

Estudio clínico y molecular de cinco familias con resistencia a la acción de las hormonas tiroideas.

Joaquín Lado Abeal^{1,2}, Ramón Albero Gamboa³, David Araujo Vilar^{1,4}, Olga Barca Mayo¹, Ignacio Bernabeú Morón⁴, María Teresa Calvo⁵, Isabel Castro Piedras^{1,2}, Jesús Martín Calamata⁶, Fernando Palos Paz¹, Roberto Peinó⁴, Diego Peteiro^{1,3}, Berta Victoria¹.

¹UETeM. Departamento de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela.

²División de Endocrinología. Departamento de Medicina. Texas Tech University Health Sciences Center-School of Medicine. Lubbock, Texas. USA.

³Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza.

⁴Servicio de Endocrinología y Nutrición. Complejo Hospitalario de Santiago de Compostela.

5

⁶Servicio de Pediatría. Hospital O. Polanco. Teruel.

Resumen

Fundamento y objetivo

El síndrome de resistencia a la acción de las hormonas tiroideas (SRHT), causado mayoritariamente por mutaciones en el gen *receptor beta de las hormonas tiroideas*, *THRB*, se caracteriza por la elevación en los niveles séricos de hormonas tiroideas (HT) con niveles elevados o normales de TSH. Se estudian cinco familias españolas con fenotipo de SRHT.

Material y Métodos

Secuenciación de *THRB*. Estudio del efecto de las mutaciones sobre la respuesta a T3 y de su efecto dominante negativo, mediante transfección celular y ensayos de movilidad electroforética (EMSA). Obtención de cultivos de fibroblastos de pacientes con y sin mutaciones en *THRB* para investigar la respuesta a T3 de los genes *regulator of calcineurin 2* (=ZAKI4) y *Kruppel-like factor 9* (=BTEB) que son regulados positivamente por las HT.

Resultados

En tres casos se detectaron mutaciones en *THRB*: R243Q, R320C y R429Q, todas causando una disminución en la respuesta a T3. R243Q y R320C presentaron un potente efecto dominante negativo. La respuesta a T3 de *ZAKI4* y *BTEB* fue diferente entre los sujetos sin mutación en *THRB*; uno se comportó de forma similar al portador de R230C y en el otro la expresión de los dos genes fue superior a la observada en controles normales.

Conclusiones

En tres de las cinco familias estudiadas se detectaron mutaciones en *THRB*, responsables del cuadro clínico, dando lugar a una menor respuesta a T3 y ejerciendo un efecto dominante negativo. Los dos casos de SRHT sin mutación en *THRB* obedecen a causas distintas, todavía desconocidas.

Palabras Clave: Síndrome de resistencia a la acción de las hormonas tiroideas, receptor beta de las hormonas tiroideas, gen *THRB*, mutación.

Introducción

El síndrome de resistencia a la acción de las hormonas tiroideas (SRHT) se caracteriza por una disminución en la sensibilidad tisular a la acción de las hormona tiroideas (HT) (1,2). Los pacientes con SRHT presentan una elevación en los niveles séricos de tiroxina (T4) y/o triyodotironina (T3), y niveles séricos de hormona estimulante del tiroides (TSH) inapropiadamente normales o elevados. Las manifestaciones clínicas son variables, pudiendo coexistir en un mismo sujeto datos de hipotiroidismo e hipertiroidismo, reflejo de que la resistencia es variable entre los diferentes tejidos (1-3).

La incidencia de SRHT se estima en 1 de 40000 nacidos vivos (4). La mayoría obedece a mutaciones autosómicas dominantes en el gen *receptor beta de las hormonas tiroideas*, *THRB* (1,4), aunque en el 15% las causas se desconocen (1,4). En los últimos 10 años se han identificado dos entidades de sensibilidad disminuida a la acción de las HT: una relacionada con mutaciones en el transportador de HT conocido como *transportador 8 de monocarboxilatos* (MCT8) (5,6), y otra causada por mutaciones en el gen *selenocysteine insertion sequence-binding protein2* (*SECISBP2* o *SBP2*) (7).

Las mutaciones en el receptor beta (TR β) responsables de SRHT, afectan a la parte del receptor en donde se une la T3, y se asocian a una menor afinidad del receptor por la hormona (8,9); con menor frecuencia, causan una interacción defectuosa con co-factores implicados en la acción de las HT (10). Para ejercer su efecto, los TRs se unen entre ellos (homodímeros) o con otros receptores nucleares (heterodímeros), principalmente con los receptores X del ácido retinoico (RXRs); estos dímeros se unen a secuencias específicas del ADN conocidas como elementos de respuesta a las hormonas tiroideas (TRE). En la ausencia de T3, los dímeros de TR se asocian a co-represores silenciando la transcripción

de genes positivamente regulados por la T3. La unión TR-T3 da lugar a la disociación de los co-represores y al reclutamiento de co-activadores al dímero, estimulando la transcripción genica (10). Los TR β s mutados interfieren con las funciones fisiológicas del TR β *wildtype*, fenómeno que se conoce como efecto dominante negativo (11), y que implica la ocupación de los TREs por el TR β mutado con una o varias de las siguientes propiedades: (a) disminución en la afinidad o incapacidad total para unirse a la T3, (b) mayor afinidad por co-represores (12-14), (d) disminución en la capacidad para reclutar co-activadores (15). La ocupación de los TREs implica que los TR β mutados conservan su capacidad de unión al ADN y la capacidad de dimerizar como homo- o heterodímeros (4); hasta la fecha no se han descrito pacientes con SRHT portadores de mutaciones que afecten al lugar de unión al ADN (4).

En el presente trabajo se estudian cinco casos con fenotipo clínico y bioquímico sugestivo de SRHT. En tres sujetos se encontraron mutaciones y en dos no se detectaron mutaciones en la región codificante de *THRB*. Se presentan evidencias *in vitro* de las consecuencias funcionales de los TR β mutados; en concreto, se estudiaron: 1) la capacidad de respuesta de los mutantes a T3 y 2) el efecto dominante negativo de los mutantes sobre el TR β *wildtype*, investigado de dos formas: incubando un gen reportero (gen que se activa por acción del TR β en presencia de T3) con el TR β *wildtype* y concentraciones crecientes de los TR β mutados y cuantificando mediante un ensayo de movilidad electroforética (EMSA), la disociación de una secuencia específica de ADN del TR β *wiltype* y TR β mutados en presencia de dosis crecientes de T3. Por último, utilizando cultivos de fibroblastos procedentes de los pacientes se estudiaron los cambios

de expresión de los genes *regulator of calcineurin 2 (RACN2, ZAKI4)* y *Kruppel-like factor 9 (KLF9, BTEB)*, regulados positivamente por T3 en sujetos normales (16).

