa:

- Se mezcló 1 g de agarosa con 100 ml de buffer TBE 1X (para geles de agarosa 1%), 2 g de agarosa con 100 ml de buffer TBE 1X (para geles de agarosa 3%), 3g de agarosa con 100 ml de buffer TBE 1X (para geles de agarosa 3%).
- Se disolvió calentando en horno de microondas o en baño maría hasta obtener una solución límpida.
- Una vez tibio, se agregó tres gotas de bromuro de etidio (10 mg/ml) de tal forma de llegar a una concentración final de 0,5 mg/ml.
- Se volcó la solución en la gelera preparada a tal efecto con el/los peine/s puesto/s.
- Se dejó solidificar.

Siembra y electroforesis de las muestras en geles de agarosa:

- Se sumergió el gel solidificado en la cuba de electroforesis horizontal (Horizon® 11.14 Gibco- Life Technologies), conteniendo 1 litro de buffer de corrida TBE 1X en cantidad suficiente para cubrirlo.
- El/los peine/s se retiraron con cuidado para no romper las calles.
- 2 ul de la muestra de ADN se mezclaron con 8 ul de H₂O destilada y 2 ul de buffer de siembra 6X.
- Se sembró todo el volumen preparado (12 ul) en una calle libre de un gel de agarosa al 1%.
- Se procedió a la electroforesis de las muestras por 30-60 minutos con una diferencia de potencial de 2 volts/cm en cuba de electroforesis horizontal.

Semicuantificación de ADN por geles:

- Se observó el gel en un transiluminador de luz UV (BTS 20.5 Uvitec Limited) y se calculó la concentración de ADN de cada una de las muestras por comparación con la intensidad de fluorescencia emitida por un ADN genómico de concentración conocida (0,2 mg/ml, en Tris-HCL 10 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM, Boheringer). Para una mejor estimación, se pudo realizar una fotografía del gel y los cálculos a partir de la fotografía digital.

2.3.3-Amplificación de Fragmentos de ADN: Reacción en Cadena de la Polimerasa- PCR.

Las reacciones fueron realizadas en 100 ul, utilizando un “*buffer standard*” de PCR (5X Colorless Go Taq Buffer, Promega, Madison, Co), conteniendo 100 - 300 ng de ADN genómico, 1,5 mM de MgCl₂, 200 uM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), 4 % de dimetilsulfóxido, 2 U de Taq polimerasa (Promega) y 50 pmoles de cada “*primer*” “*forward*” y “*reverse*”. Se incluyeron en cada amplificación controles negativos que no contenían ADN. Se diseñaron primers intrónicos y exónicos que permitieran amplificar productos de alrededor de 300 pb con el objetivo de lograr una óptima resolución posterior de los mismos en geles de poliacrilamida (ver tabla 2). Se pusieron a punto para la presente investigación las

condiciones de PCR con el objeto de amplificar los 17 exones del gen de TPO junto al promotor de dicho gen (Ver tabla 3).

Tabla 2: Los primers utilizados para la amplificación de los exones y regiones intrónicas flanqueantes del gen TPO.

Número Exón	Forward Primers		Tamaño del fragmento (pb)	Reverse Primers	
	Position del extremo 5'	Secuencia nucleotídica (5'→3')		Posición del extremo 5'	Secuencia nucleotídica (5'→3')
1	-97	ctgtccccacgaagaac	305	+119	gctgagagacgccaccc
2	-117	gtagaggctcgtggag	306	+94	gtgactctcaggagcta
3	-100	ggcatcaccgcagcaag	259	+74	cacacgtgtgtggatgt
4	-238	tgccattttctcatca	523	+115	catcctgcttggtctca
5	-21	atggttcctattttcacagat	294	+140	cggggaggccaaggaca
6	-103	ggccccacttattctcc	296	+63	ttcctcctcagcatc
7	-92	gaaccacaccaggaagt	411	+112	tgggaataggacaaaga
8a	-25	acctgaactcccctttgcc	306	1100	acgaagggcaggtaggcg
8b	-82	TCGTCGCCGGCCTCGAACTT	369	1106	ggcggcacgaagggcaggtta
8c	979	tccaccgtgtatggcagctc	450	+90	ggagagagaagccacgatgc
9	-139	cagctgaggccctattata	415	+17	ggaccgcactcactcacCTC
10	-112	tgggcaacagaaagaacg	343	+60	gctagctcggcaaatcc
11	-27	aaaccctgcagcctctccc	297	+32	cgtaaggaagacgctctg
12	-44	ttctccatgactgtgacc	296	+43	atgcacgtgctgtaactgg
13	-70	acagggacgttggtgtgtgg	344	+103	tcagaagcacttttggcg
14	-44	tgcagccgcttctctcag	271	+95	gatggtgattgacagttgcc
15	-74	agactcaggcaggacaacc	249	+75	gcttcattgcagccatgtcc
16	-42	tgccggaccctctcccataa	236	+64	gacaccgatcctgtccaa
17	-139	aagaaggatggctcatctcg	285	2853	ctgctgatttccgatttggc

Nota: Las secuencias intrónicas* se indican en minúscula, las exónicas en mayúscula y las correspondientes a regiones no traducibles en *italica*. Las posiciones nucleotídicas indican la distancia a los sitios dadores y aceptores de splicing de cada exón, respectivamente.

Condiciones generales de ciclado:

2.3.4. Validación por PCR-RFLP de la mutación descrita: p.R396fsX472

En el gen de TPO existe una mutación descrita por nuestro laboratorio, que implica una inserción/duplicación de cuatro bases en el exón 8, que genera un corrimiento del marco de lectura y la aparición de un codón stop prematuro de la traducción (Abramowicz, Targovnik, Varela, Cochaux, Krawiec, Pisarev, Propato, Juvenal, Chester, and Vassart 1992a): c.1186_1187insGGCC; p.R396fsX472. Esta mutación genera un sitio de corte para la enzima NaeI, la cual permitió evidenciar individuos portadores de la misma.

Procedimiento:

- Se colocó en un tubo:
 - 10-12 ul de producto de PCR
 - 1,5 ul de Buffer de enzima 10X
 - 1 ul de Nae I (10U)
 - H₂O csp 15ul

Los tubos conteniendo la mezcla de reacción fueron incubados over night a 37°C.

La digestión fue analizada en un gel de agarosa 3 % junto con el marcador de PM X174/Hae III. Los protocolos de digestión incluyeron controles normales digeridos y sin digerir, controles positivos digeridos y sin digerir, así como alguna muestra escogida al azar digerida y sin digerir de manera de testear el adecuado desempeño de la reacción enzimática.

2.3.5. Purificación de productos de amplificación.

Procedimiento para la purificación de productos de amplificación:

- Se sembraron 100 ul del producto de PCR en un gel de agarosa al 2 %
- Se observaron los fragmentos en el transiluminador U.V. (BTS-20.S Uvitec Limited) y se cortó con un bisturí la región que conteniendo la banda de interés.
- Se tomó el bloque de agarosa cortado y se lo colocó en un tubo Eppendorf previamente pesado.
- Se pesó el tubo conteniendo la agarosa y por diferencia se calculó el peso del fragmento:

- Para geles >2% se utilizaron 60ul de Solución tampón de Captura cada 10mg de gel.
- Para geles <2% se utilizaron 30ul de Solución tampón de Captura cada 10 mg de gel.
- Se incubó a 60°C por 20 minutos. Se pasó a una columna de purificación dispuesta en un tubo.
- Fue centrifugado 30 segundos a 13.000 rpm. Se descartó el filtrado.
- Se agregó 500 ul de Solución de lavado, se incubó un minuto.
- Fue centrifugado 30 segundos a 13.000 rpm. Se descartó el filtrado.
- Se agregó 50 ul de H₂O bidestilada. Se incubó 1 minuto a T ambiente.
- Fue centrifugado 2 minutos a 13.000 rpm y conservó el eluido con la muestra a -20°C.

2.3.6. Secuenciación por Electroforesis capilar.

A partir de los productos amplificados por PCR se purificó mediante el kit Amersham - GFX PCR DNA Purification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckingham shire, UK) cada muestra a secuenciar.

Procedimiento:

Se chequeó la concentración de los productos purificados en un gel de agarosa al 2% (ver esta Sección 3.3.c), “Preparación de las muestras para siembra en geles y electroforesis”).

Se preparó una mezcla conteniendo 100 ng del producto a secuenciar, 3 pmoles del primer involucrado siguiendo las instrucciones del kit Big Dyedeoxyterminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany).

Ambas cadenas, *sense* y *antisense*, fueron secuenciadas con el *Big Dyedeoxyterminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem, Weiterstadt, Germany), utilizando los mismos *primers forward* y *reverse* usados para la amplificación por PCR. Las muestras fueron analizadas en el ABI Prism 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Cada mutación identificada fue secuenciada a partir de por lo menos dos productos de PCR diferentes. Los cromatogramas fueron analizados por el programa ChromasPro para la visualización de las secuencias obtenidas.

2.3.7. Búsqueda de variantes en la secuencia en bases de datos informáticas.

Una vez identificada alguna variación en la secuencia en los pacientes, se realizó la búsqueda en bases de datos de polimorfismos y mutaciones. Las bases de datos utilizadas fueron el NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> o el servidor UCSC <http://genome.ucsc.edu/>

2.3.8. Clonado molecular en el sistema pGEM-T Easy Vector para la separación de alelos.

Para el estudio de pequeñas inserciones y deleciones encontradas por secuenciación, se procedió al clonado de productos de PCR para separar los alelos normal y mutado utilizando el sistema de clonado pGEM-T Easy Vector System (Promega) y la cepa DH5 α de *E. coli*, en condiciones competentes (Genotipo DH5: F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1).

El vector pGEM-T se comercializa linealizado con extremos protruyentes de timina que facilitan el clonado de fragmentos amplificados por PCR con la enzima Taq polimerasa (Figura).

Dicha enzima agrega durante el proceso de amplificación una adenina terminal la cual queda desapareada, lo que permite lograr mayores rendimientos de ligación con el vector pGEM-T. Adicionalmente el vector presenta un sitio múltiple de clonado en el gen lacZ, lo que le confiere una estrategia de selección complementaria al gen resistencia a ampicilina. De esta manera las colonias que crecen en medio LB sólido suplementado con ampicilina son portadoras del vector, de las cuales sólo las colonias blancas serán portadoras de inserto (gen lacZ interrumpido). Aquellas colonias azules resultan de la transformación con vector autoligado que restableció la estructura del gen lacZ y por ende son capaces de expresar β -galactosidasa en presencia de Isopropyl tiogalactósido (IPTG) agregado al medio, el cual actúa como inductor de la expresión del gen. La coloración azul es consecuente a la generación de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, un metabolito secundario de un análogo de galactosa agregado al medio: el 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopyranoside (X-GAL). Con el objetivo de separar alelos, se mantuvieron las condiciones descriptas de amplificación por PCR en la sección (2.3.3) según el gen y el

exón portador de la mutación. Se purificaron los fragmentos por columna según lo descrito en la Sección (2.3.4) para luego proceder a la ligación inserto-vector, transformación de bacterias competentes (*E. coli* DH5 α) y rastreo de colonias recombinantes.

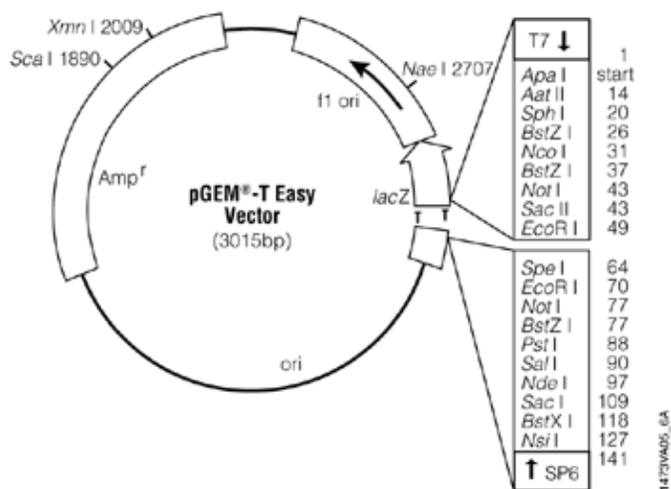


Figura 22: Esquema del vector de clonación pGEM-T easy vector. Se encuentran representados el mapa de restricción de enzimas de corte único y las secuencias funcionales de referencias

Medios de Cultivo para Transformación y Amplificación de Bacterias Competentes:

Medio de Cultivo Líquido LB (Luria Bertani):

Triptona	10 g
Estracto de Levadura	5 g
NaCl	5 g
H2 O milliq csp	1000 ml

Medio de Cultivo Sólido LB Agar

Medio Líquido LB	500 ml
Agar	1,6 g

*Los medios de cultivo se preparan y acondicionan para ser autoclavados y conservados estériles a T° ambiente.

Procedimiento para preparación de bacterias competentes: Método Químico de CaCl₂:

Para tener una alta eficiencia de transformación, fue necesario trabajar con bacterias previamente sometidas a un proceso de debilitación de su pared celular, lo cual posibilitó un mayor ingreso de ADN foráneo dentro de las bacterias antes de restablecer su pared celular. Para ello se realizó el siguiente protocolo:

- Descongelar bacterias DH5 α (conservadas a -80°C)
- Agregar LB líquido hasta completar un volumen de 1,5ml
- Estriar un placa de LB-agar sin ampicilina e incubar *over night* a 37°C
- Tomar una colonia aislada de bacterias DH5 α e inocular en 2 ml de medio LB e incubar toda la noche en baño con agitación a 37°C y 150 rpm.
- Tomar 500 μ l del crecimiento bacteriano y agregarlo a 50 ml de LB (dil 1/100)
- Incubar 3 hs 37°C y 150 rpm (llega a DO 0,4-0,6).
- Poner en hielo 20 minutos.
- Centrifugar el cultivo en dos tubos (25ml cada uno) 10 minutos a 6000 RPM en rotor SS34 a 4°C (Centrífuga Refrigerada de Suelo Sorvall).
- Resuspender cada uno de los pellet en 12,5 ml de CaCl₂ 50mM (siempre trabajar en hielo).
- Juntar el contenido de los 2 tubos en 1 e incubar en hielo 10 minutos.
- Centrifugar 10 min a 6000 RPM en rotor SS34 a 4°C (Centrífuga Refrigerada Sorvall).
- Resuspender el pellet en 4ml de CaCl₂ 50mM y 1 ml glicerol 50%
- Alicuotar en epp de 1,5 entre 200 μ l y 400 μ l por tubo.
- Congelar a -80°C.

Procedimiento para Ligación Insecto/Vector (Relación Inserto /Vector 3:1):

- Se mezclaron suavemente todos reactivos en las proporciones descritas e incubó toda la noche a 4 °C.

Soluciones para la ligación:

Buffer 10 X (Promega)	1 ul
ADN vector (50 ng)	1 ul
ADN Inserto (Producto de PCR Purificado)	3 ul
T4 Ligasa (Promega) 10 U/ul	1 ul
H2 O destilada estéril C.S. P 10 ul	4 ul

Procedimiento de Transformación (Método de Shock Térmico):

- Se adicionaron 2 µl de la ligación en un tubo de 1,5 ml.
- Se descongelaron las bacterias competentes DH5α desde -70°C en hielo y se adicionaron cuidadosamente 50 l en los tubos que conteniendo la ligación.
- Se homogeneizó cuidadosamente y se incubó 30 minutos en hielo.
- Se incubó a 42 °C por 1 min y se mantuvo en hielo 2 min.
- 900 µl de medio LB sin antibiótico fueron adicionados a temperatura ambiente.
- Se incubó durante 1 hora en un baño a 37 °C con agitación de 150 rpm.
- Se procedió a plaquear 150 µl de cada ligación en placas de Petri con LB-agar / Ampicilina / IPTG / X-Gal.
- Se incubó *over night* en estufa a 37 °C.

Amplificación de bacterias recombinantes:

A partir de los cultivos en medio solido, se tomó con ansa ojal algunas colonias aisladas blancas (recombinantes con inserto) y se las hizo crecer en *Erlenmeyers* acondicionados con 20 ml LB y Ampicilina (100 g/ml), y se incubaron a 37 °C en baño con agitación (150 rpm) durante toda la noche.

Purificación de plásmidos por columnas: “Wizard Plus SV Minipreps”:

- Centrifugar 2 ml del crecimiento bacteriano 5 minutos a 5.000 rpm.
- Descartar el sobrenadante y agregar al pellet de bacterias 250 μ l de la solución tampón de suspensión celular (G1) conteniendo RNAsa A y resuspender las células.
- Agregar 250 μ l de la solución de lisis celular (G2) y 10 μ l Proteinasa K, mezclar por inversión 5 veces. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 350 μ l de buffer de neutralización (G3) y mezclar inmediatamente por inversión 5 veces. Centrifugar 10 minutos a 12.000 rpm.
- Colocar cada columna en un tubo de 2 ml y cargar el sobrenadante del paso anterior en la columna.
- Centrifugar 1 minuto a 12.000 rpm. Descartar el eluido.
- Agregar 500 μ l de buffer de lavado (GX), e incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
- Centrifugar 1 minuto a 12.000 rpm. Descartar el eluido.
- Agregar 700 μ l de buffer de lavado (GX), e incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
- Centrifugar 1 minuto a 12.000 rpm. Descartar el eluido.
- Colocar la columna en el tubo de recuperación y agregar 50 μ l de H₂O bidestilada.
- Incubar 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar 2 minutos a 12.000 xg.
- Realizar una electroforesis de 2 μ l de la elución en gel de agarosa al 1% con Bromuro de etidio (10 mg/ml), para analizar la calidad y pureza del plásmido.

Procedimiento para el rastreo de clones portadores de inserto:

A efectos de verificar la presencia de los insertos, se digirieron los plásmidos purificados con la enzima de restricción EcoRI, la cual permite liberar el inserto validando así su presencia.

- Se colocaron en un tubo:
 - 10-12 ul de producto de PCR
 - 1,5 ul de Buffer de enzima 10X
 - 1 ul de EcoRI (10U)
 - H₂O csp 15 µl
- Los tubos conteniendo la mezcla de reacción fueron incubados over night a 37°C.
- La digestión fue analizada en un gel de agarosa 1 % junto con el marcador de PM /HindIII.

*Los clones portadores de inserto se secuenciaron de manera de evidenciar los diferentes alelos presentes en pacientes portadores de pequeñas deleciones e inserciones, con el fin de mapearlas y corroborar ausencia de alguna variación de secuencia adicional no visible en los cromatogramas previos a clonar la muestra.

2.3.9. Estudio poblacional de variaciones de secuencia por *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP).

La técnica elegida para el estudio poblacional de nuevas variaciones de secuencias responsables de Defectos de Organificación de Iodo (DOI) fue la técnica de “*Single Strand Conformation Polymorphism*” (SSCP) (Perry 1999). El principio de esta técnica es la variación en la movilidad electroforética en geles no desnaturizantes de poliacrilamida de fragmentos cortos de ADN simple cadena, cuyas secuencias difieren en una o más bases. Para el estudio poblacional se compara el resultado del patrón de migración de la variante a estudiar, con el patrón de migración 100 alelos normarles controles cuyo patrón de migración es conocido o bien cuyo origen sea de individuos que no presenten el fenotipo en estudio

Para obtener fragmentos cortos de ADN simple cadena es preciso realizar una desnaturalización del fragmento amplificado por PCR previa a la siembra, procurando evitar su renaturalización. De esta manera cada hebra simple cadena adoptará una o varias conformaciones espaciales según su composición nucleotídica, las cuales pueden ser visualizadas como un patrón de bandas posterior al revelado. Aún una única mutación puntual puede alterar la conformación tanto de la cadena molde como de la complementaria, causando un cambio detectable en la movilidad electroforética. La sensibilidad de la técnica de PCR- SSCP tiende a disminuir cuando aumenta la longitud del fragmento. Para fragmentos de alrededor de 200 pb más del 90 % de cambios simples pueden ser detectados, mientras que para fragmentos de 400 pb, la tasa de detección está por debajo del 80 %. Según la experiencia previa aplicada a la puesta a punto de esta técnica en nuestro laboratorio el tamaño de 300 pb de los fragmentos de PCR brinda una óptima resolución en geles de poliacrilamida. Secuencias mayores a 400 pb pueden ser analizadas empleando dos pares de primers de PCR con el objeto de generar fragmentos solapantes, o bien amplificando la totalidad del fragmento y digiriéndolo luego con enzimas de restricción permitiendo una corrida electroforética de fragmentos de menor tamaño. Se realizaron corridas electroforéticas para cada fragmento en estudio en diferentes concentraciones de gel a fin de obtener la mayor resolución en la movilidad de las bandas anómalas.

Solución Stock: Relación 29:1

Acrilamida	29 g
Bisacrilamida	1 g
TBE 10X	3 ml
Glicerol	3 ml
H ₂ O calidad milli-Q	c.s.p. 30ml

Buffer de siembra:

Formamida	9,8 ml
EDTA	0,05ml
0,05 % Azul de bromofenol	5 mg
0,05 % Xilenecianol	5 mg

Procedimiento de Preparación de geles de poliacrilamida:

Se utilizó una relación de acrilamida:bisacrilamida de 29:1. Los geles se realizaron al 8, 10 o al 12 %, con o sin glicerol, a fin de poner a punto las condiciones experimentales óptimas para analizar cada fragmento. Para ello se mezclaron 8 ml (8 %), 10 ml (10 %) o 12 ml (12%) de la solución stock de acrilamida:bisacrilamida con 3 ml de TBE 10X y 3 ml de glicerol (en caso de realizarse la corrida en presencia de glicerol) y se llevó a volumen final de 30 ml con H₂O milli-Q. Para la reacción de polimerización se agregaron 40 µl de Temed (N, N, N', N' tetrametilendiamina) y 70 µl de Persulfato de Amonio 500 mg/ml a la mezcla, y ésta se vierte entre dos vidrios acondicionados previamente como soporte para tal fin. Entre los vidrios se disponen tres separadores de acrílico en los bordes laterales e inferior, de manera de contener la mezcla durante la polimerización. Así mismo se coloca el peine correspondiente para procurar el espacio de posterior siembra. Se deja polimerizar por un tiempo no menor a una hora a temperatura ambiente.

Procedimiento de la Preparación de muestras para la siembra:

Se mezclaron 7 µl de producto de PCR con 4 µl de *buffer* de siembra. Las muestras se desnaturalizaron a 90° C durante 3 minutos, e inmediatamente se colocaron en hielo, hasta el momento de la siembra. Los productos de amplificación fueron corridos en condiciones diferentes que incluían: ausencia o presencia de glicerol y diferentes porcentajes de acrilamida (8,10, 12%). Se seleccionaron para cada fragmento aquellas condiciones en las cuales se observara un patrón de bandas claro y definido para posibilitar una mejor resolución de patrones diferenciales de migración.

Condiciones generales de electroforesis:

Buffer de corrida: TBE 1X

Equipo de electroforesis utilizado:

- Cuba: Modelo V16-2, Vertical System (Invitrogen, Life Technologies)
- Fuente de poder: Power-Pac 300 (Bio Rad).

La electroforesis vertical de geles de poliacrilamida se realizó a 20° C, con la aplicación de voltaje y tiempo de corrida específicos para cada uno de los exones estudiados. Se detallan a continuación las condiciones de corrida para el exón 12 de TPO evaluado.

Exón TPO	Tiempo Corrida (horas)	Voltaje (V)
12	6	160

Procedimiento de la Tinción con nitrato de plata:

Finalizada la electroforesis, los geles fueron revelados mediante tinción argéntica para visualizar cada patrón de bandas característico.

Solución fijadora 1:

Etanol Absoluto	25 ml
Ác. Acético Glacial	1,25 ml
H ₂ O miliQ csp	250ml

Solución de tinción 2:

AgNO	0,4 g
H ₂ O miliQ	250 ml

Solución reveladora 3:

NaOH 1N	9,25 ml
Formol (formaldehído, HCHO)	2,5 ml
H ₂ O milli-Q. csp	250 ml

Procedimiento:

- Se desmontan los vidrios y se sumerge el gel durante 5 minutos en 125 ml de la solución 1.
- Se descarta esa solución y se agregan otros 125 ml de solución fijadora durante 5 minutos.
- Se descarta la solución y se sumerge el gel en 250 ml de la solución 2 durante 5 minutos. Procurar que el gel deshidratado se sumerja bien en la solución de tinción.
- Se descarta la solución y se lava el gel con H₂O milli-Q
- Se descarta el agua de lavado y se agregan 250 ml de la solución 3 agitando suavemente hasta visualizar las bandas.
- Se fotografía digitalmente el gel teñido.

2.4 Estudio Bioinformático de las Mutaciones Identificadas.

Con el objeto de evaluar el potencial impacto de las alteraciones identificadas, tanto a nivel estructural como funcional, se recurrió a diferentes análisis informáticos con el fin de caracterizarlas.

Estudio del grado de conservación evolutiva de la secuencia proteica primaria:

Se emplearon los siguientes programas:

- *MegAlign*
- *BLAST Search for Conserved Domains*

En las secuencias biológicas existen zonas o regiones que suelen encontrarse invariables entre diferentes especies. Este grado de conservación estructural de una proteína implica

una importancia funcional definida de regiones codificantes específicas, dado que mantienen su composición a lo largo de la evolución. Las secuencias con Regiones más conservadas codifican para los sitios activos de enzimas, sitios de interacción con ligandos o de acoplamiento, regiones determinantes de estructura cuaternaria, etc. Esto permite mediante métodos comparativos predecir un impacto no sólo estructural sino funcional en la proteína estudiada. Para evaluar el grado de conservación evolutiva de los residuos aminocídicos alterados como consecuencia de mutaciones encontradas en pacientes con Defectos de Organificación de Iodo (DOI), se procedió al alineamiento múltiple de secuencias utilizando los programas:

MegAlign (<http://www.dnastar.com/t-sub-products-lasergene-megalign.aspx>) y *Search for Conserved Domains* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Para ello se alinearon las secuencias de TPO mutantes con secuencias homólogas de distintas especies obtenidas mediante base de datos de *GeneBank*.

Predicción de la estructura proteica secundaria:

La predicción de la estructura secundaria de una proteína brinda información sobre la distribución espacial de los residuos de aminoácidos en la estructura primaria. El conjunto de algoritmos informáticos diseñados a tal efecto se proponen predecir o asignar regiones como: probables α hélices, hebras β o *random coil*. El resultado obtenido de estructura secundaria de aminoácidos, debe compararse con la estructura cristalizada de la proteína (estructuras resueltas por cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear), con el objeto de evaluar coordenadas atómicas de resolución y calcular luego las posiciones probables de los átomos en el espacio. Luego los resultados obtenidos son la base para predecir las estructuras secundarias con los cambios de secuencia. Con este objetivo, utilizando el programa JPred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>)(Cole et al. 2008), se realizó la predicción en la estructura secundaria proteica de TPO normales y mutadas.

JPred es un servidor gratuito que utiliza una secuencia de aminoácidos o bien un alineamiento múltiple de secuencia como archivo inicial y devuelve un archivo con datos de estructura secundaria, utilizando el algoritmo “*Jnet v2.0*” para desarrollar sus predicciones. Esta plataforma utiliza perfiles *PSI-BLAST* (Altschul et al. 1997), *Position-*

specific scoring matrix (PSSM) y *hidden Markov model* (HMMER, HMM) (Jones et al.1999) (Eddy et al.1998)

Predicción del impacto de una sustitución aminoacídica en la estructura y función proteica:

Se emplearon los siguientes programas:

- PolyPhen-2
(Polymorphism Phenotyping v2: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)
- .Pmut (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>)
- SIFT “Sorting intolerant from tolerant” (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>).

Esta herramienta predice el impacto de una sustitución en la estructura y la función de una proteína humana utilizando consideraciones físicas comparativas, utilizando un clasificador probabilístico basado en el método de aprendizaje automático de máquinas de soporte vectorial, optimizado por el análisis de alto rendimiento de los datos de secuenciación de nueva generación. Los recursos que utiliza provienen de bases de datos proteicas como UniProtKB/UniRef100, de bases de datos de estructura como “*Protein Data Base*” PDB *Structure* y bases de datos alta calidad alineamiento de secuencias múltiples como UCSC MultiZ. (Adzhubei et al. 2010)

Modelaje de proteínas in silico con dominios homólogos conocidos:

Estos estudios permiten conocer las posibles modificaciones estructurales y los posibles efectos fisiopatológicos resultantes como consecuencia de las mutaciones identificadas.

Se realizó análisis estructurales y fisicoquímicos utilizando los programas:

- *Swiss-PdbViewer* 4.04 (<http://swissmodel.expasy.org/>).
- *PyMol* (<http://www.pymol.org/>)

Se conocen únicamente alrededor de 2000 plegados proteicos diferentes en la naturaleza, mientras que existen varios millones de proteínas descritas, los métodos comparativos han propuesto a fin de resolver estructuras probables que pueden adoptar ciertas proteínas cuya conformación estructural real se desconoce.

El método de modelado por homología parte de la premisa que proteínas homólogas presentarían un grado de conservación estructural o de plegado similar según la homología

de sus secuencias, lo cual permitiría predecir la estructura desconocida de una proteína a partir de la estructura conocida de su homóloga.

Existen diferentes métodos disponibles para la generación de modelos, estos requieren de la disponibilidad de cristales y representaciones de sus coordenadas bioinformáticas confiables, para ser usados como base representativa de la proteína que se desea modelar, en caso de no tener el cristal de la propia proteína la información del cristal proteico debe contener un alto grado de identidad de secuencia que vuelva confiable y preciso el modelo resultante

Para evaluar tanto la estructura normal como la mutada de TPO se utilizó la plataforma *SwissModel* (Arnold et al. 2006) que proporciona un servicio web automatizado para modelado por homología (<http://swissmodel.expasy.org/>). El resultado del modelado presenta un formato del *Protein Data Base* ó PDB que puede ser analizado en los procesadores de visualización y análisis: *SwissPDBviewer* o *Pymol*, entre otros disponibles. Con este análisis se pueden obtener información estructural y termodinámica teórica relacionada con la proteína de interés, permitiendo predecir teóricamente el impacto de cambios de aminoácidos en la superficie molecular, en la superficie electrostática, en la accesibilidad al solvente, en la energía de minimización estructural, entre otros parámetros.

El análisis se realizó en base a la estructura cristalográfica de dominios de proteína existentes, con identidad en comparación con los dominios homólogos en la TPO donde se ubicaron las variaciones de secuencia encontradas.

Las estructura cristalográfica utilizadas para los modelados por homología las hemos validados mediante ProQ (Wallner and Elofsson 2003) (Protein Quality Predictor) .Este predictor de red neural evalúa una serie de parámetros estructurales que predicen la calidad de un modelo (<http://www.sbc.su.se/~bjornw/ProQ/ProQ.html>).

- ProQ Dicho predictor arroja dos medidas de calidad: el valor *LGscore* y el valor *MaxSub* determinan el Rango de Calidad del Modelo

Correcto	Bueno	Muy Bueno
LGscore > 1.5	LGscore > 3	LGscore > 5
MaxSub > 0.1	MaxSub > 0.5	MaxSub > 0.8

Con lo que en el análisis de calidad de los modelos cristalográficos obtuvimos los siguientes valores ProQ para evaluar su calidad para ser utilizados en el modelado por homología.

- Modelo del cristal 1uzjb (795aa-842 aa) con una resolución de 2.25 Å del fragmento Holo forma de fibrilina-1 humana integrina. Con un 37,5% de identidad con el dominio- EGF.
 - Valores Pro Q:
 - LGscore 3,141
 - MaxSub 0,208

- Modelo del cristal 3sw0 del fragmento Holo-forma de la Región Reguladora C-terminal del Complemento del Factor H. (742-794) con una resolución de 1,8 Å y 37% de identidad con la región dominio- Like CCP del gen TPO.
 - Valores Pro Q:
 - LGscore 1,892
 - MaxSub 0,178

Otra herramienta de útil análisis Bioinformático, El “Evolutionary Trace” (ET)(Lichtarge, Bourne, and Cohen 1996a) o trazado evolutivo es un algoritmo que proporciona la clasificación de aminoácidos individuales de una secuencia proteica según su importancia evolutiva con respecto a secuencias homólogas y la información relacionada a su estructura tridimensional. Este programa esencialmente capta la magnitud de la presión

evolutiva en una posición determinada de la secuencia. Se obtiene mediante la correlación de las variaciones de secuencia en un alineamiento de una familia de proteínas con sus divergencias evolutivas. Es decir a partir de la estructura cristalina de una proteína o bien un modelo de la misma (archivo PDB) el servidor confecciona un alineamiento estructural con proteínas homólogas que a su vez organiza en un árbol filogenético. (<http://mammoth.bcm.tmc.edu/ETserver.html>).

Este algoritmo resulta de utilidad para el diseño de proteínas dado que permite orientar eficazmente mutaciones generadas artificialmente en las regiones más relevantes de una proteína desde el punto de vista funcional. Así mismo, este análisis puede ser de utilidad para evaluar el impacto de mutaciones naturales en la estructura de una determinada proteína responsables de situaciones patológicas. Residuos que presentan un *score* alto están asociados a variaciones que se correlacionan con divergencias grandes cerca de la raíz del árbol evolutivo, y presumiblemente se hayan ligados a cambios funcionales significativos. Residuos de menor *score*, en contraste, están asociados con variaciones cercanas a las hojas del árbol, presuntamente vinculados a modestas diferencias funcionales, o ninguna en absoluto.

El archivo resultante puede ser visualizado en las plataformas de ET *Pymol Plugin* o bien ET *Viewer* (Morgan et al. 2006) que brindan información de la relevancia funcional de residuos considerando grado de conservación evolutiva de secuencia y de estructura.

Predicción del efecto de mutaciones sobre las variantes de *splicing* exónicas potenciales:

Se emplearon siguientes los programas:

- *ESEfinder* 3.0 (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi>),
- *RESCUE-ESE* (<http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>, default settings).

ESEfinder 3.0 (Cartegni et al. 2003) permite evaluar el impacto que sustituciones nucleotídicas pueden tener en el futuro procesamiento del RNA mensajero.

Así mismo permite detectar regiones de secuencia *enhancer* para el *splicing* “*exonic splicing enhancers*” (ESE) en una secuencia nucleotídica. Las regiones ESE son sitios de interacción específica con un grupo de proteínas denominado SR por presentar motivos

ricos en arginina-serina. Esta familia de factores de empalme estructuralmente conservados están caracterizados por presentar un dominio de reconocimiento de ARN altamente específico (dominio RRM) y un dominio C-terminal rico en dipéptidos de arginina-serina (dominio RS) responsable de la interacción con otras proteínas involucradas en la maquinaria de *splicing*. La interacción de las SR con las regiones ESE es fundamental para el adecuado procesamiento del ARN mensajero, ya sea promoviendo el reclutamiento de la maquinaria de empalme o bien antagonizando la acción de elementos silenciadores.

El ESEfinder 3.0 utiliza información obtenida a partir de datos empíricos que proporcionan motivos de secuencia que presentan características ESE, generados por el método funcional “SELEX” (Chai, Xie, and Grotewold 2011) (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*). Estos ensayos proporcionan información de secuencias consenso que presentan motivos de unión a SR. Según la frecuencia de aparición de ciertos nucleótidos en posiciones específicas de ese motivo, se le asigna una puntuación o score que luego se utiliza para confeccionar una matriz de cálculo capaz de predecir posteriormente regiones potencialmente ESE en secuencias incógnita. Los valores umbrales son valores por encima de los cuales se considera una puntuación significativa para una secuencia determinada. El programa busca motivos ESE correspondientes a cuatro proteínas SR. Existen otras proteínas SR cuyos motivos de interacción ESE aún no han sido identificados por la estrategia que utiliza éste algoritmo teórico-experimental.

RESULTADOS

2.5 Identificación de mutaciones en el gen de TPO.

Digestión con enzima de restricción:

Se realizó la digestión enzimática con la enzima de restricción NaeI de todos los productos de PCR de amplificados correspondientes al exón 8b del gen de TPO de los pacientes a estudiar con hipotiroidismo congénito por posibles defectos en la organificación del yodo, con la intención de hacer la búsqueda de la mutación más frecuente, la inserción de 4 bases “GGCC” (Abramowicz et al., 1992). Esta mutación genera un corrimiento en el marco de lectura y un codón de terminación de la traducción prematuro en el codón 47 del exón 9: c.1186_1187insGGCC, p.R396fsX472.

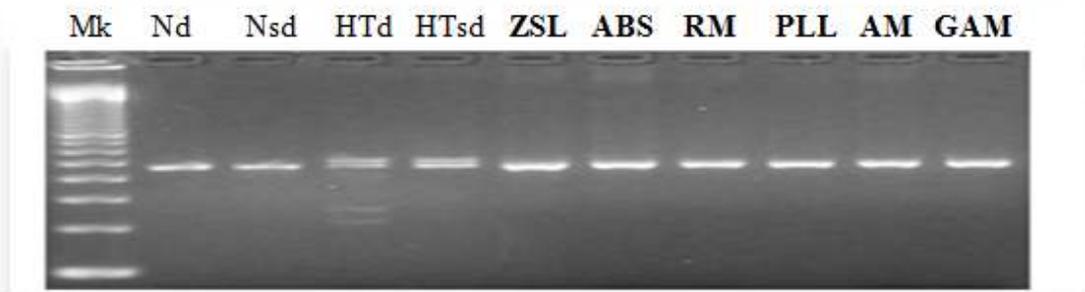


Figura 23: Corrida electroforética en gel de agarosa al 3%. Nd, Normal digerido; Nsd, Normal sin digerir; HTd, Heterocigoto Digerido; HTsd, Heterocigoto sin digerir; Pacientes: **ZSL**, **ABS**, **RM**, **PLL**, **AM**; Hermana gemela de AM, **GAM**.

Tal como se aprecia en la Figura 23, en la calle 5 del gel se sembró el producto de HT, empleado como control, sin digerir. Pueden observarse dos bandas, una superior correspondiendo a los heterodúplex formados entre las cadenas normales y las cadenas con la duplicación y una inferior correspondiendo a las dos moléculas homodúplex (entre las cadenas normales y entre las cadenas con la duplicación) que co-migran. La calle 3 en la

cual se sembró un control normal N incubado con la enzima NaeI pero no digerido por la misma, muestra una sola banda a la misma altura del fragmento inferior homodúplex de la muestra HTsd. En la calle 4 correspondiente al producto del control HT digerido, podemos observar 4 bandas. Las dos bandas superiores corresponden a los heterodúplex y a los homodúplex formados entre las cadenas normales que no son digeridos por la enzima (Figura 24). La banda superior correspondiente al heterodúplex se debe a que la enzima no puede digerir el ADN de los heterodúplex. La inserción de 4 bases genera un “loop” en el heterodúplex el cual es resistente a la digestión con Nae I.

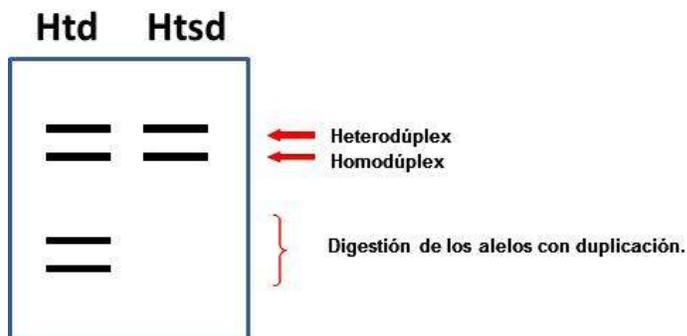


Figura 24: Representación esquemática de las bandas correspondientes a la digestión con la Enzima Nae I las cuales se muestran en la Figura 23.

No se evidenció la mutación c.1186_1187insGGCC en ninguno en los pacientes analizados.

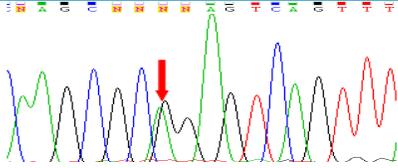
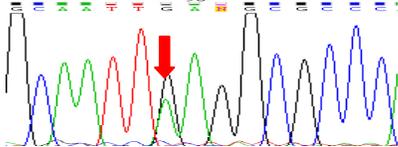
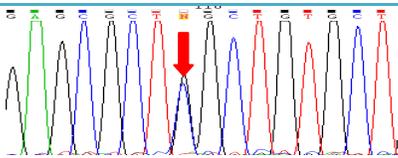
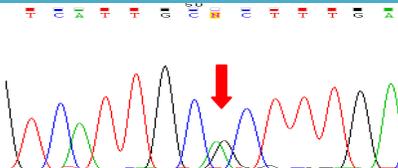
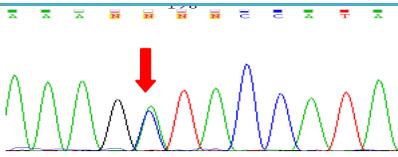
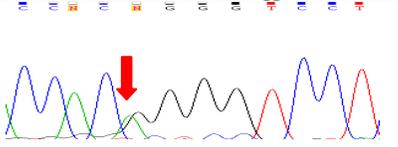
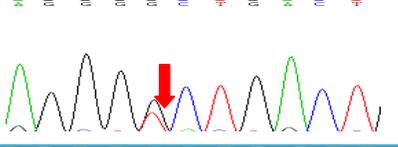
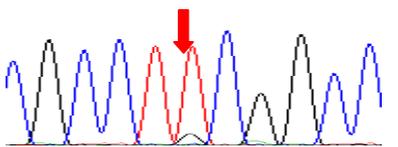
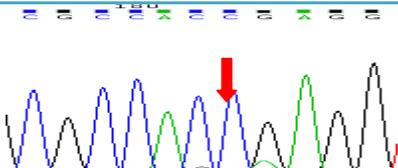
PCR- secuenciación automática

Se realizó la amplificación por PCR del promotor y de todos los exones del gen de TPO en todos los pacientes para llevar a cabo la posterior secuenciación automática.

Caso 1.

No se identificaron mutaciones en la paciente AM responsables del DOI. En la tabla 4 se describen los polimorfismos identificados para dicha paciente.

Tabla 4: Polimorfismos identificados en el gen de TPO de la paciente AM. Se indica el impacto funcional de las alteraciones mediante el algoritmo PolyPhen-2.

Locus	Alteraciones	Secuencia	Referencia	Polyphen
5'UTR	g. -35 G>A Presencia heterocigota		Polim Descripto Bikker et al 1995	Desconocido
Exón 1	c. +11 G>A Presencia heterocigota		Polim Descripto Bikker et al 1995	Desconocido
Exón2	c. 102 C>G ; p.L4L Presencia heterocigota		Polim Descripto Rs9678281	Desconocido
Intrón 2	c.95 - 30 G>A Presencia heterocigota		Variante rara rs2276701	Desconocido
Intrón 3	c.180 - 47 A>C Presencia heterocigota		Polim Descripto rs1473936	Desconocido
Intrón 6	c.613-42 G>A Presencia heterocigota		Polim Descripto rs4927610	Desconocido
Exón 7	c. 859 G>T; p.A257S Presencia heterocigota		Polim Descripto rs2280132	Desconocido
Exón 8	c.1207 G>T; p.A373S Presencia heterocigota		Polim Descripto rs2280132	Desconocido
Exón 8	c.1193 G>C; p.(S398T) Presencia homocigota		Polim Descripto rs2175977	Desconocido

Caso 2.

Los resultados del análisis de secuenciación del exón 13 del gen TPO, demostraron en el paciente **ABS** un cambio heterocigoto G>A, en la posición 2242 de la secuencia de referencia del ARNm, con un cambio de codón GTG>ATG, que provoca la sustitución del aminoácido Valina 748 por Metionina, **p.V748M**.

Esta variación fue descrita previamente con una muy baja frecuencia por lo que puede ser considerada una variante rara de secuencia (Figura 25).

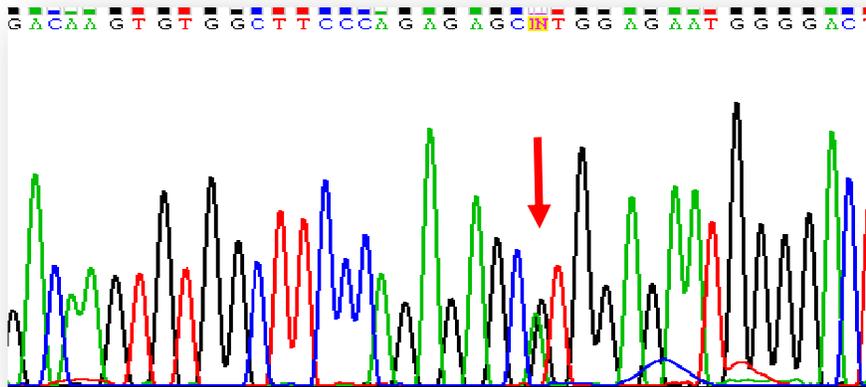


Figura 25: Secuencia parcial del exón 13 del gen de TPO obtenida a partir del producto de amplificación por PCR de una muestra de ADN genómico extraído de sangre periférica del paciente **ABS**. Se indica con una flecha en la secuencia parcial (cadena codificante) el cambio heterocigoto G>A , p.V748 M.

Los resultados del análisis de secuenciación del exón 12 y sus sitios intrónicos flanqueantes demostraron en este mismo paciente **ABS** una delección heterocigota de tres nucleótidos CTT, en el intrón 11, desde la posición -9 nucleótidos del inicio del exón 12 hasta -11 nucleótidos del mismo exón. Es un polimorfismo descrito de baja frecuencia (Figura 26).

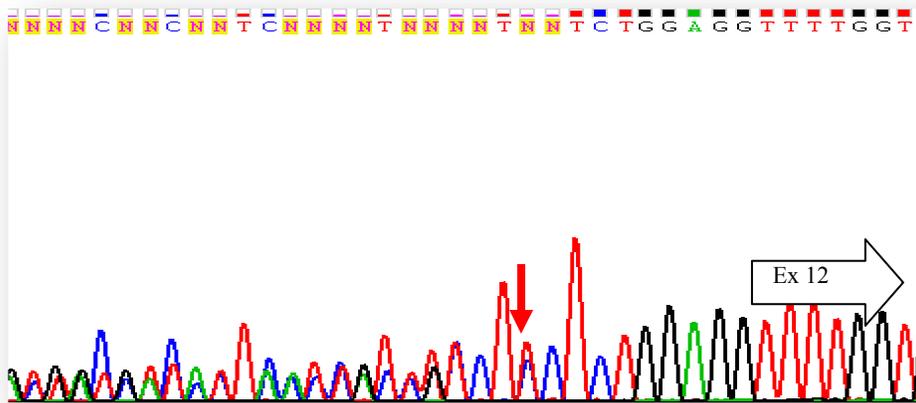


Figura 26: Electroferograma del exón 12 con secuencias intrónicas conseso de *splicing* del gen de TPO obtenida a partir del producto de amplificación por PCR-Secuenciación Automática con *primer reverse* utilizando una muestra de ADN genómico extraído de sangre periférica del paciente ABS. Se evidencia la mutación c.2007-11_2007-9del3 (-CTT).