Material y Métodos.

Sujetos.

Caso 1. El propositus, un varón de 28 años, fue remitido al Hospital Universitario Miguel Servet para estudio de bocio. El paciente no refería síntomas sugestivos de hipertiroidismo. Su talla era de 181 cm y su peso de 92,5 kg; presentaba un bocio nodular, grado 2, sin otros hallazgos físicos de interés. La TSH sérica era 2,57 μ U/ml (normal 0,41-4,94 μ U/ml), T4 libre (FT4) 2,4 ng/dl (normal 0,85-1,69 ng/dL) y T3 libre (FT3) 6,88 pg/ml (normal 2,53-4,29 pg/ml). Los valores de TSH séricos en respuesta a TRH (100 μ g en bolus) fueron: 0 min. 2,88 μ U/ml, 30 min. 18,56 μ U/ml, 60 min. 12,11 μ U/ml. El árbol genealógico se representa en la figura 1. La madre del propositus, el hijo varón del propositus y dos hermanos de éste (un varón y una mujer) presentaban fenotipo bioquímico sugestivo de resistencia a la acción de las hormonas tiroideas.

Caso 2. El caso índice, una paciente de 58 años, fue remitida al Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS) por hipertiroidismo (TSH 5,09 μ U/ml, FT4 2,49 ng/dl y FT3 5,81 pg/ml). Como antecedente personal presentaba infertilidad de causa desconocida. El árbol genealógico se resume en la figura 1. La paciente refería ser “muy nerviosa de siempre”, “tener poca memoria para el estudio”, “no recordar bien las cosas”, e hiperactividad en la infancia. No refería palpitaciones, temblores ni sudoración. Su talla era 159 cm y su peso 70 kg. No presentaba bocio y el resto de la exploración física fue normal. La ecografía y gammagrafía tiroideas no mostraron anomalías.

Caso 3. El caso index, una paciente de 34 años, fue remitida al CHUS para estudio de niveles séricos elevados de hormonas tiroideas. La paciente presentaba desde la infancia ansiedad, hiperactividad, palpitaciones, incapacidad para concentrarse y desinterés por lo estudios, abandonando la escuela a los 16 años. Sus ciclos menstruales eran normales y tuvo un embarazo y parto normales. En la figura 1 se representa el árbol genealógico. Su talla era 160 cm y su peso 70 kg. Presentaba bocio difuso, pequeño, siendo el resto de la exploración física normal. La TSH sérica era 3,58 μ U/ml, FT4 2,01 ng/dl y FT3 5,54 pg/ml. La ecografía y gammagrafía tiroideas no mostraron anomalías.

Caso 4. El caso index, una mujer de 51 años, fue remitida por su psiquiatra al CHUS para estudio de hipertiroidismo. Padecía trastorno bipolar tratado con litio. La paciente refería palpitaciones que controlaba con atenolol. Su talla era 163 cms y su peso 66 kg; presentaba un bocio pequeño, difuso y sin nódulos. Su TSH sérica era 4,45 μ U/ml, FT4 1,89 ng/dl y FT3 5,23 pg/ml Los anticuerpos antiperoxidasa y antitiroglobulina fueron negativos. Una gammagrafía tiroidea mostró una captación aumentada. Un test de TRH (100 μ g en bolus) mostró los siguientes valores de TSH: 0 min. 4,33 mUI/L, 30 min. 5,49 mUI/L y 60 min. 5,40 mUI/L. La RNM de hipófisis no mostró anomalías detectándose a nivel de la protuberancia del tronco encefálico una masa de 1 cm con características de lipoma. Una densitometria ósea fue normal.

Case 5. El propositus, un niño de 6 años de origen ecuatoriano, fue remitido al Hospital General de Teruel tras detectarse una elevación en los niveles séricos hormonas tiroideas. La historia previa del niño y su familia carecía de interés. Su talla era 107,8 cm (percentil 3 para niños españoles, 10-25 para ecuatorianos) y su peso 20,5 kg (percentil 20-50 para niños españoles, 50 para ecuatorianos) (17). El examen físico fue normal; la

edad ósea concordaba con su edad cronológica. La TSH sérica era 2,51 mIU/L, FT4, 2,2 ng/dL y FT3, 6,3 pg/mL. Los anticuerpos antiperoxidasa y antitiroglobulina fueron negativos. La ecografía tiroidea y RNM hipotálamo-hipofisarias no mostraron anomalías. El test de TRH (100 µg en bolus) mostró los siguientes valores de TSH sérica: 0 min, 3,27 mUI/L, 30 min, 22,27 mUI/L y a 60 min, 17,29 mUI/L.

Análisis Genético.

El presencia de mutaciones en el gen *THRB* se realizó sobre ADN procedente de células sanguíneas (RealPure Extracción Genómico, Durviz SL, España). En los casos 4 y 5 se utilizaron también muestras de cDNA procedentes de fibroblastos de los pacientes. Los exones 3 a 10 del gen *THRB* se amplificaron mediante PCR (condiciones y secuencia de oligonucleótidos disponibles a petición), y los productos purificados se secuenciaron en un ABI PRISM 3100 utilizando dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystem, Madrid).

Estudios funcionales *in vitro*.

Construcción de los plásmidos.

Los vectores de expresión con los mutantes *THRB* R243Q y R320C se generaron mediante mutagénesis dirigida (Quickchange II Site Direct Mutagenesis kit, Stratagene, Alemania) sobre un vector *THRB wildtype* clonado en pcDNA1 (cedido por S Refetoff, University of Chicago Medical Center, Illinois, USA) (la secuencia de nucleótidos de mutagenesis y condiciones de PCR están disponibles a petición). El vector de expresión con el mutante R429Q se generó sobre el vector pcDNA1-*THRB wildtype*, sustituyendo un fragmento de 301 bp de éste por un fragmento similar procedente del paciente y que

contiene la mutación, como se describió previamente (18). La correcta clonación de los plásmidos se comprobó mediante secuenciación directa de todo el inserto.