Con el objeto de confirmar la delección heterocigota en el intrón 11 identificada previamente se procedió a clonar en el vector pGEMT el producto de PCR correspondiente al exón 12 y sus regiones intrónicas flanqueantes del gen de TPO del paciente ABS. Se obtuvo la secuencia de ambos alelos como se indica a continuación (Figuras 27 y 28).

Secuencia Clon N°1 WT.cactgtctc**cctt**ctctggaggtttggtgggagaacagc....

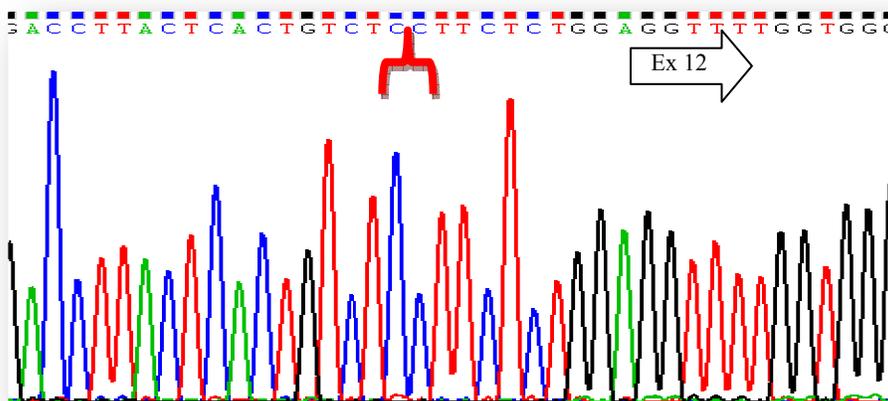


Figura 27: Electroferograma del clon 1 del Exón 12 con secuencias intrónicas conseso de *splicing* del gen de TPO obtenida a partir del producto de amplificación por PCR-Secuenciación Automática con *primer reverse* utilizando una muestra de ADN genómico extraído de sangre periférica del paciente ABS. Se evidencia el alelo con la secuencia WT.

Secuencia Clon N°2 c.2007-11_2007-9del3 (-CTT) ...cactgtctctctggaggtttgggggagaacagc....

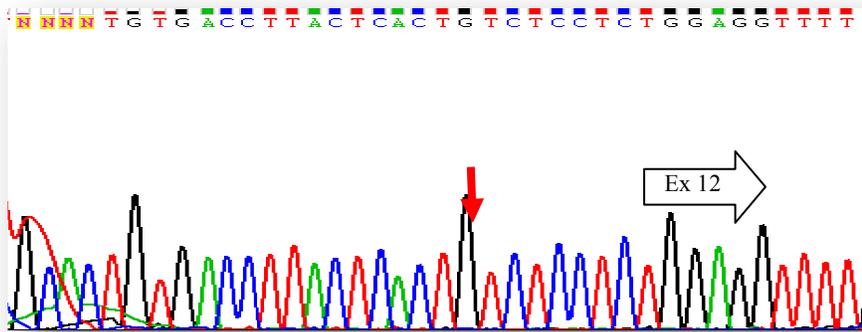


Figura 28: Electroferograma del clon 2 del Exón 12 con secuencias intrónicas consenso de *splicing* del gen de TPO obtenida a partir del producto de amplificación por PCR-Secuenciación Automática con *primer reverse* utilizando una muestra de ADN genómico extraído de sangre periférica del paciente **ABS**. Se evidencia el alelo portando la delección c.2007-11_2007-9del3 (-CTT).

Con el objetivo de determinar la segregación alélica de ambas alteraciones, la variante rara de secuencia p.V748M y la delección c.2007-11_2007-9del3 (-CTT), se llevó a cabo el estudio familiar del paciente **ABS**. Sin embargo solo fue posible estudiar la madre de paciente por falta de disponibilidad de muestras de otros familiares. En dicho estudio la madre presentó la variación p.V748M pero no la delección c.2007-11_2007-9del3 (-CTT) estimándose para la última, el origen paterno (Figuras 29,30 y 31).

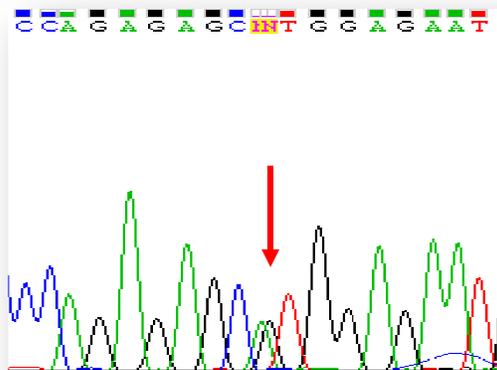


Figura 29. Secuencia parcial del exón 13 del gen TPO obtenida a partir del producto de amplificación por PCR de una muestra de ADN genómico extraído de sangre periférica de la Madre de la paciente **ABS**. Se indica con una flecha en la secuencia parcial (cadena codificante) el cambio heterocigoto G>A, p.V748 M.

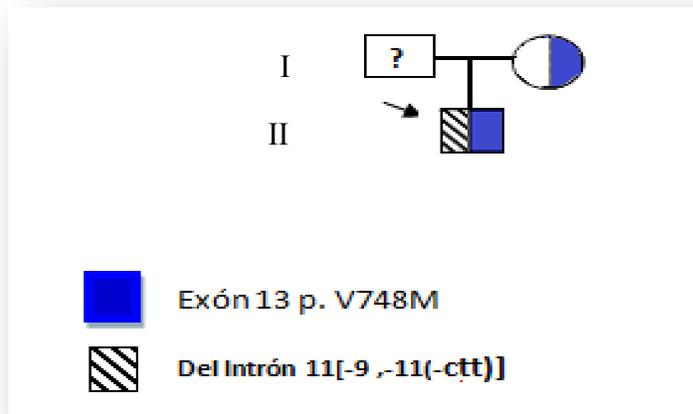
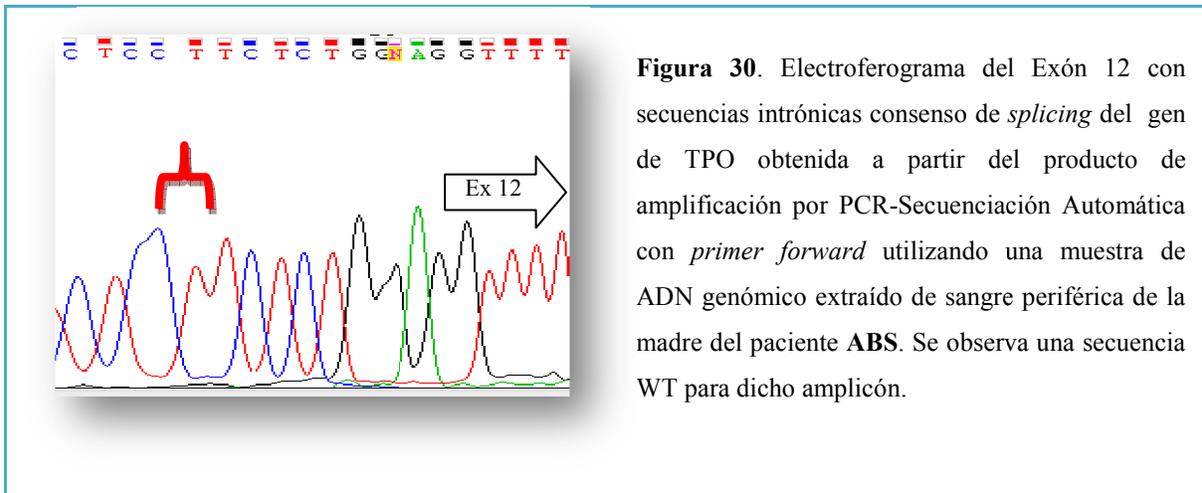
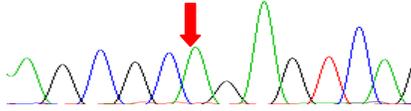
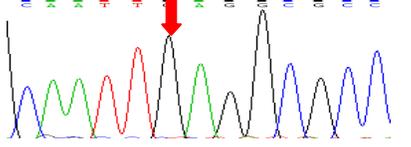
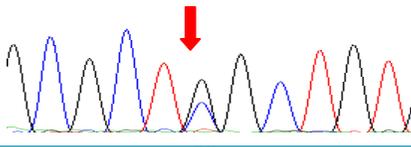
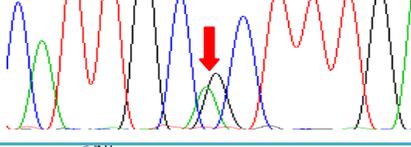
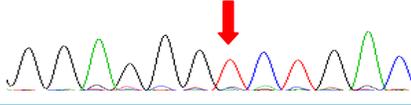
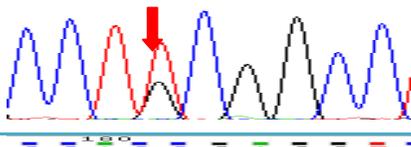
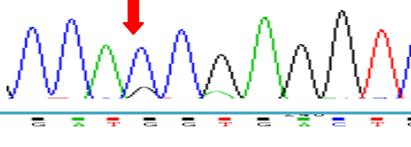
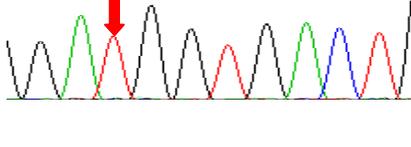
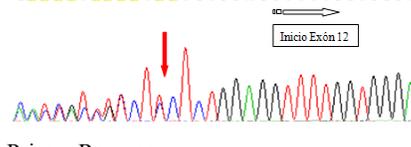
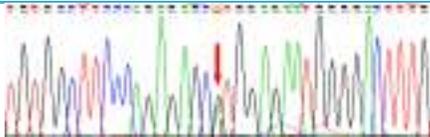
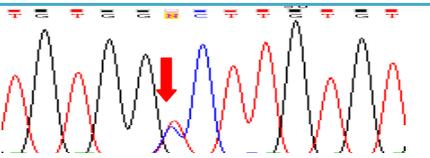
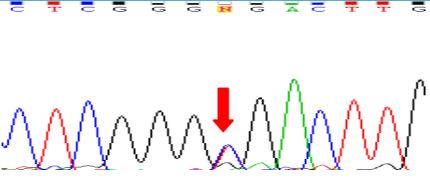


Figura 31: Estudio molecular de la familia del paciente **ABS**.

Los resultados del análisis de secuenciación del intrón 12 y los sitios intrónicos consenso de *splicing* del gen de TPO, demostraron en este mismo paciente **ABS** un polimorfismo heterocigota descrito A>C c.2215 +5, se realizó el análisis bioinformático con el programa ESEfinder (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi>) con la intención de determinar si el score de la afinidad de las proteínas asociadas al proceso de *splicing* se vería afectado. En la tabla 5 se describen los polimorfismos identificados para dicha paciente.

Tabla 5: Polimorfismos identificados en el paciente ABS.

Locus	Alteraciones	Secuencia	Referencia	Polyphen
5'UTR	c. -35 G>A Presencia Homocigota		Polim Descripto Bikker et al 1995	Desconocido
Exón 1	c. +11 G>A Presencia homocigota		Polim Descripto Bikker et al 1995	Desconocido
Exón2	c. 102 C>G ; p.L4L Presencia heterocigota		Polim Descripto Rs9678281	Desconocido
Intrón 2	c.95 - 30 G >A Presencia heterocigota		Variante rara rs2276701	Desconocido
Exón 7	c. 859 G>T; p.A257S Presencia homocigota		Polim Descripto rs2280132	Desconocido
Exón 8	c.1207 G>T; p.A373S Presencia heterocigota		Polim Descripto rs2280132	Desconocido
Exón 8	c.1193 G>C; p.S398T Presencia heterocigota		Polim Descripto rs2175977	Desconocido
Exón 11	c.2088 C>T; p.D666D Presencia homocigota		Polim Descripto rs1126797	Desconocido
Intrón 11	c.2007-11_2007-9del3 (-CCT) Presencia heterocigota	 Primer: Reverse	Polim Descripto rs68028832	Desconocido

Exón 13	c.2242 G>A; p.V748M Presencia heterocigota		Polim Descripto rs28991292	deletéreo
Intrón 13	c.2387 -17 C>T Presencia heterocigota		Polim Descripto rs28912996	Desconocido
Exón 15	c.2540 T>C ; p.V847A Presencia heterocigota		Polim Descripto rs1126799	benigno

Caso 3

Los resultados del análisis de secuenciación del exón 14 del gen de TPO demostraron en el paciente **PLL** un cambio heterocigota G>A en la posición 2395 de la secuencia de referencia del ARNm, con un cambio de codón GAG>AAG que provoca la sustitución del aa Ac. Glutámico 799 por Lisina, **p. E799K** (Figura 32). Dicha mutación fue descrita previamente.

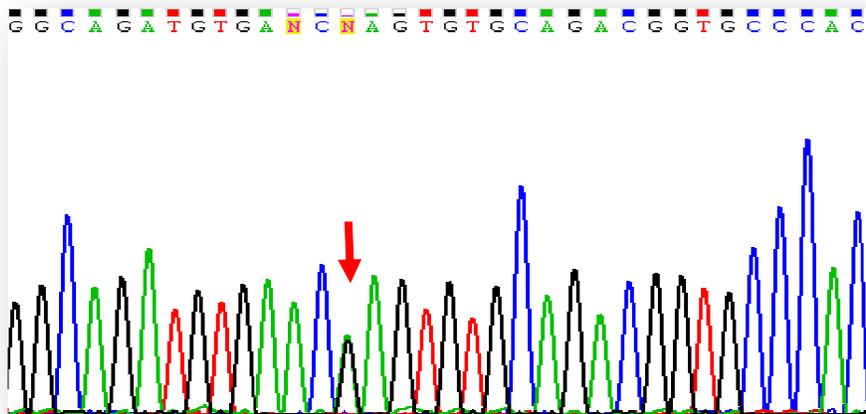


Figura 32: Secuencia parcial del exón 14 del gen de TPO obtenida a partir del producto de amplificación por PCR de una muestra de ADN genómico extraído de sangre periférica del paciente **PLL**. Se indica con una flecha en la secuencia parcial (cadena codificante) el cambio heterocigota G>A, p. E799K.

Con el objetivo de determinar el origen de la mutación previamente descrita, p. E799K, se decidió realizar un estudio familiar al paciente **PLL**. Lamentablemente, solo fue posible estudiar la madre del paciente por falta de disponibilidad de muestras de otros familiares. En dicho análisis, la madre del paciente no presentó la p. E799K (Figuras 33 y 34).

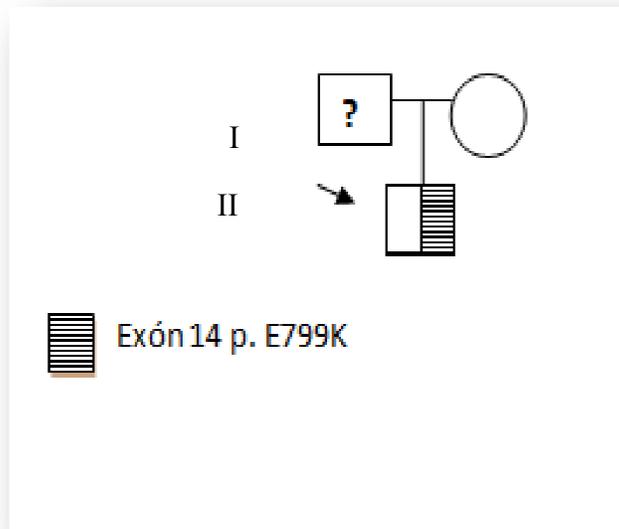
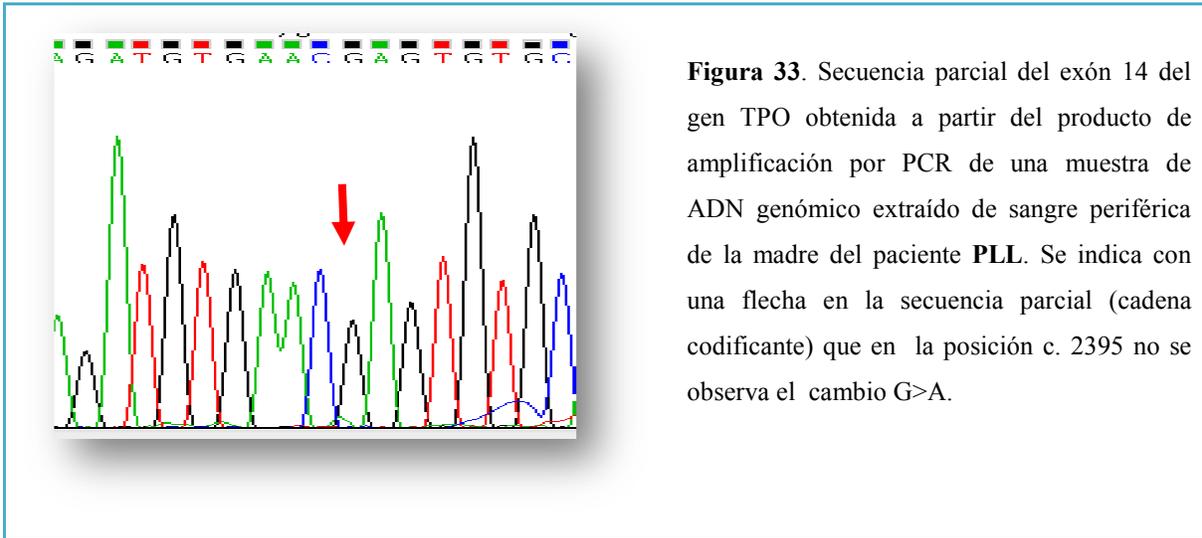
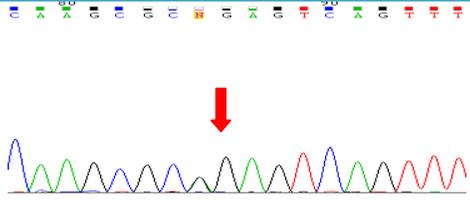
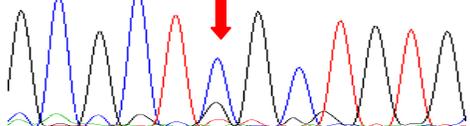
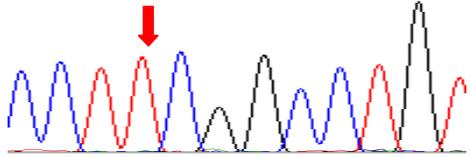
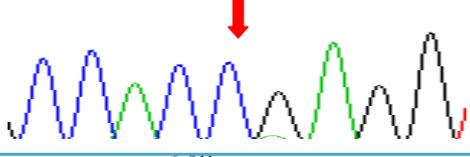
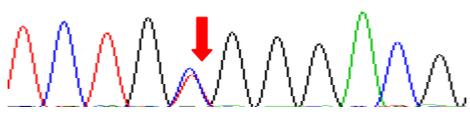
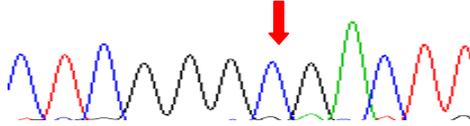


Figura 33. Estudio molecular de la familia del paciente PLL.

En la tabla 6 se describen los polimorfismos identificados para dicho paciente.

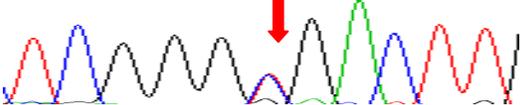
Tabla 6: Polimorfismos identificados en el paciente PPL.

Locus	Alteraciones	Secuencia	Referencia	Polyphen
5'UTR	c. -35 G>A Presencia heterocigota		Polim Descripto Bikker et al 1995	Desconocido
Exón 1	c. +11 G>A Presencia heterocigota		Polim Descripto Bikker et al 1995	Desconocido
Exón2	c. 102 C>G ; p.L4L Presencia heterocigota		Polim Descripto Rs9678281	Desconocido
Exón 8	c.1207 G>T; p.A373S Presencia homocigota		Polim Descripto rs2280132	Desconocido
Exón 8	c.1193 G>C; p.S398T Presencia homocigota		Polim Descripto rs2175977	Desconocido
Exón 11	c.2088 C>T; p.D666D Presencia homocigota		Polim Descripto rs1126797	Desconocido
Exón 15	c.2540 T>C ; p.V847A Presencia heterocigota		Polim Descripto rs1126799	Benigno

Caso 4

Los resultados del análisis de secuenciación del exón 1 al exón 17 del gen de TPO demostraron en la paciente **RM** la ausencia de mutaciones en este gen. En la tabla 7 se describen los polimorfismos identificados para dicha paciente.

Tabla 7: Polimorfismos identificados para la paciente **RM**

Locus	Alteraciones	Secuencia	Referencia	Polyphen
Exón 15	c.2540 T>C ; p.V847A Presencia heterocigota		Polim Descripto rs1126799	Benigno

Caso 5

Los resultados del análisis de secuenciación del exón 12 y los sitios intrónicos consenso de *splicing* del gen de TPO, demostraron en el paciente **ZSL** una delección heterocigota de tres nucleótidos CTT, en el intrón 11 desde la posición -11 a -9 nucleótidos del inicio del exón 12 (Figura 35). Se trata de un polimorfismo descripto.

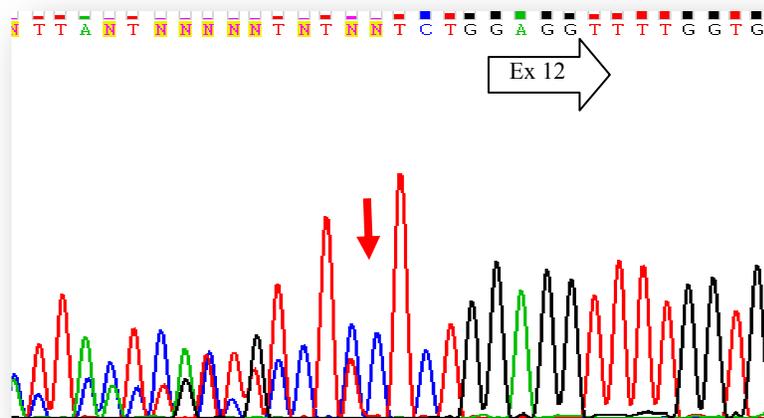


Figura 35: Electroferograma del exón 12 con secuencias intrónicas consenso de *splicing* del gen de TPO obtenido a partir del producto de amplificación por PCR-Secuenciación Automática con primer *reverse* utilizando una muestra de ADN genómico extraído de sangre periférica del paciente **ZSL**. **Se evidencia la delección heterocigota c.2007-11_2007-9del3 (-CTT).**

Con el objeto de obtener una clara secuencia de ambos alelos, se procedió a clonar previamente el amplicón correspondiente al exón 12 del paciente y sus regiones consenso de *splicing* en el vector pGEMT. Las secuencias obtenidas pueden visualizarse en las Figuras 36 y 37.

Secuencia Clon N° 1 Wt. ..cactgtctccttctctggaggttttgggggagaacagc...

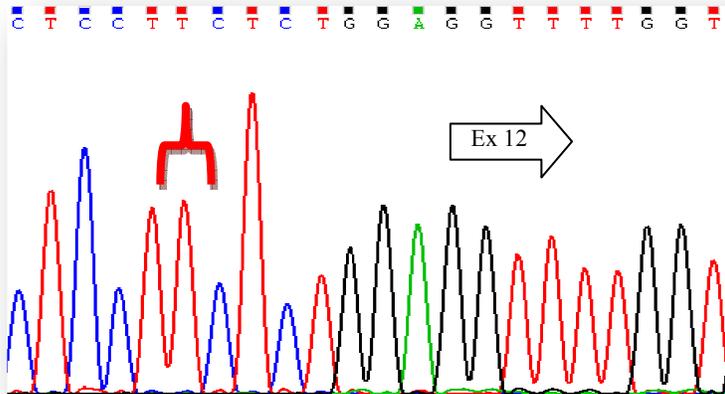


Figura 36: Electroferograma del clon 1 del Exón 12 con secuencias intrónicas consenso de *splicing* del gen de TPO obtenida a partir del producto de amplificación por PCR-Secuenciación Automática con primer *reverse* utilizando una muestra de ADN genómico extraído de sangre periférica del paciente **ZSL**. Se evidencia el alelo con la secuencia wt.

Secuencia Clon N°2 c.2007-11_2007-9del3 (-CTT) ..cactgtctcctctggaggttttgggggagaacagc.

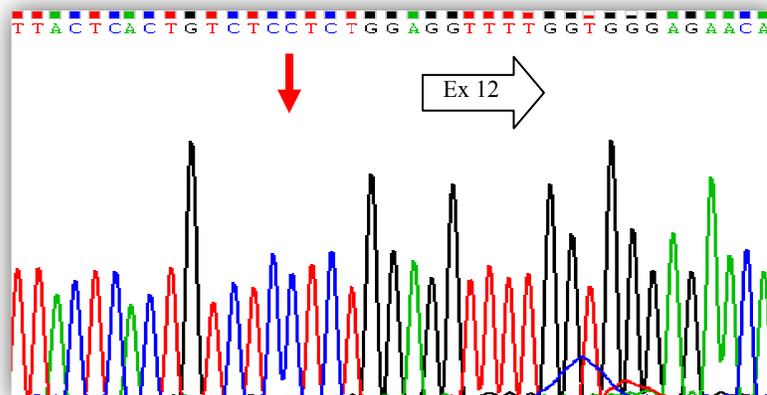


Figura 37: Electroferograma del clon 1 del Exón 12 con secuencias intrónicas consenso de *splicing* del gen de TPO obtenida a partir del producto de amplificación por PCR-Secuenciación Automática con primer *reverse* utilizando una muestra de ADN genómico extraído de sangre periférica del paciente **ZSL**. Se evidencia el alelo con la delección c.2007-11_2007-9del3 (-CTT).

Con el objetivo de determinar el origen de la delección c.2007-11_2007-9del3 (-CTT) se realizó el estudio familiar al paciente **ZSL**. La mutación del paciente tuvo un origen materno. (Figuras 38,39 y 40).

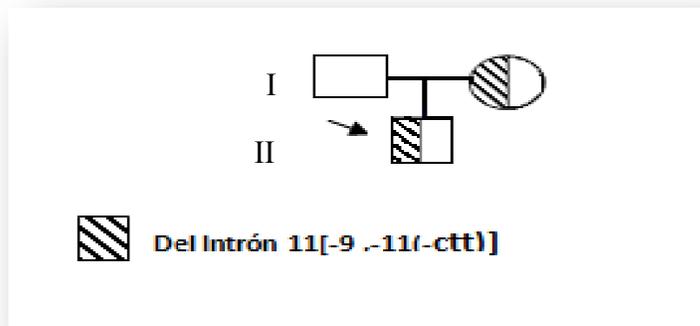
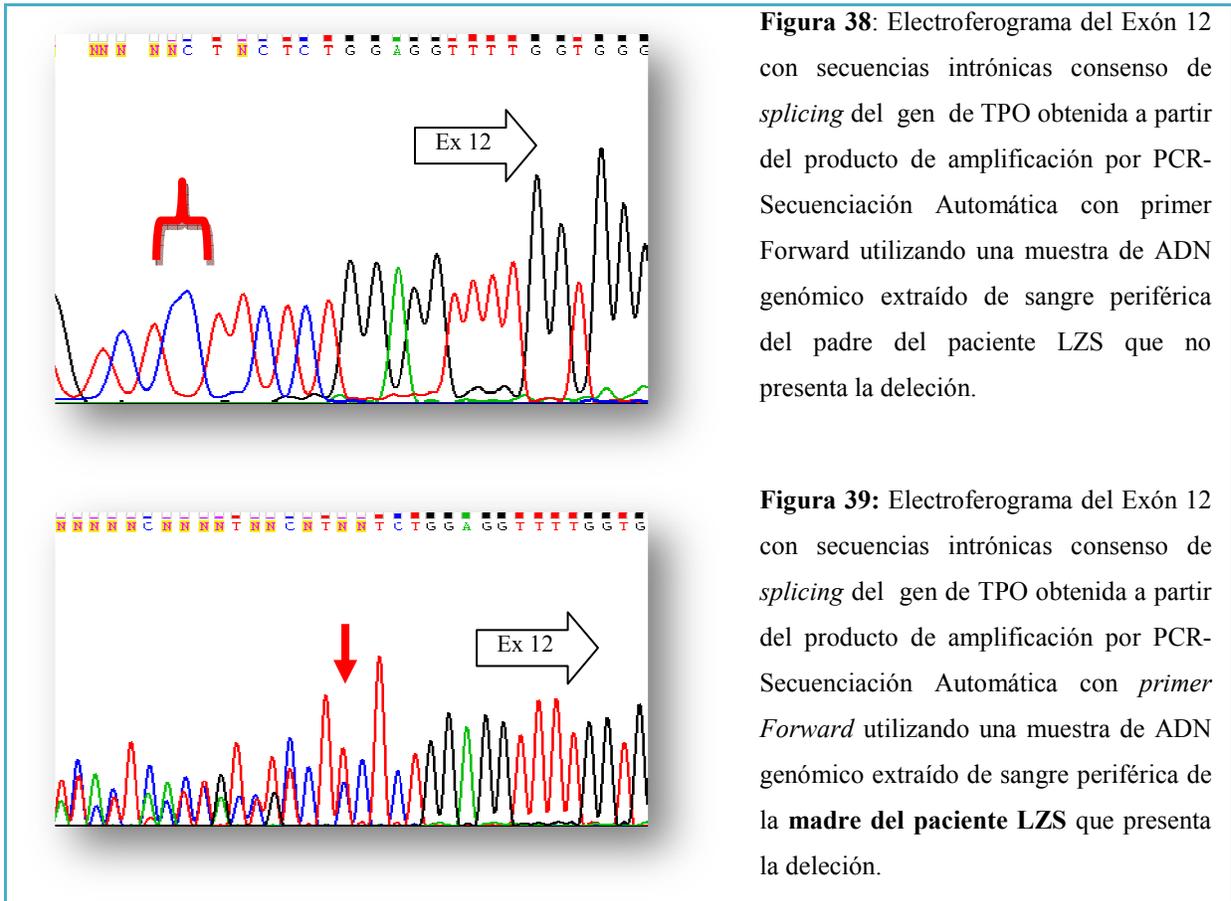


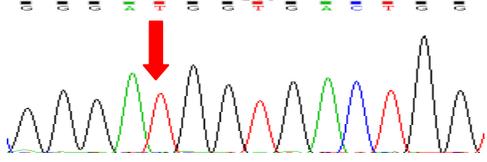
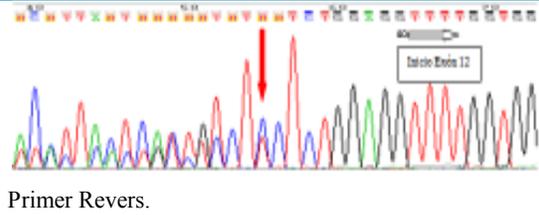
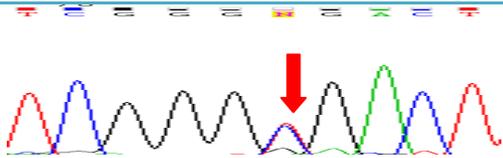
Figura40: Estudio molecular de la familia del paciente ZSL.

Los resultados del análisis de secuenciación del exón 12 y de sus sitios intrónicos consenso de *splicing* del gen de TPO, demostraron en este mismo paciente **ZSL**, un polimorfismo heterocigota descrito c.2215 +5A>C. Se realizó el análisis bioinformático con el programa ESEfinder (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi>) con la intención de ver si el score de la afinidad de las proteínas asociadas al proceso de *splicing* se vería afectado (Ver punto 2.6.1).

En la tabla 8 se describen los polimorfismos identificados para dicho paciente.

Tabla 8: Polimorfismos identificados en el paciente ZSL.

Locus	Alteraciones	Secuencia	Referencia	Polyphen
Exón2	c. 102 C>G ; p.L4L Presencia homocigota		Polim Descrito Rs9678281	Desconocido
Intrón 2	c.95 -30 G>A Presencia homocigota		Variante rara rs2276701	Desconocido
Intrón 3	c.180-47 A>C Presencia heterocigota		Polim Descrito rs1473936	Desconocido
Exón 7	c. 859 G>T; p.A257S Presencia heterocigota		Polim Descrito rs2280132	Desconocido
Exón 8	c.1207 G>T; p.A373S Presencia heterocigota		Polim Descrito rs2280132	Desconocido
Exón 8	c.1193 G>C; p.S398T Presencia homocigota		Polim Descrito rs2175977	Desconocido

Exón 11	c.2088 C>T; p.D666D Presencia homocigota		Polim Descripto rs1126797	Desconocido
Intrón 11	c.2007-11_2007-9del3 (-CCT) Presencia heterocigota		Polim Descripto rs68028832	Desconocido
Exón 15	c.2540 T>C ; p.V847A Presencia heterocigota		Polim Descripto rs1126799	Benigno

Estudio poblacional de la c.2007-11_2007-9del3 (-CTT) por medio de *Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)*.

Dado que la delección c.2007-11_2007-9del3 (-CTT) aparece descripta como variante en la base de datos *NHLBI Exome Sequencing Project (ESP)*, *Exome Variant Server* con una frecuencia de 0,109 % en población Europeo-Americana y con una frecuencia del 19,797 % en población Africana-Americana nos propusimos investigar cual es la frecuencia de aparición del alelo portando la delección en población argentina. A tal fin, mediante la técnica de PCR-SSCP en gel de Poliacrilamida al 10% sin glicerol, se estudiaron 102 cromosomas pertenecientes a 51 controles normales pertenecientes a población argentina (Figura 41). No se identificó el patrón mutado en ninguno de los controles normales en la población argentina analizada.

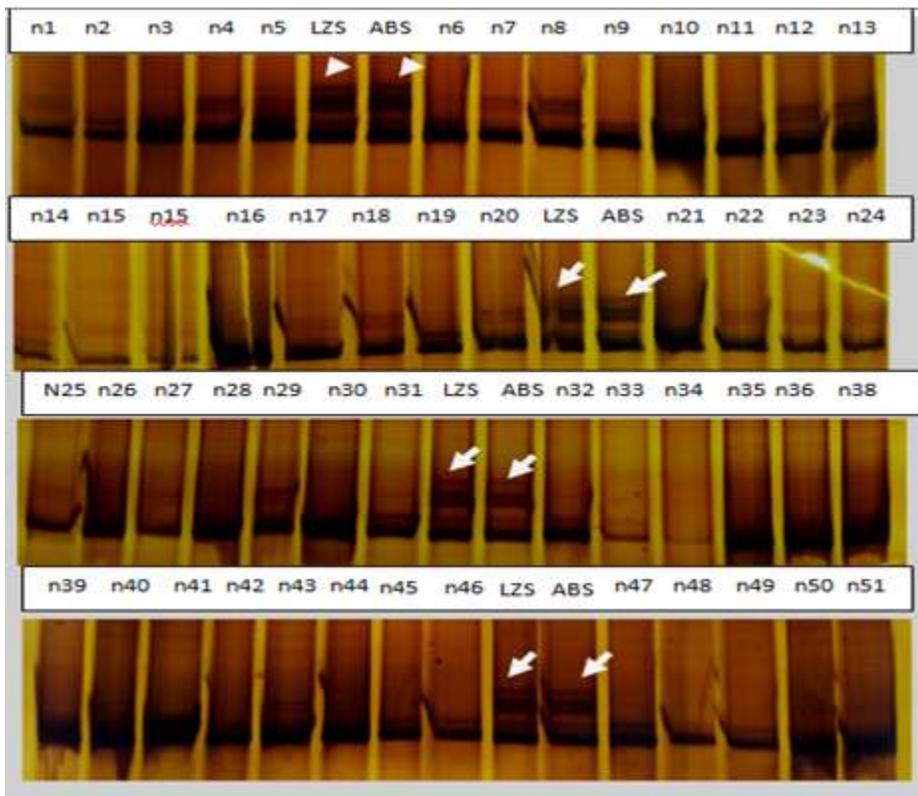


Figura 41: Estudio Poblacional, SSCP en geles de Poliacrilamida al 10% sin glicerol. Se analizaron 102 alelos pertenecientes de 51 controles normales (N1 a N52). Las muestras de los pacientes ZSL y ABS fueron corridas en cada gel.

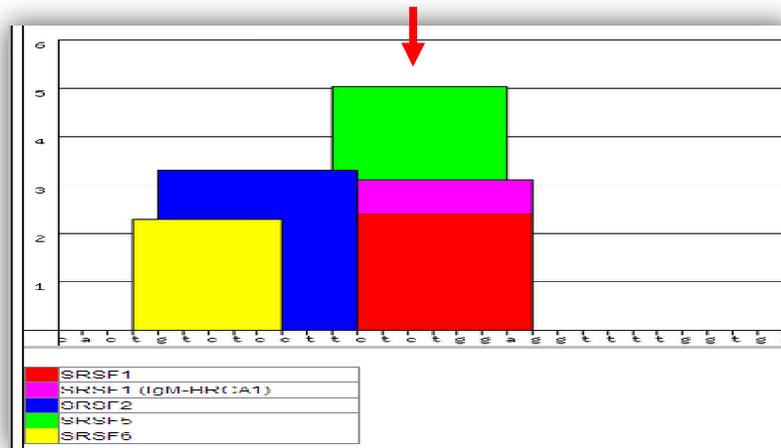
2.6 Análisis Bioinformáticos.

2.6.1 Análisis In Silico de sitios consenso de Splicing.

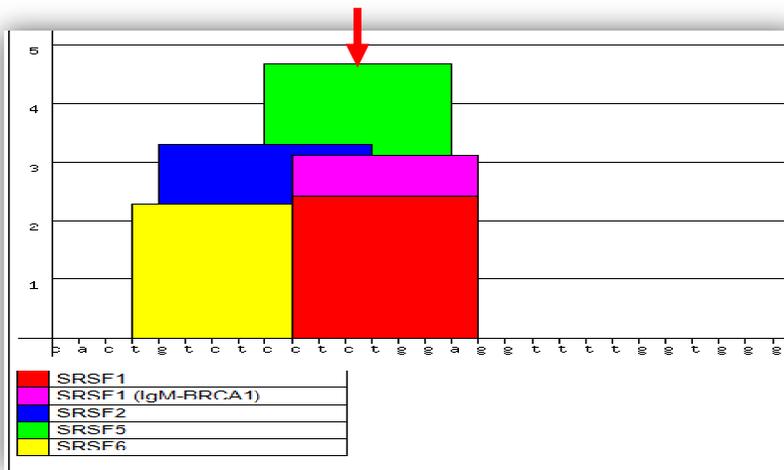
Análisis para la delección c.2007-11_2007-9del3 (-CTT):

Se utilizó el programa ESEfinder para analizar el posible efecto deletéreo ejercido por la delección **c.2007-11_2007-9del3 (-CTT)** sobre el mecanismo de *splicing*.

Según el algoritmo, la presencia del alelo con la delección, genera un cambio en el patrón de interacción de factores de splicing SR (“*Serine Rich elements*”), que se unirían a sitios “*enhancers*” de empalme o sitios ESE característicos de los genes de mamíferos (Figura 42).



Wild type

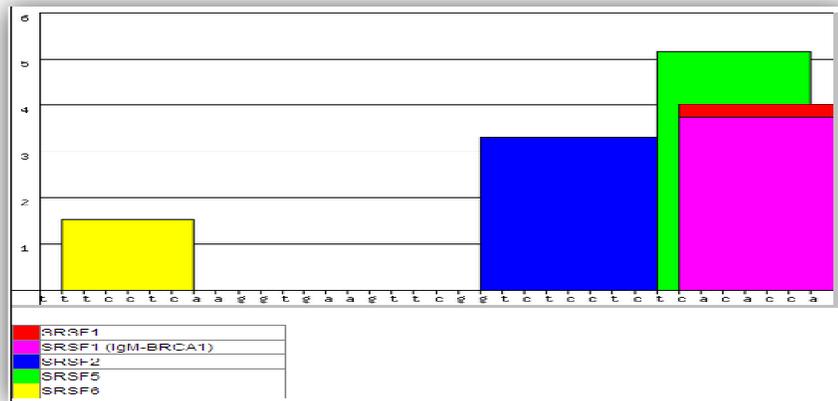


Mutante: c.2007-11_2007-9del3 (-CTT)

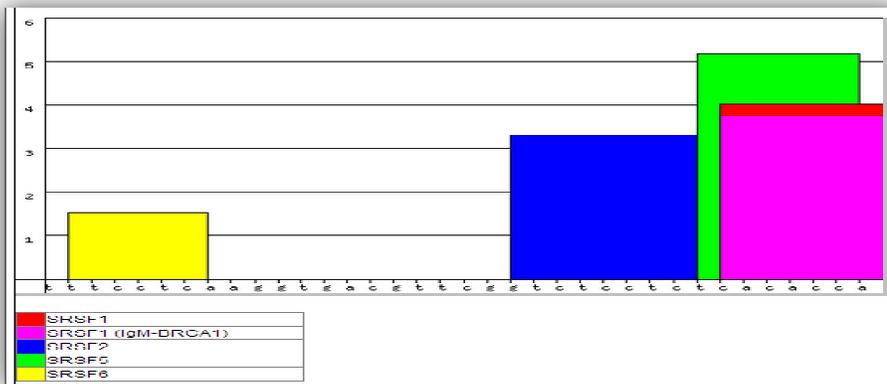
Figura 42. Análisis predictivo del impacto funcional de la deleción c.2007-11_2007-9del3 (-CTT) mediante el algoritmo “ESE finder”. SR: Serine Rich Elements.

Análisis del polimorfismo descrito c.2215 +5 A>C:

Se utilizó el programa ESEfinder para analizar las posibilidades de un efecto deletéreo causado por el polimorfismo heterocigota descrito **c.2215 +5 A>C** sobre el proceso de *splicing*. No se observan diferencias en el *score* de ninguna de las proteínas lo cual nos hace pensar que este cambio probablemente no genera alteraciones en el patrón de interacción de factores de *splicing* SR (Figura 43).



Wild type



Polimorfismo c.2215 +5 A>C

Figura 43. Análisis predictivo del impacto funcional de la variante c.2215 +5 A>C mediante el algoritmo “ESE finder”. SR: Serine Rich Elements.

2.6.2 Análisis de Homología Proteica.

Análisis de Homología Proteica para la p. E799K:

El efecto deletéreo de la mutación, en la que el ácido Glutámico, un aminoácido con carga negativa, es sustituido por Lisina, un aminoácido de carga positiva, se evaluó para investigar el grado de conservación evolutiva entre los aminoácidos codificados en el exón 14 del gen de TPO que forman parte del dominio de EGF de unión a Calcio. El alineamiento entre la secuencia de este dominio EGF en humanos y aquellas secuencias

de este dominio CCP-Like y aquellas secuencias pertenecientes a diferentes especies a través del método Clustal, indica que la posición en estudio, se encuentra conservada en las especies analizadas (Figuras 46 y 47). Esta variación fue descripta previamente con muy baja frecuencia por lo cual se la considera variante rara de secuencia.

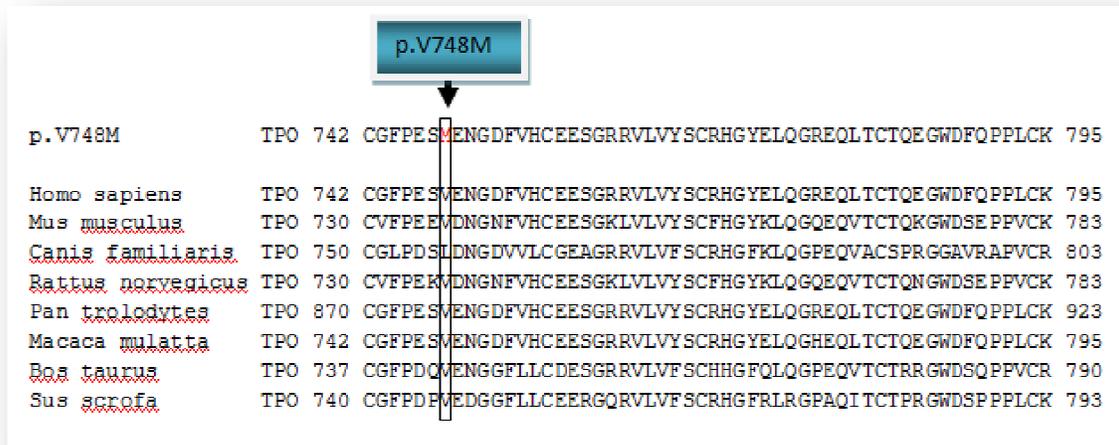


Figura 46. Análisis del grado de conservación evolutiva del codón 748 de DUOX2 por alineamiento múltiple de secuencia (algoritmo Clustal X).

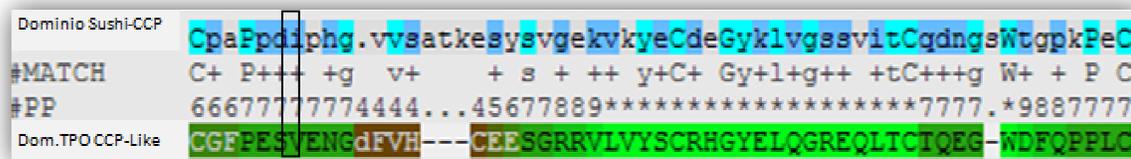


Figura 47. Análisis de homología de referencia del dominio Sushi o dominio de Proteína Control del Complemento CCP (742– 795) con la región correspondiente a Dominio CCP-Like de la proteína TPO. Realizado con Pfam-A matches. #Match: Número de coincidencias entre la secuencia mutada y Secuencia consenso del dominio Sushi-CCP referencia. #PP: Grado de probabilidad en cada alineamiento individual de residuos.[Rojo 0% -Verde100%]

2.6.3. Predicción de las Estructuras Secundarias.

Las secuencias aminoacídicas del gen de TPO, tanto nativa y como mutadas, fueron remitidas al sitio de internet <http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>, y validadas con PSIPRED v3.3 (Predict Secondary Structure) para la predicción de las estructuras secundarias, con el objeto de relacionar el cambio aminoacídico con el estructural. Estos predictores estiman que en todos los casos, las sustituciones identificadas impactarían sobre la estructura secundaria del receptor del siguiente modo:

Predicción de las Estructura Secundaria para la p.E799K:

No se observan aparentemente diferencias en el plegamiento entre la estructura secundaria entre la secuencia nativa y la secuencia que presenta la mutación p.E799K. Se observan cambios en la predicción de accesibilidad al solvente al 25% (Figuras 48 a 51).

```

Secuencia Nativa:

TPO 796 DVNECADGAHPPCHASARCRNTKGGFQCLCADPYELGDDGRTCV 836
-----EEEE-----

Secuencia p.E799K:

TPO 796 DVNKCADGAHPPCHASARCRNTKGGFQCLCADPYELGDDGRTCV 836
-----EEEE-----

```

Figura 48. Comparación de Estructura secundaria de la TPO wild type con la mutada portando la mutación p.E799K correspondiente al dominio EGF CA-Like. Hojas plegadas (E), alfa hélice (H), y conectores (-), respectivamente. Esta predicción se hizo con Jpred Versión Jnet: 2,2 UniRef90 release: 15.4.

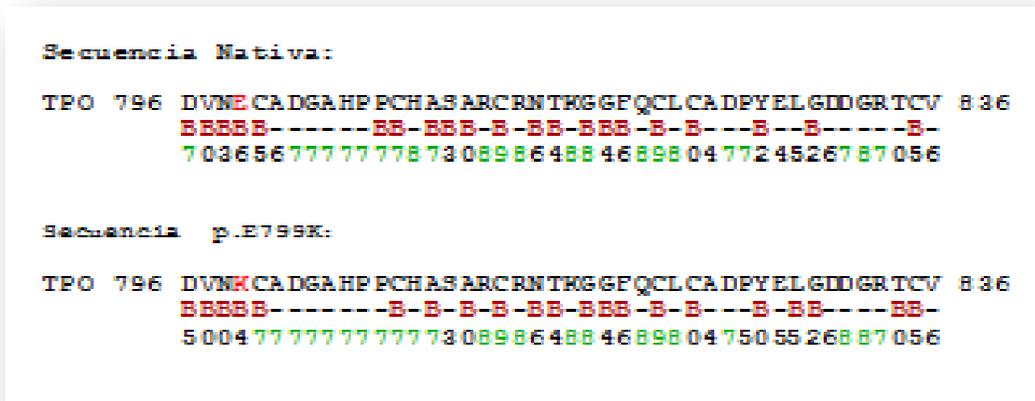


Figura 49. Comparación entre la Mutación p.E799K comparada con la Secuencia Nativa de TPO correspondiente al dominio *Like-EGF* de la predicción estructural de profundidad o accesibilidad a solvente (B) en menos de 25. La evaluación de fiabilidad de la precisión de la predicción, va de 0 a 9. A mayor valor, mayor fiabilidad. Esta predicción se hizo con Jpred Versión Jnet: 2,2 UniRef90 release: 15.4.

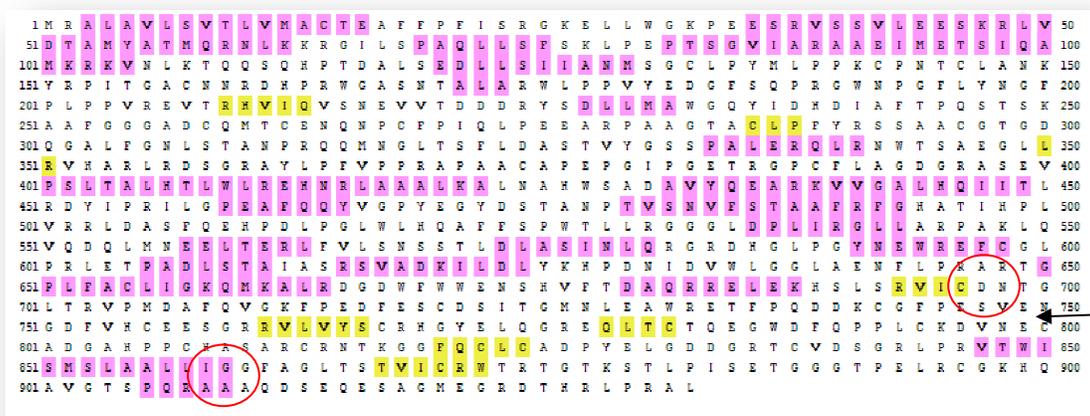


Figura 50: Validación de Estructura secundaria para la TPO nativa. Correspondientemente se representan Hojas plegadas beta (Amarillo), alfa hélice (Rosa), y loops (Blanco). Esta predicción se hizo con PSIPRED v3.3 (Predict Secondary Structure). Círculo rojo resalta el cambio en la estructura proteica.

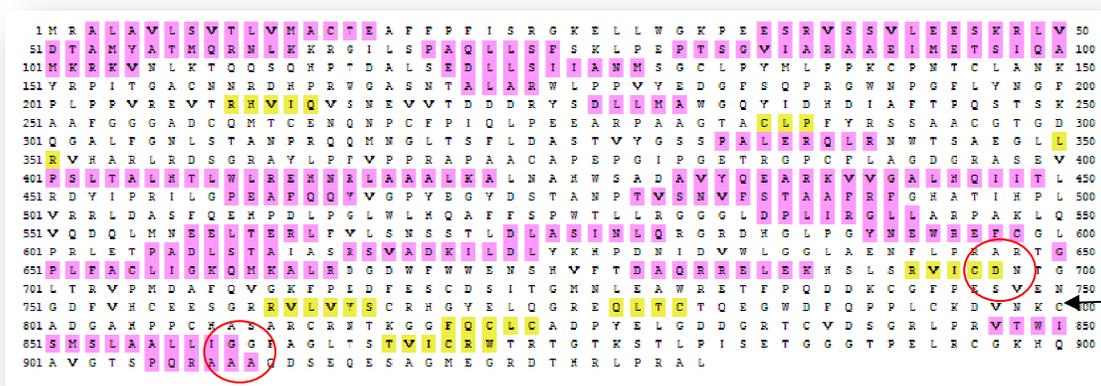


Figura 51: Validación de Estructura secundaria para el TPO con el cambio p.E799K. Correspondientemente se representan Hojas plegadas beta (Amarillo), alfa hélice (Rosa), y loops (Blanco). Esta predicción se hizo con PSIPRED v3.3 (Predict Secondary Structure). Con el Círculo rojo resalta el cambio en la estructura proteica. Con la Flecha en Negro indica el cambio de aminoácido. La sustitución provoca creación de nuevos ángulos propios de estructuras beta plegadas, y ocasionaría la pérdida de ángulos característicos de de alfa hélices comparado con la estructura nativa.

Predicción de las Estructura Secundaria para la p.V748M:

Aparentemente se observan cambios en el patrón de hojas β (E) entre la estructura secundaria de la secuencia nativa y la secuencia que presenta la variación p.V748M. No se observan cambios en la predicción de accesibilidad al solvente al 25% (Figuras 52 a 55).

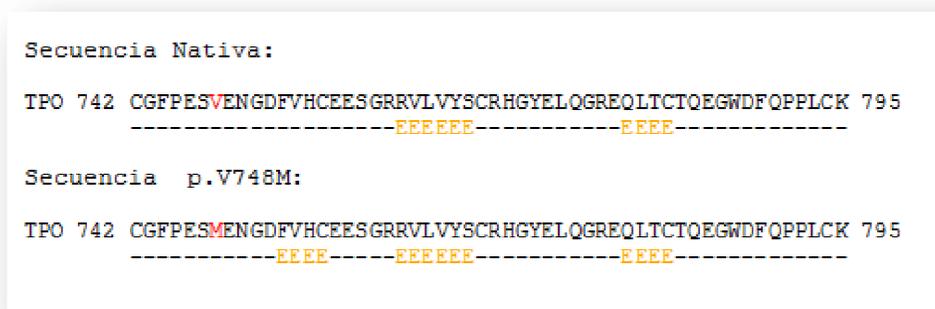


Figura 52. Comparación de Estructura secundaria del dominio CCP-Like con la variación p.V748M comparada con la Secuencia Nativa de TPO correspondiente al dominio CCP-Like. Hojas plegadas (E), alfa hélice (H), y loops (-), respectivamente. Esta predicción se hizo con Jpred Versión Jnet: 2,2 UniRef90 release: 15.4.

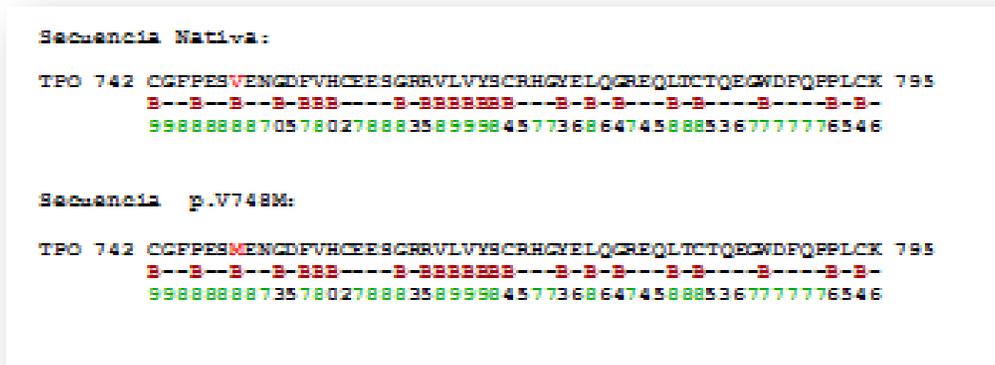


Figura 53. Comparación entre la variación p.V748M comparada con la Secuencia Nativa de TPO correspondiente al dominio CCP-Like de la predicción estructural de profundidad o accesibilidad (B) en presencia de solvente de menos de 25. La evaluación de fiabilidad de la precisión de la predicción, va de 0 a 9, entre más grande es mejor. Esta predicción se hizo con Jpred Versión Jnet: 2,2 UniRef90 release: 15.4.

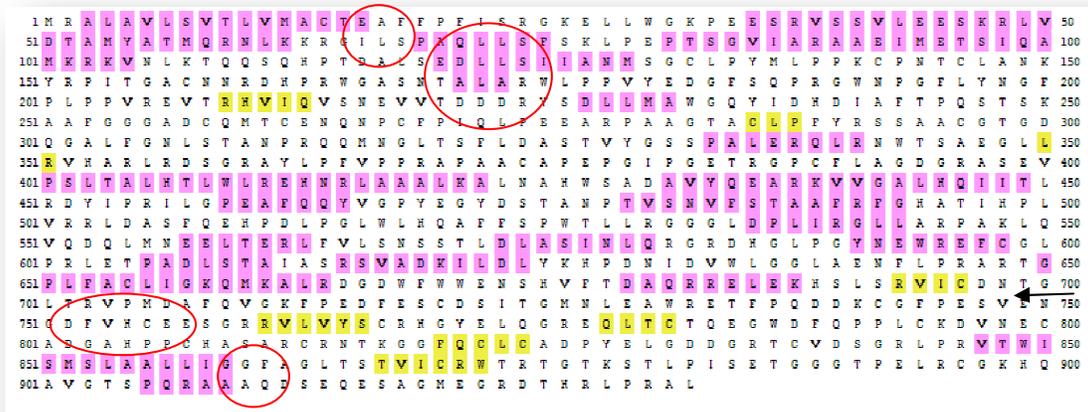


Figura 54: Validación de Estructura secundaria para la TPO nativa. Correspondientemente se representan Hojas plegadas beta (Amarillo), alfa hélice (Rosa), y loops (Blanco). Esta predicción se hizo con PSIPRED v3.3 (Predict Secondary Structure). Círculo rojo resalta el cambio en la estructura proteica.

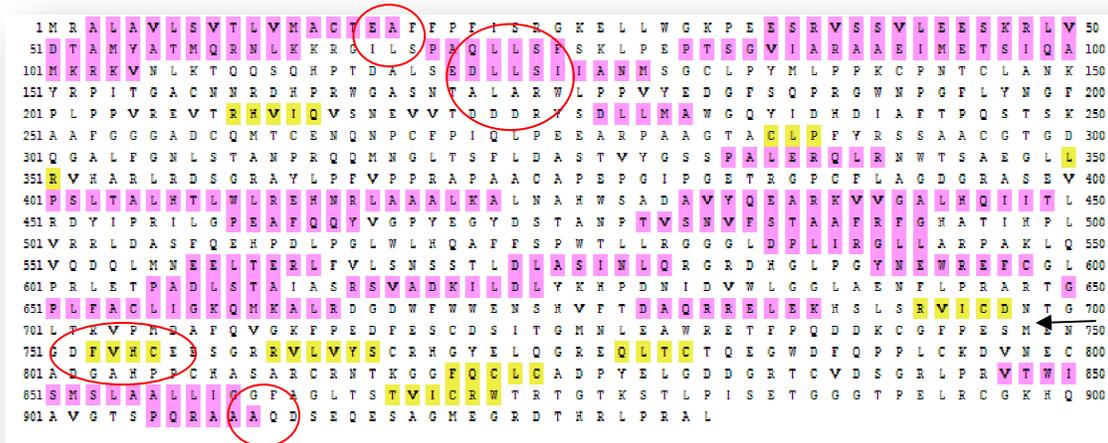


Figura 55: Validación de Estructura secundaria para el TPO con el cambio p.V748M. Se representan correspondientemente Hojas plegadas beta (Amarillo), alfa hélice (Rosa), y loops (Blanco). Esta predicción se hizo con PSIPRED v3.3 (Predict Secondary Structure). Con el Círculo rojo resalta el cambio en la estructura proteica. Con la Flecha en Negro indica el cambio de aminoácido. La sustitución provocarían tanto la pérdida como la introducción de ángulos característicos de estructuras alfa hélice y la creación de nuevos ángulos propios de estructuras beta plegadas comparado con la estructura nativa.

2.6.4 Predicción del impacto de una sustitución aminoacídica en la estructura y función proteica.

Se empleó el programa PolyPhen-2 (Adzhubei et al. 2010), (Polymorphism Phenotyping v2: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

Impacto de la mutación p.E799K.

Al utilizar el programa para predecir el impacto de la sustitución p.E799K en la estructura y función de determinó el efecto deletéreo de la misma (Figura 56).

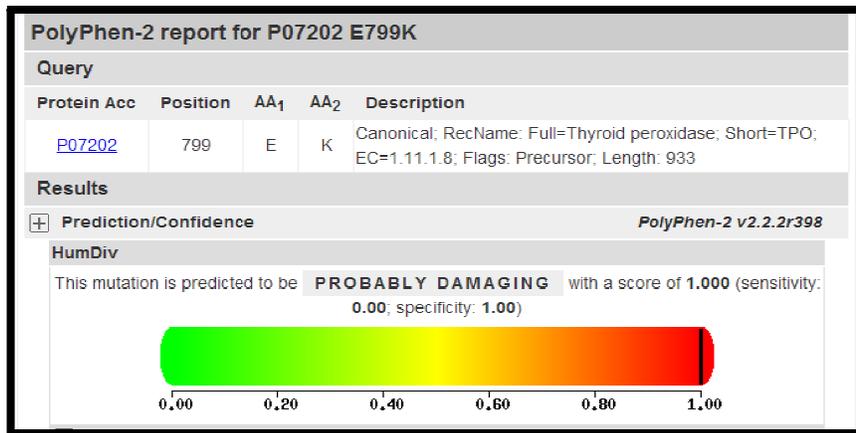


Figura 56. Output de evidencia informática. Determinación del efecto deletéreo de la mutación p.E799K. (<http://genetics.bwh.harvard.edu/ggi/pph2/2914bf8f60cb44c62dce54738d33c89412304978/2384315.html>).

Impacto de la mutación p.V748M.

Al utilizar el programa para predecir el impacto de la sustitución p.V748M en la estructura y función se obtuvo información en el que se considera deletéreo este cambio en el siguiente output:

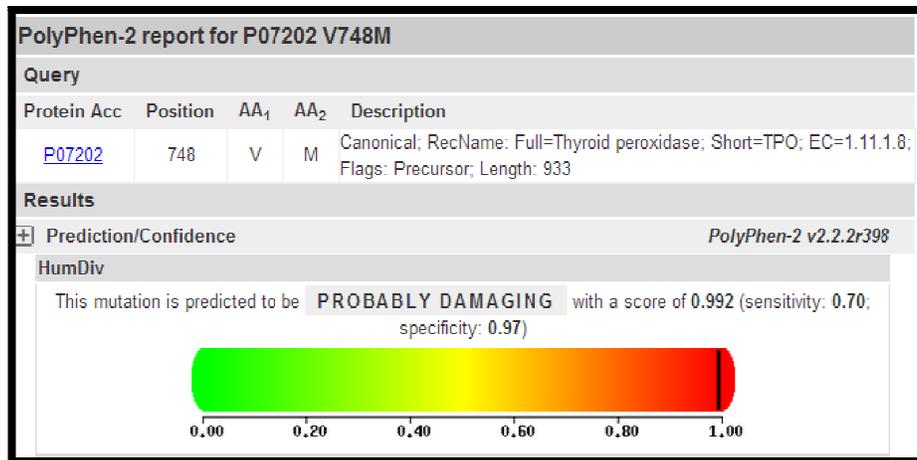


Figura 57. Output de evidencia informática. Determinación del efecto deletéreo de la mutación p.V748M. (<http://genetics.bwh.harvard.edu/ggi/pph2/2914bf8f60cb44c62dce54738d33c89412304978/2384409.html>)

2.6.5 Modelaje de proteínas in silico por comparación con dominios homólogos a dominios de TPO.

Estos estudios permiten conocer las posibles modificaciones estructurales y los posibles efectos fisiopatológicos resultantes como consecuencia de las mutaciones identificadas. Se realizaron análisis estructurales y fisicoquímicos utilizando los programas Swiss-PdbViewer 4.04 (<http://swissmodel.expasy.org/>) y PyMol (<http://www.pymol.org/>).

Se realizó el modelado por homología seleccionando las estructuras cristalográficas disponibles de los dominios proteicos más afines a los dominios de TPO en los que se identificaron las mutaciones. Se muestran en la Tabla 9, las regiones aminoacídicas de TPO correspondientes a los distintos dominios.

Tabla 9. Descripción de las regiones de la proteína codificada por el gen de TPO. Se indican en rojo las posiciones aminoacídicas cercanas a las mutaciones identificadas.

REGIÓN	POSICIÓN AMINOACIDICA (NCBI Ref- Seq: NP_000538.3)
-Péptido señal	1-18
-Péptido Maduro	19-933
Dominio An-Peroxidase	151-709
-Región Tiroperoxidasa	167-734
-Sitio Putativo de interacción Homodimero	317,593,596
-Sitio de unión a Ca ²⁺ (b)	321,325,327
-Sitio de unión al "Heme"	396,399,487,490,491,494,497,523,575,582
-Sitio putativo de unión a sustrato.	450,453..454,458,486,490,492,649,653,657,658, 661,662,665
Dominio Like-EGF -CA	769-839
-Sitio de unión a Ca ²⁺ (a)	796, 799 ,816
Dominio Like-shushi CCP	742-795
-Sitio de Interacción ligando	752,769
Región trans Membrana	847-871

Los modelos cristalográficos elegidos para realizar el modelado por homología fueron validados mediante ProQ (Wallner and Elofsson 2003) (Protein Quality Predictor). Este predictor de red neural evalúa una serie de parámetros estructurales que predicen la calidad de un modelo. (<http://www.sbc.su.se/~bjornw/ProQ/ProQ.html>)

- 1uzjb (795aa-842 aa) (algoritmo **SwissModel**), con una resolución de 2.25 Å del fragmento Holo forma de fibrilina-1 humana integrina el cual presentó un 37,5% de identidad de secuencia con el dominio- EGF e índices predictivos de calidad aceptables para la estructura según algoritmo **ProQ** (.LGscore 3,141, MaxSub 0,208).
- 3sw0 del fragmento Holo-forma de la Región Reguladora C-terminal del Complemento del Factor H (742-794) con una resolución de 1,8 Å y 37% de identidad con la región dominio- Like CCP del gen TPO.

Modelaje de proteínas in silico por comparación con dominios homólogos conocidos para la mutación p. E799K:

Utilizando los programas Swiss PDB Viewer 4.04 como visualizador se analiza p.E799K con Modelo del cristal 1uzjb (795aa-842 aa) con una resolución de 2.25 Å del fragmento Holoforma de fibrilina-1 humana integrina. Con un 37,5% de identidad con el dominio-EGF, se puede observar que los resultados de este análisis bioinformático sugieren que el reemplazo del correcto ácido Glutámico 799 de naturaleza ácida de carga negativa neta, por Lisina de naturaleza básica de carga positiva neta, aparentemente no alteraría la formación de enlaces puente de hidrógeno. Sin embargo, aparentemente existiría una distancia mayor para la unión a calcio, lo que posiblemente ocasionaría la disminución en la afinidad por este catión (Figura 58). También ocasionarían por dicho cambio, alteraciones en la superficie electrostática cambiando el relieve y la polaridad superficial (Figura 60). Se indica en la tabla 11 la comparación entre los PKa del aminoácido wt y el aminoácido mutado. El Valor de energía de minimización fue calculado mediante el programa Swiss PDB Viewer 4.04 observándose una clara diferencia entre la proteína nativa y la proteína mutada en esta posición (Tabla 11).

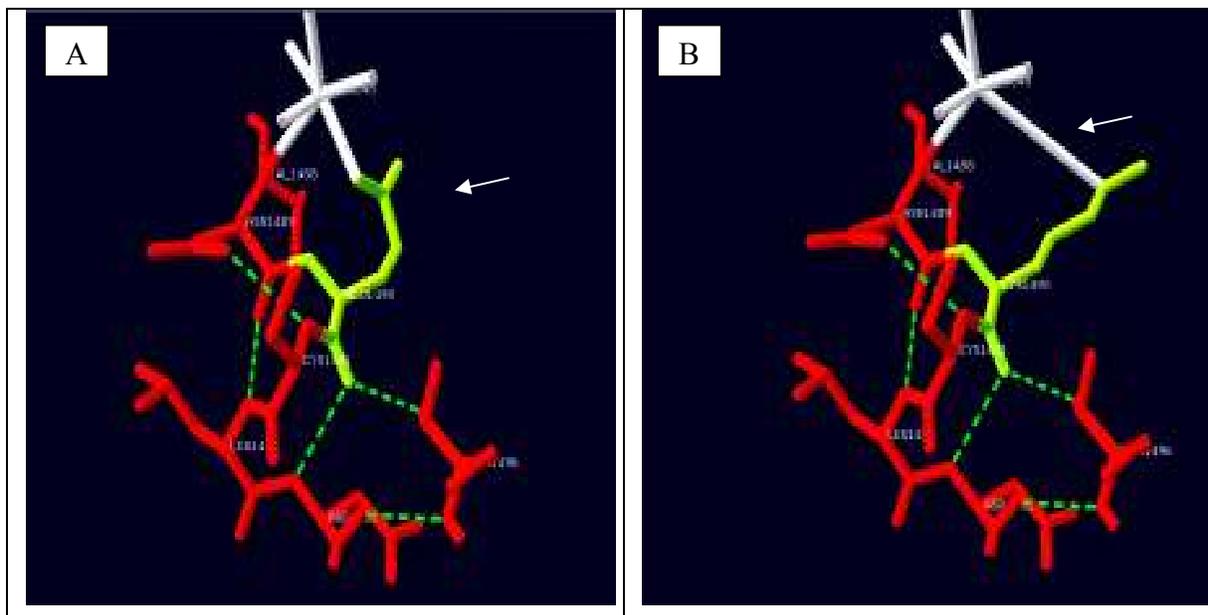


Figura 58: El reemplazo del correcto Glutámico 799 en color verde (A) por Lisina en color verde (B) no alteraría la formación de puentes de hidrógeno entre la nueva Lisina con los aminoácidos cercanos. En color rojo se indican los aminoácidos que interactúan con la posición 799. Probablemente se altera la interacción con el calcio y su unión a la proteína. En blanco se indica el Átomo de Calcio.

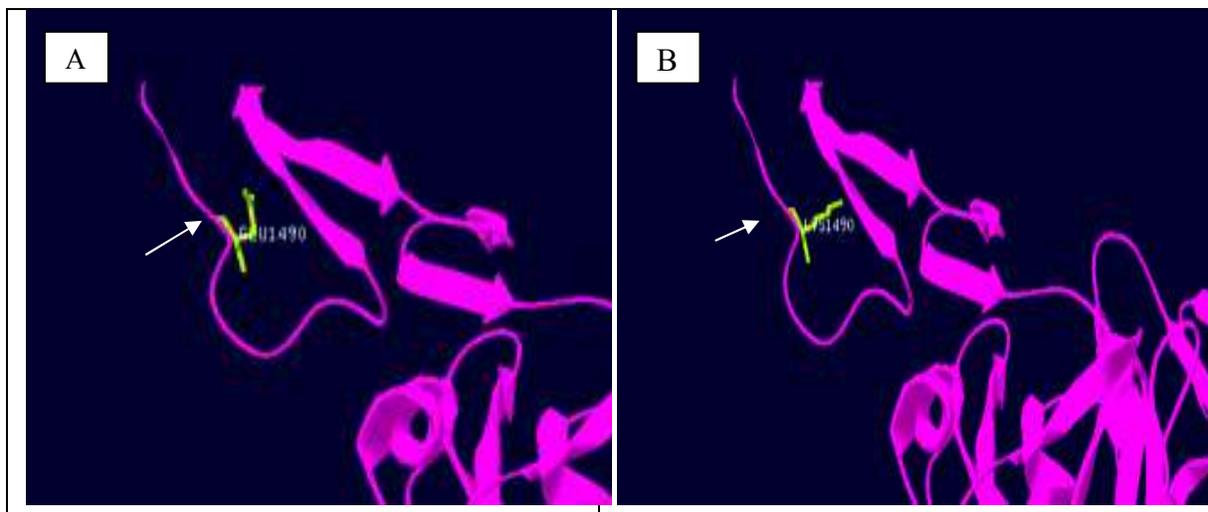


Figura 59: Representación espacial mediante el programa Pymol de la posición del aminoácido Glutámico 490 del cristal del Dominio Homólogo a TPO (homóloga a la posición Glutámico 799 en TPO) en forma nativa (A) y en la misma posición en cambio por Lisina (B). Esto es solo una representación de estructura secundaria y no la predicción de estructura terciaria con la mutación.

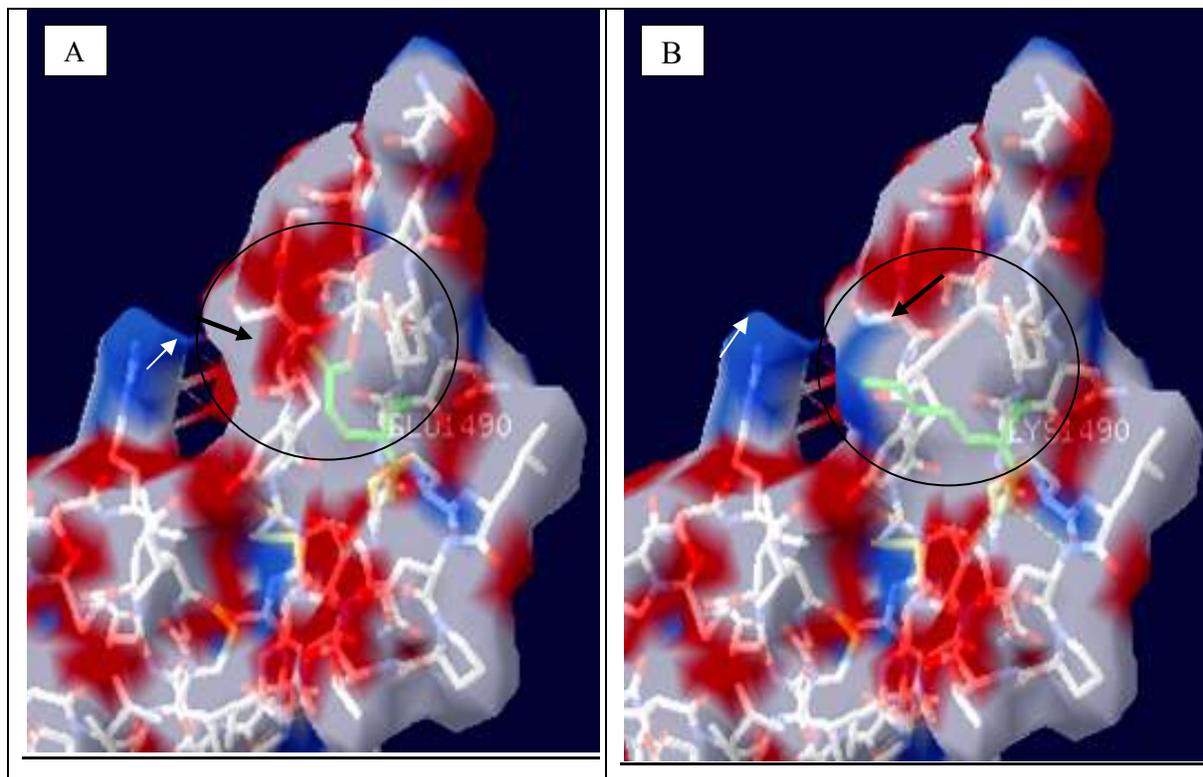


Figura 60: Representación de la superficie molecular del dominio EGF (spdb Viewer). Se indica con flechas la presencia de variación en la superficie cambiando la polaridad y el relieve superficial, entre la estructura nativa y la mutada. Azul representa polaridad positiva, Rojo representa polaridad Negativa y Blanco representa regiones neutras.

Tabla 10. Comparación entre Pka de aminoácido (AA) nativo y aminoácido (AA) mutado.

Posición Cambio	AA Nativo	Pka1	Pka2	Pka3	AA Mutado	Pka1	Pka2	Pk3
p.E799K	Acido Glutamico E Con cadena lateral con grupo cargado Acido	2.10	9.47	2.109.474.07 g COOH	Lisina K Con cadena lateral con grupo cargado Básico	2.16	9.06	10.54e-Amino

Tabla 11. Comparación de Energías de Minimización individual de cada residuo aminoacídico y la energía de minimización global, entre modelo nativo y con la Mutación.

PDB 1uzjB Dominio Like EGF Homologo a Región TPO		E Energías de minimización (KJ/mol)
Nativo	E Residuo Individual	-31,184
	E Total Estructural	-11252,924
Mutación p.E799K	E Residuo Individual	-18,057
	E Total Estructural	-11233,878

Modelaje de proteínas in silico por comparación con dominios homólogos conocidos para la variación p. V748M.

Utilizando los programas Swiss PDB Viewer 4.04 como visualizador se analiza p.V748M con Modelo del cristal 3sw0 del fragmento Holo-forma de la Región Reguladora C-terminal del Complemento del Factor H (742-794) con una resolución de 1,8 Å y 37% de identidad con la región dominio- Like CCP del gen TPO. Los resultados de este análisis bioinformático sugieren que el reemplazo de la correcta Valina 748 de naturaleza hidrofóbica por Metionina que contiene azufre y de naturaleza hidrofóbica, aparentemente no alteraría la formación de enlaces puente de hidrógeno (Figura 61). Se determina la estructura secundaria como consecuencia de la mutación (Figura 62). Esta última ocasionaría alteraciones en la superficie electrostática modificando el relieve y la polaridad superficial (Figura 63). En la Tabla 12 se muestra la comparación entre Pka de aminoácido (AA) nativo y aminoácido (AA) mutado.

El Valor de energía de minimización fue calculado mediante el programa SwissPDBViewer 4.04, observándose una clara diferencia entre la proteína nativa y la proteína mutada en esta posición (Tabla 13).

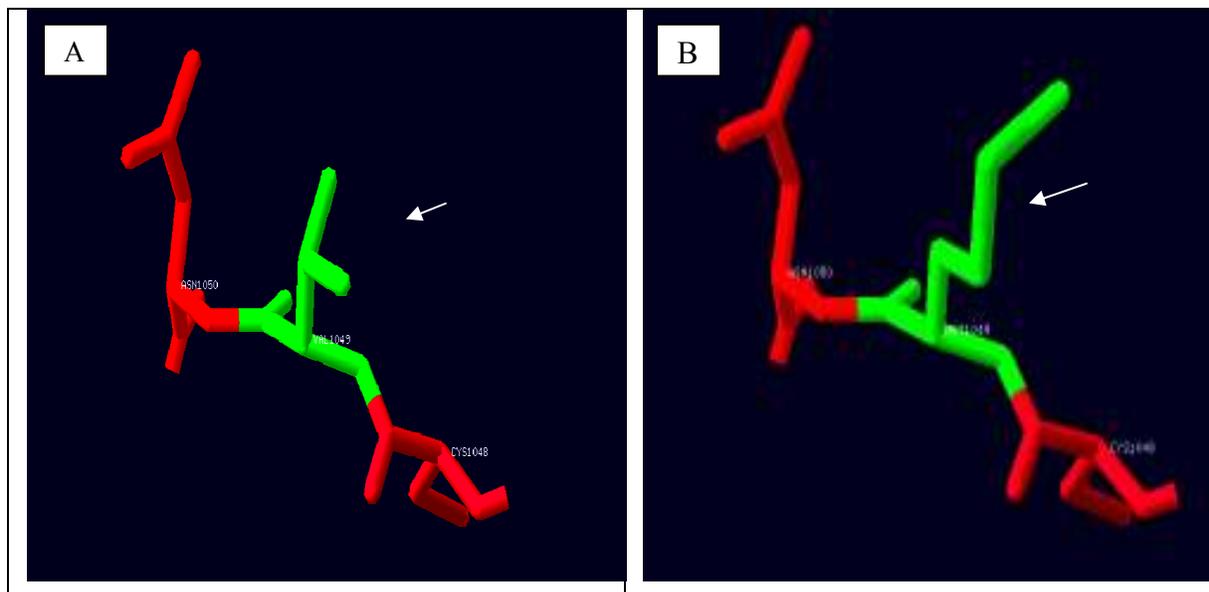


Figura 61: El reemplazo de la Valina 748 wild type, en color verde (A) por Metionina en color verde (B), no alteraría la formación de puentes de hidrógeno entre la nueva Metionina con los aminoácidos cercanos a la posición 748. En color rojo se indican los aminoácidos que interactúan con la posición 748.

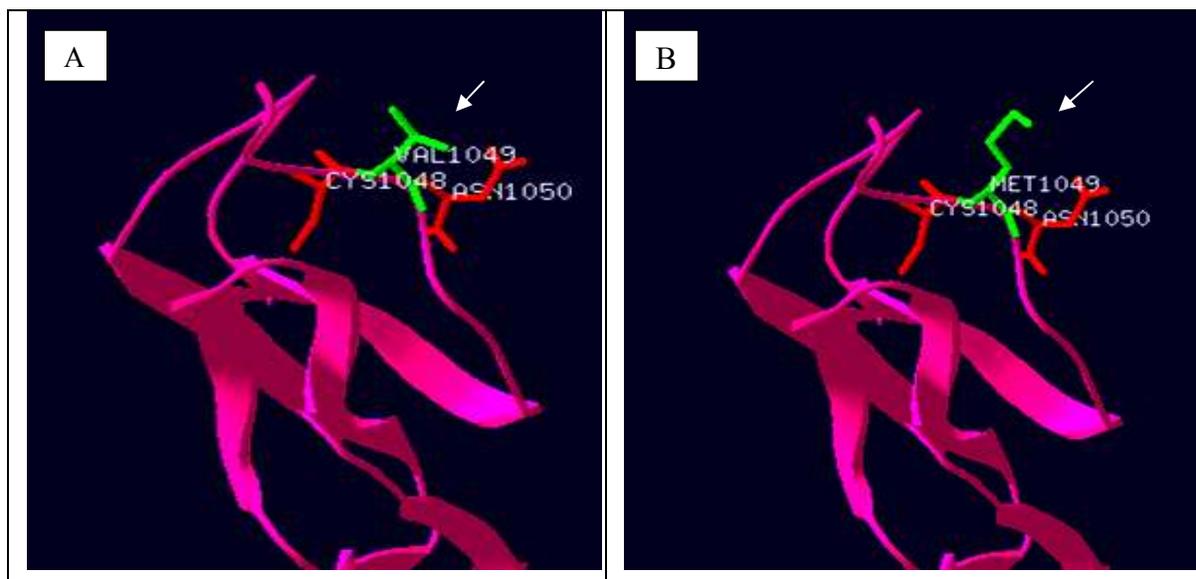


Figura 62: Representación espacial mediante el programa Pymol de la posición del aminoácido Valina 1049 del cristal del Dominio Homólogo a TPO (homóloga a la misma posición Valina 748 en TPO) en forma nativa (A) y en la misma posición el cambio por Metionina (B). Esto es solo una representación de estructura secundaria y no una predicción de estructura terciaria con la Variación.

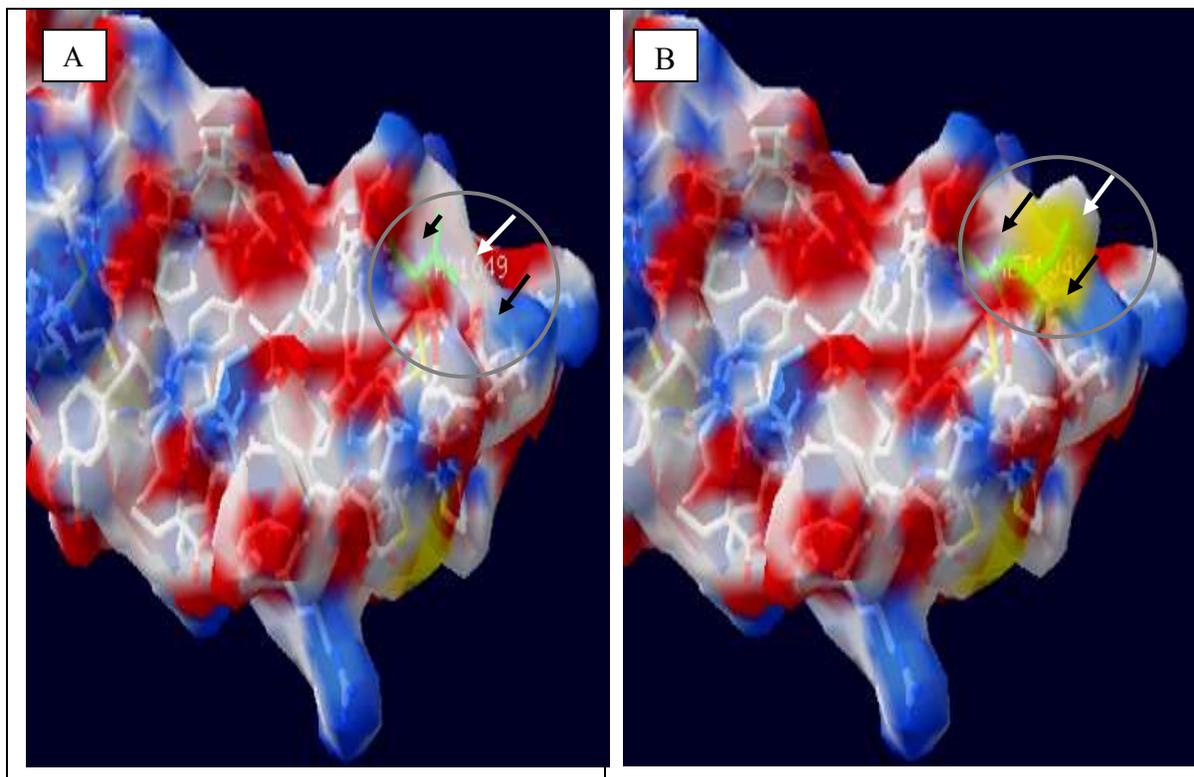


Figura 63: Representación de la superficie molecular del dominio Suchi Like-CCP (spdb Viewer). Se indica con flechas blancas y negras la presencia de variación en la superficie cambiando la polaridad en regiones de la superficie y el relieve, entre la estructura nativa y la mutada. En Azul se representa la polaridad positiva, en Rojo se representa la polaridad Negativa y en Blanco, las regiones neutras Las regiones en amarillo representan presencia de Azufre.

Tabla 12. Comparación entre Pka de aminoácido (AA) nativo y aminoácido (AA) mutado.

Posición Cambio	AA Nativo	Pka1	Pka2	Pka3	AA Mutado	Pka1	Pka2	Pk3
p.V748M	Valina V con cadena lateral no polar Hidrofóbico	2.29	9.74	---	Metionina M con cadena lateral no polar Hidrofóbico	2.13	9.28	--

Tabla 13. Comparación de Energías de Minimización individual de cada residuo aminoacídico y la energía de minimización global, entre modelo nativo y con la Variación.

PDB 3Sw0 Dominio Sushi-Like CCP Homologo a Región TPO		E Energías de minimización (KJ/mol)
Nativo	E Residuo Individual	+14,508
	E Total Estructural	+6647,043
Variación p.E799K	E Residuo Individual	-25,618
	E Total Estructural	+6660,186

DISCUSIÓN

El *screening* neonatal comenzó a implementarse hace más de 40 años bajo la forma de Programas Centralizados y Regionalizados en países desarrollados, donde es el estado quien se hace cargo de la implementación de los mismos. En Latinoamérica algunos ejemplos de programas perfectamente consolidados que han alcanzado una cobertura de casi 100 % son los países de Cuba, Chile, Uruguay y Brasil. Los programas de *screening* neonatal son una herramienta de los sistemas interdisciplinarios de Salud Pública, para seleccionar entre todos los recién nacidos vivos, a aquellos presumiblemente afectados en este caso por el hipotiroidismo congénito, una de la patología investigadas en este trabajo de tesis. Los casos positivos en el tamizaje neonatal deben ser sometidos luego a estudios de confirmación, que permitan establecer el diagnóstico y su correspondiente tratamiento y seguimiento. Un proceso de centralización y regionalización para la implementación de un programa de tamizaje neonatal ha sido demostrado en el mundo desarrollado, observándose que de este modo se logra un máximo rendimiento y eficiencia con una reducción significativa de falla en estudios epidemiológicos. El tener disponibles equipos multidisciplinarios de salud con un elevado nivel de capacitación y especialización, actuando con eficiencia desde el Tamizaje neonatal, como en el Diagnóstico clínico y Confirmación por genética molecular, continuando así en el Tratamiento y Seguimiento, y finalmente en el Consejo Genético familiar del paciente con Hipotiroidismo Congénito, podrán asegurar alcanzar con éxito el objetivo de tratar esta patología evitando el impacto psicológico y social a los que la misma conlleva.

Como se ha descrito en secciones anteriores, el hipotiroidismo congénito primario es una enfermedad causada por la insuficiente producción de las hormonas de la glándula tiroides. Estas son trascendentes para el desarrollo del sistema nervioso central, el crecimiento durante toda la infancia y la evolución normal del proceso puberal. Si el tratamiento no se inicia precozmente (antes de los 15 días de vida), la enfermedad provoca -entre otros síntomas- retraso madurativo de grado variable y la consecuente discapacidad irreversible. Un tratamiento oportuno mejora su evolución si su implementación es precoz. La

incidencia de alteraciones neurológicas y el retraso mental guardan correlación con la edad de diagnóstico y con la etiología del hipotiroidismo congénito. Para ello es de vital importancia el estudio de los genes cuyas alteraciones se encuentran vinculadas con la patología y que son responsables de las manifestaciones clínico-bioquímicas.

Una herramienta útil con la que contamos actualmente es la aplicación de la bioinformática para la presuntiva predicción de la estructura de las proteínas expresadas. El conocimiento de esta estructura es vital para entender la función de la proteína. Consecuentemente, así mismo es de vital importancia para el estudio de la función proteica, la observación de la estructura primaria, el entendimiento de la estructura secundaria de las proteínas o el plegamiento regular local entre residuos aminoacídicos cercanos en la cadena polipeptídica y de la estructura terciaria de una proteína generalmente conformada por varios tramos con estructuras secundarias distintas. Es de gran importancia el análisis de la estructura terciaria de las proteínas ya que la organización de los aminoácidos apolares que se sitúan hacia el interior de la proteína y los polares que se sitúan hacia el exterior interactuando con el agua circundante otorga a la proteína sus particularidades fisicoquímicas como la polaridad o apolaridad de la molécula, como es el caso de proteínas integrales de membrana. La predicción de dichas estructuras es de alta complejidad. Existe una gama de programas de predicción basados en la secuencia primaria, como la predicción de estructura secundaria de proteínas, basado en la creación de un consenso a partir de alineamientos de proteínas homólogas de estructura conocida. Mayormente la sensibilidad de estos programas es alta, mientras que la especificidad es relativamente baja (Laskowski RA et al. 2008). En el caso de TPO no se dispone del cristal de la proteína lo cual facilitaría el modelado y la mutagénesis in silico de las TPO portando mutaciones identificadas. En consecuencia, se recurrió al modelado por homología de estructura terciaria para evaluar las TPO mutadas a nivel tridimensional. Esta herramienta de predicción se basa en un método comparativo que parte de suponer que proteínas homólogas compartirían motivos estructurales, dado que el proceso de plegamiento proteico se encuentra evolutivamente más conservado que su secuencia aminoacídica. Aún así, es requisito inicial para obtener predicciones confiables, que las secuencias comparadas presenten un buen alineamiento entre ellas, es decir que la identidad de secuencia primaria de la proteína incógnita y aquella proteína homóloga cuya

estructura es conocida, no sea menor del 30%. La identidad de secuencia puede determinarse mediante programas específicos tales como el Pro-Q. De esta manera puede obtenerse información estructural y predecir la función de las TPO mutadas. El estudio de predicción por homología de la estructura de las proteínas y sus alteraciones, así como su posible alcance deletéreo es una importante herramienta que ofrece el desarrollo bioinformático actual.

Una vez identificada por PCR-Secuenciación la mutación p.E799K previamente descrita (Bikker et al.1995; Pannain et al. 1999; Bakker B 2000), en el dominio EGF- *like* de TPO se realizó un análisis in silico de las posibles alteraciones en el péptido. Se utilizaron los programas Swiss PDB Viewer 4.04 como visualizador para analizar p.E799K con el Modelo del cristal luzjb (795aa-842 aa) con una resolución de 2.25 Å, cristal del fragmento Holoforma de fibrilina-1 humana integrina. Este cristal presenta un 37,5% de homología con el dominio- EGF, se puede observar hipotéticamente en los resultados de este análisis bioinformático, que por el reemplazo del correcto ácido Glutámico 799 de naturaleza ácida de carga negativa neta, por Lisina de naturaleza básico de carga positiva neta, aparentemente no alteraría la formación de enlaces puente de hidrógeno, sin embargo aparentemente si existiría una distancia mayor en la unión a calcio, lo que posiblemente ocasionaría la disminución en la afinidad por este catión. También se observó que posiblemente ocasionaría por el cambio, alteraciones en la superficie electrostática cambiando el relieve y la polaridad superficial. El Valor de energía de minimización calculado mediante el programa Swiss PDB Viewer 4.04 mostró una clara diferencia entre la proteína nativa y la proteína mutada en esta posición. El alineamiento entre la secuencia de este dominio EGF de unión a Calcio en humanos y aquellas secuencias pertenecientes a diferentes especies del mismo dominio a través del método Clustal, indica que la posición en estudio se encuentra conservada en las especies analizadas. No se observó aparentemente diferencias en el plegamiento entre la estructura secundaria entre la secuencia nativa y la secuencia que presenta la mutación p.E799K. Se observan cambios en la predicción de accesibilidad al solvente al 25%. Al utilizar el programa para predecir el impacto de la sustitución p.E799K en la estructura y función se obtuvo información por la cual se considera deletéreo este cambio. Nuestros resultados son muy interesantes y

coinciden con datos previos reportados en bibliografía hasta el presente. Como se mencionó anteriormente la mutación p.E799K se encuentra en el dominio EGF- *like* de TPO. La función del dominio de homología con EGF no es clara. Este dominio está presente en un gran número de proteínas extracelulares y unidas a membrana. Muchas de estas proteínas requieren calcio para su actividad biológica y los sitios de unión al calcio se encontraron en la región N-terminal de los dominios EGF-*like*. La unión al calcio podría ser crucial para numerosas interacciones proteína-proteína. Mutaciones en esta región fueron reportadas en varios pacientes con funciones tiroideas severas. Seis cisteínas en el dominio EGF forman tres puentes disulfuro: C800-C814, C808-C823 y C825-C838.