Transfección de plásmidos.

Se emplearon células HepG2 (ECACC, UK) cultivadas en un medio compuesto de DMEM (SIGMA, España), suero fetal bovino (FCS) (10%) y gentamicina (50 µg/ml), a una temperatura de 37°C, humedad del 100% y CO₂ al 10%. Las células se en placas de cultivos de 12 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 70%, retirándose entonces el medio, lavándose las células con buffer fosfato salino (PBS) y, por último, añadiendo 1 ml de la solución de transfección compuesta de DMEM, FCS (10%) libre de hormona tiroidea, lipofectamina (Invitrogen, España), los vectores de expresión THRβ y el vector reportero Palx3-Luc (cedido por el Prof S Refetoff, University of Chicago Medical Center) que expresa el gen de la luciferasa (Luc) bajo control de un promotor que tiene tres copias de un TRE palindrómico (AGGTCATGACCT) (18). La concentración de los vectores de expresión THRβ fue 5 ng por pocillo y del gen reportero 1 µg por pocillo. La cantidad total de ADN transfectado se ajustó a 1.5 µg por pocillo con un plásmido pcDNA1 vacío. Transcurridas 24 horas, las células se lavaron con PBS y se incubaron en un medio compuesto de DMEM, FCS (10%) libre de hormona tiroidea y gentamicina (50 µg/ml) durante 24 horas, añadiendo a continuación T3 a la dosis de 10⁻⁹M, 10⁻⁸M y 10⁻⁷M, incubando las células durante otras 24 horas. Finalizada la incubación, las células se lisaron y se procedió a medir la actividad luciferasa mediante el Luciferase Assay System (Promega, Madrid) en un luminómetro (Junior LB 9509, Berthold, Alemania). Las transfecciones se realizaron en triplicados y cada experimento se realizó al menos en 2 ocasiones.

El efecto dominante negativo de los TR β mutados se investigó cotransfectando el plásmido TR β *wildtype* con los plásmidos TR β mutados a una relación *wildtype*:mutado de 1:1, 1:2 y 1:4, con una concentración total de plásmidos de 5 ng por pocillo, utilizando como reportero el plásmido Palx3-Luc (1 μ g) y T3 a la dosis de 10^{-7} M.

Ensayo de Movilidad Electroforética (EMSA)

[35 S]TR β *wildtype* y mutantes (243Q, 320C, 429Q) se obtuvieron mediante transcripción y traducción *in vitro* de los respectivos plásmidos, empleando un lisado de reticulocitos de conejo (Invitrogen, España) en presencia de [35 S] cisteína durante 1,5 h a 30 °C. Los productos de la traducción (2 μ L) se resolvieron en un gel SDS-PAGE (10%) durante 2 horas a 100 voltios, verificándose su presencia en una película fotográfica expuesta durante 32 horas a -80°C.

Como secuencia de unión al TR β se eligió la repetición de la secuencia consenso AGGTCA separadas entre sí por 4 bases, conocida como DR4 (AGCTTCAGGTCACAGGAGGTCAGA). Estos oligonucleótidos se anillaron en presencia de 5 mM de cacadilato sódico y 50 mM de NaCl, durante 2 minutos a 65°C. Posteriormente se desfosforilaron con el enzima SAP-quinasa (Qiagen, España) mediante incubación a 37°C durante 15 minutos, inactivando luego la enzima por incubación a 65°C durante 15 minutos. Por último, los oligonucleótidos se precipitaron con etanol/acetato sódico y se resuspendieron en una concentración de 100 ng/ μ L. Los oligonucleótidos (100 ng) se marcaron con 2 μ L de γ^{32} P-ATP mediante una polinucleótido quinasa T4 (Promega, España) y se purificaron mediante columnas de filtración en gel G-50 (MicroSpinTM, Amersham Pharmacia, España).

Los oligonucleótidos (^{32}P -DR4) se incubaron con los TR β beta obtenidos a partir de la traducción *in vitro*. La mezcla de reacción estaba compuesta por: 10 μL de tampón de unión 2X (Tris 40mM, pH 7.9; EDTA 2mM pH 7.9; NP40, 0.1%; Glicerol, 20%), 20 000 cpm ^{32}P -DR4, 1 μg de Poli dI:dC (Sigma Aldrich, Madrid), 1mM de DTT (Sigma Aldrich, Madrid) y 3 μL de lisado de reticulocitos.

En el caso de la muestra que se usó como control negativo, mediante inhibición por competición, se añadió oligonucleótido no marcado, en una concentración 100X de la utilizada en el caso del oligonucleótido marcado.

Al cabo de 45 minutos a temperatura ambiente, se añadieron a cada muestra 20 μL de tampón de carga (Native Sample Buffer, Biorad, Madrid) y se procedió a cargar las muestras en el gel para ser sometidas a electroforesis, que se realizó en geles verticales de poliacrilamida al 10% en condiciones no desnaturalizantes. Como tampón de electroforesis se utilizó TBE 0.5X (tris 89mM; ácido bórico 89mM; EDTA 2mM pH 8). El gel se sometió a 300 voltios durante 45 minutos y a 4°C, para posteriormente cargar las muestras y desarrollar la electroforesis a 300V durante 1-1.30 horas. Por último, tras secado el gel se autorradiografió durante 3 horas a -80 °C.

Cultivos de fibroblastos y estudios de expresión génica.