Así mismo, identificada la variación p.V748M por PCR-Secuenciación se realizó un análisis *in silico* de las posibles alteraciones en el péptido. Esta variación se encuentra en la base de datos de referencia *Exome variant server* con el código rs28991292. Se utilizó el programa Swiss PDB Viewer 4.04 como visualizador y se analizó la p.V748M con Modelo del cristal 3sw0 del fragmento Holo-forma de la Región Reguladora C-terminal del Complemento del Factor H. (742-794) con una resolución de 1,8 Å y 37% de homología con la región dominio- Like CCP del gen TP. Se puede observar que los resultados de este análisis bioinformático sugieren que el reemplazo de la correcta Valina 748 de naturaleza hidrofóbica por Metionina que contiene azufre y de naturaleza hidrofóbica, aparentemente no alteraría la formación de enlaces puente de hidrógeno; sin embargo posiblemente, sí ocasionaría por el cambio, alteraciones en la superficie electrostática modificando el relieve y la polaridad superficial. El Valor de energía de minimización calculado mediante el programa SwissPDBViewer 4.04, permitió observar una clara diferencia entre la proteína nativa y la proteína mutada en esta posición. El alineamiento entre la secuencia de este dominio CCP-Like y aquellas secuencias pertenecientes a diferentes especies a través del método Clustal, indica que la posición en estudio se encuentra conservada en las especies analizadas. Esta Variación fue descrita previamente y como consecuencia de su baja frecuencia es considerada una Variante rara de secuencia. Se observaron cambios en el patrón de hojas β (E) entre la estructura secundaria de la secuencia nativa y la secuencia que presenta la variación p.V748M, y no se observaron cambios en la predicción de accesibilidad al solvente al 25%. Si bien el residuo 748 no se encuentra en la región

catalítica, ubicándose en el dominio CCP de TPO, el cambio p.V748M podría tener un impacto conformacional en la enzima potencialmente deletéreo, resultante de un plegamiento alternativo de la misma. De manera de evaluar de manera predictiva éste impacto, se analizaron los posibles cambios en la estructura secundaria que presentaría la molécula en presencia de metionina en posición 748, observándose cambios significativos en el patrón de hojas β (E). Al utilizar el programa para predecir el impacto de la sustitución p.V748M en la estructura y función, se obtuvo información por la cual se considera deletéreo este cambio pudiéndose evidenciar también en la base de datos (Exome variant server) (referencia para esta variante código rs28991292), las frecuencias genotípicas y alélicas que caracterizan a la sustitución c.2242 G>A; p.V748M. Dada la baja representatividad poblacional del alelo A en población Hispánica y Afroamericana, que alternativamente supera el 1% en poblaciones como la Asiática y Africana Sub-Sahariana, podemos considerarla una Variante Rara de secuencia.

Muestra			Genotipos detallados			Alelos	
Base de Datos de Referencia	Origen	Tamaño	A/A	A/G	G/G	A	G
ESP Cohort Populations		4552	0.000	1.000		0.000	1.000
HapMap-CEU	European	222	0.018	0.982		0.009	0.991
HapMap-HCB	Asian	84	0.024	0.976		0.012	0.988
HapMap-JPT	Asian	166	0.012	0.988		0.006	0.994
EGP_YORUB-PANEL	Sub-Saharan African	24		1.000			1.000
EGP_HISP-PANEL	Hispanic	44	0.045	0.955		0.023	0.977
EGP_CEPH-PANEL	European	44		1.000			1.000
EGP_AD-PANEL	African American	30		1.000			1.000
EGP_ASIAN-PANEL	Asian	48		1.000			1.000

Figura 64. Frecuencias genotípicas y alélicas de la variante c.2242G>A, descriptas en SNPdb (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=28991292)

Una delección heterocigota ha sido identificada en dos pacientes por PCR-Secuenciación, la c.2007-11_2007-9del3 (-CTT). El amplicón correspondiente al exón 12 y sus regiones consenso de splicing fueron clonados en el vector pGEMT con el objetivo de evidenciar los alelos materno y paterno. Dado que dicha delección aparece descripta como

polimorfismo nos propusimos realizar un estudio en población argentina para determinar su frecuencia.

Para el análisis predictivo de impacto funcional de sustituciones nucleotídicas en regiones consenso de *splicing* se recurrió al servidor ESEfinder. Las secuencias ESE o regiones *enhancer* de *splicing*, son secuencias de alta prevalencia y de amplia distribución a lo largo de genes de mamíferos que presentan un rol fundamental en la regulación del empalme adecuado de exones y la correcta remoción de intrones durante el procesamiento de mensajeros primarios. Dichas secuencias son sitios de reconocimiento específico para un grupo muy conservado de proteínas ricas en residuos serina/arginina conocidas como proteínas SR. Esta familia de factores de *splicing* se encuentra estructuralmente conservada, presentando en términos generales dos motivos estructurales característicos: un dominio de unión a ARN (RRM: *RNA-recognition Motif*) o sitio de reconocimiento de secuencias ESE y un dominio rico en di péptidos de serina-arginina (RS) responsable de interactuar con otras proteínas (Graveley et al. 2000). Al unirse a secuencias ESE, las proteínas SR promueven el reclutamiento de la maquinaria de empalme y la consecuente identificación de los sitios consenso de *splicing* para cada uno de los exones. Así mismo tienen la capacidad de antagonizar el efectos de elementos silenciadores vecinos (Graveley et al.2000). El ESEfinder utiliza la información experimental obtenida de ensayos funcionales in vitro de identificación de motivos ESE según la estrategia *systematic evolution of ligands by exponential enrichment* (SELEX) y bases de datos de sitios consenso de *splicing* (dbCASE). A través de su matriz de datos es posible predecir sitios ESE presentes en la secuencia incógnita a analizar así como también las interacciones de dichas secuencias con diferentes proteínas SR. Si una sustitución en un sitio consenso de *splicing* modifica el patrón de interacción con dichas proteínas, la predicción indica que dicho cambio en la secuencia presentaría un procesamiento alternativo del mensajero primario. Éste fue el caso de la delección identificada c.2007-11_2007-9del3 (-CTT). En cambio para el otro polimorfismo descrito en el gen de TPO, analizado desde el punto de vista de su efecto sobre el proceso de *splicing* c.2215 +5 A>C no se observó un efecto sobre el mismo. Esto demuestra cómo el uso de los algoritmos predictivos utilizados resulta una herramienta sumamente útil aportando información valiosa para la proyección de ensayos funcionales

de las alteraciones identificadas, de manera de optimizar recursos ante sustituciones cuyo impacto puede ser leve o nulo desde el punto de vista estructural y funcional. En nuestro caso, ensayos futuros funcionales de minigenes resultarán de gran utilidad para determinar el efecto de la delección c.2007-11_2007-9del3 (-CTT) sobre el mecanismo de *splicing*.

Tal como se mencionara anteriormente la TPO presenta un rol protagónico en la síntesis de hormonas tiroideas. La mayoría de los casos con defectos de organificación presentan mutaciones en el gen de TPO (Ris-Stalpers y Bikker et al. 2010). El fenotipo más frecuentemente observado corresponde a defectos permanentes, pudiendo evidenciarse mutaciones inactivantes bialélicas tanto en TPO como en DUOX2, ya sea de manera homocigota o bien como compuestos heterocigotas de mutaciones diferentes. Los casos monoalélicos para TPO podrían ser resultado de la inactivación al azar del segundo alelo normal. En organismos diploides eucariotas existen tres clases de expresión monoalélica: inactivación al azar del X, inactivación parental autosómica conocida como “*imprinting*”, y expresión monoalélica al azar de genes autosómicos (como sucede en los genes de la inmunoglobulinas, de receptores de células T, de interleuquinas, receptores de células *natural killer* o receptores olfativos, entre otros) (Gimelbrant et al. 2007). Gimelbrant y colaboradores reportaron que este último mecanismo se encuentra presente en alrededor del 5 al 10% de los 4000 genes autosómicos evaluados en líneas celulares estables. Así mismo, la remodelación cromatínica, poliadenilación alternativa, modificación de histonas, editado de ARN y regulación por microARNs, son algunos de los mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales alternativos que podrían explicar la expresión monoalélica de TPO.

Adicionalmente, la presencia accesorias de polimorfismos en el gen de TPO que secunden a una mutación única encontrada en dicho gen, podría tener un efecto no despreciable en la expresión de la patología. Si bien es consenso internacional el no asociar a fenotipo la presencia de polimorfismos en materia de patologías hereditarias, existen numerosos reportes de variantes de secuencias ampliamente distribuidas en la población que muestran un efecto neto funcional sobre la proteína en la que están presentes.

De todas formas, es importante destacar que existen regiones regulatorias no exploradas desde el punto de vista funcional durante el transcurso del presente trabajo, así como tampoco se exploró la potencial presencia de mutaciones en los genes DUOX2, DUOXA2,

DUOX1, DUOX1A1, que podrían asociarse a expresiones monoalélicas de los genes de TPO.

Capítulo 3

SÍNDROME DE RESISTENCIA A HORMONAS TIROIDEAS

3.1 INTRODUCCIÓN

La incidencia de RHT es de 1 caso en 40.000 nacidos vivos, con más de 1000 casos conocidos (Refetoff et al. 1993; Chatterjee et al. 1996; Weiss et al. 2000) y se caracteriza por una disminución de la respuesta a las HT por parte de los tejidos centrales y periféricos (Refetoff et al. 1982; Lamberg et al. 1973). El cuadro clínico en los pacientes es muy variable e incluye bocio, signos de hipertiroidismo e hipotiroidismo, baja estatura, deficiencia en la maduración ósea e hiperactividad con déficit de atención (Usala et al. 1990). El síndrome se caracteriza por una elevación de las HT libres y un nivel normal o elevado pero inapropiado de TSH. Mutaciones en los genes que codifican para los receptores son responsables de RHT y se ha asociado principalmente a mutaciones en el gen THRbeta en forma autosómica dominante (Sakurai et al. 1990).

En antiguas clasificaciones la RHT fue subdividida en función de la base clínica en resistencia generalizada, hipofisaria y resistencia de los tejidos periféricos. Esta subclasificación parecía tener utilidad clínica en base a los síntomas y signos, pero no tiene una base etiológica que la justifique ya que se identificaron en las distintas formas de RHT mutaciones en el gen THRbeta idénticas y no muestran diferencias de laboratorio distintivas.

La ausencia de mutaciones identificadas en el gen THRAalfa en individuos con RHT ha sido motivo de discusión durante años. Se ha propuesto que sus productos jugarían un rol menor como receptores o que los defectos del THRAalfa serían letales y como lógica consecuencia incompatibles con la vida, e incluso que ocasionarían un fenotipo diferente al de RHT.

En la última década se han creado ratones *Knock in* portando diferentes mutaciones en el gen *THR α* en uno o ambos alelos con el objeto de dilucidar el efecto. Estos ratones no presentaron anormalidades en las pruebas de función tiroidea (Ying H. et al, 2007; Sjogren et al. 2007), Sin embargo la introducción de mutaciones en ambos alelos no resultó letal para los embriones, pero murieron poco tiempo después del nacimiento (Kaneshige et al. 2001), mientras que alteraciones en solo uno de los alelos resultó en enanismo y otras anomalías claramente distinguibles de las causadas por mutaciones en el gen *THR*. Estos resultados serían consistentes con la ausencia de mutaciones identificadas en el gen *THR α* en individuos con RHT. Sin embargo, en el año 2012 se ha descrito por primera vez un caso esporádico de RHT en un paciente, debida a una sustitución en el gen *THR α* (c.1207G>T, p.E403X), con efecto dominante negativo, cuyo fenotipo es más profundo en aquellos órganos en los que prevalece este tipo de receptores, como esqueleto, tracto gastrointestinal y miocardio (Bochukova et al. 2012).

Las mutaciones más frecuentes en el gen *THR β* originan sustitución de un aminoácido. Inserción o deleción con cambio del marco de lectura fueron identificadas en muy pocos casos. Las mutaciones del gen *THR β* descritas ligadas a RHT se localizan en el dominio LBD y la región *hinge* adyacente. La mayoría de estas mutaciones fueron identificadas en los exones 9 y 10, resultando en una variable reducción de la afinidad de T_3 por el receptor (Weiss et al. 1994, 1996; Pohlenz et al.1996; Di Fulvio et al. 1997; Nagashima et al. 1997). También se han identificado mutaciones en la región *hinge*.. Un ejemplo de las últimas es una sustitución de alanina por treonina en el codón 234. Esta mutación está localizada en el exón 7 a solo 9 aminoácidos del dominio LBD (el dominio de unión a T_3 se extiende desde la posición 243 al extremo carboxilo terminal), indicando que esta área lindante afecta de alguna forma también a la unión de T_3 . En la Figura 65 se muestra la estructura del *THR β* con ambos dominios separados por una región *hinge* y los clusters en los que se agrupan las mutaciones.

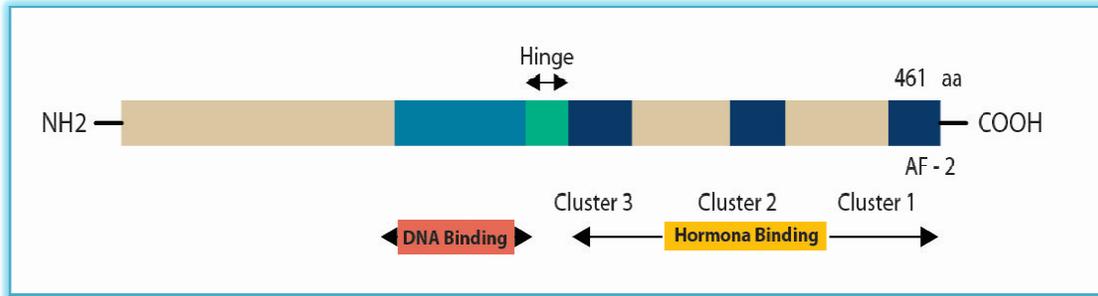


Figura 65. Representación esquemática de la organización estructural del péptido del receptor beta de hormonas tiroideas.

En esta patología el receptor mutado ejerce un efecto negativo sobre el normal, siendo éste un modelo ideal para el estudio del mecanismo patogénico de las enfermedades hereditarias dominantes, en contraste con el patrón de herencia autosómico recesivo postulado para la mayoría de los síndromes tiroideos.

En el caso de la familia en la se describió una mutación que origina la resistencia es debida a una delección completa de la región codificante del gen THRbeta, la herencia fue autosómica recesiva. Los tres miembros afectados de esta familia presentaron delección de ambos alelos (materno y paterno) mientras que el gen THRalfa se encontraba normal. Esto demuestra que la falta del gen THRbeta permite la sobrevida, y como probable conclusión el THRalfa 1 expresado en todos los tejidos, es funcionalmente capaz de sustituir parcialmente al THRbeta. Los individuos heterocigotas de esta familia con delección en uno de los dos alelos THRbeta no tienen anormalidades clínicas o de laboratorio, indicando que son portadores de la enfermedad y que la expresión de un solo alelo es suficiente para una función normal. El mecanismo de herencia dominante de la RHT se debe a una interferencia negativa del receptor mutado con la función del receptor normal, por efecto competitivo que disminuye el número de receptores normales que se unen a los sitios TRE en los genes regulados por HT, reduciendo el número de unidades de receptores funcionalmente activos. En el caso de la delección total de la región codificante y como consecuencia de no existir la formación de un receptor mutado que interfiera, los individuos de la familia con un solo alelo afectado se comportan como portadores heterocigotas de una enfermedad autosómica recesiva, y permite un funcionamiento correcto del receptor expresado por el alelo normal. Los individuos heterocigotas portando mutaciones puntuales en el gen THRbeta, corresponden al grupo que presenta la mayor

anormalidad de la función tiroidea. Por tanto la forma de RHT más severa sucede cuando el receptor mutado es expresado, en lugar de cuando está completamente ausente, debido posiblemente, a que los receptores TR β pueden interferir también con el funcionamiento de los TR α . Estudios llevados a cabo durante la última década, han establecido los requerimientos básicos para que los receptores TR β mutados ejerzan el efecto de dominancia negativa. Éstos incluyen, la preservación de unión a los sitios TRE en el ADN y la habilidad para dimerizarse ya sea con una molécula homóloga como heteróloga. Estos criterios se aplican a receptores mutados con actividad de unión a T₃ alterada. Además, un efecto dominante negativo puede ser ejercido a través de la asociación alterada con un cofactor aún en la ausencia de deterioro importante para la unión con T₃ (afinidad aumentada de un receptor mutado a un correpresor o asociación reducida con un coactivador). Estas conclusiones se basan en la evidencia experimental directa como en las observaciones que correlacionan la localización de mutaciones en la molécula del receptor y las consecuencias clínicas. En primer lugar, la introducción en un TR β mutado de una mutación artificial adicional que suprime la unión al ADN, la dimerización o la asociación con un correpresor resulta en la abolición de su efecto dominante negativo. En los genes regulados positivamente por HT el efecto dominante negativo ocurre por la formación de un complejo entre el receptor mutado y los correpresores nucleares con supresión de la transcripción (Sakurai et al. 1990; Nagaya et al. 1993; Yoh et al. 1997; Tagami et al. 1998). Por el contrario, en los genes regulados negativamente, como ser los genes TSHalfa y beta, el complejo entre el TR β mutante y los correpresores activan la transcripción.

Se estima que en 10 % de casos familiares de RHT no están asociados al *locus* THRbeta (Pohlenz et al. 1999), indicando la posibilidad de que también sean cofactores defectivos la causa de la gran heterogeneidad que presenta esta patología.

Solo cuatro casos de mutaciones homocigotas en el gen THRbeta han sido informados hasta el momento. El primer caso descrito corresponde al de una delección de tres pares de bases con la consecuente pérdida de la treonina 337 (Usala et al. 1991), el segundo caso identificado fue debido a la ausencia completa de ambos alelos THRbeta (Takeda et al. 1992), en cuyo caso la transmisión resultó recesiva por la ausencia del efecto dominante negativo. Recientemente se identificaron dos nuevas mutaciones con presencia alélica

homocigota en tres pacientes con RHT. La mutación c.1325G>A; p.G347E, reportada previamente en individuos heterocigotas de una misma familia y la mutación c.1231C>T; p.R316C, recientemente descrita (Ferrara et al. 2012). La homocigosis aparente de un quinto caso (Frank-Raue et al. 2004), sería en realidad el resultado de una delección del alelo paterno junto a una sustitución c.1123T>G; p.I280S de origen materno, produciendo en realidad un compuesto heterocigota.

La cristalografía ha permitido interpretar a estos receptores tridimensionalmente y ha proporcionado ideas acerca de la disfunción provocada por diferentes mutaciones. Si bien éstas se agrupan en tres regiones *clusters*, el modelo tridimensional revela que la mayoría de las mutaciones identificadas se localizan alrededor del bolsillo que aloja HT. Esta proximidad explicaría la defectuosa unión del ligando aún en casos en que las alteraciones no se ubiquen directamente en el bolsillo y explicaría también por qué los receptores mutados se diferencian unos de otros en otras funciones tales como interacciones con correpresores, con coactivadores y dimerización. Por ejemplo, estudios llevados a cabo sobre dos receptores mutados identificados en pacientes con RHT (p.R316H y p.A317T) evidenciaron que si bien en ambos casos la afinidad por la hormona se encontraba disminuida, p.A317T mantiene intacta la capacidad de dimerización, mientras que p.A316H solo es capaz de establecer heterodímeros (Russell Huber et al. 2003). Se muestran en la Tabla 14 todas las mutaciones identificadas hasta el momento en los exones 7, 8, 9 y 10.

Tabla 14: Mutaciones descritas en el gen THRbeta.

<i>Exón 7</i>	<i>Exón 8</i>		<i>Exón 9</i>			<i>Exón 10</i>			
A234T	P247L	V284I	C298A	V319K	R338W	R383H	R424 K	K443N	L454S
A234X	G251E	V284R	C298R	R320C	Q340H	P384R	K424A	V444R	L454T
Q235R	V264D	D285A	E299A	R320H	K342I	V389A	T426R	C446R	L454V
R243Q	L266K	K288A	I302A	R320L	N343L	V389K	T426I	C446X	F455L
R243W	A268G	K289A	I302M	Y321C	G344A	E390R	D427A	T448R	L456R
	F269A		I302R	D322H	G344E	E393R	L428R	E449R	E457A
	H271R		I302V	D322N	G345A	Q396R	R429A	E449X	E457D

	K274E		L305I	E324R	G345D	L400R	R429Q	L450H	E457K
	I276L		K306A	L328S	G345R	L410R	R429W	F451C	E457R
	I276N		K306E	T329N	G345S	Y406K	M430R	F451I	E457T
	T277R		C309A	L330F	G345V	Y409K	I431T	F451L	V458A
	A279V		C309K	L330S	L346V	R410A	A433R	L451S	V458E
	I280K		C309W	G332E	G347E	H413R	C434X	F451X	V458G
	I280M		M310I	G332R	V348E	V414K	C434R	P453A	V458M
	I280S		M310L	E333D	V348R	V414L	H435L	P453H	F459C
	T281V		M310T	E333Q	V349M	H416R	H435Q	P453L	E460K
	T281R		E311K	M334K	D351A	W418K	S437R	P453N	
	T281Q		A312T	M334R	D355A	P419R	R438C	P453S	
	T281L		M313T	M334T	M358A	K420A	R438H	P453T	
	T281I		S314C	V336M	S361R	L421R	L440R	P453Y	
	V283A		S314F	T337A	N364R	L422R	M442T	P453X	
	V283M		S314Y	T337H	D366R	R423H	M442V	L454A	
	V284A		R316H	T337I	D367R	R423M	K443E	L454R	
			A317T	R338L					

DELECCIONES DESCRIPTAS :

c.12971304delGCCTGCCA

c.1305_1306insT

c.1358-1359insC

MÉTODOS Y MATERIALES

3.2 Caracterización Clínica - Bioquímica de Pacientes con posible presencia de mutaciones en el Gen de THR.

Aspectos Éticos

El protocolo de estudio fue aprobado por los Comités de Ética, Investigación y Docencia de los siguientes hospitales:

Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez de Buenos Aires, Argentina

Hospital de Pediatría “Prof. Dr. Juan Pedro Garrahan” de Buenos Aires, Argentina

Hospital Ramos Mejía

Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina

Hospital Universitario de Salamanca, España

Hospital Clínico Magallanes “Dr. Lautaro Navarro Avaria”, Punta Arena, Chile

Las familias participantes en la presente tesis firmaron el correspondiente consentimiento informado, luego de ser debidamente asesoradas por el personal médico responsable del diagnóstico, haciendo referencia a los alcances y limitaciones del protocolo utilizado. Se respetaron los principios éticos detallados en la sección 2.2.

Población estudiada:

Se estudiaron once pacientes y sus respectivas familias, 2 provenientes del Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE) Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, 1 del Hospital de Pediatría “Prof. Dr. Juan Pedro Garrahan”, 1 del Hospital Italiano, 1 del Hospital Ramos Mejía, 1 del Hospital Clínico Magallanes “Dr. Lautaro Navarro Avaria” y 5 del Hospital Universitario de Salamanca.

3.2. 1 Cuadro clínico-bioquímico de los casos analizados.

Las determinaciones hormonales se hicieron según la metodología descrita en la Sección 2.2.

Caso 1:

Paciente **23119, LSP.**

Hospital Universitario de Salamanca, España

Paciente nacido el 19-08-1992. Se detectó presencia de bocio en su primer consulta a los 18 años. Bocio 0b/III. Las determinaciones hormonales arrojaron los siguientes resultados.

TSH (uUI/ml)	T₃ libre (pg/dl)	T₄ total (ug/dl)	T₄ libre (ng/dl)	Anticuerpos antitiroideos
4,10	1,9	12,6	2,7	Negativos
VN: 0,2-5	VN: 0,8-2,8	VN:6-16,8	VN:0,7-1,8	

El valor de TG resultó normal. La RMN hipofisaria mostró una lesión focal hipointensa postero-central sugerente de quiste de Pars intermedia por lo cual se recomienda nuevo control por RMN. No existían tiroidopatías como antecedentes familiares. No se realizó test de supresión con L-T3 (200 microgramos) al no estar comercializada en España. RMN.

Caso 2:

Paciente **27356, DHH**

Hospital Universitario de Salamanca, España

Paciente nacido el 04-07-1979. Se presentó a los 24 años a la primer consulta presentando Bocio 0b/III. Se detallan a continuación las determinaciones hormonales:

TSH (uUI/ml)	T₃ libre (pg/dl)	T₄ total (ug/dl)	T₄ libre (ng/dl)	Anticuerpos antitiroideos
7,74	2,6	16,5	2,7	Negativos
VN: 0,2-5	VN: 0,8-2,8	VN:6-16,8	VN:0,7-1,8	

Fue medicado desde Octubre de 2003 hasta Diciembre de 2004 con Tirodril 15mg/día y Emconcor 10mg/día. Por escaso beneficio, dicho tratamiento fue suspendido, incluso el paciente presentó niveles más elevados de T4 libre. Anticuerpos antitiroideos resultaron negativos y la RMN hipofisaria, normal. En cuanto a sus antecedentes familiares puede citarse su madre con T4 libre elevada, TSH normal, ACTPO y ATG positivos.

Caso 3:

Paciente **27357, MMD**

Hospital Universitario de Salamanca, España

Paciente nacido el 11-12-1938. Su primera consulta fue a los 73 años. Presentaba Hemitiroidectomía izquierda por BMN, Bocio 0b/III derecho. Fue tratado con Tirodril 5mg durante un mes el cual fue posteriormente suspendido. RMN hipofisaria normal. No presenta antecedentes familiares de tiroidopatías. Sus últimas determinaciones hormonales pueden visualizarse a continuación:

TSH (uUI/ml)	T₃ libre (pg/dl)	T₄ total (ug/dl)	T₄ libre (ng/dl)	Anticuerpos antitiroideos
3,84	1,8	17,9	2,8	Negativos
VN: 0,2-5	VN: 0,8-2,8	VN:6-16,8	VN:0,7-1,8	

Su TG se encuentra dentro de límites normales. No se realizó test de supresión con L-T3 (200 microgramos) al no estar comercializada en España.

Caso 4:

Paciente 27367

Hospital Universitario de Salamanca, España

Paciente de 14 años que se presenta a la consulta con bocio 0b/III. Se encuentra sin tratamiento. La determinaciones hormonales muestran los siguientes resultados:

TSH (uUI/ml)	T₃ libre (pg/dl)	T₄ total (ug/dl)	T₄ libre (ng/dl)	Anticuerpos antitiroideos
6,55	3	15	2,8	Negativos
VN: 0,2-5	VN: 0,8-2,8	VN:6-16,8	VN:0,7-1,8	

Caso 5:

Paciente PAA.

Hospital de Pediatría “Prof. Dr. Juan Pedro Garrahan”

Paciente nacido el 04/05/2002. El paciente consulta por primera vez a los 3.5 años de edad en Posadas por presentar bocio, taquicardia y valores de hormonas tiroideas elevadas con TSH dentro de valores normales. El niño presentaba una edad ósea de 3 años, acorde a su edad cronológica y ecografía tiroidea con glándula tiroidea aumentada de tamaño, sin imágenes sólidas ni quísticas (LD 35 x 19 x 21 mm y LI 36 x 20 x 22 mm) Se muestran a continuación los valores obtenidos de dichas determinaciones hormonales.

TSH (uUI/ml)	T₃ libre (pg/dl)	T₄ total (ug/dl)	T₄ libre (ng/dl)	Anticuerpos antitiroideos
6,74	3,74	18,8	3,11	Negativos
VN: 0,97-4,32	VN: 1,04-2,18	VN: 6,9-13	0,93-1,94	

Se le indicó iniciar tratamiento con Metimazol 10 mg/día, asumiendo al paciente con hipertiroidismo. Bajo este tratamiento se evidenció moderado descenso de T4 (11-16 ug/dl) y aumento de TSH (45 mUI/ml) con progresivo agrandamiento del bocio.

Fue derivado para su tratamiento al hospital de Pediatría Garrahan a los 11 años con tasa y talla acorde a la edad, frecuencia cardíaca normal (70 x minuto), bocio gigante que deformaba el cuello, dificultad en el aprendizaje por déficit atencional y los siguientes valores hormonales bajo tratamiento con Metimazol 10 mg/día.

TSH (uUI/ml)	T₃ libre (pg/dl)	T₄ total (ug/dl)	T₄ libre (ng/dl)	Anticuerpos antitiroideos
13.68	4.15	11,8	1,82	Negativos
VN: 0,97-4,32	VN: 1,04-2,18	VN: 6,9-13	0,93-1,94	

Se repiten dosajes hormonales luego de 1 mes de haber suspendido el tratamiento con Metimazol.

TSH (uUI/ml)	T₃ libre (pg/dl)	T₄ total (ug/dl)	T₄ libre (ng/dl)	Anticuerpos antitiroideos
1,88	3,64	17	2,39	Negativos
VN: 0,97-4,32	VN: 1,04-2,18	VN: 6,9-13	0,93-1,94	

La ecografía tiroidea mostró glándula tiroidea aumentada globalmente de tamaño con ecoestructura heterogénea, con imágenes quísticas de diferentes tamaños, difusamente distribuidas con moderado aumento de la vascularización, istmo engrosado de similar ecoestructura, sin adenomegalias regionales. Lóbulo derecho: 124 cm³, Lóbulo izquierdo: 85.5 cm³. Ante la sospecha de RTH se decidió suspender el metimazol y se indicó resección quirúrgica del bocio. El peso de la pieza quirúrgica fue de 250 grs. La anatomía patológica mostró hiperplasia nodular.

Caso 6:Paciente **CA**.**Hospital Ramos Mejía**

Paciente con Bocio Nodular, anticuerpos antitiroideos y las siguientes determinaciones hormonales.

TSH (uUI/ml)	T₃ libre (pg/dl)	T₄ total (ug/dl)	T₄ libre (ng/dl)	Anticuerpos antitiroideos
2,48	--	16	1.56	Negativos
VN: 0,2-5	VN: 0,8-2,8	VN: 6,9-13	VN:0,7-1,8	

Caso 7:Paciente **KA**.**Hospital Italiano**

Paciente nacido el 27-9-01 a las 37 semanas de gestación por cesárea. Su peso al nacer fue de 3,060 kg. A los 6 años y 5 meses tenía un peso de 17.7 kg, p 3-10; talla 114.2 p 25-50, prepuber, un bocio importante, FC 88-104 x min, TA 88/45. Cursaba el primer grado en el colegio, su desempeño es normal. No presenta antecedentes familiares de patología tiroidea. Las determinaciones hormonales al momento de la consulta se muestran a continuación:

TSH (uUI/ml)	T₃ libre (ng/dl)	T₄ total (ug/dl)	T₄ libre (ng/dl)	Anticuerpos antitiroideos
2,63	241	16,8	2,74	Negativos
VN: 0,2-5	VN: 80-220	VN: 6,9-13	VN:0,7-1,8	

Las determinaciones fueron repetidas el 24-11-11 observándose los resultados siguientes:

TSH (uUI/ml)	T₃ libre (ng/dl)	T₄ total (ug/dl)	T₄ libre (ng/dl)	Anticuerpos antitiroideos
5,42	297	22,8	3,19	Negativos
VN: 0,2-5	VN: 80-220	VN: 6,9-13	VN:0,7-1,8	

La ecografía mostró una glándula tiroides de mayor tamaño, heterogénea con presencia de quistes coloides. El último control demostró las siguientes determinaciones hormonales:

TSH (uUI/ml)	T₃ libre (ng/dl)	T₄ total (ug/dl)	T₄ libre (ng/dl)	Anticuerpos antitiroideos
3,27	260	14,9	2,4	Negativos
VN: 0,2-5	VN: 80-220	VN: 6,9-13	VN:0,7-1,8	

Su peso fue de 18,4 kg y su talla de 114,5 cm. Presentó taquicardia, FC 100 x Min.

Caso 8:

Paciente **RMM**.

Hospital Clínico Magallanes “Dr. Lautaro Navarro Avaria”, Punta Arena, Chile

Paciente sin síntomas ni signos de hipertiroidismo, hijo único de padres no consanguíneos. Embarazo con diabetes gestacional, recién nacido en término. Peso 3,608 kg, talla 51, sin patología perinatal ni otros antecedentes. Desde aproximadamente los dos años de edad acude por poligastro constipación. Tratado con polietilenglicol con buen resultado. Obeso desde lactante, actualmente con hiperactividad. FC 92 x min. Presenta hiperactividad. Ecocardiografía Normal. Padres con niveles hormonales tiroideos normales. Se muestran dos determinaciones hormona, las que llevó a la consulta y un control realizado a los dos meses.

TSH (uUI/ml)	T₃ libre (pg/dl)	T₄ total (ug/dl)	T₄ libre (ng/dl)	Anticuerpos antitiroideos
0,45	501,8 ng/dl	24,86	2,28	Negativos
0,56	361,0		1,76	Negativos
VN: 0,2-5	VN: 80-220	VN: 6,9- 13	VN:0,7-1,8	

Caso 9:

Paciente VC

Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez

El paciente, de 5 años de edad es derivado del CEDIE como consecuencia de las determinaciones hormonaes descriptas a continuación. La RMN hipofisaria fue normal. No existen tiroidopatías como antecedentes familiares.

TSH (uUI/ml)	T₃ libre (pg/dl)	T₄ total (ug/dl)	T₄ libre (ng/dl)	Anticuerpos antitiroideos
5,08	3,75	15	2,67	Negativos
VN: 0,97-4,32	VN: 1,04- 2,18	VN: 6,9-13	VN:0,7-1,8	

Caso 10:

Paciente 29342

Hospital Universitario de Salamanca, España

Paciente de 19 años con presencia de Bocio 0b/III. Se encontraba sin tratamiento en el momento de la consulta. Se muestran a continuación los resultados de las determinaciones hormonales indicadas

TSH (uUI/ml)	T₃ libre (pg/dl)	T₄ total (ug/dl)	T₄ libre (ng/dl)	Anticuerpos antitiroideos
7,2	2,7	16,5	3	Negativos
VN: 0,2-5	VN: 0,8-2,8	VN:6-16,8	VN:0,7-1,8	

Caso 11:Paciente **SG****Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez**

Paciente de 5 años de edad. Consulta por bocio. Se indican a continuación las determinaciones hormonales.

TSH (uUI/ml)	T₃ libre (pg/dl)	T₄ total (ug/dl)	T₄ libre (ng/dl)	Anticuerpos antitiroideos
4	2,08	14	2,6	Negativos
VN: 0,97-4,32	VN: 1,04- 2,18	VN: 6,9-13	VN:0,7-1,8	

3.3 Identificación de mutaciones en el Gen del THRbeta.**3.3.1. Extracción, purificación de ADN genómico de sangre periférica y cuantificación.**

Los procedimientos se describen en las Secciones 2.3.1 y 2.3.2.

3.3.2. Amplificación de Fragmentos de ADN: Reacción en Cadena de la Polimerasa- PCR.

Las reacciones fueron realizadas en 100 ul, utilizando un “*buffer standard*” de PCR (5X Colorless Go Taq Buffer, Promega, Madison, Co), conteniendo 225 - 250 ng de ADN genómico, 1,5 mM de MgCl₂, solución 200 uM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), 4 % de dimetilsulfóxido, 2 U de Taq polimerasa (Promega) y 50 pmoles de cada “*primer*”

"forward" y "reverse". Se incluyeron en cada amplificación controles negativos que no contenían ADN.

Las condiciones se pusieron a punto a partir de ADN de controles normales para pasar posteriormente a la amplificación en los pacientes y sus familiares. En la tabla 15 se indica la secuencia de los primers para la amplificación del gen THRbeta.

Tabla 15: Secuencia de los *primers* para la amplificación del gen THRbeta.

Exón	Primers Forward		Tamaño del fragmento (pb)	Primers Reverse	
	Posición del extremo 5'	Secuencia nucleotídica (5'→ 3')		Posición del extremo 5'	Secuencia nucleotídica (5'→ 3')
7	-40	agcttgctgtgtatcttggg	352	+66	agtatccaaggtgatgagg
8	-124	tgtaagacggccagtgatgtgaatggatg tacagg	431	+124	caggaagctatgaccgacgtt gctttcatatgattaagtccc
9	-40	ctggcattttgaattcgttctttgctg	344	+42	aaagctctttggatccccactg ag
10	-44	ccttccatctctgcagcaatgtccatc	312	+26	gaattatgagaatgaattcagt cagt

Las posiciones nucleotídicas indican la distancia a los sitios dadores y aceptores de *splicing* de cada exón, respectivamente.

Tabla 16 : Condiciones de PCR para los exones del gen THRbeta a analizar.

Exón	Buffer 5X (ul)	DMSO (%)	dNTPs (ul)	PRIMER F (50pmoles)	PRIMER R (50pmoles)	DNA Taq Pol (ul)	DNA (ng)	TEMPRATURA ANN. °C
7	20	4	2	1	1	0.4	250	57
8	20	4	2	1	1	0.4	225	55.5
9	56	4	2	1	1	0.4	225	56
10	56	4	2	1	1	0.4	250	56

Condiciones generales de ciclado:

- | | | | |
|---|---------------------------|-------------|-------------|
| - | Desnaturalización inicial | 3 minutos | 95°C |
| - | 40 ciclos de: | | |
| | ➤ Desnaturalización | 30 segundos | 95°C |
| | ➤ <i>Annealing</i> | 30 segundos | 55,5 - 57°C |
| | ➤ Extensión | 60 segundos | 72°C |
| - | Extensión final | 10 minutos | 72°C |

Equipo utilizado: Ciclador Térmico Eppendorf Mastercycler.

3.3.3 Purificación de productos de amplificación.

Según Sección 2.3.5

3.3.4. Secuenciación por Electroforesis capilar.

Según Sección 2.3.6.

3.3.5. Búsqueda de variantes en la secuencia en bases de datos informáticas.

Según Sección 2.3.7.

3.3.6 Estudio poblacional de variaciones de secuencia por *Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)*.

Se analizó por esta técnica la alteración no descrita en bibliografía **p.P452L** con el objeto de determinar si se trata de una mutación o de un polimorfismo. Para ello los productos de PCR del exón 10 a partir del paciente con la alteración y 102 cromosomas normales fueron analizados en geles de agarosa al 8% sin glicerol. Se corrió a 160 V durante 5 horas. Los detalles de la técnica se describen en la Sección 2.3.9.

3.4 Estudio Bioinformático de las Mutaciones Identificadas.

Se realizó el análisis de homología proteica, de predicción de la estructura proteica secundaria, de la predicción del impacto funcional de las sustituciones aminoacídicas que fueron identificadas. Ver Sección 2.4.

En el caso del THRbeta, los estudios 3D se basaron en diferentes estructuras cristalográficas correspondientes al dominio de unión al ligando de la isoforma B1 del receptor de T₃ humano.

-PDB 1NAX: resolución 2.70Å. Aminoácidos: 211-460

Valores Pro Q:

LGscore 5.664

MaxSub 0.486

-PDB 3GWS: resolución 2.20 Å. Aminoácidos 202-460

Valores Pro Q:

LGscore 6,277

MaxSub 0,569

-PDB 1BSX: resolución 3.60 Å. Aminoácidos 211-460 co-cristalizado con el péptido KHKILHRLQLDSS (Aminoácidos 687-698) del coactivador GRIP.

Valores Pro Q:

LGscore 6,724

MaxSub 0,407

-PDB 3D57: resolución 2.20 Å. Homodímero. Cadena A: Aminoácidos 210-460, Cadena B: 211-460

Valores Pro Q:

LGscore 6.571

MaxSub 0.470

RESULTADOS

3.3 Identificación de mutaciones en el gen THRbeta.

PCR- secuenciación automática:

Caso 1.

No se ha identificado ninguna mutación en el paciente 23119, LSP en los exones 7, 8, 9 y 10 del gen THRbeta.

Caso 2.

Los resultados del análisis de secuenciación del exón 8 del gen THRbeta demostraron en el paciente 27356, DHH, una transversión heterocigota C>G, en la posición c.802 (GCC>GGC), que provoca la sustitución del aminoácido Alanina de la posición 268 por Glicina (p. A268G) (Figura 66). Esta mutación fue descrita en bibliografía previamente.

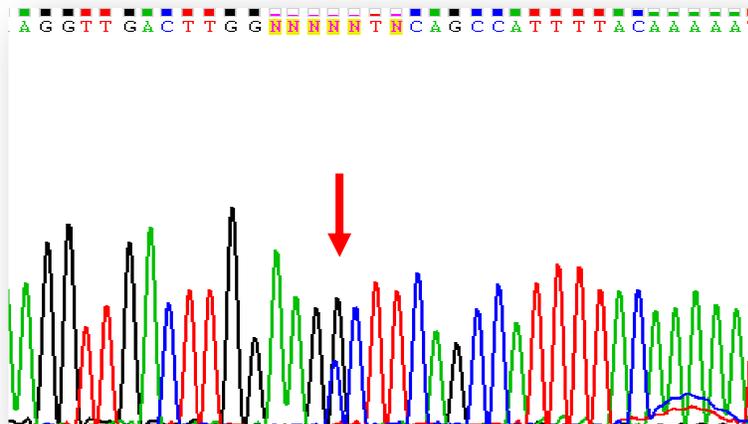
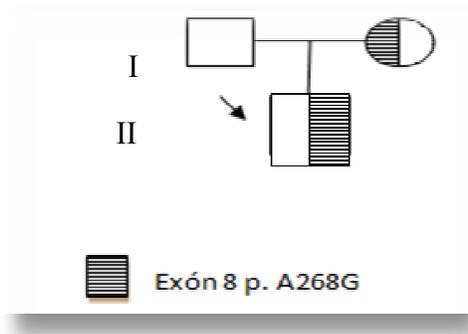
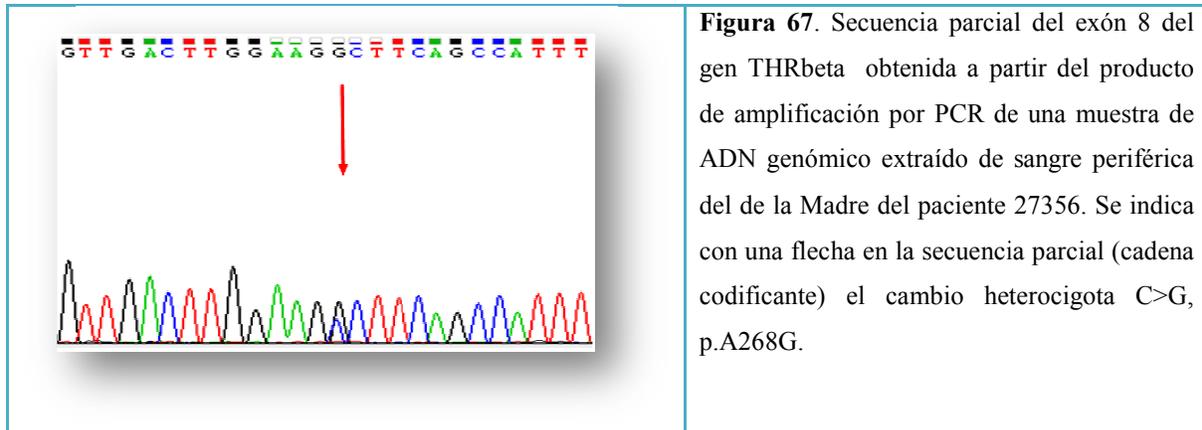


Figura 66. Secuencia parcial del exón 8 del gen THRbeta obtenida a partir del producto de amplificación por PCR de una muestra de ADN genómico extraído de sangre periférica del paciente 27356, DHH. Se indica con una flecha en la secuencia parcial (cadena codificante) el cambio heterocigota C>G, p. A268G.

Con el objetivo de determinar el origen de la mutación p.A268G, se realiza el estudio familiar, sin embargo solo fue posible disponer de una muestra de sangre de la madre. En el estudio la madre presentó la mutación p. A268G (Figura 67).



Casos 3 y 4.

En los pacientes 27357 (MMD) y 27367, el análisis de secuenciación de los exones 7, 8, 9 y 10 del gen THRBeta no demostró presencia de mutaciones.

Caso 5.

Los resultados del análisis de secuenciación del exón 10 del gen THRbeta, demostraron en el paciente PAA una transición heterocigota C>T, en la posición c.1355 (CCC>CTC) que provoca la sustitución del aminoácido Prolina 452 por Leucina (p.P452L) (Figura 69).

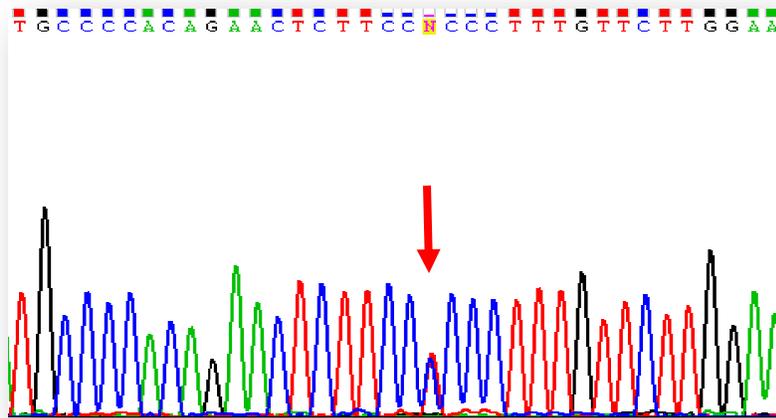


Figura 69. Secuencia parcial del exón 10 del gen THRbeta obtenida a partir del producto de amplificación por PCR de una muestra de ADN genómico extraído de sangre periférica del paciente PAA. Se indica con una flecha en la secuencia parcial (cadena codificante) el cambio heterocigota C>T, p.P452L.