Los cultivos de fibroblastos se obtuvieron a partir de una biopsia de piel de los propositus de los casos 2, 4, 5 y de un varón y una mujer controles sanos. Los fibroblastos crecieron y cultivaron en placas de 100 mm en DMEM, FCS (10%) y gentamicina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), a una temperatura de 37C y CO $_2$ al 10%. A confluencia cercana al 100% las células se tripsinizaron y transfirieron en el mismo medio de cultivo a placas de 24 pocillos; alcanzada una confluencia del 95%, el medio se aspiró, las células se

lavaron tres veces con PBS, e incubaron en DMEM, gentamicina (50 µg/ml) y FCS (10%) libre de hormonas tiroideas (18). Transcurridas 24 horas, se añadió T3 a la dosis de 2×10^{-9} M, recogiendo los fibroblastos para proceder a la extracción de RNA total, al tiempo 0 y a las 24 horas. El RNA total se extrajo con TRIzol (Invitrogen, Barcelona). La retrotranscripción se realizó sobre 1 µg de RNA total mediante la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen, Madrid), 5µM de hexámeros aleatorios y 2mM dideoxinucleótidos (Ecogen) en un volumen total de 20 µl. La expresión de *ZAKI4*, *BTEB* y del control interno *RNA polimerasa II*, se cuantificó por PCR en tiempo real en un Light Cycler 2.0 (Roche, Barcelona) mediante sondas y oligonucleótidos específicos diseñados mediante la Universal ProbeLibrary (Roche). Las reacciones se llevaron a cabo con 5 µl de QuantiTect Probe PCR Kit Master Mix (Qiagen, Madrid), 0.2 µl de la sonda ProbeLibrary, 0.3 µM de cada oligonucleótido, 10 ng de cDNA, y agua libre de RNases en un volumen final de 20 µl (el número de sonda Universal ProbeLibrary, la secuencia de oligonucleótidos y las condiciones de la PCR en tiempo real pueden obtenerse poniéndose en contacto con los autores). La expresión génica se normalizó utilizando la RNA polimerasa II como gen de referencia y aplicando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (19), dándole a la expresión a tiempo 0 el valor arbitrario de 1.

Análisis de datos.

Los resultados de los experimentos de transfección y de expresión génica se analizaron con el programa informático SPSS 14.0 (Chicago, Illinois, USA). La comparación entre grupos se realizó mediante el test estadístico t-student.

Resultados.

Análisis genético.

Todas las mutaciones encontradas fueron heterocigotas. El propositito del caso 1 presentó la mutación c.728G>A, localizada en el exón 7 del gen *THRB*, que da lugar a la sustitución de una Arginina por Glutamina en el codón 243 (R243Q). El propositito heredó la mutación de su madre, y la misma mutación se encontró en un hermano, una hermana y un hijo varón del propositito (figura 1). En el caso 2, la paciente índice presentó la mutación c.958C>T, localizada en el exón 9, originando la sustitución de una Arginina por una Cisteína en el codón 320 (R320C). Al no disponer de ADN de los progenitores, y dado que su única hermana no presentó la mutación, se desconoce si aquella heredó la mutación o si es una mutación *de-novo* (figura 1). La paciente índice del caso 3 presentó la mutación c.1286G>A, localizada en el exón 10, dando lugar a la sustitución de una Arginina por una Glutamina en el codón 429 (R429Q). La mutación no se encontró en sus progenitores ni hermanos, lo que sugiere que es una mutación *de-novo* (figura 1). En los proposititos de los casos 4 y 5 no se detectaron ni mutaciones en la región codificante ni anomalías en el *splicing* the gen *THRB*.

Estudios funcionales *in vitro*.

Tanto el TR β *wildtype* como los mutantes mostraron capacidad de unirse al DR4 (figura 2A); sin embargo, mientras TR β *wildtype* se disoció de DR4 con dosis fisiológicas de T3 (10^{-9} M), los mutantes requirieron dosis suprafisiológicas de T3, superiores para 243Q y 320C respecto a 429Q (figura 2A). En células HepG2 transfectadas con TR β *wildtype* o con los mutantes se observó un aumento en la actividad luciferasa con dosis crecientes de T3 (figura 2B); sin embargo, para cada dosis de T3 la actividad luciferasa fue inferior en los mutantes 243Q y 320C respecto al TR β *wildtype* (figura 2B); para 429Q las diferencias respecto a TR β *wildtype* fueron significativas sólo

para la dosis 10^{-9} M. Los mutantes 243Q y 320C ejercieron un claro efecto dominante negativo sobre el TR β *wildtype*, que en el caso del 429Q sólo se observó con una cantidad de mutante 4 veces superior al TR β *wildtype* (figura 3).

Estudios de expresión génica en fibroblastos.

Los fibroblastos procedentes de sujetos control presentaron un aumento en la expresión de *BTEB* de 2-2,5 veces y de *ZAKI4* de 4-4,8 veces tras 24 horas de incubación con T3 respecto al tiempo 0 (figura 4). En fibroblastos procedentes del heterocigoto para R320C, no se observaron cambios en la expresión de *ZAKI4* aumentando la expresión de *BTEB* 2,5 veces (figura 4). En el caso de fibroblastos procedentes de los sujetos con fenotipo de SRHT sin mutaciones en *THRB*, la respuesta a T3 fue diferente; mientras que en el propósito del caso 4 se observó una respuesta similar al heterocigoto para R320C (figura 4), en el propósito del caso 5 se observó un incremento en la expresión de *ZAKI4* y *BTEB* superior incluso los controles (figure 4).

Discusión.

El nivel de TSH sérica es un marcador muy sensible de disfunción tiroidea. De hecho, tanto en el hipertirodismo como en el hipotirodismo, los valores séricos de TSH disminuyen o aumentan respectivamente, antes de que se detecten alteraciones en los niveles séricos de hormonas tiroideas. La elevación en sangre de T4 y/o T3 se asocia casi siempre con un descenso en los niveles séricos de TSH, por lo que niveles normales o aumentados de TSH sérica en presencia de niveles elevados de T4 y/o T3 no son habituales, y orientan hacia la presencia en suero de algún factor que interfiera con la determinación de hormonas tiroideas (20), de un tumor hipofisario secretor de TSH (21)

o de SRHT (1). La presencia en suero de un factor que interfiera con la determinación de una de las hormonas tiroideas no suele afectar a la determinación de ambas, T4 y T3 , y los pacientes no presentan datos clínicos de disfunción tiroidea; la determinación hormonal por de otro método suele resolver el dilema y, en caso de duda, se puede realizar una dilución del suero con finalidad de lograr que el factor no interfiera en el ensayo; si el factor sérico que interfiere con la determinación hormonal es un anticuerpo, la precipitación de inmunoglobulinas en suero suele eliminar la interferencia (20). La presencia de un tumor secretor de TSH puede descartarse con la realización de una RNM de hipófisis, con un test de TRH (en caso de tumor no hay respuesta), y con la determinación de la subunidad alfa hipofisaria (elevada en presencia de adenoma hipofisario). En caso de duda, el curso clínico y la historia familiar son de utilidad. Por último, la sospecha de SRHT se establece en base a la clínica del paciente, su evolución, historia familiar y, de persistir la incertidumbre, tras descartar la existencia de un adenoma hipofisario secretor de TSH; el diagnóstico de SRHT se establece con certeza en caso de encontrar mutación en el gen *THRB* (4).