Con el objetivo de determinar el origen de la mutación p.P452L, se realizó el estudio familiar, sin embargo solo fue posible estudiar la madre y el padre del paciente por falta de disponibilidad de muestras de otros familiares. La mutación resultó “de novo” ya que los padres no eran portadores de la misma (Figuras 70-72).

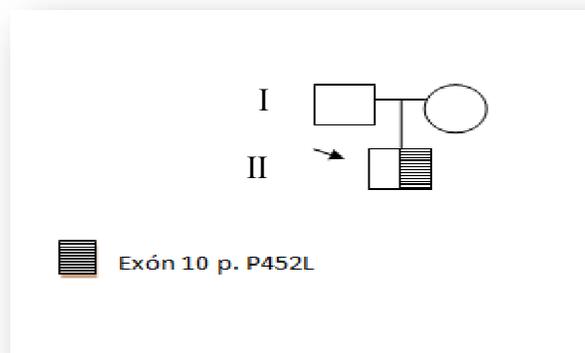
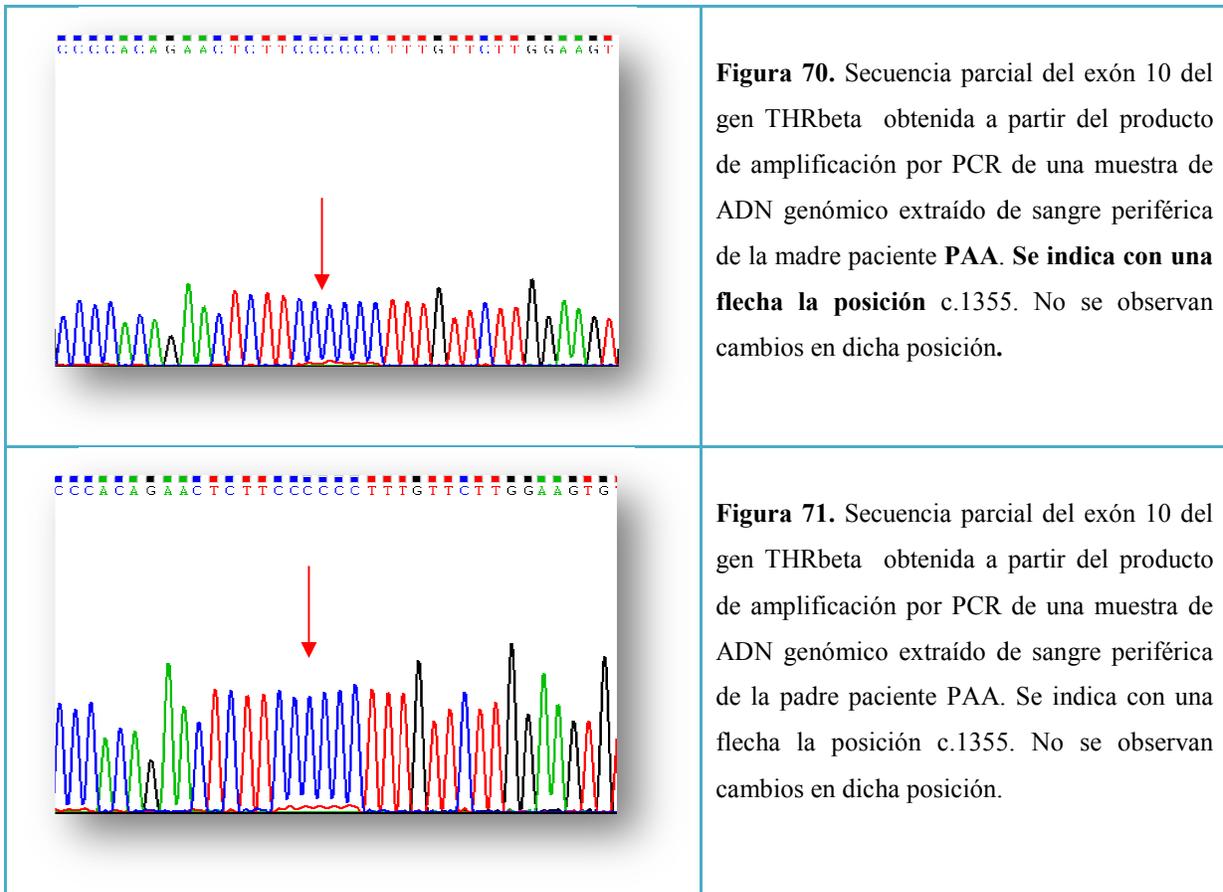


Figura 72: Estudio molecular de la familia del paciente PAA.

Estudio poblacional de la variación p.P452L por Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

Este cambio no fue descrito con anterioridad por lo que se realizó un estudio poblacional para determinar si la variación es un polimorfismo presente en al menos el 1% de la población o de lo contrario si se presenta en menos 1% siendo una mutación.

Se empleó la técnica de SSCP. En un gel de poliacrilamida al 8% sin glicerol se estudiaron 102 alelos pertenecientes de 51 controles normales pertenecientes a población argentina, siendo Argentina el país de origen del paciente (Figura 73).

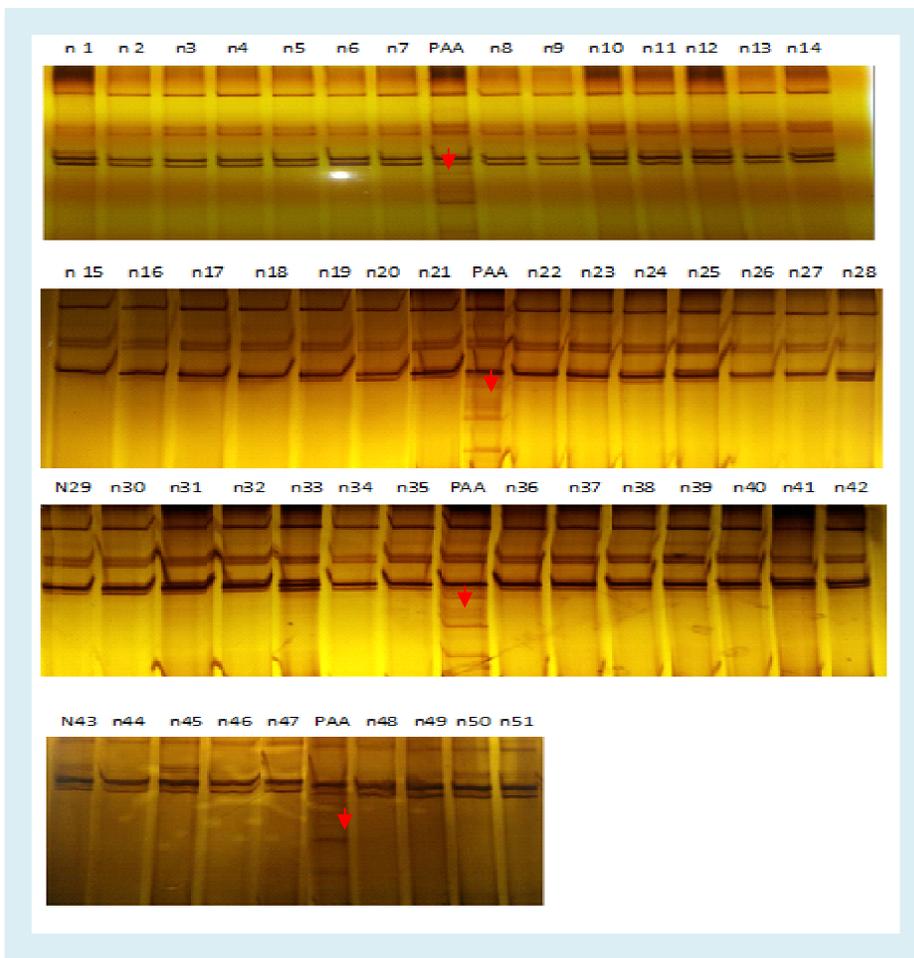


Figura 73. Estudio Poblacional. SSCP en geles de Poliacrilamida al 8% sin glicerol. Se estudiaron 102 alelos pertenecientes de 51 controles normales (N51-N52). PAA: paciente portador de la mutación p.P452L.

Caso 6.

Los resultados del análisis de secuenciación del exón 7 del gen THRbeta demostraron en el paciente CA un cambio heterocigota T/C, en la posición c.735 (TTT/TTC). Sin embargo se trató de un polimorfismo nucleotídico codificando ambos codones el aminoácido Fenilalanina en la posición 245 (p.F245F). Esta variante se considera un polimorfismo exónico, descrito previamente c.735C>T (F245F), con presencias alélicas: homocigota T, homocigota C, y heterocigota T/C. Dichas variantes no se han asociado con RHT. (Sorensen HG, 2008) (Figura 74).

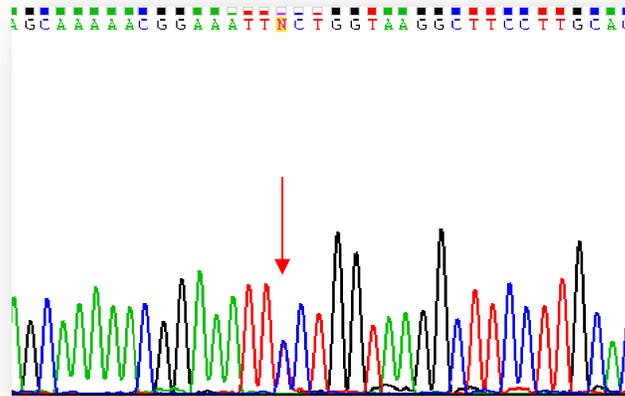


Figura 74. Secuencia parcial del exón 7 del gen THRbeta obtenida a partir del producto de amplificación por PCR de una muestra de ADN genómico extraído de sangre periférica del paciente CA. Se indica con una flecha en la secuencia parcial (cadena codificante) el cambio heterocigoto T/C, p. F245F.

Caso 7.

Los resultados del análisis de secuenciación del exón 9 del gen THRbeta demostraron en la paciente KA una transversión heterocigota G>C, en la posición c.1033, (GGT>CGT) que provoca la sustitución del aminoácido Glicina 345 por Arginina (p. G345 R). (Figura 75). Esta mutación fue descrita previamente.

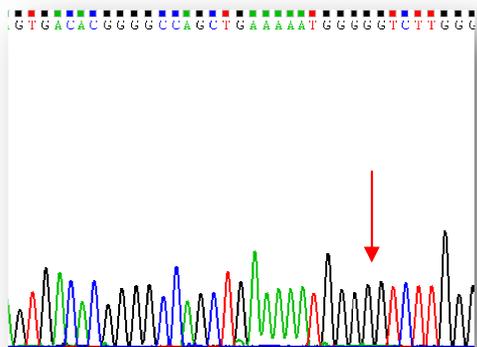


Figura 77. Secuencia parcial del exón 9 del gen THR beta obtenida a partir del producto de amplificación por PCR de una muestra de ADN genómico extraído de sangre periférica de la madre de la paciente KA. Se indica con una flecha la posición c.1033. No se observan cambios en la posición.

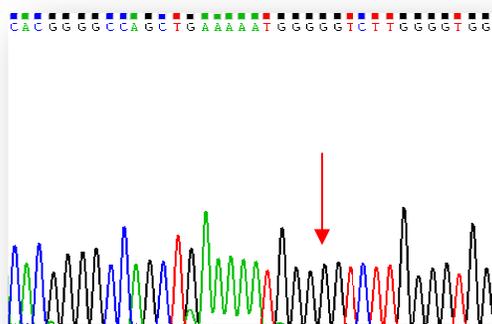


Figura 78. Secuencia parcial del exón 9 del gen THR beta obtenida a partir del producto de amplificación por PCR de una muestra de ADN genómico extraído de sangre periférica de la hermana de la paciente KA. Se indica con una flecha la posición c.1033. No se observan cambios en la posición.

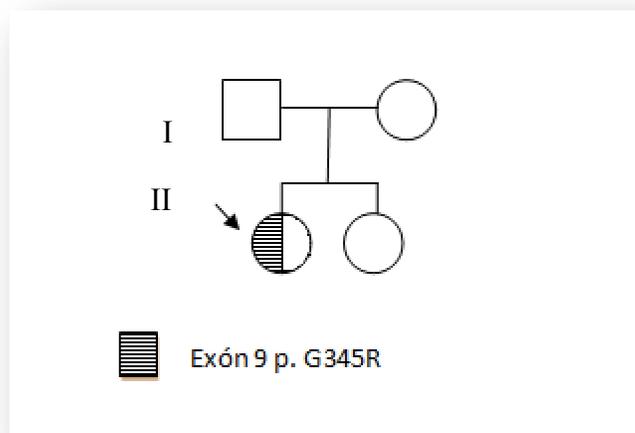


Figura 79: Estudio molecular de la familia de la paciente KA.

Caso 8.

Los resultados del análisis de secuenciación del exón 7 del gen THRbeta, demostraron en el paciente RMM un cambio heterocigota T/C, en la posición c.735, con un cambio de codón TTT>TTC y sin cambio en el aminoácido codificado, p.F245F. Este resultado se considera polimorfismo exónico descrito previamente c.735C>T (F245F) cuyas posibles presencias alélicas: homocigota T, homocigota C, y heterocigota T/C no han sido asociadas con RHT (Sorensen HG, 2008) (Figura 80).

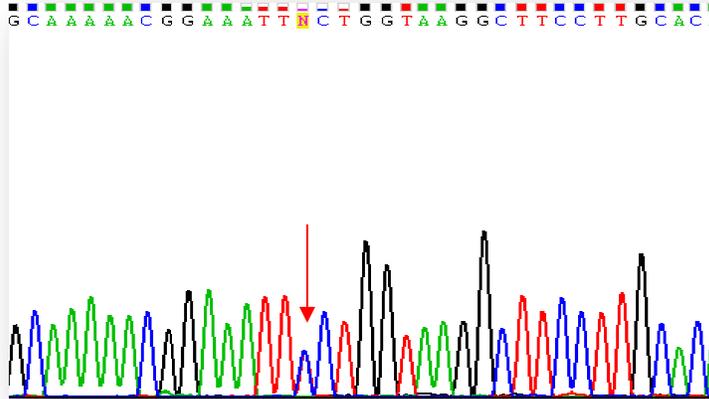


Figura 80. Secuencia parcial del exón 7 del gen THRbeta obtenida a partir del producto de amplificación por PCR de una muestra de ADN genómico extraído de sangre periférica del paciente RMM. Se indica con una flecha en la secuencia parcial (cadena codificante) el cambio heterocigota c.735T>C, p.F245F.

Casos 9, 10 y 11.

En los pacientes VC, 29342 y SG el análisis de secuenciación de los exones 7, 8, 9 y 10 del gen THRbeta no demostró presencia de mutaciones.

3.6 Análisis Bioinformático de los Receptores de Hormonas Tiroideas Mutados.

3.6.1 Análisis de Homología Proteica

El alineamiento múltiple de secuencia proteica mostró que todas las posiciones aminoacídicas estudiadas por el método Clustal se encuentran conservadas en las especies analizadas. Así la Alanina *wild type* de la posición 268, la Glicina 345 *wild type* y la Prolina *wild type* de la posición 452 se encuentran altamente conservados en el TR β de especies más o menos alejadas filogenéticamente con respecto al *Homo sapiens*.

Análisis de Homología Proteica para la p. A 268G:

Se realizó el análisis de homología proteica para la sustitución del aminoácido Alanina 268 por Glicina p.A268G, exón 8 del gen del THR β (Figura 81).

	p.A268G	247	PEDIGQAPIVNAPEGGKVDLEAFSGFSHFTKIITPAITRVVDFAKKLPMFCE	295
Homo Sapiens	247	PEDIGQAPIVNAPEGGKVDLEAFSGFSHFTKIITPAITRVVDFAKKLPMFCE	295	
Macaca mulatta	247	PEDIGQAPIVNAPEGGKVDLEAFSGFSHFTKIITPAITRVVDFAKKLPMFCE	295	
Macaca fascicularis	247	PEDIGQAPIVNAPEGGKVDLEAFSGFSHFTKIITPAITRVVDFAKKLPMFCE	295	
Mus musculus	247	PEDIGQAPIVNAPEGGKVDLEAFSGFSHFTKIITPAITRVVDFAKKLPMFCE	295	
Rattus norvegicus	247	PEDIGQAPIVNAPEGGQVDLEAFSGFSHFTKIITPAITRVVDFAKKLPMFCE	295	
Equus caballus	247	PEDIGQAPIVNAPEGGKVDLEAFSGFSHFTKIITPAITRVVDFAKKLPMFCE	295	
Canis familiaris	253	PEDIGQAPIVNAPEGGKVDLEAFSGFSHFTKIITPAITRVVDFAKKLPMFCE	301	
Conger myriaster	183	AEDIGQAPITINAPDCSKVDLEAFSQFTQIITPAITRVVDFAKKLPMFCE	231	
Danio rerio	181	PEDIGSAPIVNAPEGNKVDLEAFSQFTKIITPAITRVVDFAKKLPMFCE	229	
Gallus gallus	155	PEDIGQAPIVNAPEGGKVDLEAFSQFTKIITPAITRVVDFAKKLPMFCE	203	

Figura 81. El Alineamiento de secuencia aminoacídica entre las posiciones 247 a 295 del TR β muestra que la Alanina 268 se encuentra muy conservada, lo cual sería afectado por mutación p.A268G (*algoritmo Clustal X*).

Análisis de Homología Proteica para la p.G345R:

Se realizó el análisis de homología proteica para la sustitución del aminoácido Glicina 345 por Arginina p.G345 R, exón 9 del gen del THR β (Figura 82).

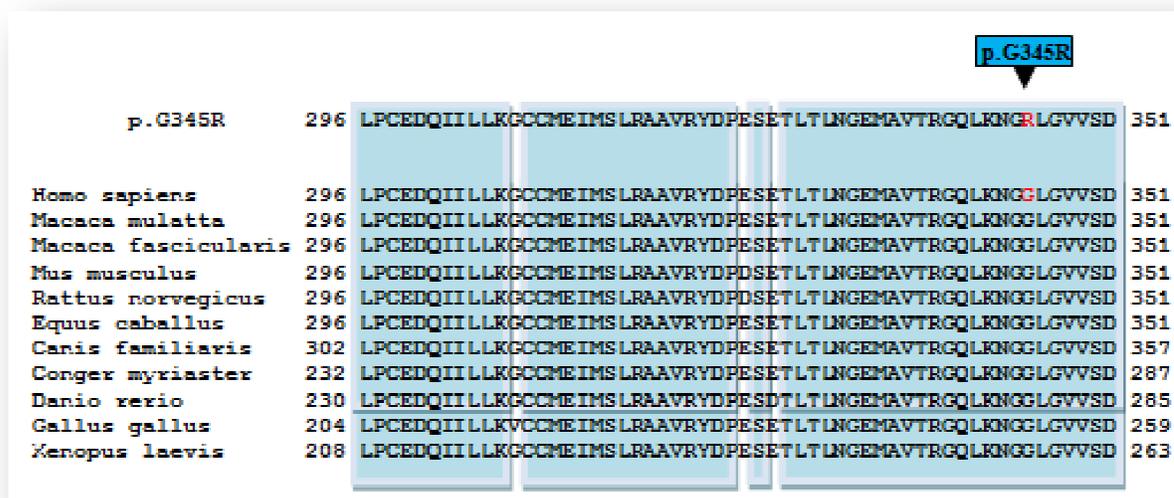


Figura 82. El Alineamiento de secuencia aminoacídica entre las posiciones 296 al 351 del TR β muestra que la Glicina 345 se encuentra muy conservada, lo cual sería afectado por mutación p. G345R (algoritmo Clustal X).

Análisis de Homología Proteica para la p. P452L:

Se realizó el análisis de homología proteica para la sustitución del aminoácido Prolina 452 por Leucina p. P452L, exón 10 del gen del THR β (Figura 83).

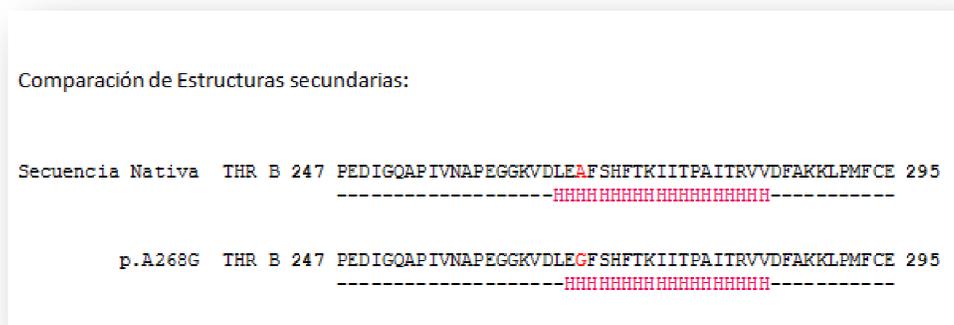


Figura 84. Comparación de estructura secundaria correspondiente al dominio *LBD* con la mutación p.A268G comparada con la estructura secundaria nativa de TRbeta correspondiente a esa región. Hojas plegadas beta (E), alfa hélice (H), y loops (-), respectivamente. Esta predicción se hizo con Jpred Versión Jnet: 2,2. UniRef90 release: 15.4.

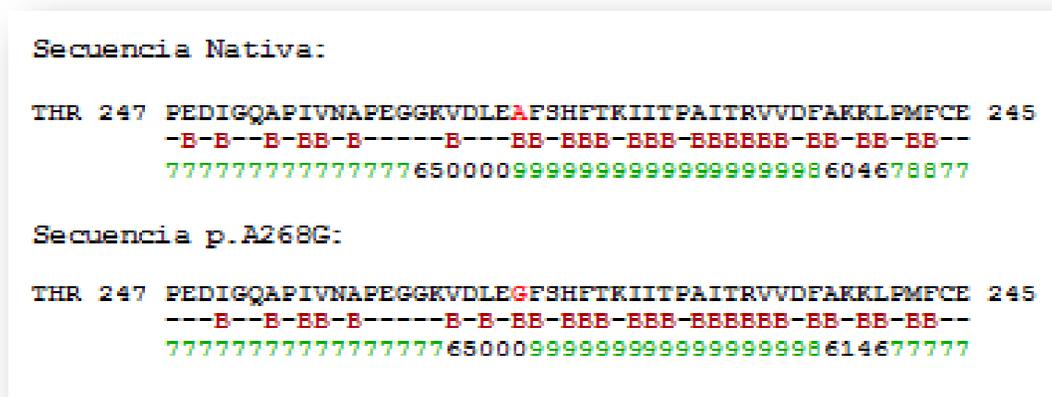


Figura 85. Comparación entre la predicción estructural de profundidad o accesibilidad (B) al solvente de menos de 25% de la proteína mutada p.A268G comparada con la secuencia nativa de TRbeta correspondiente al dominio *LBD*. La evaluación de fiabilidad de la precisión de la predicción, va de 0 a 9, mostrando valores cercanos a 9 una mayor fiabilidad. Esta predicción se hizo con Jpred Versión Jnet: 2,2 UniRef90 release: 15.4.

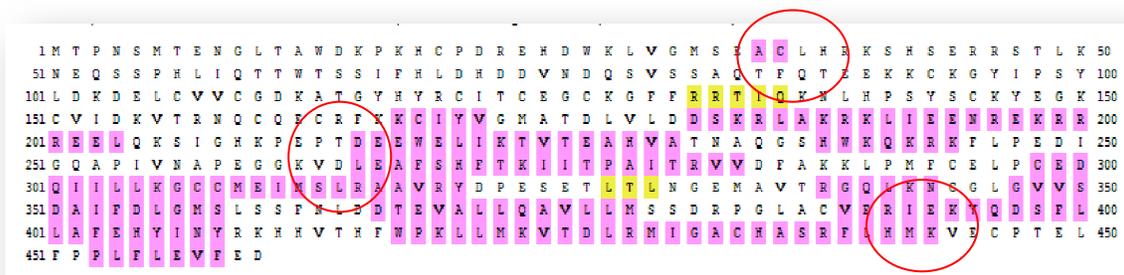


Figura 86: Validación de Estructura secundaria para el TRbeta nativa. Representación de Hojas plegadas beta (Amarillo), alfa hélice (Rosa), y loops (Blanco), respectivamente. Esta predicción se hizo con PSIPRED v3.3 (Predict Secondary Structure). Círculo rojo resalta el cambio en la estructura proteica.

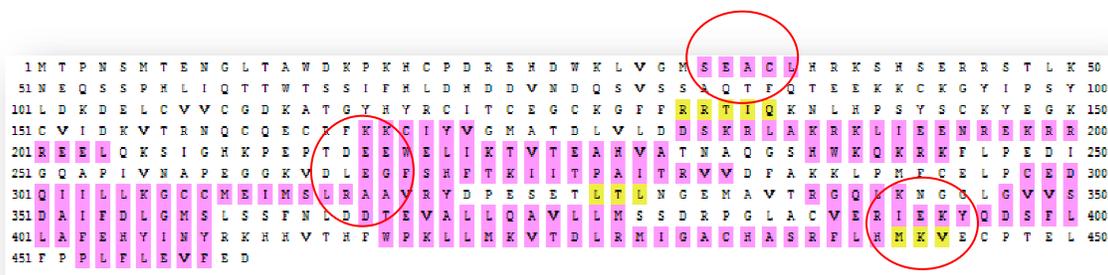


Figura 87: Validación de Estructura secundaria para el TRbeta con mutación p.A268G. Representación Hojas plegadas beta (Amarillo), alfa hélice (Rosa), y loops (Blanco), respectivamente. Se observa tanto la pérdida como la introducción de ángulos característicos de estructuras alfa hélice y la creación de nuevos ángulos propios de estructuras beta plegadas. Esta predicción se hizo con PSIPRED v3.3 (Predict Secondary Structure). Círculo rojo resalta el cambio en la estructura proteica.

Predicción de las Estructura Secundaria para la p.G345R:

Aparentemente se observa una diferencia entre la estructura secundaria de la secuencia nativa entre las regiones aminoacídicas 296 y 351 de la proteína THRBeta y la secuencia que presenta la mutación p.G345R. Dichos cambios provocarían tanto la pérdida como la introducción de ángulos característicos de estructuras alfa hélice y la creación de nuevos ángulos propios de estructuras beta plegadas.

Adicionalmente, se observan cambios en la predicción de accesibilidad al solvente del 25% (Figuras 88 a 91).

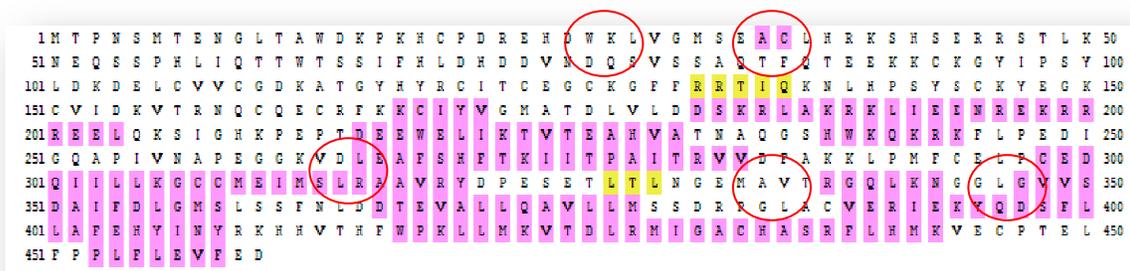


Figura 90: Validación de estructura secundaria para el TRbeta nativo. Representación de Hojas plegadas beta (Amarillo), alfa hélice (Rosa), y loops (Blanco), respectivamente. Esta predicción se hizo con PSIPRED v3.3 (Predict Secondary Structure). Círculo rojo resalta el cambio en la estructura proteica.

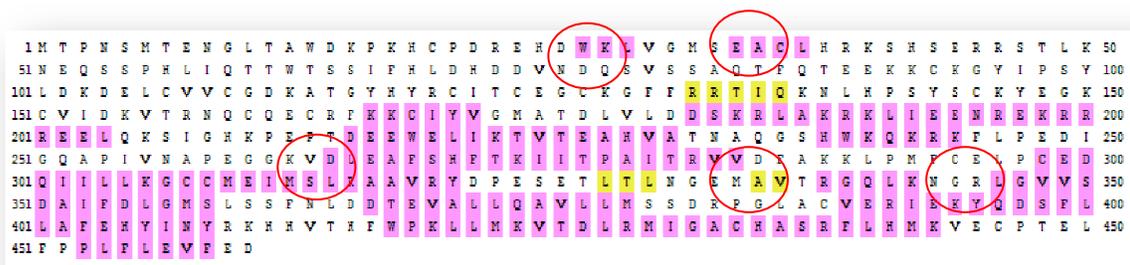


Figura 91: Validación de estructura secundaria para el TRbeta con mutación p.G345R. Hojas plegadas beta (Amarillo), alfa hélice (Rosa), y loops (Blanco), respectivamente. Se observa tanto la pérdida como la introducción de ángulos característicos de estructuras alfa hélice y la creación de nuevos ángulos propios de estructuras beta plegadas. Esta predicción se hizo con PSIPRED v3.3 (Predict Secondary Structure). Círculo rojo resalta el cambio en la estructura proteica.

Predicción de las Estructura Secundaria para la p.P452L:

Aparentemente se observa una diferencia entre la estructura secundaria de la secuencia nativa entre los aminoácidos 407 y 461 del TRbeta y la secuencia que presenta la mutación p.P452L. Dichos cambios provocarían tanto la pérdida como la introducción de ángulos característicos de estructuras alfa hélice y la creación de nuevos ángulos propios de estructuras beta plegadas.

Se observan cambios en la predicción de accesibilidad al solvente (25%).

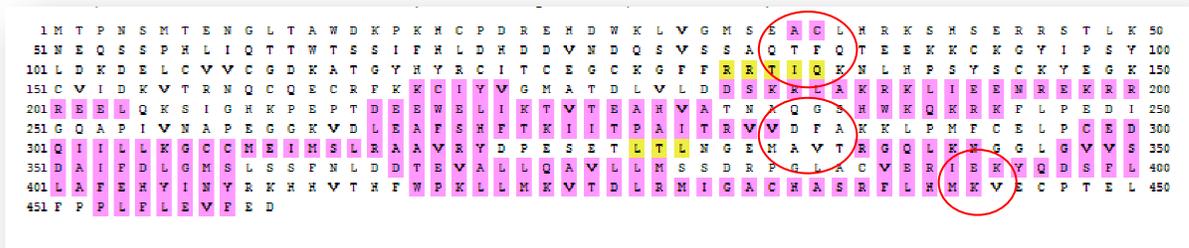


Figura 94: Validación de estructura secundaria para el THRbeta nativo. Representación Hojas plegadas beta (Amarillo), alfa hélice (Rosa), y loops (Blanco), respectivamente. Esta predicción se hizo con PSIPRED v3.3 (Predict Secondary Structure). Círculo rojo resalta el cambio en la estructura proteica.

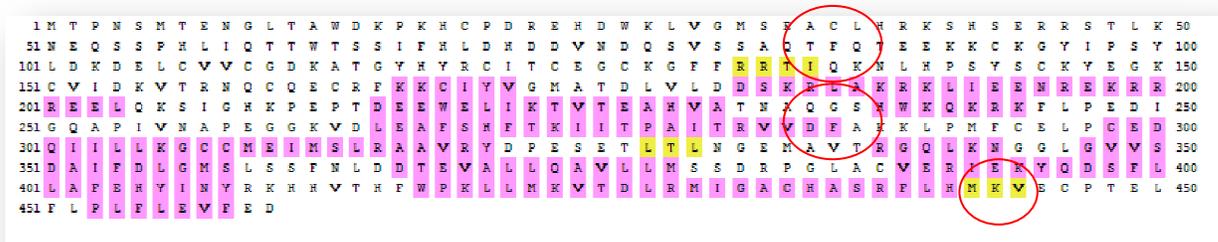


Figura 95: Validación de Estructura secundaria para el TRbeta con mutación p.P452L. Hojas plegadas beta (Amarillo), alfa hélice (Rosa), y loops (Blanco), respectivamente. Se observa tanto la pérdida como la introducción de ángulos característicos de estructuras alfa hélice y la creación de nuevos ángulos propios de estructuras beta plegadas. Esta predicción se hizo con PSIPRED v3.3 (Predict Secondary Structure). Círculo rojo resalta el cambio en la estructura proteica.

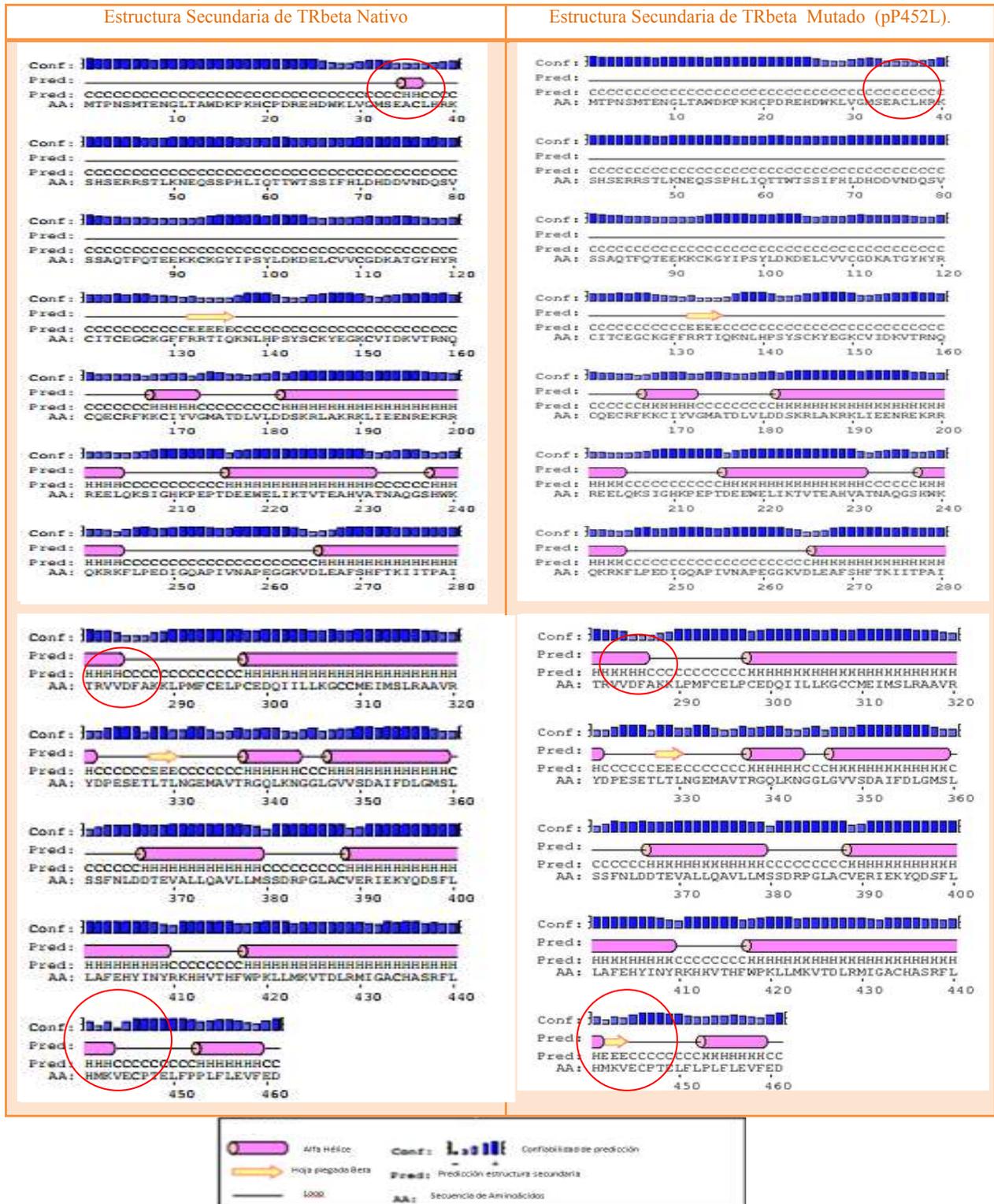


Figura 96: Validación de estructura secundaria para el TRbeta con nueva mutación p.P452L, comparada con la Estructura secundaria Nativa de TRH Beta. Hojas plegadas beta (E), alfa hélice (H), y loops (-), respectivamente. Esta predicción se hizo con PSIPRED v3.3 (Predict Secondary Structure). Círculo rojo resalta el cambio en la estructura proteica.

3.6.3 Predicción del impacto de una sustitución aminoacídica en la estructura y función proteica.

Predicción del impacto de una sustitución aminoacídica en la estructura y función proteica p.A268G:

Al utilizar los programas para predecir el impacto de la sustitución p.A268G en la estructura y función se determinó que la mutación tendría un efecto deletéreo (Figura 97).

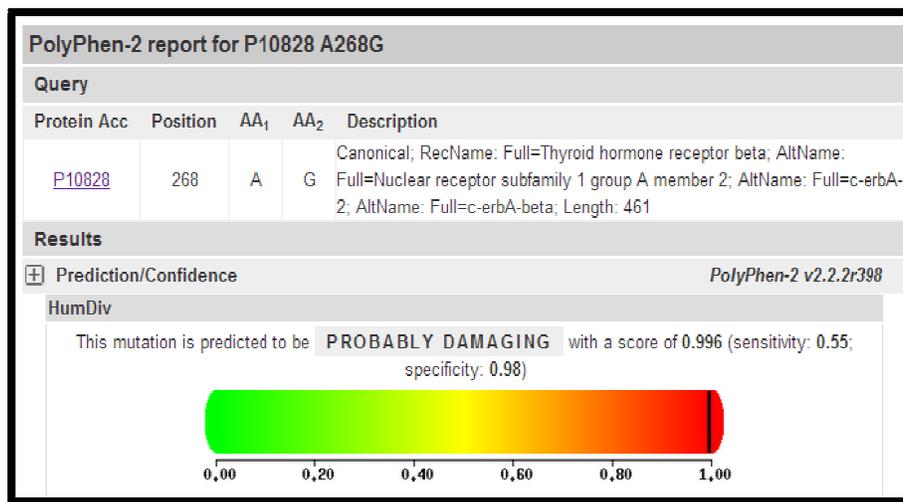


Figura 97. Evidencia informática para la predicción de la mutación p.A268G sobre la estructura y función del TRbeta.

<http://genetics.bwh.harvard.edu/ggi/pph2/2914bf8f60cb44c62dce54738d33c89412304978/2384453.html>

Predicción del impacto de una sustitución aminoacídica en la estructura y función proteica p.G345R:

Al utilizar los programas para predecir el impacto de la sustitución p.G345R en la estructura y función se determinó que la mutación tendría un efecto deletéreo (Figura 98).

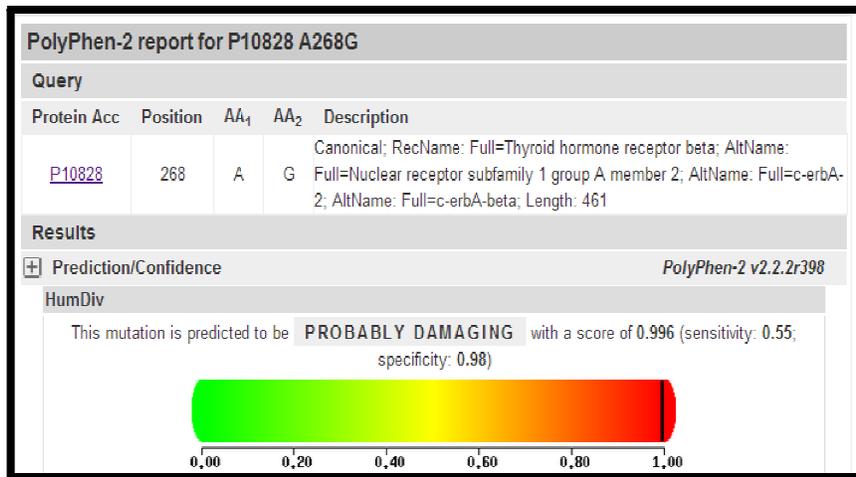


Figura 98. Evidencia informática para la predicción de la mutación p.G345R sobre la estructura y función del TRbeta.

<http://genetics.bwh.harvard.edu/ggi/pph2/2914bf8f60cb44c62dce54738d33c89412304978/2384454.html>

Predicción del impacto de una sustitución aminoacídica en la estructura y función proteica p.P452L:

Al utilizar los programas para predecir el impacto de la sustitución p.P452L en la estructura y función se determinó que la mutación tendría un efecto deletéreo (Figura 99).

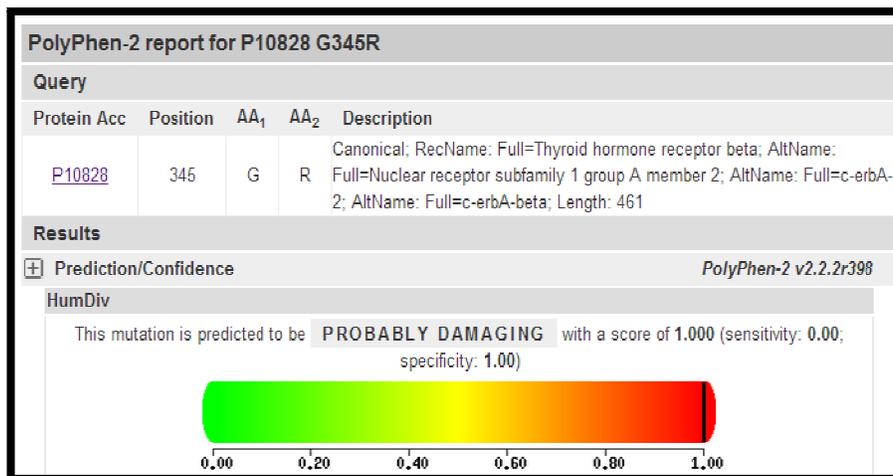


Figura 99. Evidencia informática para la predicción de la mutación p.G345R sobre la estructura y función del

TRbeta.<http://genetics.bwh.harvard.edu/ggi/pph2/2914bf8f60cb44c62dce54738d33c89412304978/2384454.html>

3.6.4 Predicción de las estructuras terciarias.

Utilizando los programas Swiss PDB Viewer 4.04 y Pymol, como visualizadores se analizó cada una de las mutaciones identificadas. Para este análisis se consideraron distintas estructuras cristalográficas, dominio de unión al ligando de la isoforma B1 del receptor de T3 humano ya sea como monómero u homodímero e interaccionando con el CoActivador Grip.

- PDB 1NAX: resolución 2.70Å. Aminoácidos: (211-460)
- PDB 3GWS: resolución 2.20 Å. Aminoácidos (202-460)
- PDB 1BSX: resolución 3.60 Å. Aminoácidos (211-460)co-cristalizado con el péptido KHKILHRLQLDSS de GRIP Aminoácidos (687-698).
- PDB 3D57: resolución 2.20 Å. Homodímero. Cadena A: Aminoácidos (210-460), Cadena B: (211-460).

Se muestran en la tabla 17 la relación entre las distintas posiciones aminoacídicas del TRbeta y la funcionalidad del receptor.

Tabla 17. Descripción de las Regiones de la proteína codificada por el gen THRbeta. Posiciones en Rojo: Posiciones cercanas a las mutaciones de interés.

<i>REGIÓN</i>	<i>POSICIONES AMINOACIDICAS</i> (NCBI Ref-Seq. NP_001239563.1)
<u>Región de Modulación</u>	1-106
<u>Dominio de unión al AND DBD</u> compuesto por dos C4-tipo dedos de Zinc	106-192
-Sitios de Unión al Zinc	107,110,124,127,145,151,161,164
-Sitios de interacción interface Heterodimero	117,120,175,177,178
<u>Dominio de Unión a Ligando LBD</u>	216-458
-Región de interacción con NR2F6	244-461
-Región de unión a Ligando	244-461
-Sitios específicos de unión a Ligando	269,272,273,275,276,279,282,310,313,317,32

	9-331,341,344,346,353,435,442,455
-Sitios específicos de reconocimiento de Co-Activador	281,284,288,298,302,305,453,454,457
-Sitios de interacción interface Homodimero	348,393,423,426-427,430,433-434,436-437

Predicción de las estructuras terciarias, Modelaje de proteínas *in silico*, análisis del receptor portando la mutación p.A268G:

Los resultados de este análisis bioinformático sugieren que el reemplazo de la correcta alanina 268 de naturaleza hidrofóbica por glicina de naturaleza hidrofóbica aparentemente no alteraría la formación de enlaces puente de hidrógeno así como tampoco la superficie electrostática. Tampoco se observan cambios que afecten a la homodimerización ni la interacción con el co-Activador GRIP. El Valor de energía de minimización fue calculado mediante el programa Swiss PDB Viewer 4.04 observándose una clara diferencia entre la proteína nativa y la proteína mutada en esta posición (Figuras 100-105; Tablas 18 y 19).

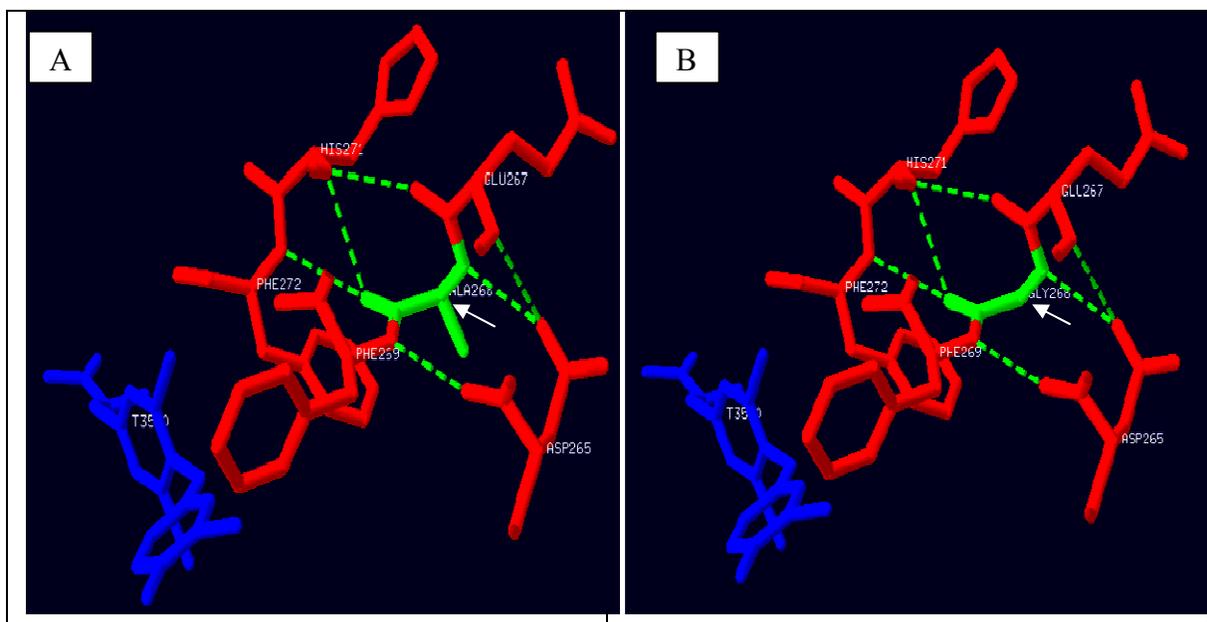


Figura 100: El reemplazo de la correcta Alanina 268 en color verde (A) por Glicina color verde (B), no alteraría la formación de puentes de hidrógeno entre la nueva leucina y la molécula de la hormona T3 ni con los aminoácidos cercanos a la posición 268. En azul se indica la molécula de hormona T3. En color rojo, los aminoácidos que interaccionan con la posición 268.