En el presente estudio, 3 de los 5 casos con sospecha de SPTH presentaron mutaciones en el gen *THRB*. Las 3 mutaciones han sido descritas con anterioridad, y se localizan dentro de los 3 *clusteres* en donde residen todas las mutaciones naturales descritas hasta la fecha. Estas zonas comprenden la región de unión a la T3, y la región conocida como bisagra o flexible del receptor que separa la parte de unión al ADN de la región carboxiterminal de unión a la hormona. La elevada mutagenicidad de estas regiones se debe a la presencia en el ADN de zonas ricas en los nucleótidos G y/o C o a la presencia de dinucleótidos CpG (4). Las tres mutaciones encontradas son heterocigotas; sin

embargo, el cuadro de SRTH no se debe a haploinsuficiencia ya que individuos con delección de uno de los alelos TR β *wildtype* no presentan SRTH (4), sino que obedece a que el TR β mutante interfiere con la función del receptor *wildtype*, fenómeno conocido como dominante negativo (4).

La mutación R243Q (caso 1) afecta al residuo Arginina²⁴³, situado en una zona rica en dinucleótidos CpG en la parte bisagra del receptor (22), y provoca el cambio de Arginina por Glutamina. Los estudios de transfección mostraron que el mutante 243Q ejerce un importante efecto dominante negativo sobre el TR β *wildtype* y, mediante EMSA, se demostró que incluso con dosis muy elevadas de T3, 243Q permanece unido DR4. Esto implica que 243Q no tiene alteradas sus capacidades de unión al ADN, de heterodimerización y de unión a co-represores (22,23). A pesar del notable cuadro clínico de SRHT de los pacientes portadores de esta mutación, estudios *in vitro* han demostrado que este mutante no tiene una disminución importante en la capacidad de unión a la T3 (13,22); sin embargo, la unión de T3 a 243Q disminuye notablemente una vez que el mutante se une al ADN, perdiendo además la capacidad de disociarse del co-represor NCoR (12,22). Estudios de cristalografía han demostrado que la mutación R243Q aumenta la flexibilidad y movilidad de la región del receptor en donde se encuentra, desestabilizando la parte de unión a la hormona y alterando la liberación de co-represores una vez unida la hormona (24).

La mutación R320C (caso 2) afecta al residuo Arginina³²⁰ situado en una zona rica en dinucleótidos CpG que forma parte de la región de unión a la T3 (4). La mutación provoca el cambio de Arginina por Cisteína y ha sido ampliamente descrita (25,26). Al igual que en el caso anterior, 320C ejerce un importante efecto dominante negativo sobre

el TR β *wildtype*, y su disociación de DR4 requiere dosis muy elevadas de T3. Estudios previos han demostrado que mutaciones naturales en la Arginina³²⁰ presentan una disminución superior al 50% en la capacidad de unión a la T3, factor responsable del SRHT (27)

La mutación R429Q (caso 3) afecta al residuo Arginina⁴²⁹ situado en una región rica en dinucleótidos CpG en el dominio de unión a la T3 (4). Esta mutación origina el cambio de Arginina por Glutamina. En caso índice presentó manifestaciones clínicas sugestivas de hipertiroidismo, y los experimentos *in vitro* mostraron que el receptor mutado responde de forma similar al TR β *wildtype* en cuanto al estímulo de la actividad luciferasa del gene reportero PAL3-luc, requiriendo dosis menores de T3 que los otros dos mutantes estudiados de T3 para disociarse del elemento DR4. 429Q requiere una concentración 4 veces superior al *wildtype* para ejercer el efecto dominante negativo sobre un reportero Pal3-Luc, que es regulado positivamente por T3. El comportamiento clínico y los resultados de los estudios *in vitro* concuerdan con estudios previos, en donde se sugiere que este mutante causa resistencia central a la acción de las hormonas tiroideas (28). De hecho, 429Q tiene un mayor efecto sobre la transactivación de genes regulados por las hormonas tiroideas en sentido negativo que sobre genes regulados en sentido positivo (4). La subunidad alfa de TSH y el TRH están regulados negativamente por la T3, por lo que los sujetos portadores de 429Q debieran de presentar una alteración en la acción de las hormonas tiroideas a nivel hipotálamo hipofisario (29); en este sentido, estudios *in vitro* han mostrado que 429Q bajo la acción de la T3, ejerce una menor inhibición sobre la regulación de TRH y TSH alfa que el TR β \square *wildtype* (30), lo que

explicaría la elevación de la TSH y, al no existir resistencia periférica a la T3, los síntomas de hipertirodismo de la paciente.

En los sujetos de los casos 4 y 5 no se encontraron mutaciones en la región codificante del gen *THRB* en muestras de ADN procedentes de linfocitos. Así mismo, tampoco se encontraron evidencias de anomalías en el *splicing* del gen en las amplificaciones de cDNA procedente de fibroblastos de los pacientes. La prevalencia de casos de SRHT sin mutaciones en el gen *THRB* es del 15% habiéndose descartado la existencia de mosaicismos y de mutaciones en diferentes co-activadores, co-represores, co-reguladores y transportadores (4). Aunque nuestro estudio no reveló la causa de la resistencia a la acción de las hormonas tiroideas en estos dos sujetos, los estudios *in vitro* sugieren que los mecanismos son diferentes para cada uno de estos sujetos. Los cambios en la expresión de *ZAKI4* y *BETB* tras la administración de T3 en los fibroblastos del caso 4, son similares a los observados en el sujeto con la mutación R320C; esto sugiere que la resistencia en este caso está relacionada con un defecto en la acción del TR β ; una posibilidad es que este defecto se debe a una alteración en los co-represores o co-activadores o en otros receptores nucleares que dimerizan con TR. Los cambios en la expresión de *ZAKI4* y *BETB* en los fibroblastos del sujeto 5 fueron diferentes, presentando un aumento en la expresión incluso superior a la observada en fibroblastos de los sujetos control. Esta observación indica que los fibroblastos de este sujeto son capaces de transportar T3 y no son resistentes a la acción de la T3. La elevación de T4 y T3 sugiere además que no existe un defecto en la conversión de T4 en T3, y que la acción de las desyodinasas 1 y 2 está conservada. Aunque en base a todos estos datos se podría hipotetizar que el sujeto presenta una resistencia central a la acción de las hormonas

tiroideas, la RNM de hipófisis fue normal y los hallazgos de la anamnesis y exploración física no evidenciaron datos de hipertiroidismo, esperables en un cuadro de resistencia central. Dado que *ZAKI4* y *BETB* son genes regulados por TR β (16), existe pues la posibilidad es que el sujeto sea portador de una mutación en TR α ; sin embargo, hasta la fecha no se han descrito sujetos con mutaciones naturales en TR α y se desconoce por ello que fenotipo clínico-bioquímico pudieran presentar.

Agradecimientos

Al profesor Samuel Refetoff de la Universidad de Chicago por la cesión de los plásmidos Palx3-Luc y pcDNA1-THRB.

Este trabajo fue financiado por Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS (proyecto PI030401 a JL-A), Ministerio de Educación (proyecto SAF2006-02542 a JL-A), Xunta de Galicia (poyectos PGIDIT04PXIC20801PN y PGIDIT06PXIB 208360PR a JL-A).

References.

1. Refetoff S, Weiss RE, Usala SJ. The syndromes of resistance to thyroid hormone. *Endocr Rev.*1993;14:348-99.
2. Beck-Peccoz P, Chatterjee VK. The variable clinical phenotype in thyroid hormone resistance syndrome. *Thyroid.* 1994;4:225-32.
3. Brucker-Davis F, Skarulis MC, Grace MB, Benichou J, Hauser P, Wiggs E et al. Genetic and clinical features of 42 kindreds with resistance to thyroid hormone. The National Institutes of Health Prospective Study. *Ann Intern Med.* 1995;123:572-83.
4. Refetoff S, Dumitrescu AM. Syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone: genetic defects in hormone receptors, cell transporters and deiodination. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2007;21:277-305.
5. Dumitrescu AM, Liao XH, Best TB, Brockmann K, Refetoff S. A Novel Syndrome Combining Thyroid and Neurological Abnormalities Is Associated with Mutations in a Monocarboxylate Transporter Gene. *American Journal of Human Genetics* 2004;74:168–175.
6. Friesema EC, Grueters A, Biebermann H, Krude H, von Moers A, Reeser M, et al. Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet* 2004;364:1435–37.
7. Dumitrescu AM, Liao XH, Abdullah MS, Lado-Abeal J, Majed FA, Moeller LC, et al. Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism. *Nat Genet.* 2005;37:1247-1252.

8. Sakurai A, Takeda K, Ain K, Ceccarelli P, Nakai A, Seino S, et al. Generalized resistance to thyroid hormone associated with a mutation in the ligand-binding domain of the human thyroid hormone receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86:8977-81.
9. Usala SJ, Tennyson GE, Bale AE, Lash RW, Gesundheit N, Wondisford FE, et al. A base mutation of the C-erbA beta thyroid hormone receptor in a kindred with generalized thyroid hormone resistance. Molecular heterogeneity in two other kindreds. *J Clin Invest*. 1990;85:93-100.
10. Tagami T, Jameson JL. Nuclear corepressors enhance the dominant negative activity of mutant receptors that cause resistance to thyroid hormone. *Endocrinology*. 1998;139:640-50.
11. Yen PM, Chin WW. Molecular mechanisms of dominant negative activity by nuclear hormone receptors. *Mol Endocrinol*. 1994;8:1450–54.
12. Safer JD, Cohen RN, Hollenberg AN, Wondisford FE. Defective release of corepressor by hinge mutants of the thyroid hormone receptor found in patients with resistance to thyroid hormone. *J Biol Chem*. 1998;273:30175–82.
13. Yoh SM, Chatterjee VK, Privalsky ML. Thyroid hormone resistance syndrome manifests as an aberrant interaction between mutant T3 receptors and transcriptional corepressors. *Mol Endocrinol*. 1997;11:470–80.
14. Tagami T, Jameson JL. Nuclear corepressors enhance the dominant negative activity of mutant receptors that cause resistance to thyroid hormone. *Endocrinology*. 1998;139:640–50.

15. Collingwood TN, Rajanayagam O, Adams M, Wagner R, Cavaillès V, Kalkhoven E, et al. A natural transactivation mutation in the thyroid hormone β receptor: impaired interaction with putative transcriptional mediators. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:248–53.
16. Moeller LC, Cao X, Dumitrescu AM, Seo H, Refetoff S. Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor beta through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Nucl Recept Signal*. 2006;4:e020
17. Monnier C, Vercauteren M, Susanne C. Estudio de crecimiento de la población escolar de Quito (Ecuador). *Antropologie*. 2003;5:9-20.
18. Lado-Abeal J, Dumitrescu AM, Liao XH, Cohen RN, Pohlenz J, Weiss RE, et al. A de novo mutation in an already mutant nucleotide of the thyroid hormone receptor beta gene perpetuates resistance to thyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:1760-67.
19. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001;25:402–08.
20. Despres N, Grant AW. Antibody interference in thyroid assays: a potential for clinical misinformation. *Clinical Chemistry*. 1988;44:440–54.
21. Beck-Peccoz P, Persani L, Mannavola D, Campi I. Pituitary tumours: TSH-secreting adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009; 23:597-606.
22. Yagi H, Pohlenz J, Hayashi Y, Sakurai A, Refetoff S. Resistance to thyroid hormone caused by two mutant thyroid hormone receptors beta, R243Q and R243W, with marked

impairment of function that cannot be explained by altered in vitro 3,5,3'-triiodothyronine binding affinity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:1608-14.

23. Collingwood TN, Wagner R, Matthews CH, Clifton-Bligh RJ, Gurnell M, Rajanayagam O, et al. A role for helix 3 of the TR β ligand-binding domain in coactivator recruitment identified by characterization of a third cluster of mutations in resistance to thyroid hormone. *The EMBO Journal.* 1998;17:4760–70.