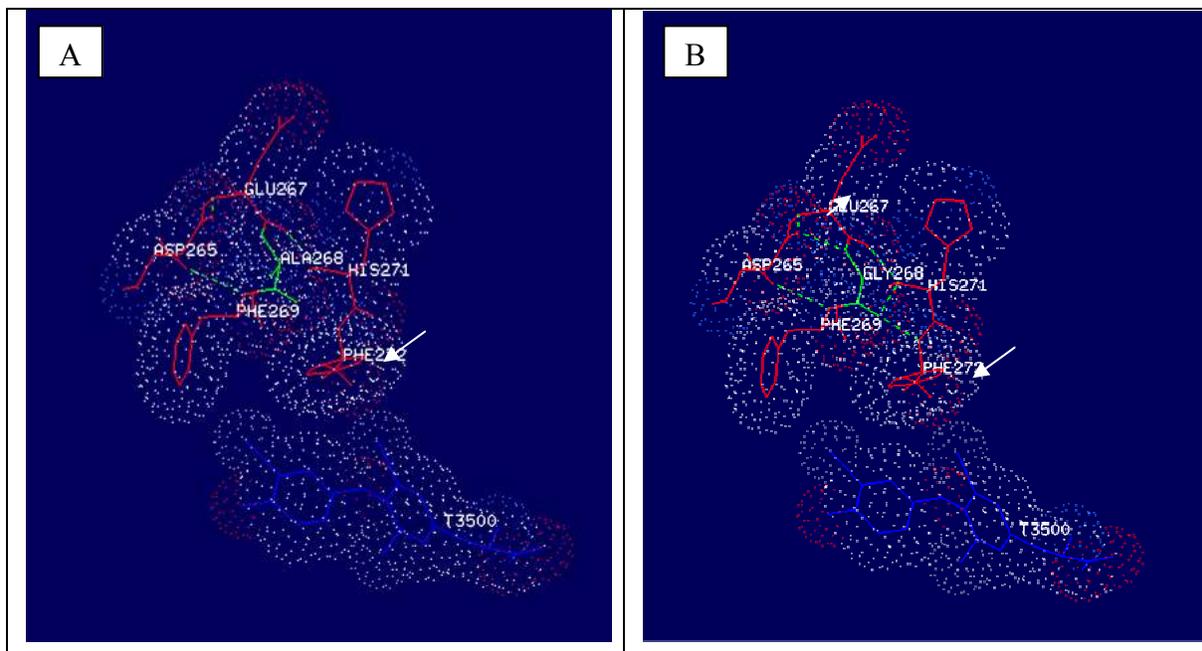


Figura 101: No se observa impedimento estérico del TR β sobre T₃ ocasionado por el cambio de Alanina 268 (A) por Glicina(B).

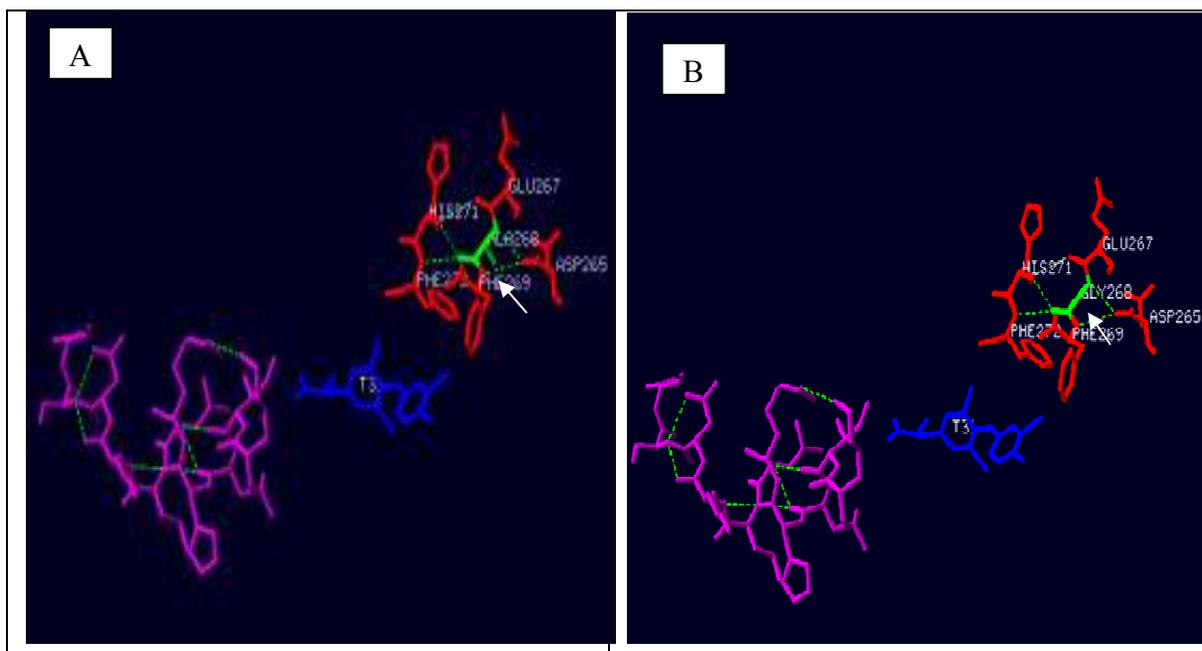


Figura 102: El reemplazo de la correcta Alanina 268 en color verde (A) por Glicina en color verde (B), no alteraría la formación de puentes de hidrógeno ni la interacción normal del TRbeta con el CoA-GRIP. En color azul se representa la molécula de hormona T₃. En color violeta,el Co-activador GRIP. En color rojo, aminoácidos que interaccionan con la posición 268.

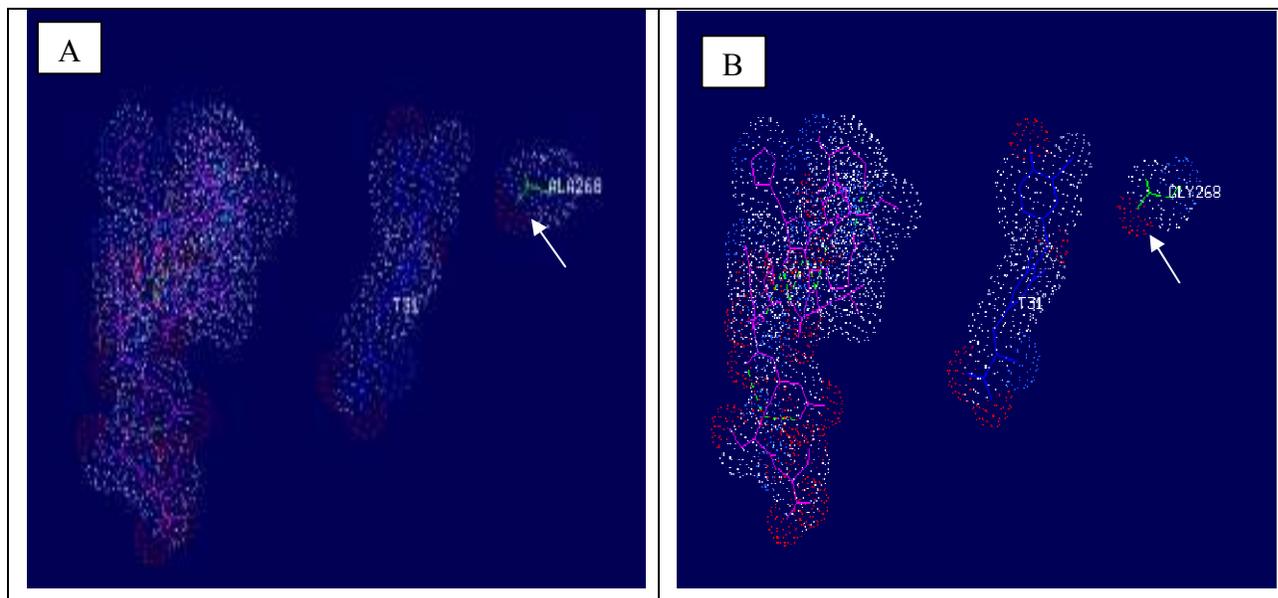


Figura 103: No se observa impedimento estérico del TR β sobre T₃ ni sobre el Co-activador GRIP ocasionado por el cambio de Alanina 268 (A) por Glicina (B).

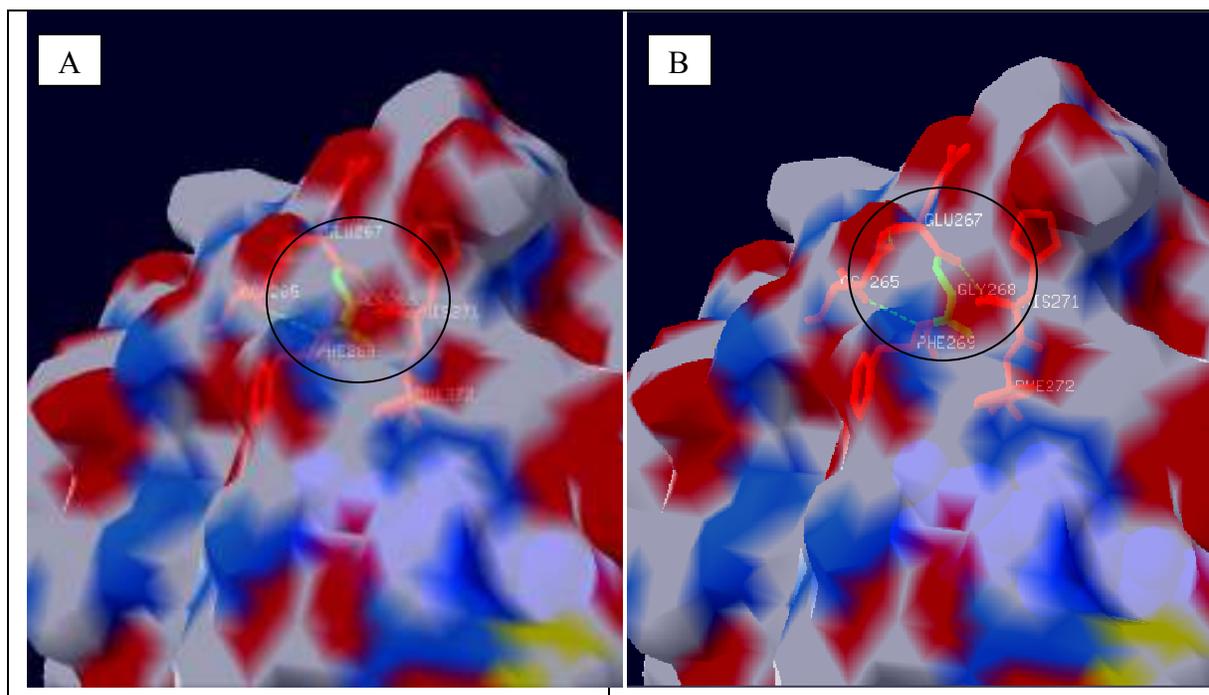


Figura 104: Representación de la superficie molecular del TR β sin cambio aparentemente entre la proteína nativa y la que presenta la mutación A268G (spdb Viewer).

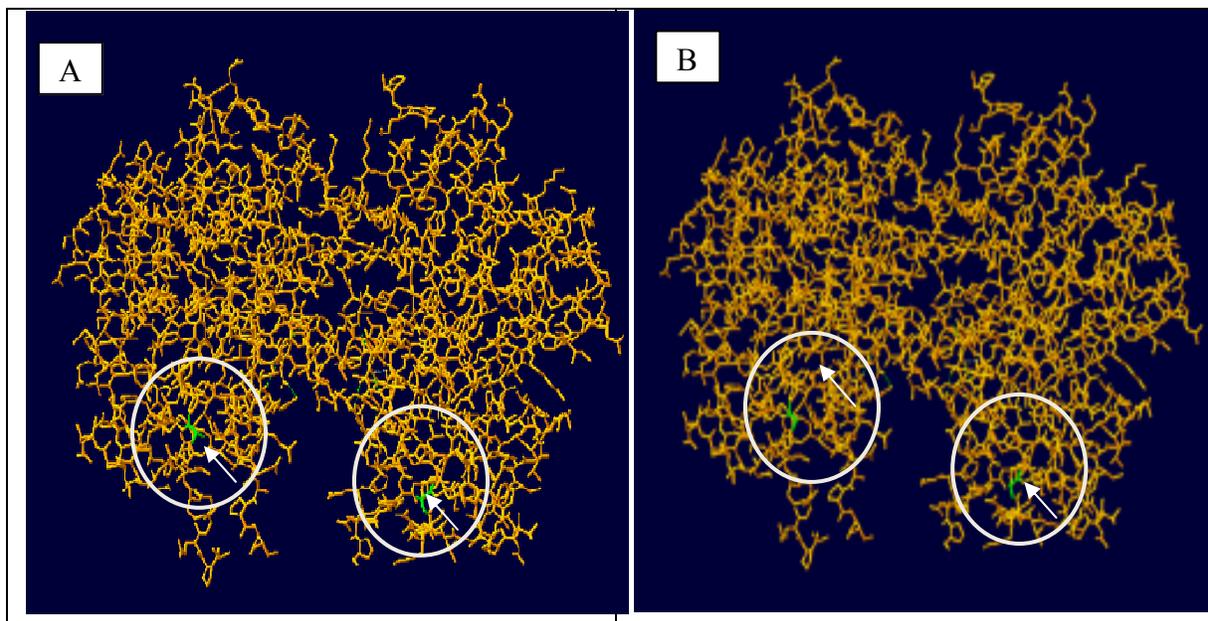


Figura 105: No se observan cambios en la relación de homodimerización del TR β como consecuencia de la sustitución de la correcta Alanina 228 (A) por Glicina 268 (B).

Tabla 18. Comparación entre Pka de aa nativo y aa mutado.

Posición Cambio	AA Nativo	Pka1	Pka2	Pka3	AA Mutado	Pka1	Pka2	Pka3
p.A268G	Alanina A con cadena lateral no polar. Hidrofóbico	2.35	9.87	--	Glicina G Con cadena lateral no polar. Hidrofóbico	2.35	9.78	--

Tabla 19. Comparación de Energías de Minimización individual de cada residuo aminoacídico y la energía de minimización global, entre modelo nativo y con la Mutación.

E Energías de minimización THR Beta (KJ/mol)		RECEPTOR LIGANDO B-selectina Homologo a T3 PDB 1NAX	INTERACCIÓN CON HORMONA T3 Y COA. GRIP PDB 1BSX	HOMODIMERIZACIÓN PDB 3D57 (Corregido)
Nativo	E Residuo Individual	-28,372	-17,097	-27,533
	E Total Estructural	-8527,881	-3639,414	-11633,270
Mutación p.A268G	E Residuo Individual	+15,337	+25,834	+16,970
	E Total Estructural	-8441,306	-3552,958	-11462,964

Predicción de las estructuras terciarias, Modelaje de proteínas *in silico*, análisis del receptor portando la mutación p.G345R

Los resultados de este análisis bioinformático sugieren que el reemplazo de la correcta Glicina 345 de naturaleza hidrofóbica por Arginina de naturaleza de carga positiva o Básico, aparentemente genera la formación de un enlace de puente de hidrógeno entre el aminoácido y la hormona, así como también una superposición en los radios de Van der Waals entre la hormona y el aminoácido Arginina, ocasionando impedimento estérico del TR β sobre T $_3$; sin embargo aparentemente no ocasiona por el cambio alteraciones en la superficie electrostática, ni la interacción de homodimerización, (ni la interacción con el co-regulador GRIP no dependiente de hormona). El Valor de energía de minimización fue calculado mediante el programa Swiss PDB Viewer 4.04 observándose una clara diferencia con valores suficientemente altos en la diferencia entre la proteína nativa y la proteína mutada en esta misma posición (Figuras 106-111; Tablas 20 y 21).

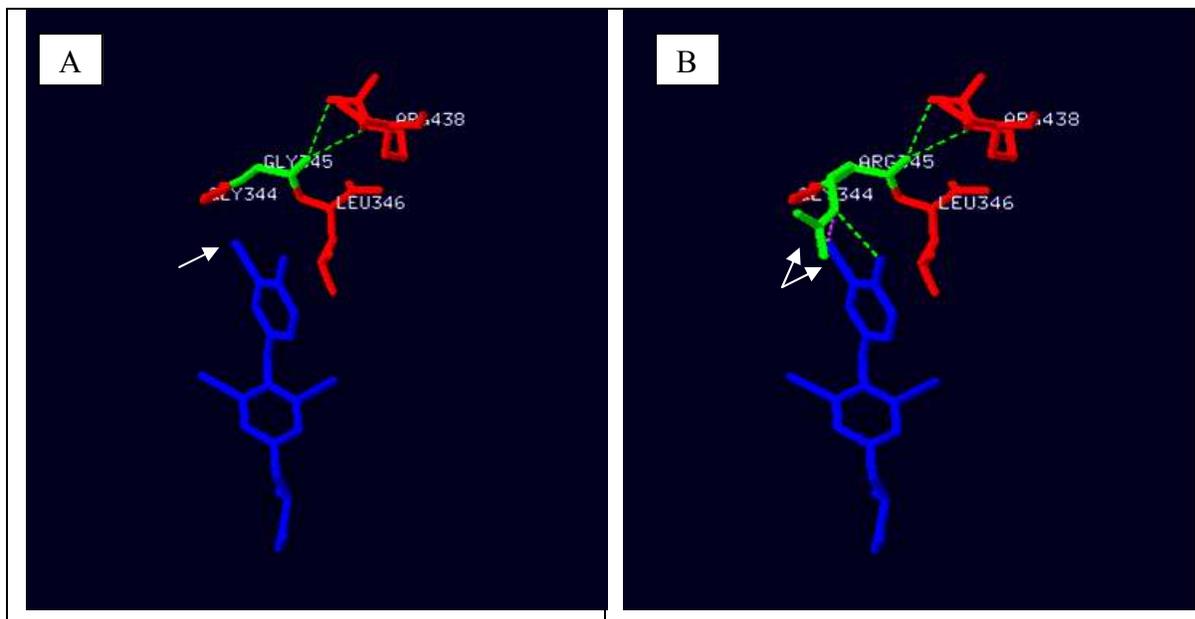


Figura 106: El reemplazo de la correcta Glicina 345 en color verde (A) por Arginina en color verde (B), alteraría la formación de puentes de hidrógeno generados por los puentes de hidrógeno entre la nueva Arginina y la molécula de la hormona T3. En azul molécula de hormona T3. En color rojo aminoácidos que interactúan con la posición 345.

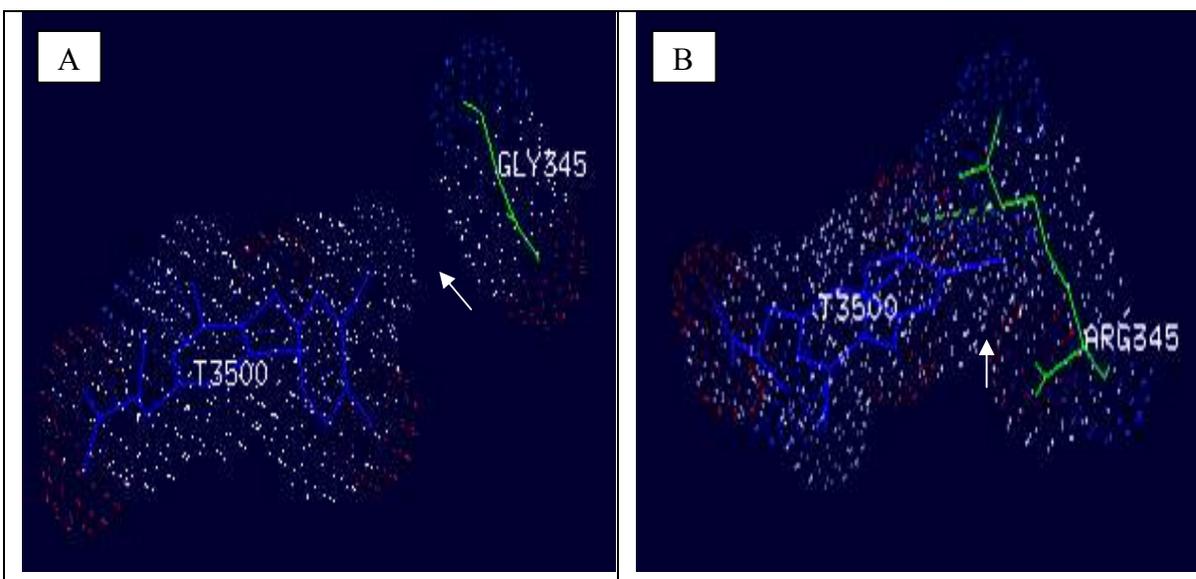


Figura 107: Si se observa impedimento estérico del TR β sobre T₃ ocasionado por el cambio de Glicina 345 (A) por Arginina (B).

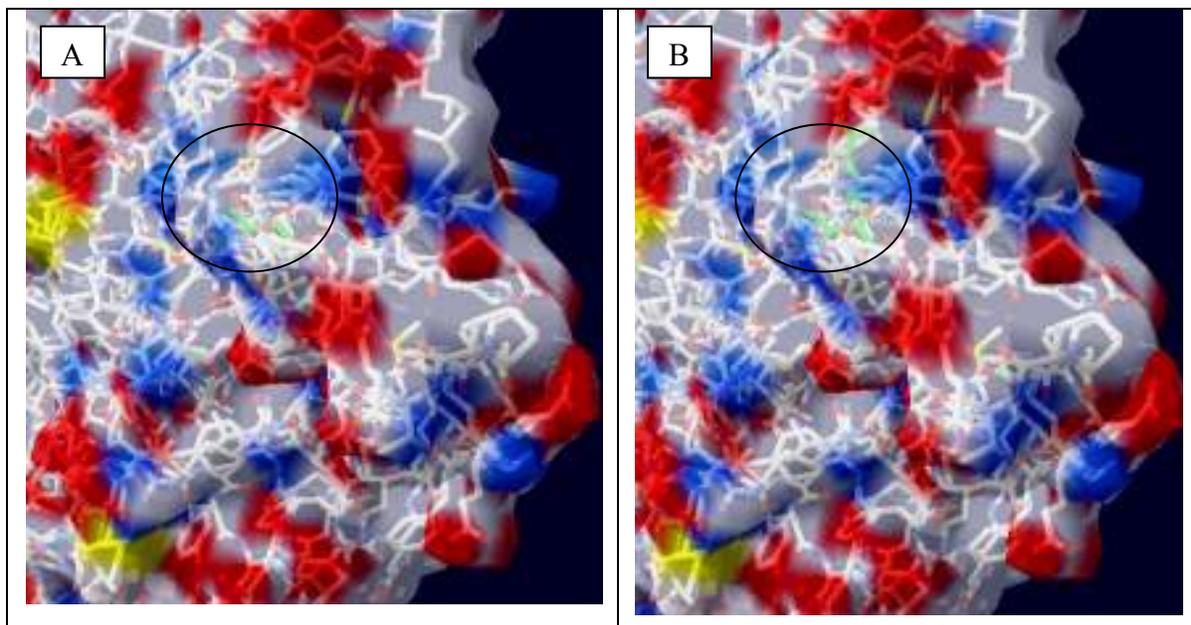


Figura 108: Representación de la superficie molecular del TR β (spdb Viewer).

Superficie de la proteína nativa con la Glicina 345 (A), Superficie de la proteína mutada con la Arginina 345 (B).

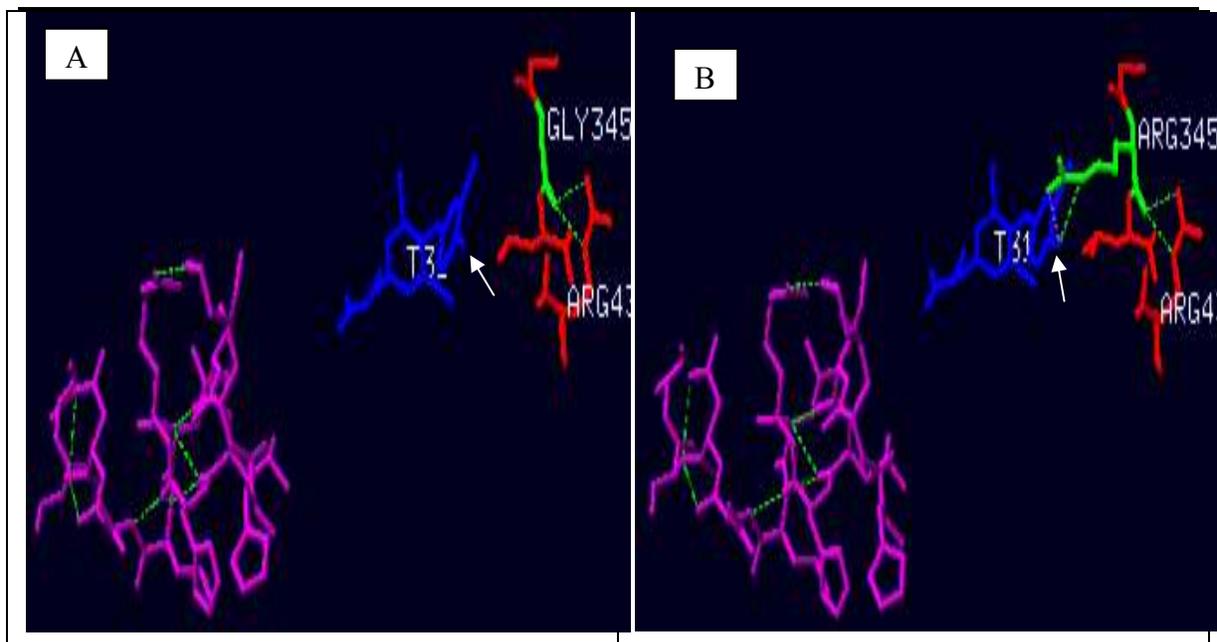


Figura 109: El reemplazo de la correcta Glicina 345 en color verde (A) por Arginina en color verde (B), sí alteraría la formación de puentes de hidrógeno agregando dos puentes de hidrogeno entre la nueva Arginina y la molécula de la hormona T3. En color azul representación de la molécula de hormona T3. En color violeta representación del Co-activador GRIP. En color rojo aminoácidos que interacción con la posición 345.

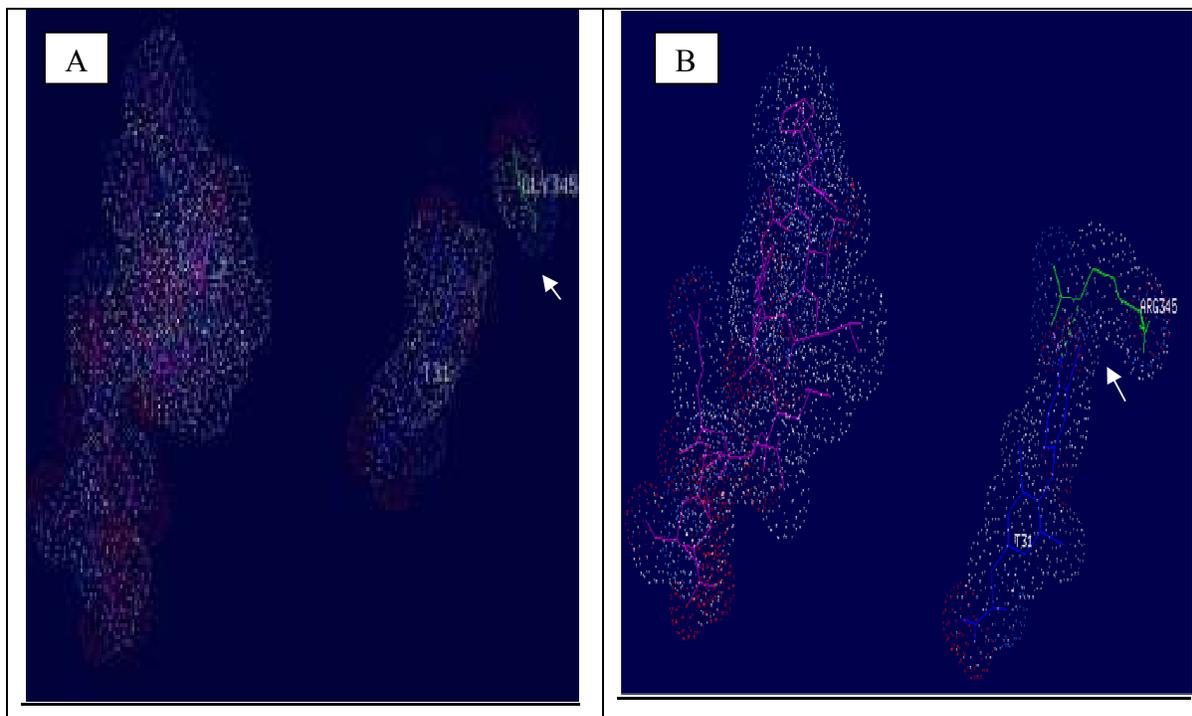


Figura 110: Se observa impedimento estérico del TR β sobre T₃ ocasionado por el cambio de Glicina 345 (A) por Arginina (B). No se observa impedimento estérico sobre el Co-Activador GRIP.

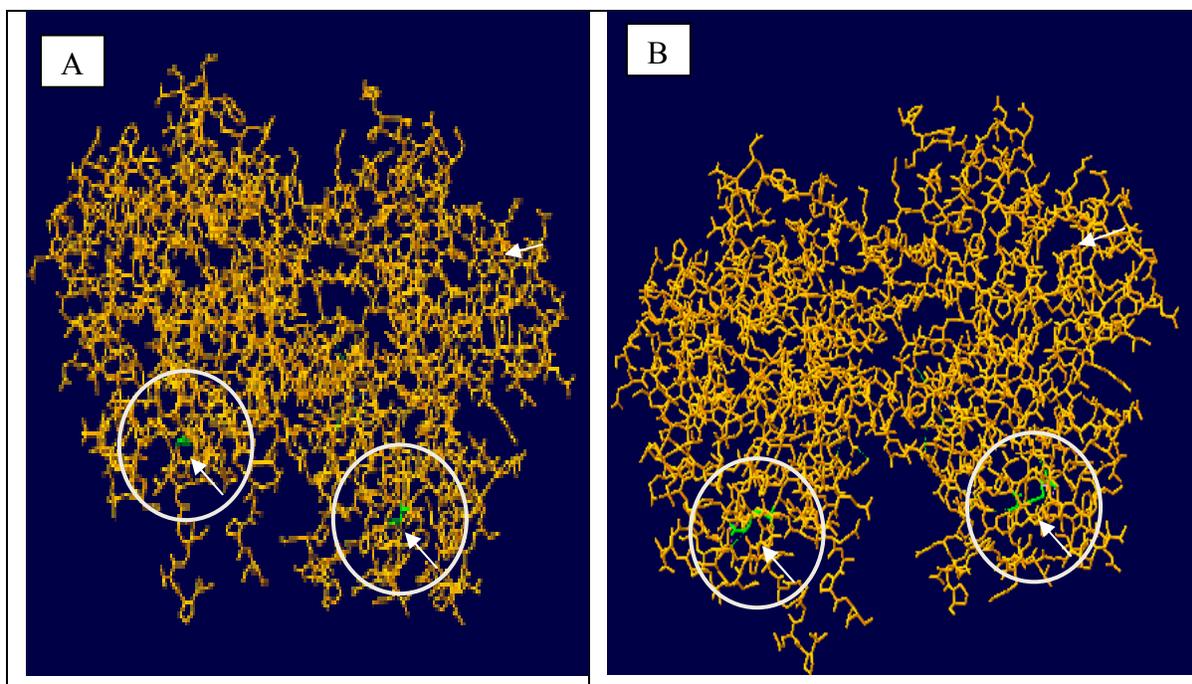


Figura 111: No se observan cambios en la relación de homodimerización del TR β por el cambio de la correcta Glicina 345 (A) por Arginina 345 (B) dado que la posición no se presenta cercana a la zona de interacción.

Tabla 20. Comparación entre Pka de aminoácido (AA) nativo y aminoácido (AA) mutado.

Posición Cambio	AA Nativo	Pka1	Pka2	Pka3	AA Mutado	Pka1	Pka2	Pka3
p.G345R	Glicina G con cadena lateral no polar Hidrofóbico	2.35	9.78	--	Arginina R con cadena lateral con grupo de Carga Positiva (Básico)	1.82	8.99	12.48 Guanidinio

Tabla 21. Comparación de Energías de Minimización individual de cada residuo aminoácido y la energía de minimización global, entre modelo nativo y mutado.

Energías de minimización THR Beta (KJ/mol)		RECEPTOR LIGANDO B-selectina Homologo a T3 PDB 1NAX	INTERACCIÓN CON HORMONA T3 Y COA. GRIP PDB 1BSX	HOMODIMERIZACIÓN PDB 3D57 (Corregido)
Nativo	E Residuo Individual	+28,610	+37,699	+38,976
	E Total Estructural	-8521,074	-3642,749	-11884,278
Mutación p.G345R	E Residuo Individual	+858,936	+1355,476	+606,373
	E Total Estructural	-7155,047	+1589690,375	-888784,063

Predicción de las estructuras terciarias, Modelaje de proteínas *in silico*, análisis del receptor portando la mutación p.P452L

:

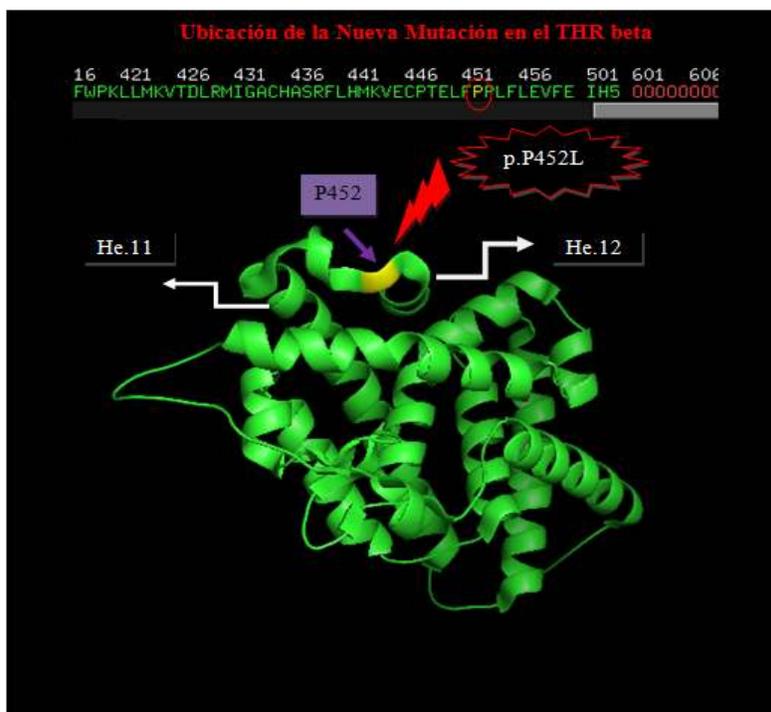


Figura 112. Ubicación de la correcta Prolina 452 se encuentra posterior a la formación hélice 11 y precede estructuralmente la hélice número 12 en la estructura del THR beta, siendo esta la misma posición de cambio p.P452L, mutación anteriormente no descrita.

Los resultados de este análisis bioinformático sugieren que el reemplazo de la correcta Prolina 452 de naturaleza hidrofóbica por leucina de naturaleza hidrofóbica igualmente, no genera la formación de enlaces de puentes de hidrógeno entre el aminoácido y la hormona distintos a la forma nativa, no ocasionan impedimentos estéricos del TR β sobre T $_3$ ni el coA- Grip, ni en la de homodimerización; sin embargo aparentemente el cambio ocasiona alteraciones en la superficie electrostática. El Valor de energía de minimización fue calculado mediante el programa Swiss PDB Viewer 4.04 observándose una clara diferencia con valores altos entre la proteína nativa y la proteína mutada en esta posición (Figuras 113-116; Tablas 22 y 23).

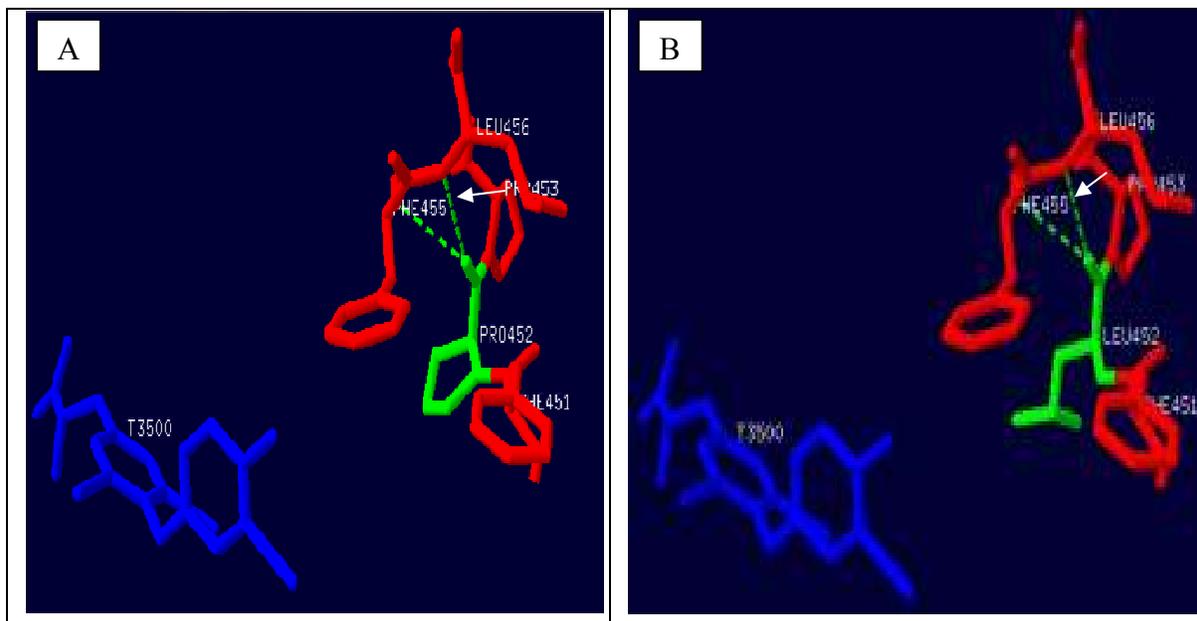


Figura 113: El reemplazo de la correcta Prolina 452 en color verde (A) por Leucina en color verde (B), no alteraría la formación de puentes de hidrógeno entre la nueva Leucina y la molécula de la hormona T3 ni con los aminoácidos cercanos a la posición 452. En azul molécula de hormona T3. En color rojo aminoácidos que interacción con la posición 268.

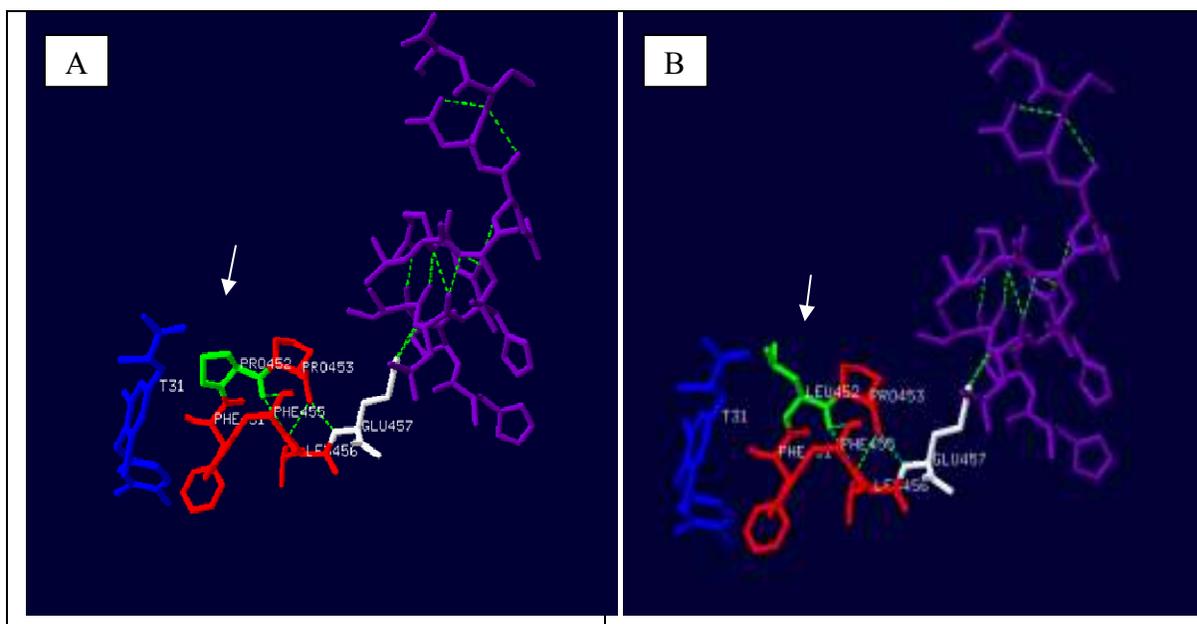


Figura 114: El reemplazo de la correcta Prolina 452 en color verde (A) por Leucina en color verde (B), no alteraría la formación de puentes de hidrógeno, sin generar nuevos puentes entre la nueva leucina y la molécula de la hormona T3, ni con los aminoácidos cercanos a la posición 452. En azul molécula de hormona T3. En color rojo aminoácidos que interacción con la posición 452.

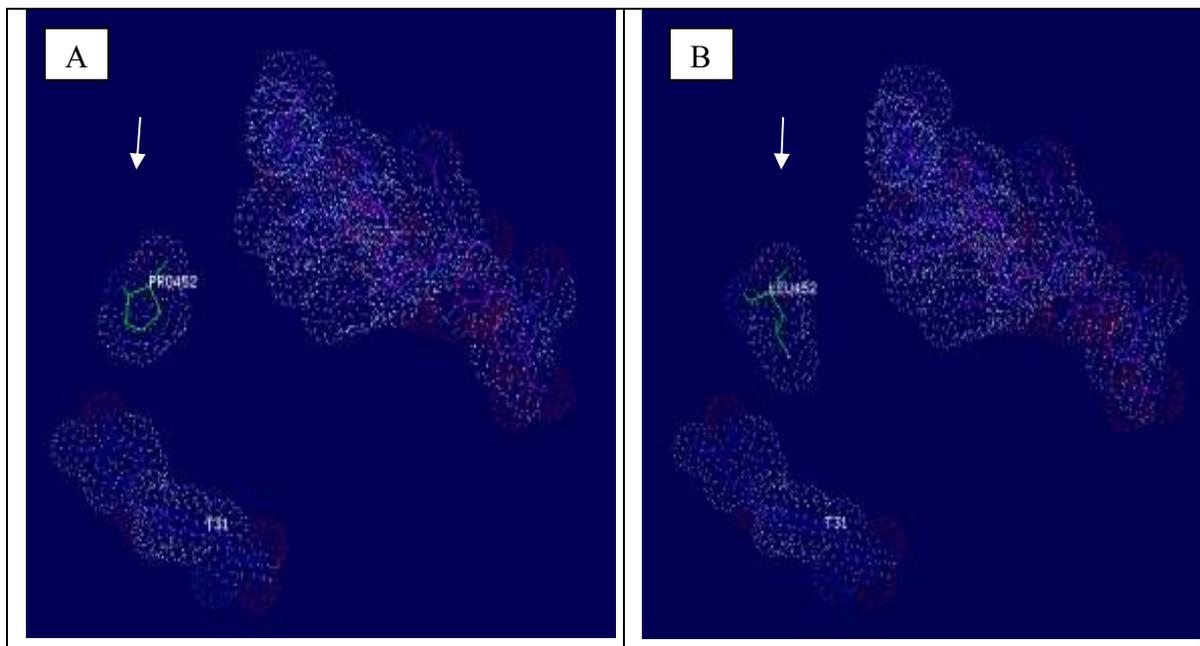


Figura 114: No se observa impedimento estérico del TR β sobre T₃ ni sobre el Co-activador GRIP ocasionado por el cambio de Prolina 452 (A) por Leucina 452 (B).