24. Huber BR, Desclozeaux M, West BL, Cunha-Lima ST, Nguyen HT, Baxter JD, et al. Thyroid hormone receptor-beta mutations conferring hormone resistance and reduced corepressor release exhibit decreased stability in the N-terminal ligand-binding domain. *Mol Endocrinol.* 2003;17:107-16.

25. R E Weiss, M Weinberg, S Refetoff. Identical mutations in unrelated families with generalized resistance to thyroid hormone occur in cytosine-guanine-rich areas of the thyroid hormone receptor beta gene. Analysis of 15 families. *J Clin Invest.* 1993;91:2408-15.

26. Weiss R, Tunca H, Knapple WL, Faas FH, Refetoff S. Phenotype Differences of Resistance to Thyroid Hormone in Two Unrelated Families with an Identical Mutation in the Thyroid Hormone Receptor β Gene (R320C). *Thyroid.* 1997;7:35-38.

27. Hayashi Y, Sunthornthepvarakul T, Refetoff S. Mutations of CpG dinucleotides located in the triiodothyronine (T₃)-binding domain of the thyroid hormone receptor (TR) beta gene that appears to be devoid of natural mutations may not be detected because they are unlikely to produce the clinical phenotype of resistance to thyroid hormone. *J Clin Invest.* 1994;94:607-615.

28. Hayashi Y, Weiss RE, Sarne DH, Yen PM, Sunthornthepvarakul T, Marcocci C, et al. Do clinical manifestations of resistance to thyroid hormone correlate with the functional alteration of the corresponding mutant thyroid hormone- β receptors? *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80:3246–3256
29. Clifton-Bligh RJ, de Zegher F, Wagner RL, Collingwood TN, Francois I, Van Helvoirt M, et al. A Novel TR β Mutation (R383H) in Resistance to Thyroid Hormone Syndrome Predominantly Impairs Corepressor Release and Negative Transcriptional Regulation. *Molecular Endocrinology.* 1998;12: 609-21.
30. Flynn TR, Hollenberg AN, Cohen O, Menke JB, Usala SJ, Tollin S, et al. A novel C-terminal domain in the thyroid hormone receptor selectively mediates thyroid hormone inhibition. *J Biol Chem.* 1994; 269:32713-16.

Figuras

Figura 1. Árboles genealógicos. Las flechas señalan a los sujetos propósito y los portadores de mutaciones se representan en negro.

Figura 2. A. Unión-disociación del ADN. Mediante ensayos de movilidad electroforética (EMSA) se comprobó que TR β *wildtype* y los tres mutantes se unen a una secuencia DR4; el receptor *wildtype* se disoció de la unión al ADN con dosis fisiológicas de T3 permaneciendo los mutantes unidos; 243Q y 320C requirieron las dosis mas elevadas de T3 para disociarse. **B. Actividad luciferasa en células HepG2 transfectadas con diferentes receptores.** Tanto TR β *wildtype* como los mutantes estimularon la actividad luciferasa del plásmido Palx3-luc, sugiriendo que se unen a éste y a la hormona tiroidea; 243Q y 320C presentaron una respuesta menor que el TR β *wildtype* para todas las concentraciones de T3 mientras que con 429Q la respuesta fué inferior para 10⁻⁹M pero no para dosis superiores de T3.

Figura 3. Efecto dominante negativo. Los mutantes 243Q y 320C ejercieron un potente efecto dominante negativo sobre el receptor TR β *wildtype* evidente con una relación *wildtype*:mutante 1:1; para 429Q dicho efecto sólo se observó a concentraciones cuatro veces superiores del receptor mutado.

Figura 5. Expresión génica en cultivos de fibroblastos. El aumento en la expresión de *ZAKI4* y *BTEB* en cultivos de fibroblastos tratados con T3 durante 24 horas fue menor en aquellos procedentes del sujeto portador de R320C respecto a los controles normales; los fibroblastos procedentes del caso índice 4 respondieron de forma similar a R320C; en los fibroblastos del caso índice 5, el aumento en la expresión de *ZAKI4* y *BTEB* fue superior a los sujetos controles.

Figura 1.