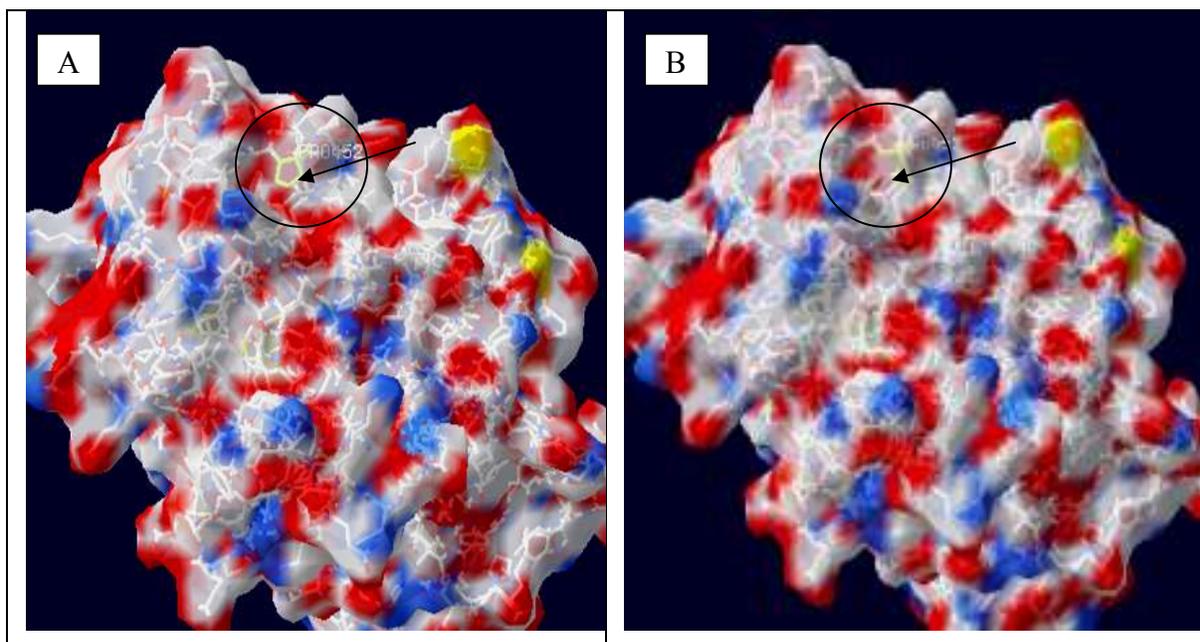


Figura 115: Representación de la superficie molecular del TR β (spdb Viewer). Se indica con flechas la presencia de variación en la superficie debida a cambios en la polaridad en zonas de la proteína asociadas a la sustitución aminoacídica de Prolina 452 (A) por Leucina 452 (B)

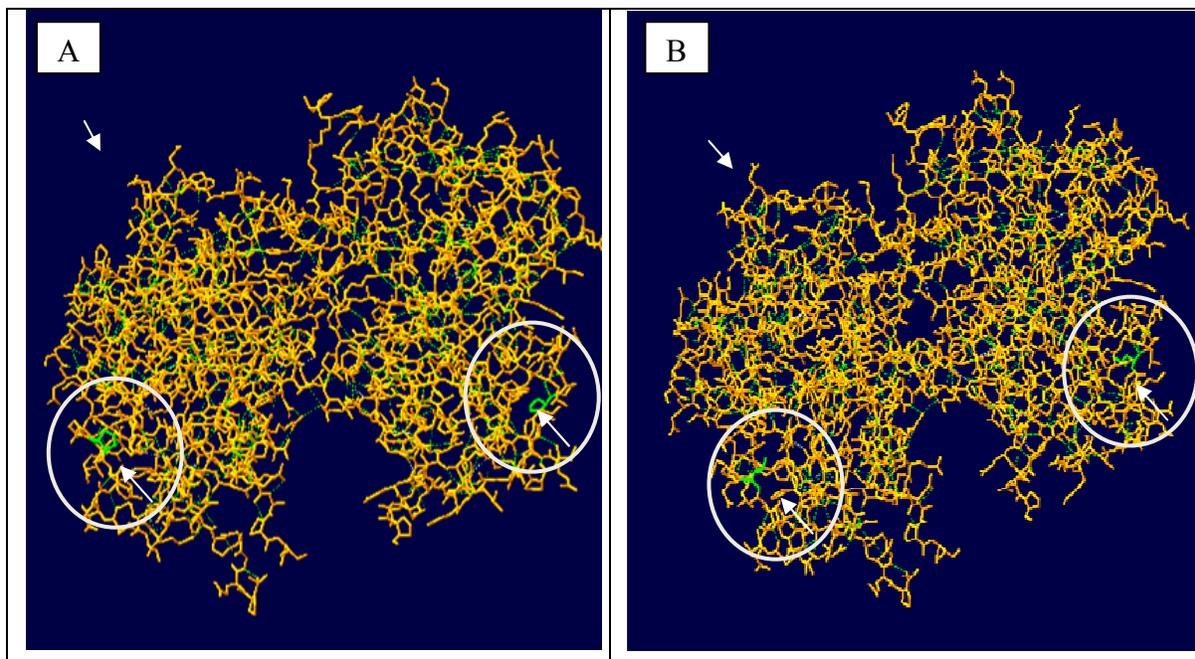


Figura 116: No se observan cambios en la relación de homodimerización del TR β como consecuencia del cambio de Prolina 452 (A) por Leucina 452 (B) dado que esta posición no se presenta cercana a la zona de interacción.

Tabla 22. Comparación entre Pka de aminoácido (AA) nativo y aminoácido (AA) mutado.

Posición Cambio	AA Nativo	Pka1	Pka2	Pka3	AA Mutado	Pka1	Pka2	Pk3
p.P452L	Prolina P con cadena lateral no polar Hidrofóbico Aromatico	1.95	10.64	--	Leucina L con cadena lateral no polar Hidrofóbico	2.33	9.74	--

Tabla 23. Comparación de Energías de Minimización individual de cada residuo aminoacido y la energía de minimización global, entre modelo nativo y con la Mutación.

E Energías de minimización THR Beta (KJ/mol)		RECEPTOR LIGANDO B-selectina Homologo a T3 PDB 1NAX	INTERACCIÓN CON HORMONA T3 Y COA. GRIP PDB 1BSX	HOMODIMERIZACIÓN PDB 3D57 (Corregido)
Nativo	E Residuo Individual	-0,561	+6,250	-5,263
	E Total Estructural	-8527,751	-3627,253	-11633,044
Mutación p.P452L	E Residuo Individual	+19,094	+21,606	+29,873
	E Total Estructural	-8522,844	-2764,263	-11556,793

DISCUSIÓN

En el presente trabajo hemos identificado 3 mutaciones diferentes en el gen THRbeta en 3 familias con cuadro clínico bioquímico compatible con RHT y un polimorfismo descrito en otras dos familias. De esta manera se identificó y caracterizó en el exón 10 una mutación no descrita en bibliografía, c.1355C>T, p.P452L por lo cual se realizó un análisis poblacional en el cual 100 cromosomas normales fueron analizados mediante la técnica de PCR-SSCP con el objeto de determinar la naturaleza de la alteración. Los resultados obtenidos indicaron que se trataba de una nueva mutación. El análisis del grupo familiar del paciente portador de la p.P452L permitió determinar que se trató de una mutación de *novo*. Por otra parte se identificaron dos mutaciones descritas previamente, la c.802C>G, p.A268G (Pascal et al. 1995)(Kawther et al.2014)(Rivolta et al.2014) localizada en el exón 8 y la c.1033G>C, p.G345R (Takashi et al. 1992) (Adams et al. 1994) (Lee et al. 2011) (presente en el exón 9. El análisis del grupo familiar de los pacientes portadores de las mutaciones descritas permitió determinar que la p.A268G tenía un origen materno mientras que la mutación p.G345R resultó ser una mutación de *novo*. El polimorfismo identificado en dos familias es el c.735T>C, p.F245F, presente en el exón 7 y descrito previamente. Ninguna de las variantes alélicas correspondientes a dicho polimorfismo se han asociado con RHT.

Con el fin de evaluar las mutaciones identificadas, previo a estudios funcionales in vivo, se llevaron a cabo análisis bioinformáticos para predecir el posible efecto deletéreo que las mismas pudieran ocasionar. La secuencia de aminoácidos de una proteína, también llamada estructura primaria, puede ser determinada fácilmente desde la secuencia de nucleótidos sobre el gen que la codifica. El conocimiento de esta estructura es vital para entender la función de la proteína. Consecuentemente, así mismo es de vital importancia para el estudio de la función proteica, el entendimiento de la estructura secundaria de las proteínas o el plegamiento regular local entre residuos aminoacídicos cercanos de la cadena polipeptídica y de la estructura terciaria de una proteína la cual generalmente se encuentra conformada por varios tramos con estructuras secundarias distintas. Relacionado con la estructura terciaria es de gran interés conocer como las proteínas están organizadas

en función de los aminoácidos que la conforman. Así, los aminoácidos apolares se sitúan hacia el interior de la proteína y los polares se sitúan hacia el exterior interactuando con el agua circundante dándole esta característica estructural a la proteína particularidades físicoquímicas. La predicción de dichas estructuras es de alta complejidad lo que la convierte en un enigma a resolver a diario.

En la actualidad, hay diversos programas de predicción gratuitos basados en la secuencia. En general, la sensibilidad de estos programas es alta, mientras que la especificidad es relativamente baja (Laskowski RA et al. 2008). Otro método alternativo es la predicción sobre la base de datos de la estructura en tres dimensiones en el que el efecto sobre la estructura proteica se predice a partir de una o más reglas (por ejemplo, la ubicación de la mutación y el cambio en el tamaño de aminoácidos). En los últimos años se introdujo un método de predicción para evaluar la patogenicidad de mutaciones identificadas basado en el modelado de estructuras proteicas sobre la base de estructuras cristalográficas de las mismas. En este sentido, una alteración se predice como deletérea cuando produce: pérdida de puentes de hidrógeno, pérdidas de contactos de van der Waals o formación de contactos anormales entre residuos o entre residuos y ligando. Ciertas mutaciones podrían ser predichas como benignas dado que no interrumpirían puentes de hidrógeno, ni alterarían contactos de van der Waals, ni afectarían la formación de contactos entre residuos o entre residuos y la hormona tiroidea (Narumi S et al.2010). Sin embargo la predicción del impacto de las sustituciones identificadas podrían producir cambios en la estructura secundaria afectando el plegamiento de la proteína como también su estabilidad, conformación e interacción de las estructuras terciarias, considerando no solo interacciones entre residuos y entre residuos y hormona tiroidea, sino también interacciones con el corregulador más estudiado involucrado en el mecanismo de acción de las hormonas tiroideas, GRIP.

En el presente trabajo, se han incluido tanto la predicción del impacto que todas las sustituciones identificadas ocasionarían sobre las estructuras secundarias, como así también sobre la estabilidad, conformación e interacción de las estructuras terciarias, considerando no solo interacciones entre residuos y entre residuos y hormona tiroidea, sino también con correguladores, ampliando entonces el espectro de interacciones que pudieran verse afectadas a causa de mutaciones. Estos ensayos se basaron en diferentes estructuras

cristalográficas, considerando aquellas en las que el receptor se encuentra unido a hormona en forma monomérica, formando homodímeros como también cocrystalizado con el corregulador GRIP.

Se realizaron los ensayos de mutagénesis “in silico” tanto de la sustitución novel como de dos mutaciones previamente descritas (p.A268G y p.G345R) y ampliamente estudiadas funcionalmente, con el fin de validar el procedimiento y sus resultados. En todos los casos las sustituciones alterarían la estructura secundaria de la región LBD ya sea por pérdida o introducción de enlaces característicos de estructuras alfa hélices o láminas beta. Por otra parte, los resultados del análisis bioinformático de las estructuras tridimensionales llevado a cabo sobre la sustitución p.G345R, se correlacionaron con los ensayos funcionales reportados y realizados sobre la misma, incluso respecto a otras sustituciones identificadas en la misma posición (Takashi Nagaya et al 1991), (Kitajima et al. 1995, Adams et al. 1992, Padilla et al. 1991).

La sustitución p.G345R previamente descrita, se ha estudiado profundamente desde el punto de vista funcional, y se localiza en el núcleo proteico a diferencia de la posición 452; de modo que los cambios en la superficie electrostática no fueron tan evidentes. Como se explicó anteriormente, nuestros resultados bioinformáticos fueron compatibles con los funcionales que la sustitución p.G345R provocaría una alteración directa de la afinidad en la interacción con T₃, pudiendo entonces comprenderse la importancia de dicha posición independientemente del reemplazo aminoacídico. Los resultados de este análisis bioinformático sugieren que el reemplazo de la correcta Glicina 345 de naturaleza hidrofóbica por Arginina de naturaleza de carga positiva o Básico, aparentemente genera la formación de un enlace de puente de hidrógeno entre el aminoácido y la hormona, así como también una superposición en los radios de Van der Waals entre la hormona y el aminoácido Arginina, ocasionando un impedimento estérico del TR β sobre T₃; sin embargo aparentemente no ocasiona por el cambio alteraciones en la superficie electrostática, ni la interacción de homodimerización, ni la interacción con el co-regulador GRIP no dependiente de hormona). El Valor de energía de minimización fue calculado mediante el programa Swiss PDB Viewer 4.04 observándose una clara diferencia con

valores suficientemente altos en la diferencia entre la proteína nativa y la proteína mutada en esta misma posición.

Los resultados observados en la sustitución p.P452L, sugieren una disminución en la estabilidad del receptor, dado que dicha posición se encuentra en una región arquitectónicamente estabilizadora entre dos hélices (11 y 12). Luego dicha posición se relaciona con la movilidad o flexibilidad de la molécula. El cambio de una Prolina por una Leucina sugiere una disminución en la rigidez. Los resultados de este análisis bioinformático sugieren que el reemplazo de la correcta Prolina 452 de naturaleza hidrofóbica por Leucina de naturaleza hidrofóbica igualmente, no genera la formación de enlaces de puentes de hidrógeno entre el aminoácido y la hormona distintos a la forma nativa, no ocasionan impedimentos estéricos del TR β sobre T₃ ni el co-Activador Grip, ni en la de homodimerización, sin embargo aparentemente ocasiona por el cambio, alteraciones en la superficie electrostática. El Valor de energía de minimización fue calculado mediante el programa Swiss PDB Viewer 4.04 observándose una clara diferencia con valores altos entre la proteína nativa y la proteína mutada en esta posición.

Hemos analizado además la sustitución p.A268G conocida, observándose qué valor de energía de minimización calculado podría afectar la estabilidad de la proteína. Así mismo el plegamiento de la misma durante la síntesis se vería alterado dado los resultados de la predicción de la estructura secundaria. Los resultados de este análisis bioinformático sugieren que el reemplazo de la correcta Alanina 268 de naturaleza hidrofóbica por Glicina de naturaleza hidrofóbica, aparentemente no alteraría la formación de enlaces puente de hidrógeno así como tampoco la superficie electrostática, ni cambios en la interacción de homodimerización, ni la interacción con el co-Activador GRIP. El Valor de energía de minimización fue calculado mediante el programa Swiss PDB Viewer 4.04 observándose una clara diferencia entre la proteína nativa y la proteína mutada en esta posición.

Ensayos mediante los cuales los alelos mutados TRbeta expresados “*in vitro*” y el análisis posterior de afinidad de unión a T₃, de su capacidad de dimerización y de unión a correguladores, nos permitirán confirmar las hipótesis descriptas.

Si bien la frecuencia del Síndrome de Resistencia a Hormonas Tiroideas es muy baja, no debemos cometer el error de subestimarla ya que muchos pacientes atraviesan la patología de manera asintomática. El cuadro clínico es muy variable desde bocios discretos, hasta formas más graves (sordera neurosensorial, trastornos neurológicos, *nistagmus*). Un diagnóstico apropiado y oportuno direccionaría el tratamiento más conveniente evitando no solo la administración de medicación inapropiada como antitiroideos, los cuales producen grandes bocios secundarios a los niveles sostenidamente aumentados de TSH, sino también la resección quirúrgica de la glándula por su confusión con un cuadro de hipertiroidismo tal como ocurrió con nuestro paciente portador de la mutación p.P452L.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En el presente trabajo hemos identificado 3 mutaciones diferentes en el gen THRbeta en 3 familias con cuadro clínico bioquímico compatible con RHT y un polimorfismo descrito en otras dos familias. De esta manera se identificó y caracterizó en el exón 10 una mutación no descrita en bibliografía, c.1355C>T, p.P452L por lo cual se realizó un análisis poblacional en el cual 100 cromosomas normales fueron analizados mediante la técnica de PCR-SSCP con el objeto de determinar la naturaleza de la alteración. Los resultados obtenidos indicaron que se trataba de una nueva mutación. El análisis del grupo familiar del paciente portador de la p.P452L permitió determinar que se trató de una mutación de *novo*. Por otra parte se identificaron dos mutaciones descritas previamente, la c.802C>G, p.A268G (Pascal et al. 1995)(Kawther et al.2014)(Rivolta et al.2014) localizada en el exón 8 y la c.1033G>C, p.G345R (Takashi et al. 1992) (Adams et al. 1994) (Lee et al. 2011) (presente en el exón 9. El análisis del grupo familiar de los pacientes portadores de las mutaciones descritas permitió determinar que la p.A268G tenía un origen materno mientras que la mutación p.G345R resultó ser una mutación de *novo*. El polimorfismo identificado en dos familias es el c.735T>C, p.F245F, presente en el exón 7 y descrito previamente. Ninguna de las variantes alélicas correspondientes a dicho polimorfismo se han asociado con RHT.

Con el fin de evaluar las mutaciones identificadas, previo a estudios funcionales *in vivo*, se llevaron a cabo análisis bioinformáticos para predecir el posible efecto deletéreo que las mismas pudieran ocasionar. La secuencia de aminoácidos de una proteína, también llamada estructura primaria, puede ser determinada fácilmente desde la secuencia de nucleótidos sobre el gen que la codifica. El conocimiento de esta estructura es vital para entender la función de la proteína. Consecuentemente, así mismo es de vital importancia para el estudio de la función proteica, el entendimiento de la estructura secundaria de las proteínas o el plegamiento regular local entre residuos aminoacídicos cercanos de la cadena polipeptídica y de la estructura terciaria de una proteína la cual generalmente se encuentra conformada por varios tramos con estructuras secundarias distintas. Relacionado

con la estructura terciaria es de gran interés conocer como las proteínas están organizadas en función de los aminoácidos que la conforman. Así, los aminoácidos apolares se sitúan hacia el interior de la proteína y los polares se sitúan hacia el exterior interactuando con el agua circundante dándole esta característica estructural a la proteína particularidades físicoquímicas. La predicción de dichas estructuras es de alta complejidad lo que la convierte en un enigma a resolver a diario.

En la actualidad, hay diversos programas de predicción gratuitos basados en la secuencia. En general, la sensibilidad de estos programas es alta, mientras que la especificidad es relativamente baja (Laskowski RA et al. 2008). Otro método alternativo es la predicción sobre la base de datos de la estructura en tres dimensiones en el que el efecto sobre la estructura proteica se predice a partir de una o más reglas (por ejemplo, la ubicación de la mutación y el cambio en el tamaño de aminoácidos). En los últimos años se introdujo un método de predicción para evaluar la patogenicidad de mutaciones identificadas basado en el modelado de estructuras proteicas sobre la base de estructuras cristalográficas de las mismas. En este sentido, una alteración se predice como deletérea cuando produce: pérdida de puentes de hidrógeno, pérdidas de contactos de van der Waals o formación de contactos anormales entre residuos o entre residuos y ligando. Ciertas mutaciones podrían ser predichas como benignas dado que no interrumpirían puentes de hidrógeno, ni alterarían contactos de van der Waals, ni afectarían la formación de contactos entre residuos o entre residuos y la hormona tiroidea (Narumi S et al.2010). Sin embargo la predicción del impacto de las sustituciones identificadas podrían producir cambios en la estructura secundaria afectando el plegamiento de la proteína como también su estabilidad, conformación e interacción de las estructuras terciarias, considerando no solo interacciones entre residuos y entre residuos y hormona tiroidea, sino también interacciones con el corregulador más estudiado involucrado en el mecanismo de acción de las hormonas tiroideas, GRIP.

En el presente trabajo, se han incluido tanto la predicción del impacto que todas las sustituciones identificadas ocasionarían sobre las estructuras secundarias, como así también sobre la estabilidad, conformación e interacción de las estructuras terciarias, considerando no solo interacciones entre residuos y entre residuos y hormona tiroidea, sino también con correguladores, ampliando entonces el espectro de interacciones que pudieran verse

afectadas a causa de mutaciones. Estos ensayos se basaron en diferentes estructuras cristalográficas, considerando aquellas en las que el receptor se encuentra unido a hormona en forma monomérica, formando homodímeros como también cocrystalizado con el corregulador GRIP.

Se realizaron los ensayos de mutagénesis “in silico” tanto de la sustitución novel como de dos mutaciones previamente descritas (p.A268G y p.G345R) y ampliamente estudiadas funcionalmente, con el fin de validar el procedimiento y sus resultados. En todos los casos las sustituciones alterarían la estructura secundaria de la región LBD ya sea por pérdida o introducción de enlaces característicos de estructuras alfa hélices o láminas beta. Por otra parte, los resultados del análisis bioinformático de las estructuras tridimensionales llevado a cabo sobre la sustitución p.G345R, se correlacionaron con los ensayos funcionales reportados y realizados sobre la misma, incluso respecto a otras sustituciones identificadas en la misma posición (Takashi Nagaya et al 1991), (Kitajima et al. 1995, Adams et al. 1992, Padilla et al. 1991).

La sustitución p.G345R previamente descrita, se ha estudiado profundamente desde el punto de vista funcional, y se localiza en el núcleo proteico a diferencia de la posición 452; de modo que los cambios en la superficie electrostática no fueron tan evidentes. Como se explicó anteriormente, nuestros resultados bioinformáticos fueron compatibles con los funcionales que la sustitución p.G345R provocaría una alteración directa de la afinidad en la interacción con T₃, pudiendo entonces comprenderse la importancia de dicha posición independientemente del reemplazo aminoacídico. Los resultados de este análisis bioinformático sugieren que el reemplazo de la correcta Glicina 345 de naturaleza hidrofóbica por Arginina de naturaleza de carga positiva o Básico, aparentemente genera la formación de un enlace de puente de hidrógeno entre el aminoácido y la hormona, así como también una superposición en los radios de Van der Waals entre la hormona y el aminoácido Arginina, ocasionando un impedimento estérico del TR β sobre T₃; sin embargo aparentemente no ocasiona por el cambio alteraciones en la superficie electrostática, ni la interacción de homodimerización, ni la interacción con el co-regulador GRIP no dependiente de hormona). El Valor de energía de minimización fue calculado

mediante el programa Swiss PDB Viewer 4.04 observándose una clara diferencia con valores suficientemente altos en la diferencia entre la proteína nativa y la proteína mutada en esta misma posición.

Los resultados observados en la sustitución p.P452L, sugieren una disminución en la estabilidad del receptor, dado que dicha posición se encuentra en una región arquitectónicamente estabilizadora entre dos hélices (11 y 12). Luego dicha posición se relaciona con la movilidad o flexibilidad de la molécula. El cambio de una Prolina por una Leucina sugiere una disminución en la rigidez. Los resultados de este análisis bioinformático sugieren que el reemplazo de la correcta Prolina 452 de naturaleza hidrofóbica por Leucina de naturaleza hidrofóbica igualmente, no genera la formación de enlaces de puentes de hidrógeno entre el aminoácido y la hormona distintos a la forma nativa, no ocasionan impedimentos estéricos del TR β sobre T₃ ni el co-Activador Grip, ni en la de homodimerización, sin embargo aparentemente ocasiona por el cambio, alteraciones en la superficie electrostática. El Valor de energía de minimización fue calculado mediante el programa Swiss PDB Viewer 4.04 observándose una clara diferencia con valores altos entre la proteína nativa y la proteína mutada en esta posición.

Hemos analizado además la sustitución p.A268G conocida, observándose qué valor de energía de minimización calculado podría afectar la estabilidad de la proteína. Así mismo el plegamiento de la misma durante la síntesis se vería alterado dado los resultados de la predicción de la estructura secundaria. Los resultados de este análisis bioinformático sugieren que el reemplazo de la correcta Alanina 268 de naturaleza hidrofóbica por Glicina de naturaleza hidrofóbica, aparentemente no alteraría la formación de enlaces puente de hidrógeno así como tampoco la superficie electrostática, ni cambios en la interacción de homodimerización, ni la interacción con el co-Activador GRIP. El Valor de energía de minimización fue calculado mediante el programa Swiss PDB Viewer 4.04 observándose una clara diferencia entre la proteína nativa y la proteína mutada en esta posición.

Ensayos mediante los cuales los alelos mutados TRbeta expresados “*in vitro*” y el análisis posterior de afinidad de unión a T₃, de su capacidad de dimerización y de unión a correguladores, nos permitirán confirmar las hipótesis descriptas.

Si bien la frecuencia del Síndrome de Resistencia a Hormonas Tiroideas es muy baja, no debemos cometer el error de subestimarla ya que muchos pacientes atraviesan la patología de manera asintomática. El cuadro clínico es muy variable desde bocios discretos, hasta formas más graves (sordera neurosensorial, trastornos neurológicos, *nistagmus*). Un diagnóstico apropiado y oportuno direccionaría el tratamiento más conveniente evitando no solo la administración de medicación inapropiada como antitiroideos, los cuales producen grandes bocios secundarios a los niveles sostenidamente aumentados de TSH, sino también la resección quirúrgica de la glándula por su confusión con un cuadro de hipertiroidismo tal como ocurrió con nuestro paciente portador de la mutación p.P452L.

BIBLIOGRAFIA

- Abramowicz MJ, Duprez L, Parma J 1997 Familial congenital hypothyroidism due to inactivating mutation of the thyrotropin receptor causing profound hypoplasia of the thyroid gland. *J Clin Invest* 99:3018–3024.
- Abramowicz MJ, Targovnik HM, Varela V, Cochaux P, Krawiec L, Pisarev MA, Propato FV, Juvenal G, Chester HA, Vassart G 1992 Identification of a mutation in the coding sequence of the human thyroid peroxidase gene causing congenital goiter. *J Clin Invest* 90:1200-1204.
- Abramowicz MJ, Targovnik HM, Varela V, Cochaux P, Krawiec L, Pisarev MA, Propato FV, Juvenal G, Chester HA, Vassart G 1992 Identification of a mutation in the coding sequence of the human thyroid peroxidase gene causing congenital goiter. *J Clin Invest* 90:1200-1204.
- Adato A, Raskin L, Petit C, Bonne-Tamir B 2000 Deafness heterogeneity in a Druze isolate from the Middle East: novel OTOF and PDS mutations, low prevalence of GJB2 35delG mutation and indication for a new DFNB locus. *Eur J Hum Genet* 8:437-42.
- Afink G, Kulik W, Overmars H, de Randamie J, Veenboer T, van Cruchten A, Craen M, Ris-Stalpers C 2008 Molecular characterization of iodotyrosine dehalogenase deficiency in patients with hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4894–4901.
- Alberti L, Proverbio MC, Costagliola S, Romoli R, Boldrighini B, Vigone MC, Weber G, Chiumello G, Beck-Peccoz P, Persani L 2002 Germline mutations of TSH receptor gene as cause of nonautoimmune subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2549–2555.
- Altschul S F et al. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic acids research* 25(17): 3389-402. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=146917&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Alzaharani AS, Baitei EY, Zou M, Shi Y 2006 Metastatic thyroid follicular carcinoma arising from congenital goiter due to a novel splice donor site mutation in the thyroglobulin gene. *J Clin Endocrinol Metab* 91:740-746.
- Amaro.-Méndez S. Breve historia de la endocrinología. 1975. Editorial Científico-Médica, La Habana.
- Ambrügger P, Stoeva I, Biebermann H, Torresani T, Leitner C, Gruters A 2001 Novel mutations of the thyroid peroxidase gene in patients with permanent congenital hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* 145: 19-24.
- Arnaud-Lopez L, Usala G, Ceresini G, Mitchell BD, Pilia MG, Piras MG, Sestu N, Maschio A, Busonero F, Albai G, Dei M, Lai S, Mulas A, Crisponi L, Tanaka T, Bandinelli S, Guralnik JM, Loi A, Balaci L, Sole G, Prinzi A, Mariotti S, Shuldiner AR, Cao A, Schlessinger D, Uda M, Abecasis GR, Nagaraja R, Sanna S, Naitza S 2008 Phosphodiesterase 8B gene variants are associated with serum TSH levels and thyroid function. *Am J Hum Genet* 82:1270–1280.
- Arnold, Konstantin et al. 2006. "The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling." *Bioinformatics (Oxford, England)* 22(2): 195-201. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16301204> (Accessed October 26, 2012).
- Avbelj M, Tahirovic H, Debeljak M, Kusekova M, Toromanovic A, Krzysnik C, Battelino T 2007 High prevalence of thyroid peroxidase gene mutations in patients with thyroid dysmorphogenesis. *Eur J Endocrinol* 156:511-519.
- Bakker B, Bikker H, Vulsma T, de Randamie JS, Wiedijk BM, de Vijlder JJ 2000 Two decades of screening for congenital hypothyroidism in The Netherlands: TPO gene mutations in total iodide organification defects (an update). *J Clin Endocrinol Metab* 85:3708-3712.
- Ban Y, Tozaki T, Taniyama M, Skrabanek L, Nakano Y, Ban Y, Hirano T. 2012. Multiple SNPs in intron 41 of thyroglobulin gene are associated with autoimmune thyroid disease in the Japanese population. *Plos one* 7:5-37501.
- Barkoff MS, Kocherginsky M, Anselmo J, Weiss RE, Refetoff SJ. 2010. Autoimmunity in Patients with Resistance to Thyroid Hormone. *Clin. Endocrinol. Metab.* 95(7):3189–3193.
- Barreiro Arcos ML, Sterle HA, Paulazo MA, Valli E, Klecha AJ, Isse B, Pellizas CG, Farias RN, Cremaschi GA. 2011. Cooperative nongenomic and genomic actions on thyroid hormone mediated-modulation of T cell proliferation involve up-regulation of thyroid hormone receptor and inducible nitric oxide synthase expression. *J. Cell. Physiol.* 226: 3208–3218.
- Baryshev M, Sargsyan E, Wallin G, Lejniaks A, Furudate S, Hishinuma A, Mkrtchian S, 2004 Unfolded protein response is involved in the pathology of human congenital hypothyroid goiter and rat non-goitrous congenital hypothyroidism. *J Mol Endocrinol* 32:903-920.
- Beck-Peccoz P, Calebiro D., Persani L 2006b TSH resistance. *Hot Thyroidol* e1.
- Beck-Peccoz P, Persani L, Calebiro D, Bonomi M, Mannavola D, Campi I 2006a Syndromes of hormone resistance in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20:529–546.
- Belforte, F.S., Miras, M.B., Olcese, M.C., Sobrero, G., Testa, G., Muñoz, L., Gruñeiro-Papendieck, L., Chiesa, A., González-Sarmiento, R., Targovnik, H.M., Rivolta, C.M., 2012. Congenital goitrous hypothyroidism: mutation analysis in the thyroid peroxidase gene. *Clin Endocrinol (Oxf)* 76, 568-576.
- Belguith-Maalej S, Kallel R, Mnif M, Abid M, Ayadi H, Hadj-Kacem H. 2013. Association of intronic repetition of SLC26A4 gene with Hashimoto thyroiditis disease. *Genet. Res., Camb.* 95, 38–44.
- Belguith-Maalej S, Rebuffat SA, Charfeddine I, Mnif M, Nadir RF, Abid M, Ghorbel A, Peraldi-Roux S, Ayadi H, Hadj-Kacem H. 2011. SLC26A4 expression among autoimmune thyroid tissues. *Immunobiology* 216, 571–578.
- Biebermann H, Schöneberg T, Krude H, Schultz G, Gudermann T, Grüters A 1997 Mutations of the human thyrotropin receptor gene causing thyroid hypoplasia and persistent congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3471–3480.
- Biebermann H, Schöneberg T, Schulz A, Krause G, Grüters A, Schultz G, Gudermann T 1998 A conserved tyrosine residue (Y601) in transmembrane domain 5 of the human thyrotropin receptor serves as a molecular switch to determine G-protein coupling. *FASEB J.* 12:1461–1471.
- Bikker H, Baas F, de Vijlder JJ 1997 Molecular analysis of mutated thyroid peroxidase detected in patients with total iodide organification defects. *J Clin Endocrinol Metab* 82:649-653.
- Bikker H, den Hartog MT, Baas F, Gons MH, Vulsma T, de Vijlder JJ 1994 A 20-basepair duplication in the human thyroid peroxidase gene results in a total iodide organification defect and congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 79:248-252.
- Bikker H, Vulsma T, Baas F, de Vijlder JJ 1995 Identification of five novel inactivating mutations in the human thyroid peroxidase gene by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Mutat* 6:9-16.
- Bikker H, Waelkens JJ, Bravenboer B, de Vijlder JJ 1996 Congenital hypothyroidism caused by a premature termination signal in exon 10 of the human thyroid peroxidase gene. *J Clin Endocrinol Metab* 81:2076–2079.
- Bikker H, Waelkens JJ, Bravenboer B, de Vijlder JJ 1996 Congenital hypothyroidism caused by a premature 47. termination signal in exon 10 of the human thyroid peroxidase gene. *J Clin Endocrinol Metab* 81:2076–2079.
- Bliss RD, Gauger PG, Delbridge LW. Surgeons Approach to the Thyroid Gland: Surgical Anatomy and the importance of technique. *World J. Surg.* 2000; 24: 91-97.
- Blons H 2004 Screening of SLC26A4 (PDS) gene in Pendred's syndrome: a large spectrum of mutations in France and phenotypic heterogeneity. *Clin Genet* 66:333– 340.
- Bogazzi F, Raggi F, Ultimeieri F, Campomori A, Cosci C, Berrettini S, Neri E, La Rocca R, Ronca G, Martino E, Bartalena L 2000 A novel mutation in the pendrin gene associated with Pendred's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 52:279-85
- Bogazzi F, Russo D, Raggi F, Ultimeieri F, Berrettini S, Forli F, Grasso L, Ceccarelli C, Mariotti S, Pinchera A, Bartalena L, Martino E 2004 Mutations in the SLC26A4 (pendrin) gene in patients with sensorineural deafness and enlarged vestibular aqueduct. *J Endocrinol Invest* 27:430-435.
- Borck G, Roth C, Martine U, Wildhardt G, Pohlentz J 2003 Mutations in the PDS Gene in German Families with Pendred's Syndrome: V138F Is a Founder Mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2916-2921.
- Borgel K, Pohlentz J, Holzgreve W, Bramswig JH 2005 Intrauterine therapy of goitrous hypothyroidism in a boy with a new compound heterozygous mutation (Y453D and C800R) in the thyroid peroxidase gene. A long-term follow-up. *Am J Obstet Gynecol* 193:857-858.
- Börgel, Kirsten et al. 2005. "Intrauterine therapy of goitrous hypothyroidism in a boy with a new compound heterozygous mutation (Y453D and C800R) in the thyroid peroxidase gene. A long-term follow-up." *American journal of obstetrics and gynecology* 193(3 Pt 1): 857-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16150286>.
- Bretones P, Duprez L, Parma J, David M, Vassart G, Rodien P 2001 A familial case of congenital hypothyroidism caused by a homozygous mutation of the thyrotropin receptor gene. *Thyroid* 11:977–980.

- Calaciura F, Miscio G, Coco A, Leonardi D, Cisternino C, Regalbuto C, Bozzali M, Maiorana R, Ranieri A, Carta A, Buscema M, Trischitta V, Sava L, Tassi V 2002 Genetics of specific phenotypes of congenital hypothyroidism: a population-based approach. *Thyroid* 12:945–951.
- Calebiro D, de Filippis T, Lucchi S, Covino C, Panigone S, Beck-Peccoz P, Dunlap D, Persani L 2005 Intracellular entrapment of wild-type TSH receptor by oligomerization with mutants linked to dominant TSH resistance. *Hum Mol Genet* 14 :2991–3002.
- Camilot M, Teofoli F, Gandini A 2005 Thyrotropin receptor gene mutations and TSH resistance: variable expressivity in the heterozygous. *Clin Endocrinol (Oxf)* 63:146–151.
- Campbell C, Cucci RA, Prasad S, Green GE, Edeal JB, Galer CE, Karniski LP, Sheffield VC, Smith, RJ 2001 Pendred syndrome, DFNB4, and PDS/SLC26A4 identification of eight novel mutations and possible genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat* 17:403–411.
- Cangul, Hakan et al. 2013. “Thyroid dysmorphogenesis is mainly caused by TPO mutations in consanguineous community.” *Clinical endocrinology* 79(2): 275-81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23236987>.
- Caputo M, Rivolta CM, Esperante SA, Gruñeiro-Papendieck L, Chiesa A, Pellizas CG, González-Sarmiento R, Targovnik HM 2007a. Congenital hypothyroidism with goitre caused by new mutations in the thyroglobulin gene. *Clin Endocrinol (Oxf)* 67:351–357.
- Caputo M, Rivolta CM, Gutnisky VJ, Gruñeiro-Papendieck L, Chiesa A, Medeiros-Neto G, González-Sarmiento R, Targovnik HM 2007b Recurrence of the p.R277X/p.R1511X compound heterozygous mutation in the thyroglobulin gene in unrelated families with congenital goiter and hypothyroidism: haplotype analysis using intragenic thyroglobulin polymorphisms. *J Endocrinol* 195:167–177.
- Caron P, Moya CM, Malet D, Gutnisky VJ, Chabardes B, Rivolta CM, Targovnik HM 2003 Compound heterozygous mutations in the thyroglobulin gene (1143delC and 6725G>A(R2223H)) resulting in fetal goitrous hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 3546–3553.
- Cartegni, Luca et al. 2003. “ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers.” *Nucleicacidsresearch* 31(13):3568-71. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=169022&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cavarzere P, Castanet M, Polak M, Raux-Demay MC, Cabrol S, Carel JC, Leger J, Czernichow P 2008 Clinical description of infants with congenital hypothyroidism and iodide organification defects. *Horm Res* 70:240–248.
- Cavarzere P, Castanet M, Polak M, Raux-Demay MC, Cabrol S, Carel JC, Leger J, Czernichow P 2008 41. Clinical description of infants with congenital hypothyroidism and iodide organification defects. *Horm Res* 70:240–248.
- Clifton-Bligh RJ, Gregory JW, Ludgate M, John R, Persani L, Asteria C, Beck-Peccoz P, Chatterjee, VKK 1997 Two novel mutations in the thyrotropin (TSH) receptor gene in a child with resistance to TSH. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1094–1100.
- Corral J, Martín C, Pérez R, Sánchez I, Mories MT, San Millán JL, Miralles JM, González-Sarmiento, R 1993 Thyroglobulin gene point mutation associated with non-endemic simple goitre. *Lancet* 341:462-464.
- Coucke PJ, Van Hauwe P, Everett LA, Demirhan O, Kabakkaya Y, Dietrich NL, Smith RJ, Coyle E, Reardon W, Trembath R, Willems PJ, Green ED, Van Camp G 1999 Identification of two different mutations in the PDS gene in an inbred family with Pendred syndrome. *J Med Genet* 36:475-7
- Coyle B, Reardon W, Herbrick JA, Tsui LC, Gausden E, Lee J, Coffey R, Grueters A, Grossman A, Phelps PD, Luxon L, Kendall-Taylor P, Scherer SW, Trembath RC 1998 Molecular analysis of the PDS gene in Pendred syndrome. *Hum Mol Genet* 7:1105-1112.
- Cremers WR, Bolder C, Admiraal RJ, Everett LA, Joosten FB, van Hauwe P, Green ED, Otten BJ 1998 Progressive sensorineural hearing loss and a widened vestibular aqueduct in Pendred syndrome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 124:501–505.
- Dalamón V, Elgoyhen AB 2009 Hipoacusias de origen genético. Actualización: Genetic sensorineural hearing loss. *Rev Med Clin Condes* 20:408 - 417
- De Felice M, Di Lauro R 2004 Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr Rev* 25:722–746.
- De la Vieja A, Ginter CS, Carrasco N 2004 The Q267E mutation in the sodium/iodide symporter (NIS) causes congenital iodide transport defect (ITD) by decreasing NIS turnover. *J Cell Sci* 117:677–687.
- De la Vieja A, Ginter CS, Carrasco N 2005 Molecular analysis of a congenital iodide transport defect: G543E impairs maturation and trafficking of the Na⁺/I⁻ symporter. *Mol Endocrinol* 19:2847–2858.
- De la Vieja, A., Reed, M.D., Ginter, C.S., Carrasco, N., 2007. Amino acid residues in transmembrane segment IX of the Na/I symporter play a role in its Na⁺ dependence and are critical for transport activity. *J. Biol. Chem.* 282, 25290–25298.
- De Marco G, Agretti P, Camilot M, Teofoli F, Tatò L, Vitti P, Pinchera A, Tonacchera M 2009 Functional studies of new thyrotropin receptor (TSHr) mutations identified in patients affected by hypothyroidism or isolated hyperthyrotropinaemia. *Clin Endocrinol. (Oxf)* 70, 335–338.
- de Roux N, Misrahi M, Brauner R, Houang M, Carel JC, Granier M, Le Bouc Y, Ghinea N, Boumedienne A, Toublanc JE, Milgrom E 1996 Four families with loss of function mutations of the thyrotropin receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4229–4235.
- De Vijlder JJM, Vulsma T 1996 Hereditary metabolic disorders causing hypothyroidism. In: Braverman, L.E., Utiger, R.D. (Eds.), *Werner and Ingbar's the Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*, 7 edn. Lippincott-Raven, Philadelphia:749–755.
- Deladoey J, Pfarr N, Vuissoz JM, Parma J, Vassart G, Biesterfeld S, Pohlenz J, Van VG 2008 Pseudodominant inheritance of goitrous congenital hypothyroidism caused by TPO mutations: molecular and in silico studies. *J Clin Endocrinol Metab* 93:627-633.
- Dohan O, Gavrielides MV, Ginter CS, Amzel LM, Carrasco N 2002 Na⁺/I⁻ symporter activity requires a small and uncharged amino acid residue at position 395. *Mol Endocrinol* 16:1893–1902.
- Dossena S, Rodighiero S, Vezzoli V, Bazzini C, Sironi C, Meyer G, Furst J, Ritter M, Garavaglia ML, Fugazzola L, Persani L, Zorowka P, Storelli C, Beck-Peccoz P, Botta G, Paulmichl M 2006 Fast fluorometric method for measuring pendrin (SLC26A4) Cl⁻/I⁻ transport activity. *Cell Physiol Biochem* 18: 67–74.
- Dumitrescu AM, Refetoff S. 2013. Review. The syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone *Biochimica et Biophysica Acta* 1830: 3987–4003.
- Dunn JT, Dunn AD 2000 Thyroglobulin: chemistry, biosynthesis, and proteolysis. In: *The Thyroid*, 8th edition. Eds: Braverman LE, Utiger R. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia:91-104.
- Ellegaard L, Molinari M, Helenius A 1999 Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 286:1882-1888.
- Entrez Gene: THRA thyroid hormone receptor, alpha, Erythroblastic Leukemia Viral “v-erb-a” Oncogene Homolog, Avian.
- Espósito, C; Miccadei, S.; Salardi, A.; Civitareale, D.; 1998
- Everett LA, Glaser B, Beck JC, Idol JR, Buchs A, Heyman M, Adawi F, Hazani E, Nassir E, Baxevasis AD, Sheffield VC, Green ED 1997 Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet* 17:411–422.
- Fagman H, Andersson L, Nilsson M. 2006 The developing mouse thyroid: embryonic vessel contacts and parenchymal growth pattern during specification, budding, migration, and lobulation. *Dev Dyn*. 235:444-55.
- Fayadat L, Siffroi-Fernandez S, Lanet J, Franc JL 2000 Calnexin and calreticulin binding to human thyroperoxidase is required for its first folding step(s) but is not sufficient to promote efficient cell surface expression. *Endocrinology* 141:959-966.
- Felice M, Di Lauro R. 2004 Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. 28. *Endocr Rev.* 25:722-46.
- Ferrara A, Onigata K, Ercan O, Woodhead H, Weiss R, Refetoff S. 2012. Homozygous Thyroid Hormone Receptor Beta-Gene Mutations in Resistance to Thyroid Hormone: Three New Cases and Review of the Literature. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97(4):1328–1336.
- Fricke-Otto S, Pfarr N, Muhlenberg R, Pohlenz J 2005 Mild congenital primary hypothyroidism in a Turkish family caused by a homozygous missense thyrotropin receptor (TSHR) gene mutation (A593V). *Exp Clin Endocrinol Diab* 113:582–585.
- Friedman JE, Watson JA Jr, Lam DW, Rokita SE 2006 Iodotyrosine deiodinase is the first mammalian member of the NADHoxidase/flavin reductase superfamily. *J Biol Chem* 281:2812–2819.
- Fuchs O, Pfarr N, Pohlenz J, Thanner F, Schmidt H 2008 Congenital hypothyroidism caused by a novel homozygous mutation in the thyroid peroxidase gene. *J Pediatr Endocrinol Metab* 21:1093-1097.
- Fugazzola L 2002 Differential diagnosis between Pendred and pseudo-Pendred syndromes: clinical, radiologic, and molecular studies. *Pediatr Res* 51:479–484.
- Fugazzola L, Cerutti N, Mannavola D, Vannucchi G, Fallini C, Persani L, Beck-Peccoz P 2003 Monoallelic expression of mutant thyroid peroxidase allele causing total iodide organification defect. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3264-3271.

- Fugazzola L, Mannavola D, Cerutti N, Maghnie M, Pagella F, Bianchi P, Weber G, Persani L, Beck-Peccoz P 2000 Molecular analysis of the Pendred's syndrome gene and magnetic resonance imaging studies of the inner ear are essential for the diagnosis of true Pendred's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2469–2475.
- Fujiwara H, Tatsumi K, Tanaka S, Kimura M, Nose O, Amino N 2000 A novel V59E missense mutation in the sodium iodide symporter gene in a family with iodide transport defect. *Thyroid* 10:471–474.
- Fujiwara H, Tatsumi KI, Miki K, Harada T, Miyai K, Takai S, Amino N 1997 Congenital hypothyroidism caused by a mutation in the Na⁺/I⁻ symporter. *Nat Genet* 16:124–125.
- Fujiwara H, Tatsumi KI, Miki K, Harada T, Okada S, Nose O, Kodama S, Amino N 1998 Recurrent T354P mutation of the Na⁺/I⁻ symporter in patients with iodide transport defect. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2940–2943.
- Gagné N, Parma J, Deal C, Vassart G Van Vliet G 1998 Apparent congenital athyreosis contrasting with normal plasma thyroglobulin levels and associated with inactivating mutations in the thyrotropin receptor gene: are athyreosis and ectopic thyroid distinct entities? *J Clin Endocrinol Metab* 83:1771–1775.
- Gillam MP, Bartolone L, Kopp P, Bevenga S 2005 Molecular analysis of the PDS gene in a nonconsanguineous Sicilian family with Pendred's syndrome. *Thyroid* 15:734–741.
- Gillam MP, Sidhaye AR, Lee EJ, Rutishauser J, Stephan CW, Kopp P 2004 Functional characterization of pendrin in a polarized cell system. Evidence for pendrin-mediated apical iodide efflux. *J Biol Chem* 279:13004–13010.
- Gimelbrant A 2007 Widespread monoallelic expression on human autosomes. *Science* 318: 1136–40
- Gnidouh S, Caillou B, Talbot M, Ohayon R, Kaniewski J, Noël-Hudson MS, Morand S, Agnangji D, Sezan A, Courtin F, Virion A, Dupuy C 2004 Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site. *FASEB J* 18:1574–1576.
- Gonzalez Trevino O, Karamanoglu Arseven O, Ceballos CJ, Vives VI, Ramirez RC, Gomez VV, Medeiros-Neto G, Kopp P 2001 Clinical and molecular analysis of three Mexican families with Pendred's syndrome. *Eur J Endocrinol* 144:585–593.
- González-Sarmiento R, Corral J, Mories MT, Corrales JJ, Miguel-Velado E, Miralles-García JM 2001 Monoallelic deletion in the 5' region of the thyroglobulin gene as a cause of sporadic nonendemic simple goiter. *Thyroid* 11:789–93.
- Grasberger H 2010 Defects of thyroidal hydrogen peroxide generation in congenital hypothyroidism. *Mol Cell Endocrinol* 322:99–106.
- Grasberger H, De Deken X, Miot F, Pohlenz J, Refetoff S 2007a Missense mutations of dual oxidase 2 (DUOX2) implicated in congenital hypothyroidism have impaired trafficking in cells reconstituted with DUOX2 maturation factor. *Mol Endocrinol* 21:1408–1421.
- Grasberger H, Mimouni-Bloch A, Vantghem MC, van Vliet G, Abramowicz M, Metzger DL, Abdullatif H, Rydlewski C, Macchia PE, Scherberg NH, van Sande J, Mimouni M, Weiss RE, Vassart G, Refetoff S 2005a. Autosomal dominant resistance to thyrotropin as a distinct entity in five multigenerational kindreds: clinical characterization and exclusion of candidate loci. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4025–4034.
- Grasberger H, Refetoff S 2006 Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent. *J Biol Chem* 281:18269–18272.
- Grasberger H, Van Sande J, Hag-Dahood Mahameed A, Tenenbaum-Rakover Y, Refetoff S 2007 A familial thyrotropin (TSH) receptor mutation provides in vivo evidence that the inositol phosphates/Ca²⁺ cascade mediates TSH action on thyroid hormone synthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2816–2820.
- Gutnisky VJ, Moya CM, Rivolta CM, Domené S, Varela V, Toniolo JV, Medeiros-Neto G, Targovnik HM 2004 Two distinct compound heterozygous constellation (R277X / IVS34-1G>C and R277X / R1511X) in the thyroglobulin (TG) gene in affected individuals of a Brazilian kindred with congenital goiter and defective TG synthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 89:646–657.
- Haynes CM, Caldwell S, Cooper AA 2002 An HRD/DER- independent ER quality control mechanism involves Rsp5p-dependent ubiquitination and ER-golgi transport. *J Cell Biol* 158 :91-101.
- Hishinuma A, Fukata S, Kakudo K, Murata Y, Ieiri T 2005 High incidence of thyroid cancer in longstanding goiters with thyroglobulin mutations. *Thyroid* 15:1079-1084.
- Hishinuma A, Fukata S, Nishiyama S, Nishi Y, Oh-Ishi M, Murata Y, Ohyama Y, Matsuura N, Kasai K, Harada S, Kitanaka S, Takamatsu J, Kiwaki K, Ohye H, Uruno T, Tomoda C, Tajima T, Kuma K, Miyauchi A, Ieiri T 2006 Haplotype analysis reveals founder effects of thyroglobulin gene mutations C1058R and C1977S in Japan. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3100-3104.
- Hishinuma A, Furudate SI, Masamichi OI, Nagakubo N, Namatame T, Ieiri T 2000 A novel missense mutation (G2320R) in thyroglobulin causes hypothyroidism in rdw rats. *Endocrinology* 141:4050-4055.
- Hishinuma A, Takamatsu J, Ohyama Y, Yokozawa T, Kanno Y, Kuma K, Yoshida S, Matsuura N, Ieiri T 1999 Two novel cysteine substitutions (C1263R and C1995S) of thyroglobulin cause a defect in intracellular transport of thyroglobulin in patients with congenital goiter and the variant type of adenomatous goiter. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 1438-1444.
- Horvath A, Boikos S, Giatzakis C, Robinson-White A, Groussin L, Griffin KJ, Stein E, Levine E, Delimpasi G, Hsiao HP, Keil M, Heyerdahl S, Matyakhina L, Libè R, Fratticci A, Kirschner LS, Cramer K, Gaillard RC, Bertagna X, Carney JA., Bertherat J, Bossis I, Stratakis CA 2006 A genomewide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia. *Nat Genet* 38:794–800.
- Hu H, Wu L, Feng Y, Pan Q, Long Z, Li J, Dai H, Xia K, Liang D, Niikawa N, Xia J 2007 Molecular analysis of hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct in the mainland Chinese: a unique SLC26A4 mutation spectrum. *J Hum Genet* 52:492-497.
- Ieiri T, Cochaux P, Targovnik HM, Suzuki M, Shimoda SI, Perret J, Vassart G 1991 A 3' splice site mutation in the thyroglobulin gene responsible for congenital goiter with hypothyroidism. *J Clin Invest* 88:1901-1905.
- In: Braverman, L.E., 40. Utiger, R.D. (Eds.), *Werner and Ingbar's the Thyroid: Fundamental and Clinical Text*, 7 edn. Lippincott-Raven, Philadelphia:749–755.
- Ishinaga H, Shimizu T, Yuta A, Tsukamoto K, Usami S, Majima Y 2002 Pendred's syndrome with goiter and enlarged vestibular aqueducts diagnosed by PDS gene mutation. *Head Neck* 24:185-90.
- Iwasaki S, Tsukamoto K, Usami S, Misawa K, Mizuta K, Mineta H 2006 Association of SLC26A4 mutations with clinical features and thyroid function in deaf infants with enlarged vestibular aqueduct. *J Hum Genet* 51:805-810.
- Jeziorska A, Pniewska-Siark B, Brzezińska E, Pastuszek-Lewandoska D, Lewiński A 2006 A novel mutation in the thyrotropin (thyroid-stimulating hormone) receptor gene in a case of congenital hypothyroidism. *Thyroid* 16:1303-9.
- Jordan N, Williams N, Gregory JW, Evans C, Owen M, Ludgate M 2003 The W546X mutation of the thyrotropin receptor gene: potential major contributor to thyroid dysfunction in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1002–1003.
- Kendall EC, Osterberg AE. The chemical identification of thyroxine. *J Biol Chem*. 1919; 40: 265-334
- Kim PS, Ding M, Menon S, Jing CG, Cheng JM, Miyamoto T, Li B, Furudate S, Agui T 2000 A missense mutation G2320R in the thyroglobulin gene causes non-goitrous congenital primary hypothyroidism in the WIC-rdw rat. *Mol Endocrinol* 14:1944-1953.
- Kim PS, Hossain SA, Park YN, Lee I, Yoo SE, Arvan P 1998 A single amino acid change in the acetylcholinesterase-like domain of thyroglobulin causes congenital goiter with hypothyroidism in the cog/cog mouse: A model of human endoplasmic reticulum storage diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9909-9913.
- Kim PS, Lee J, Jongsamak P, Menon S, Li B, Hossain SA, Bae J-H, Panijpan B, Arvan P 2008 Defective protein folding and intracellular retention of thyroglobulin-R19K mutant as a cause of human congenital goiter. *Mol Endocrinol* 22:477–484.
- Kim YH, Verlander JW, Matthews SW, Kurtz I, Shin W, Weiner ID, Everett LA, Green ED, Nielsen S, Wall SM 2005 Intercalated cell H⁺/OH⁻ transporter expression is reduced in Slc26a4 null mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F1262–F1272.
- Kimura T, Van Keymeulen A, Golstein J, Fusco A., Dumont JE, Roger PP 2001 Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr Rev* 22:631–656.
- Kinne A, Schüle R, Krause G. 2011. Primary and secondary thyroid hormone transporters. *Thyroid Research*. 4(Suppl 1):S7.
- Kitamura K, Takahashi K, Noguchi Y, Kuroshikawa Y, Tamagawa Y, Ishikawa K, Ichimura K, Hagiwara H 2000 Mutations of the Pendred syndrome gene (PDS) in patients with large vestibular aqueduct. *Acta Otolaryngol* 120:137-41.

- Kitanaka S, Takeda A, Sato U, Miki Y, Hishinuma A, Ieiri T, Igarashi T 2006 A novel compound heterozygous mutation in the thyroglobulin gene resulting in congenital goitrous hypothyroidism with high serum triiodothyronine levels. *J Hum Genet* 51:379-382.
- Kleinau G, Jäschke H, Neumann S, Lättig J, Paschke R, Krause G 2004 Identification of a novel epitope in the thyroid-stimulating hormone receptor ectodomain acting as intramolecular signaling interface. *J Biol Chem* 279:51590-51600.
- Kluge B, Renault N, Rohr KB. 2005 Anatomical and molecular reinvestigation of lamprey endostyle 22. development provides new insight into thyroid gland evolution. *Dev Genes Evol* 215:32.
- Kosugi S, Bhayana S, Dean HJ 1999 A novel mutation in the sodium/iodide symporter gene in the largest family with iodide transport defect. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3248-3253.
- Kosugi S, Inoue S, Matsuda A, Jhiang SM 1998a Novel, missense and loss of function mutations in the sodium/iodide symporter gene causing iodide transport defect in three Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3373-3376.
- Kosugi S, Okamoto H, Tamada A, Sanchez-Franco F 2002 A novel peculiar mutation in the sodium/iodide symporter gene in Spanish siblings with iodide transport defect. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3830-3836.
- Kosugi S, Sato Y, Matsuda A, Ohyama Y, Fujieda K, Hiroaki I, Kameya T, Isozaki O, Jhiang SM, 1998b. High prevalence of T354P sodium/iodide symporter gene mutation in Japanese patients with iodide transport defect who have heterogeneous clinical pictures. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4123-4129.
- Kotani T, Umeki K, Kawano J, Suganuma T, Hishinuma A, Ieiri T, Harada S 2003 Partial iodide organification defect caused by a novel mutation of the thyroid peroxidase gene in three siblings. *Clin Endocrinol (Oxf)* 59:198-206.
- Kotani T, Umeki K, Yamamoto I, Maesaka H, Tachibana K, Ohtaki S 1999 A novel mutation in the human thyroid peroxidase gene resulting in a total iodide organification defect. *J Endocrinol* 160:267-273.
- LaFranchi S 1999 Congenital hypothyroidism: etiologies, diagnosis, and management. *Thyroid* 9: 735-740.
- Lee J, Di Jeso B, Arvan P 2008 The cholinesterase-like domain of thyroglobulin functions as an intramolecular chaperone. *J Clin Invest* 118:2950-2958.
- Li XC, Everett LA, Lalwani AK, Desmukh D, Friedman TB, Green ED, Wilcox ER 1998 A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet* 18:215-217.
- López-Bigas N, Melchionda S, de Cid R, Grifa A, Zelante L, Govea N, Arbones ML, Gasparini P, Estivill X 2002 Identification of five new mutations of PDS/SLC26A4 in Mediterranean families with hearing impairment. *Hum Mutat* 18:548.
- Lopez-Bigas N, Rabionet R, de Cid R, Govea N, Gasparini P, Zelante L, Arbones ML, Estivill X 1999 Splice-site mutation in the PDS gene may result in intrafamilial variability for deafness in Pendred syndrome. *Hum Mutat* 14:520-526.
- Luca Persani L, Calebiro D, Cordella D, Weber G, Gelmini G, Libri D, Filippis T, Bonomi M 2010 Genetics and phenomics of hypothyroidism due to TSH resistance. *Mol Cell Endocrinol* 322:72-82.
- Machiavelli GA, Caputo M, Rivolta CM, Olcese MC, Gruñeiro-Papendieck L, Chiesa A, González-Sarmiento R, Targovnik HM 2010 Molecular analysis of congenital goiters with hypothyroidism caused by defective thyroglobulin synthesis. Identification of a novel c.7006C>T [p.R2317X] mutation and expression of minigenes containing nonsense mutations in exon 7. *Clin Endocrinol* 72:112-121.
- Mantovani G, Ballare E, Giammona E, Beck-Peccoz P, Spada A 2002 The α gene: predominant maternal origin of transcription in human thyroid gland and gonads. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4736-4740.
- Mantovani G, Bondioni S, Linglart A, Maghnie M, Cisternino M, Corbetta S, Lania AG, Beck-Peccoz P, Spada A 2007 Genetic analysis and evaluation of resistance to thyrotropin and growth hormone-releasing hormone in pseudohypoparathyroidism type Ib. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3738-3742.
- Mantovani G, Spada A 2006 Mutations in the α gene causing hormone resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20:501-513.
- Maruo Y, Takahashi H, Soeda I, Nishikura N, Matsui K, Ota Y, Mimura Y, Mori A, Sato H, Takeuchi Y 2008 Transient congenital hypothyroidism caused by biallelic mutations of the dual oxidase 2 gene in Japanese patients detected by a neonatal screening program. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4261-4267.
- Mascantoni I, Montesinos M, Alamino VA, Susperreguy S, Nicola JP, Illarregui JM, Masini-Repiso AM, Rabinovich GA, Pellizas CG. 2010. Nuclear Factor (NF)- κ B-dependent Thyroid Hormone Receptor β 1 Expression Controls Dendritic Cell Function via Akt Signaling. *J. of biological chemistry*. 285:13, 9569-9582.
- Mascia, A.; Nitsch, L.; Di Lauro, R.; Zannini, M.; 2002
- Masmoudi S, Charfedine I, Hmani M, Grati M, Ghorbel AM, Elagaied-Boulila A, Drira M, Hardelin JP, Ayadi H 2000 Pendred syndrome: phenotypic variability in two families carrying the same PDS missense mutation. *Am J Med Genet* 90:38-44.
- Matsuda A, Kosugi S 1997 A homozygous missense mutation of the sodium/iodide symporter gene causing iodide transport defect. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3966-3971.
- Mayayo E, Santiesteban P, Vicens Calvet E 2000 Patología tiroidea fetal y neonatal. En: Argente Oliver J, Carrascosa Lezcano A, Gracia Bouthelie R, Rodríguez Jierro F, eds. *Tratado de Endocrinología Pediátrica y de la Adolescencia*. Barcelona: Doyma:647-700.
- Medeiros-Neto G, Targovnik HM, Vassart G 1993 Defective thyroglobulin synthesis and secretion causing goiter and hypothyroidism. *Endocr Rev* 14:165-183.
- Mendive FM, Rivolta CM, González-Sarmiento R, Medeiros-Neto G, Targovnik HM 2005 Nonsense-mediated alternative splicing of the human thyroglobulin gene. *Mol Diagn* 9:143-149.
- Moeller LC, Kimura S, Kusakabe T, Liao XH, Van Sande J, Refetoff S 2003 Hypothyroidism in thyroid transcription factor 1 haploinsufficiency is caused by reduced expression of the thyroid-stimulating hormone receptor. *Mol Endocrinol* 17:2295-2302.
- Montanelli L, Agretti P, de Marco G, Bagattini B, Ceccarelli C, Brozzi F, Lettieri T, Cerbone M, Vitti P, Salerno M, Pinchera A, Tonacchera M 2009 Congenital Hypothyroidism and Late-Onset Goiter: Identification and Characterization of a Novel Mutation in the Sodium/Iodide Symporter of the Proband and Family Members. *Thyroid* 19:1419-1425.
- Moreno JC 2003 Identification of novel genes involved in congenital hypothyroidism using serial analysis of gene expression. *Horm Res* 60:96-102.
- Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, Vulsma T, Ris-Stalpers C 2002 Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med* 347:95-102.
- Moreno JC, Klootwijk W, van Toor H, Pinto G, D'Alessandro M, Lèger A, Goudie D, Polak M, Grütters A, Visser TJ 2008 Mutations in the iodotyrosine deiodinase gene and hypothyroidism. *N Engl J Med* 358:1811-1818.
- Morgans ME, Trotter WR 1958 Association of congenital deafness with goitre; the nature of the thyroid defect. *Lancet* 1:607-609.
- Mueller S, Kleinau G, Jaeschke H, Neumann S, Krause G, Paschke R 2006 Significance of ectodomain cysteine boxes 2 and 3 for the activation mechanism of the thyroid-stimulating hormone receptor. *J Biol Chem* 281:31638-31646.
- Nagasaki K, Narumi S, Asami T, Kikuchi T, Hasegawa T, Uchiyama M 2008 Mutation of the gene for thyroid transcription factor-1 (TITF1) in a patient with clinical features of resistance to thyrotropin. *Endocr J* 55:875-878.
- Nagashima T, Murakami M, Onigata K 2001 Novel inactivating missense mutations in the thyrotropin receptor gene in Japanese children with resistance to thyrotropin. *Thyroid* 11:551-559.
- Narumi S, Cho H, Tamada I, Kozu Y, Tsuchiya T, Nagai T, Hasegawa T. 2010. One novel and two recurrent THRB mutations associated with resistance to thyroid hormone: structure-based computational mutation prediction. *Clin Pediatr Endocrinol*; 19(4), 91-99.
- Narumi S, Muroya K, Abe Y, Yasui M, Asakura Y, Adachi M, Hasegawa T 2009 TSHR mutations as a cause of congenital hypothyroidism in Japan: a population-based genetic epidemiology study. *J Clin Endocrinol Metab* 94:1317-1323.
- Nascimento AC, Guedes DR, Santos CS, Knobel M, Rubio IG, Medeiros-Neto G 2003 Thyroperoxidase gene mutations in congenital goitrous hypothyroidism with total and partial iodide organification defect. *Thyroid* 13:1145-1151.
- Nicoletti A, Bal M, De Marco G, Baldazzi L, Agretti P, Memabò S, Ballarini E, Cicognani A, Tonacchera M, Cassio A 2009 Thyrotropin-stimulating hormone receptor gene analysis in pediatric patients with non-autoimmune subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 94:4187-4194.
- Niu DM, Hsu JH, Chong KW, Huang CH, Lu YH, Kao CH, Yu HC, Lo MY, Jap TS 2009 Six new mutations of the thyroglobulin gene discovered in taiwanese children presenting with thyroid dysmorphogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 94:5045-5052.

- Niu DM, Hwang B, Chu YK, Liao CJ, Wang PL, Lin CY 2002 High prevalence of a novel mutation (2268 insT) of the thyroid peroxidase gene in Taiwanese patients with total iodide organification defect, and evidence for a founder effect. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4208-4212.
- Niu DM, Lin CY, Hwang B, Jap TS, Liao CJ, Wu JY 2005 Contribution of genetic factors to neonatal transient hypothyroidism. *Arch Dis Child- Fetal* 90:F69-F72.
- Nogueira CR, Nguyen LQ, Coelho-Neto JR, Arseven OK, Jameson JL, Kopp P, Medeiros-Neto, GA 1999 Structural analysis of the thyrotropin receptor in four patients with congenital hypothyroidism due to thyroid hypoplasia. *Thyroid* 9:523-529.
- Ohayon R, Noël-Hudson MS, Morand S, Francon J, Courtin F, Virion A, Dupuy C 2006 Cloning and characterization of a novel isoform of iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) DEHAL1C from human thyroid: comparisons with DEHAL1 and DEHAL1B. *Thyroid* 16:715-724.
- Ohno, M.; Zannini, M.; Levy, O.; Carrasco, N.; Di Lauro, R.; 1999
- Ohye H, Fukata S, Hishinuma A, Kudo T, Nishihara E, Ito M, Kubota S, Amino N, Ieiri T, Kuma K, Miyauchi A 2008 A novel homozygous missense mutation of the dual oxidase 2 (DUOX2) gene in an adult patient with large goiter. *Thyroid* 18:561-566.
- Pachucki J, Wang D, Christophe D, Miot F 2004 Structural and functional characterization of the two human ThOX/Duox genes and their 5-flanking regions. *Mol Cell Endocrinol* 214:53-62.
- Pannain S, Weiss RE, Jackson CE, Dian D, Beck JC, Sheffield VC, Cox N, Refetoff S 1999 Two different mutations in the thyroid peroxidase gene of a large inbred Amish kindred: power and limits of homozygosity mapping. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1061-1071.
- Pardo V, Rubio IG, Knobel M, Aguiar-Oliveira MH, Santos MM, Gomes S, Oliveira CR, Targovnik HM, Medeiros-Neto G 2008 Phenotypic variation among four family members with congenital hypothyroidism caused by two distinct thyroglobulin gene mutations. *Thyroid* 18:783-786.
- Pardo V, Vono-Toniolo J, Rubio IG, Knobel M, Possato RF, Targovnik HM, Kopp P, Medeiros-Neto, G 2009 The p.A2215D thyroglobulin gene mutation leads to deficient synthesis and secretion of the mutated protein and congenital hypothyroidism with wide phenotype variation. *J Clin Endocrinol Metab* 94:2938-2944.
- Park HJ, Lee SJ, Jin HS, Lee JO, Go SH, Jang HS, Moon SK, Lee SC, Chun YM, Lee HK, Choi JY, Jung SC, Griffith AJ, Koo SK 2005 Genetic basis of hearing loss associated with enlarged vestibular aqueducts in Koreans. *Clin Genet* 67:160-165.
- Park HJ, Shaikat S, Liu XZ, Hahn SH, Naz S, Ghosh M, Kim HN, Moon SK, Abe S, Tukamoto K, Riazuddin S, Kabra M, Erdenetungalag R, Radnaabazar J, Khan S, Pandya A, Usami SI, Nance WE, Wilcox ER, Griffith AJ 2003 Origins and frequencies of SLC26A4 (PDS) mutations in east and south Asians: global implications for the epidemiology of deafness. *J Med Genet* 40:242-248.
- Park SM, Chatterjee VKK 2005 Genetics of congenital hypothyroidism. *J Med Genet* 42:379-389.
- Park SM, Chatterjee VKK 2005 Genetics of congenital hypothyroidism. *J Med Genet* 42:379.
- Park SM, Clifton-Bligh RJ, Betts P, Chatterjee VKK 2004 Congenital hypothyroidism and apparent athyreosis with compound heterozygosity or compensated hypothyroidism with probable hemizyosity for inactivating mutations of the TSH receptor. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60:220-227.
- Parlato R, Rosica A, Rodriguez-Mallon A, Affuso A, Postiglione MP, Arra C, et al. 2004 An integrated regulatory 31. network controlling survival and migration in thyroid organogenesis. *Dev Biol.* 276:464-75
- Patten JL, Johns DR, Valle D, Eil C, Gruppiso PA, Steele G, Smallwood, PM, Levine MA 1990 Mutation in the gene encoding the stimulatory G protein of adenylate cyclase in Albright's hereditary osteodystrophy. *N Eng. J Med* 322:1412-1419.
- Pendred V 1896 Deaf-mutism and goiter. *Lancet* 148:532.
- Pera A, Dossena S, Rodighiero S, Gandia M, Botta G, Meyer G, Moreno F, Nofziger C, Hernandez-Chico C, Paulmichl M 2008a Functional assessment of allelic variants in the SLC26A4 gene involved in Pendred syndrome and nonsyndromic EVA. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:18608-18613.
- Pera A, Villamar M, Vinuela A, Gandia M, Meda C, Moreno F, Hernandez-Chico C 2008b A mutational analysis of the SLC26A4 gene in Spanish hearing impaired families provides new insights into the genetic causes of Pendred syndrome and DFNB4 hearing loss. *Eur J Hum Genet* 16:888-896.
- Pérez-Centeno C, González-Sarmiento R, Mories MT, Corrales JJ, Miralles-García JM 1996 Thyroglobulin exon 10 gene point mutation in a patient with endemic goiter. *Thyroid* 6:423-427.
- Persani L, Calebiro D, Bonomi M 2007 Technology insight: modern methods to monitor protein-protein interactions reveal functional TSH receptor oligomerization. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3: 180-190.
- Persani L, Ferretti E, Borgato S, Faglia G, Beck-Peccoz P 2000a. Circulating TSH bioactivity in sporadic central hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3631-3635.
- Persani L, Lania A, Alberti L, Romoli R, Mantovani G, Filetti S, Spada A, Conti M 2000b Induction of specific phosphodiesterase isoforms by constitutive activation of the cAMP pathway in autonomous thyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2872-2878.
- Peteiro-González D, Lee J, Rodríguez-Fontan J, Castro-Piedras I, Cameselle-Teijeiro J, Beiras A, Bravo SB, Alvarez CV, Hardy DM, Targovnik HM, Arvan P, Lado-Abeal J 2010 New insights into Thyroglobulin Pathophysiology Revealed by the Study of a Family with Congenital Goiter. *J Clin Endocrinol Metab* 95:3522-6.
- Pfarr N, Borck G, Turk A, Napiontek U, Keilmann A, Muller-Forell W, Kopp P, Pohlenz J 2006a Goitrous congenital hypothyroidism and hearing impairment associated with mutations in the TPO and SLC26A4/PDS genes. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 91:2678-2681.
- Pfarr N, Korsch E, Kaspers S, Herbst A, Stach A, Zimmer C, Pohlenz J 2006 Congenital hypothyroidism caused by new mutations in the thyroid oxidase 2 (THOX2) gene. *Clin Endocrinol* 65:810-815.
- Pfarr N, Musholt TJ, Musholt PB, Brzezinska R, Pohlenz J 2006b Congenital primary hypothyroidism with subsequent adenomatous goiter in a Turkish patient caused by a homozygous 10-bp deletion in the thyroid peroxidase (TPO) gene. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64:514-518.
- Pohlenz J, Ahrens W, Hiort O 2003 A new heterozygous mutation (L338N) in the human Gs_α (GNAS1) gene as a cause for congenital hypothyroidism in albright's hereditary osteodystrophy. *Eur J Endocrinol* 148:463-468.
- Pohlenz J, Medeiros-Neto G, Gross JL, Silveiro SP, Knobel M, Refetoff S 1997 Hypothyroidism in a Brazilian kindred due to iodide trapping defect caused by a homozygous mutation in the sodium/iodide symporter gene. *Biochem Biophys Res Commun* 240:488-491.
- Pohlenz J, Rosenthal IM, Weiss RE, Jhiang SM, Burant C, Refetoff S 1998 Congenital hypothyroidism due to mutations in the sodium/iodide symporter. Identification of a nonsense mutation producing a downstream cryptic 3' splice site. *J Clin Invest* 101:1028-1035.
- Prasad S, Kölln KA, Cucci RA, Trembath RC, Van Camp G, Smith RJ 2004 Pendred syndrome and DFNB4-mutation screening of SLC26A4 by denaturing high-performance liquid chromatography and the identification of eleven novel mutations. *Am J Med Genet A* 124A:1-9.
- Pryor SP, Madeo AC, Reynolds JC, Sarlis NJ, Arnos KS, Nance WE, Yang Y, Zalewski CK, Brewer CC, Butman JA, Griffith AJ 2005 SLC26A4/PDS genotype-phenotype correlation in hearing loss with enlargement of the vestibular aqueduct (EVA): evidence that Pendred syndrome and nonsyndromic EVA are distinct clinical and genetic entities. *J Med Genet* 42:159-165.
- Qi X, Loiseau F, Chan WL, Yan Y, Wei Z, Milroy LG, Myers R M, Ley SV, Read RJ, Carrell RW, Zhou A. 2011. Allosteric Modulation of Hormone Release from Thyroxine and Corticosteroid-binding Globulins. *J. Biol. Chem.* 286(18):16163-16173
- Rapa A, Monzani A, Moia S, Vivenza D, Bellone S, Petri A, Teofoli F, Cassio A, Cesaretti G, Corrias A, de Sanctis V, Di Maio S, Volta C, Wasniewska M, Tatò L, Bona G 2009 Subclinical hypothyroidism in children and adolescents: a wide range of clinical, biochemical, and genetic factors involved. *J Clin Endocrinol Metab* 94:2414-2420.
- Rastogi MV, LaFranchi SH 2010 Congenital hypothyroidism. *Orphanet J Rare Dis* 5:17.
- Reardon W, Coffey R, Phelps PD, Luxon LM, Stephens D, Kendall-Taylor P, Britton KE, Grossman A, Trembath R 1997 Pendred syndrome --100 years of underascertainment? *Q J M* 90:443-447.
- Reardon W, Mahoney CF, Trembath R, Jan H, Phelps PD 2000 Enlarged vestibular aqueduct: a radiological marker of Pendred syndrome, and mutation of the PDS gene. *QJM* 93:99-104.
- Refetoff S 2003 Resistance to thyrotropin. *J Endocrinol Invest* 26:770-779.
- Richter-Unruh A, Hauffa BP, Pfarr N, Pohlenz J 2004 Congenital primary hypothyroidism in a Turkish family caused by a homozygous nonsense mutation (R609X) in the thyrotropin receptor gene. *Thyroid* 14 :971-974.
- Riedel C, Levy O, Carrasco N 2001 Post-transcriptional Regulation of the Sodium/Iodide Symporter by Thyrotropin. *J Biol Chem* 24:21458-21463.

- Ris-Stalpers, C., Bikker H. ; 2010. Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to TPO mutations. *Mol Cell Endocrinol.* 322, 38-43.
- Rivolta CM, Esperante SA, Gruneiro-Papendieck L, Chiesa A, Moya CM, Domene S, Varela V, Targovnik HM 2003 Five novel inactivating mutations in the thyroid peroxidase gene responsible for congenital goiter and iodide organification defect. *Hum Mutat* 22:259.
- Rivolta CM; Olcese MC; Belforte FS, Chiesa A; Gruneiro-Papendieck L ; Iorcanaky S; Herzovich V; Cassorla F; Gauna A; Gonzalez-Sarmiento R; Targovnik HM. 2009. Genotyping of Resistance to Thyroid Hormone in South American Population. Identification of seven novel missense mutations in the human thyroid hormone receptor beta gene. *Molecular and Cellular Probes*, 23:148-153.
- Rivolta CM, Louis-Tisserand M, Varela V, Gruneiro-Papendieck L, Chiesa A, Gonzalez-Sarmiento R., Targovnik HM 2007 Two compound heterozygous mutations (c.215delA/c.2422T->C and c.387delC/c.1159G->A) in the thyroid peroxidase gene responsible for congenital goitre and iodide organification defect. *Clin Endocrinol (Oxf)* 67:238-246.
- Rivolta CM, Moya CM, Gutnisky VJ, Varela V, Miralles-García JM, González-Sarmiento R, Targovnik HM 2005 A new case of congenital goiter with hypothyroidism due to a homozygous p.R277X mutation in the exon 7 of the thyroglobulin gene: A mutational hot spot could explain the recurrence of this mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 90:3766-3770.
- Ris-Stalpers, C, Hennie Bikker H 2010 Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to TPO mutations. *Mol Cell Endocrinol* 322: 38-43
- Rodrigues C, Jorge P, Soares JP, Santos I, Salomao R, Madeira M, Osorio RV, Santos R 2005 Mutation screening of the thyroid peroxidase gene in a cohort of 55 Portuguese patients with congenital hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* 152:193-198.
- Russo D, Betterle C, Arturi F 2000 A novel mutation in the thyrotropin (TSH) receptor gene causing loss of TSH binding but constitutive receptor activation in a family with resistance to TSH. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4238-4242.
- Salvatore D, Davies TF, Schlumberger MJ, Hay ID, Larsen PR. Thyroid physiology and diagnostic evaluation of patients with thyroid disorders. En: Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM, editores. *Williams Textbook of Endocrinology*, 12th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011. p. 327-361
- Salvatore D, Davies TF, Schlumberger MJ, Hay ID, Larsen PR. Thyroid physiology and diagnostic evaluation of patients with thyroid disorders. En: Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM, editores. *Williams Textbook of Endocrinology*, 12th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011. p. 327-361
- Santos CL, Bikker H, Rego KG, Nascimento AC, Tambascia M, de Vijlder JJ, Medeiros-Neto 1999 A novel mutation in the TPO gene in goitrous hypothyroid patients with iodide organification defect. *Clin Endocrinol (Oxf)* 51:165-172.
- Sato E, Nakashima T, Miura Y, Furuhashi A, Nakayama A, Mori N, Murakami H, Naganawa S, Tadokoro M 2001 Phenotypes associated with replacement of His by Arg in the Pendred syndrome gene. *Eur J Endocrinol* 145:697-703.
- Sawaya S, Bagshaw A, Buschiazio E, Kumar P, Chowdhury S, Black M, Gemell N. 2013. Microsatellite Tandem Repeats Are Abundant in Human Promoters and Are Associated with Regulatory Elements. *Plos One.* 8:2:54710.
- Scott DA, Wang R, Kreman TM, Andrews M, McDonald JM, Bishop JR, Smith RJ, Karniski LP, Sheffield VC 2000 Functional differences of the PDS gene product are associated with phenotypic variation in patients with Pendred syndrome and non-syndromic hearing loss (DFNB4). *Hum Mol Genet* 9:1709-1715.
- Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC, Karniski LP 1999 The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet* 21:440-443.
- Shibayama K, Ohya Y, Hishinuma A, Yokota Y, Kazahari K, Kazahari M, Ieiri T, Matsuura N 2005 Subclinical hypothyroidism caused by a mutation of the thyrotropin receptor gene. *Pediatr Int* 47:105-108.
- Shyu AB, Wilkinson MF, van HA 2008 Messenger RNA regulation: to translate or to derade. *EMBO J* 27:471-481.
- Shyu AB, Wilkinson MF, van HA 2008 Messenger RNA regulation: to translate or to derade. *EMBO J* 27:471-46. 481.
- Simm D, Pfarr N, Pohlenz J, Prawitt D, Dorr HG 2009 Two novel mutations in the human thyroid peroxidase (TPO) gene: genetics and clinical findings in four children. *Acta Paediatr* 98:1057-1061.
- Simpson E. Clinical biochemistry in Scotland, a random history. <http://www.elliottsimpson.com/history/introduction.htm>.
- Sir Charles Harington and the structure of thyroxine. *Mayo Clin Proc.* 1964Aug;39:553-9
- Sklate RT, Olcese MC, Maccallini GC, Sarmiento RG, Targovnik HM, Rivolta CM. 2013. Novel mutation p.A64D in the serpin7 Gene as a cause of partial thyroxine-binding globulin deficiency associated with increases affinity in transthyretin by a known p.A109T mutation in the TTR gene. *Horm Metab Res.* Epub ahead of print.
- Sotomayor, H., & M.Perez Mayorca. 2001. Un estudio de historio y antropología médica del Bocio endémico en la nueva granada a propósito de su representación artística en tiempos prehispánicos y en el siglo XIX. *Rev.Acad. Colomb.Cienc.*25(95):161-178,2001.ISSN 0370-3908
- Spitzweg C, Morris JC 2010 Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to NIS mutations. *Mol Cell Endocrinol* 322:56-63.
- Stanbury JB, Kassenaar AA, Meijer JW, Terpstra J 1955 The occurrence of mono- and di-iodotyrosine in the blood of a patient with congenital goiter. *J Clin Endocrinol Metab* 15:1216-1227.
- Stanbury JB, Dumont JE 1983 *Familial Goiter and Related Disorders (The Metabolic Basis of Inherited Disease)*. McGraw-Hill, New York: 231-269.
- Stanbury JB, Roemans P, Buhler UK, Ochi Y 1968 Congenital hypothyroidism with impaired thyroid response to thyrotropin. *N Engl J Med* 21:1132-1136.
- Stinckens C, Huygen PL, Joosten FB, Van Camp G, Otten B, Cremers CW 2001 Fluctuant, progressive hearing loss associated with Meniere like vertigo in three patients with Pendred syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 61:207-15.
- Sunthornthepvarakul T, Gottschalk ME, Hayashi Y, Refetoff S 1995 Resistance to thyrotropin caused by mutations in the thyrotropin-receptor gene. *N Engl J Med* 332:155-160.
- Sura-Trueba S, Aumas C, Carre A, Durif S, Leger J, Polak M, de Roux N 2009 An inactivating mutation within the first extracellular loop of the thyrotropin receptor impedes normal posttranslational maturation of the extracellular domain. *Endocrinology* 150:1043-1050.
- Szinnaï G, Kosugi S, Derrien C, Lucidarme N, David V, Czernichow P, Polak M 2006 Extending the clinical heterogeneity of iodide transport defect (ITD): a novel mutation R124H of the sodium/iodide symporter gene and review of genotype-phenotype correlations in ITD. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 1199-1204.
- Tajima T, Tsubaki J, Fujieda K 2005 Two novel mutations in the thyroid peroxidase gene with goitrous hypothyroidism. *Endocr J* 52:643-645.
- Takeshita A, Nagayama Y, Yamashita S, Takamatsu J, Ohsawa N, Maesaka H, Tachibana K, Tokuhiro E, Ashizawa K, Yokoyama N 1994 Sequence analysis of the thyrotropin (TSH) receptor gene in congenital primary hypothyroidism associated with TSH unresponsiveness. *Thyroid* 4:255-259.
- Targovnik H, Vono J, Billerbeck AEC, Cerrone GE, Varela V, Mendive F, Wajchenberg BL, Medeiros-Neto G 1995 A 138-nucleotide deletion in the thyroglobulin ribonucleic acid messenger in a congenital goiter with defective thyroglobulin synthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3356-3360.
- Targovnik HM, Cochaux P, Corach D, Vassart G 1992 Identification of a minor Tg mRNA transcript in RNA from normal and goitrous thyroids. *Mol Cell Endocrinol* 84:R23-R26.
- Targovnik HM, Esperante SA, Rivolta CM 2010 Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to thyroglobulin mutations. *Mol Cell Endocrinol* 322:44-55.
- Targovnik HM, Medeiros-Neto G, Varela V, Cochaux P, Wajchenberg BL, Vassart G 1993 A nonsense mutation causes human hereditary congenital goiter with preferential production of a 171-nucleotide-deleted thyroglobulin ribonucleic acid messenger. *J Clin Endocrinol Metab* 77:210-215.
- Targovnik HM, Rivolta CM, Mendive FM, Moya CM, Medeiros-Neto G 2001 Congenital goiter with hypothyroidism caused by a 5' splice site mutation in the thyroglobulin gene. *Thyroid*:11, 685-690.
- Targovnik HM, Souchon PF, Machiavelli GM, Salmon-Musial AS, Mauran PLA, Sulmont V, Doco-Fenzy M, Rivolta CM 2009 Congenital goitre with hypothyroidism caused by a novel compound heterozygous mutations in the thyroglobulin gene. *Clin Endocrinol (Oxf)* Sep 10. DOI: 10.1111/j.0300-0664.2009.03702.x.
- Tatsumi KI, Miyai K, Amino N 1998 Genetic basis of congenital hypothyroidism: abnormalities in the TSH beta gene, the PIT1 gene, and the NIS gene. *Clin Chem Lab Med* 36:659-662.
- Taylor JP, Metcalfe RA, Watson PF, Weetman AP, Trembath RC 2002 Mutations of the PDS gene, encoding pendrin, are associated with protein mislocalization and loss of iodide efflux: implications for thyroid dysfunction in Pendred syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1778-1784.

- Tenenbaum-Rakover Y, Grasberger H, Mamasiri S, Ringkanonot U, Montanelli L, Barkoff MS, Dahood AM, Refetoff S 2009 Loss-of-function mutations in the thyrotropin receptor gene as a major determinant of hyperthyrotropinemia in a consanguineous community. *J Clin Endocrinol Metab* 94:1706–1712.
- Tenenbaum-Rakover Y, Mamasiri S, Ris-Stalpers C, German A, Sack J, Ion-Shalev S, Pohlenz J, Refetoff S 2007 Clinical and genetic characteristics of congenital hypothyroidism due to mutations in the thyroid peroxidase (TPO) gene in Israel. *Clin Endocrinol (Oxf)* 66:695–702.
- Thomas SR, McTamney PM, Adler JM, Laronde-Leblanc N, Rokita 2009. Crystal structure of iodotyrosine deiodinase, a novel flavoprotein responsible for iodide salvage in thyroid glands. *J Biol Chem* 284:19659–19667. Gnidehou S, Lacroix L, Sezan
- Tiosano D, Pannain S, Vassart G, Parma J, Gershoni-Baruch R, Mandel H, Lotan R, Zaharan Y, Pery M, Weiss RE, Refetoff S, Hochberg Z 1999 The hypothyroidism in an inbred kindred with congenital thyroid hormone and glucocorticoid deficiency is due to a mutation producing a truncated thyrotropin receptor. *Thyroid* 9:887–894.
- Tonacchera M, Agretti P, De Marco G, Elisei R, Perri A, Ambrogini E, De Servi M, Cecarelli C, Viacava P, Refetoff S, Panunzi C, Bitti MLM, Vitti P, Chiovato L, Pinchera A 2003 Congenital hypothyroidism due to a new deletion in the sodium/iodide symporter protein. *Clin Endocrinol* 59:500–506.
- Tonacchera M, Agretti P, De Marco G, Perri A, Pinchera A, Vitti P, Chiovato L 2001 Thyroid resistance to TSH complicated by autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4543–4546.
- Tonacchera M, Agretti P, Pinchera A, Rosellini V, Perri A, Collecchi P, Vitti P, Chiovato L 2000 Congenital hypothyroidism with impaired thyroid response to thyrotropin (TSH) and absent circulating thyroglobulin: evidence for a new inactivating mutation of the TSH receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1001–1008.
- Tonacchera M, DeMarco G, Agretti P, Montanelli L, Di Cosmo C, Freitas Ferreira AC, Dimida A, Ferrarini E, Ramos HE, Ceccarelli C, Brozzi F, Pinchera A, Vitti P 2009 Identification and functional studies of two new dual-oxidase 2 (DUOX2) mutations in a child with congenital hypothyroidism and a eutopic normal-size thyroid gland. *J Clin Endocrinol Metab* 94:4309–4314.
- Tonacchera M, Di Cosmo C, De Marco G, Agretti P, Banco M, Perri A, Gianetti E, Montanelli L, Vitti P, Pinchera A 2007 Identification of TSH receptor mutations in three families with resistance to TSH. *Clin Endocrinol (Oxf)* 67:712–718.
- Tonacchera M, Perri A, De Marco G, Agretti P, Banco ME, Di Cosmo C, Grasso L, Vitti P, Chiovato L, Pinchera A 2004 Low prevalence of thyrotropin receptor mutations in a large series of subjects with sporadic and familial nonautoimmune subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 89:5787–5793.
- Tsukamoto K, Suzuki H, Harada D, Namba A, Abe S, Usami S 2003 Distribution and frequencies of PDS (SLC26A4) mutations in Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct: a unique spectrum of mutations in Japanese. *Eur J Hum Genet* 11:916–922.
- Tsunekawa K, Onigata K, Morimura T, Kasahara T, Nishiyama S, Kamoda T, Mori M, Morikawa A, Murakami M 2006 Identification and functional analysis of novel inactivating thyrotropin receptor mutations in patients with thyrotropin resistance. *Thyroid* 16:471–479.
- Umeki K, Kotani T, Kawano J, Suganuma T, Yamamoto I, Aratake Y, Furujo M, Ichiba Y 2002 Two novel missense mutations in the thyroid peroxidase gene, R665W and G771R, result in a localization defect and cause congenital hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* 146:491–498.
- Umeki K, Yamamoto I, Yukizane S, Kotani T 2004 Congenital hypothyroidism caused by a unique thyroid peroxidase allele containing two mutations, C1708T and C2737T. *J Pediatr Endocrinol Metab* 17: 231–234.
- Usami S, Abe S, Weston MD, Shinkawa H, Van Camp G, Kimberling WJ 1999 Non-syndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct is caused by PDS mutations. *Hum Genet* 104:188–92.
- Van de Graaf SAR, Ris-Stalpers C, Veenboer GJM, Cammenga M, Santos C, Targovnik HM, de Vijlder JJM, Medeiros-Neto G 1999 A premature stopcodon in thyroglobulin mRNA results in familial goiter and moderate hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2537–2542.
- Van Hauwe P, Everett LA, Coucked P, Scott DA, Kraft ML, Ris-Stalpers C, Bolder C, Otten B, de Vijlder JJ, Dietrich NL, Ramesh A, Srisailapathy SC, Parving A, Cremers CW, Willems PJ, Smith RJ, Green ED, Van Camp G 1998 Two frequent missense mutations in Pendred syndrome. *Hum Mol Genet* 7:1099–1104
- Varela V, Rivolta CM, Esperante SA, Gruneiro-Papendieck L, Chiesa A, Targovnik HM 2006 Three mutations (p.Q36H, p.G418fsX482, and g.IVS19-2A > C) in the dual oxidase 2 gene responsible for congenital goiter and iodide organification defect. *Clin Chem* 52:182–191.
- Vigone MC, Fugazzola L, Zamproni I, Passoni A, Di Candia S, Chiumello G, Persani L, Weber G 2005 Persistent mild hypothyroidism associated with novel sequence variants of the DUOX2 gene in two siblings. *Hum Mutat* 26:395.
- Vijlder JJM, Vulsma T., 1996 Hereditary metabolic disorders causing hypothyroidism.
- Vitti P, Delange F 2003 Europe is iodine deficient. *Lancet* 361:1226.
- Weinstein LS, Liu J, Sakamoto A, Xie T, Chen M 2004 Minireview: GNAS: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 145:5459–5464.
- Wolff J 2003 Anion selectivity by the sodium iodide symporter. *Endocrinology* 144:247–252.
- Wu CC, Yeh TH, Chen PJ, Hsu CJ 2005 Prevalent SLC26A4 Mutations in Patients with Enlarged Vestibular Aqueduct and/or Mondini Dysplasia: A Unique Spectrum of Mutations in Taiwan, Including a Frequent Founder Mutation. *Laryngoscope* 115:1060–1064.
- Wu JY, Shu SG, Yang CF, Lee CC, Tsai FJ 2002 Mutation analysis of thyroid peroxidase gene in Chinese patients with total iodide organification defect: identification of five novel mutations. *J Endocrinol* 172:627–635.
- Xie J, Pannain S, Pohlenz J, Weiss RE, Moltz K, Morlot M, Asteria C, Persani L, Beck-Peccoz P, Parma J, Vassart G, Refetoff S 1997 Resistance to thyrotropin (TSH) in three families is not associated with mutations in the TSH receptor or TSH. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3933–3940.
- Yong AM, Goh SS, Zhao Y, Eng PH, Koh LK, Khoo DH 2001 Two Chinese families with Pendred's Syndrome-radiological imaging of the ear and molecular analysis of the pendrin gene. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3907–11.
- Yuan ZF, Luo YF, Wu YD, Shen Z, Zhao ZY 2007 Thyrotropin receptor gene inactivating mutation in Chinese children with congenital hypothyroidism *Zhonghua. Er Ke Za Zhi* 45:508–512.
- Zamproni I, Grasberger H, Cortinovis F, Vigone MC, Chiumello G, Mora S, Onigata K, Fugazzola L, Refetoff S, Persani L, Weber G 2008 Biallelic inactivation of the dual oxidase maturation factor 2 (DUOX2) gene as a novel cause of congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 93:605–610.

Referencias Electrónicas

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- <http://www.genome.ucsc.edu>
- <http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred>
- <http://www.spdbv.vital-it.ch>
- <http://www.graphpad.com/scientific-software/instat>
- <http://www.dnastar.com/t-sub-products-lasergene-megalign.aspx>
- <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
- <http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>
- <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>
- <http://swissmodel.expasy.org/>
- <http://www.pymol.org/>
- <http://www.sbc.su.se/~bjornw/ProQ/ProQ.html>
- <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi>
- <http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>, default settings
- <http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>, default settings
- <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>
- <http://evs.gs.washington.edu/>

Trabajo de Tesis de Maestría para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires en Biología Molecular Médica por:

Bc. Carolina Osorio Larroche

Directora de Tesis:

Prof. Dra. Carina M. Rivolta