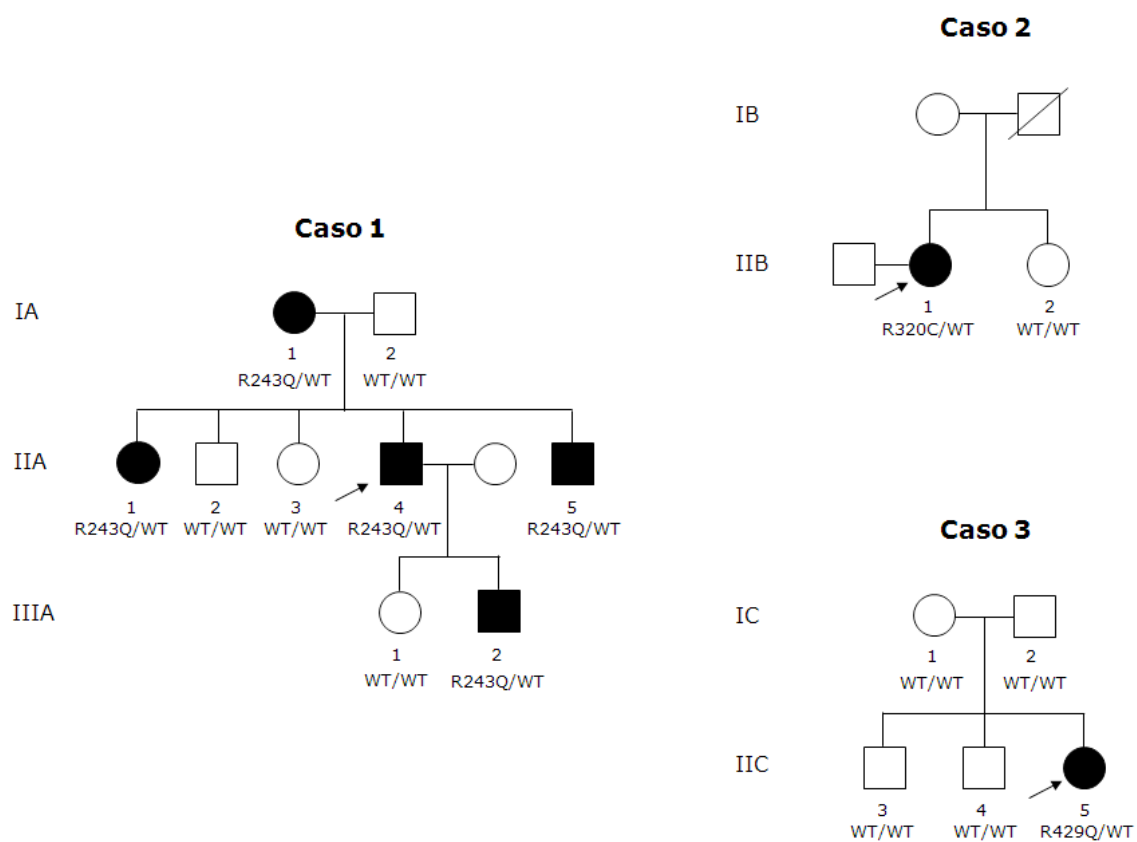


Figura 2

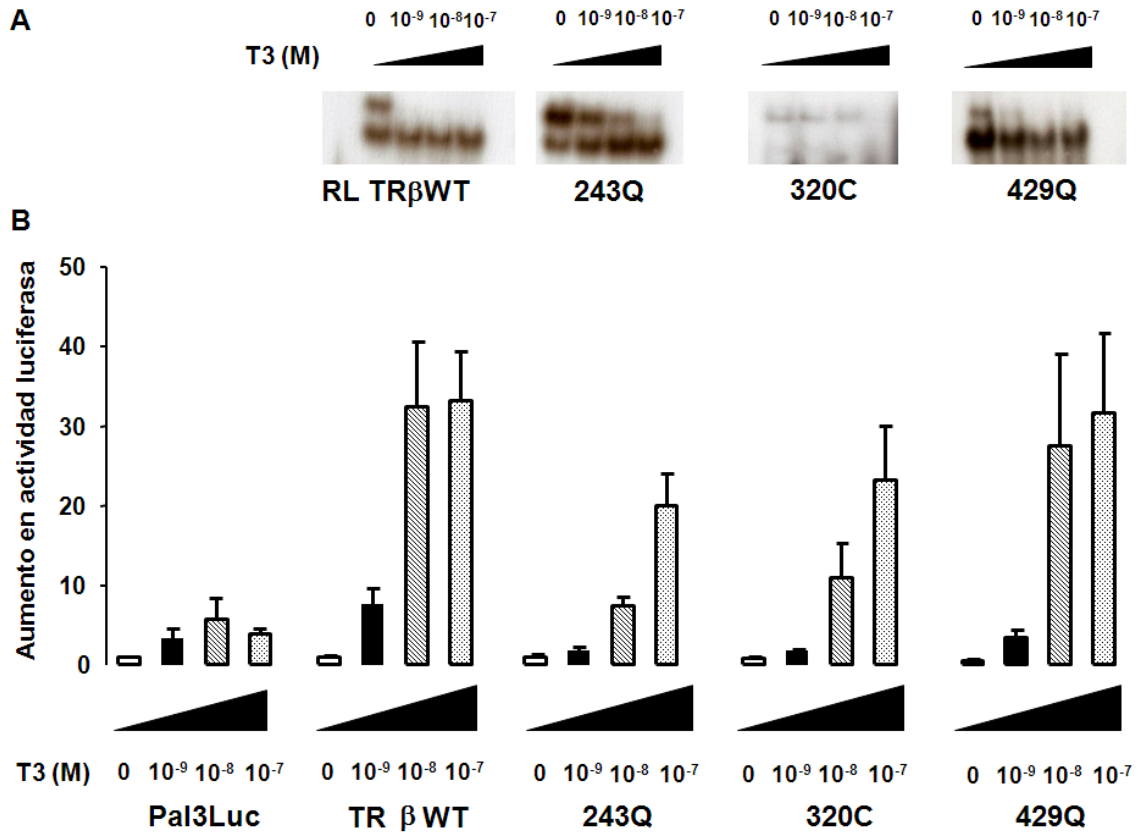


Figura 3

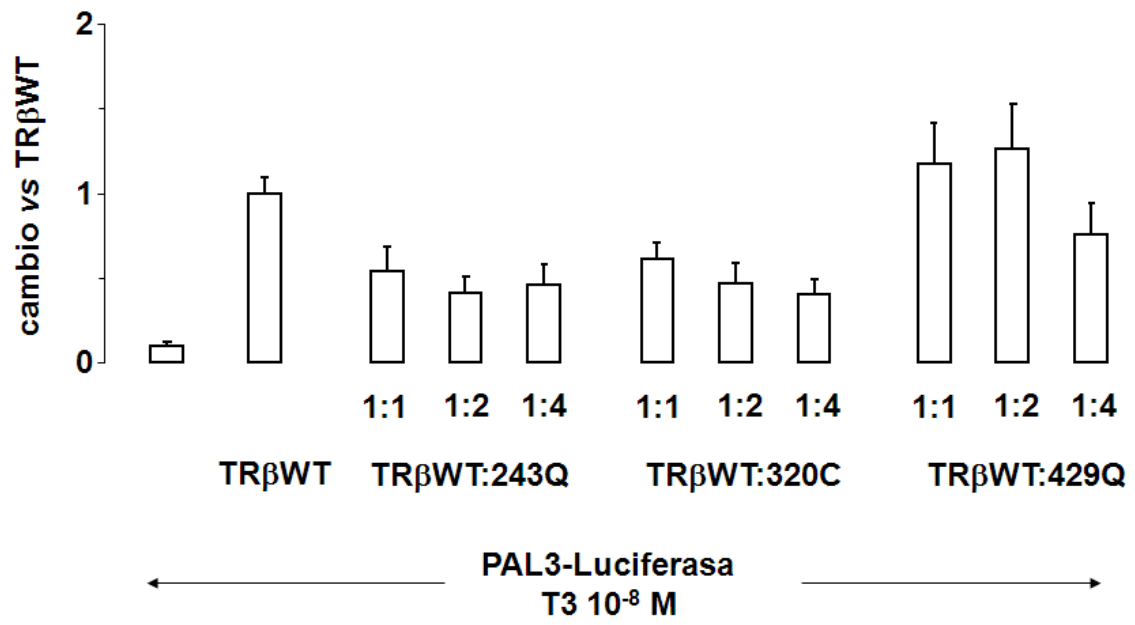
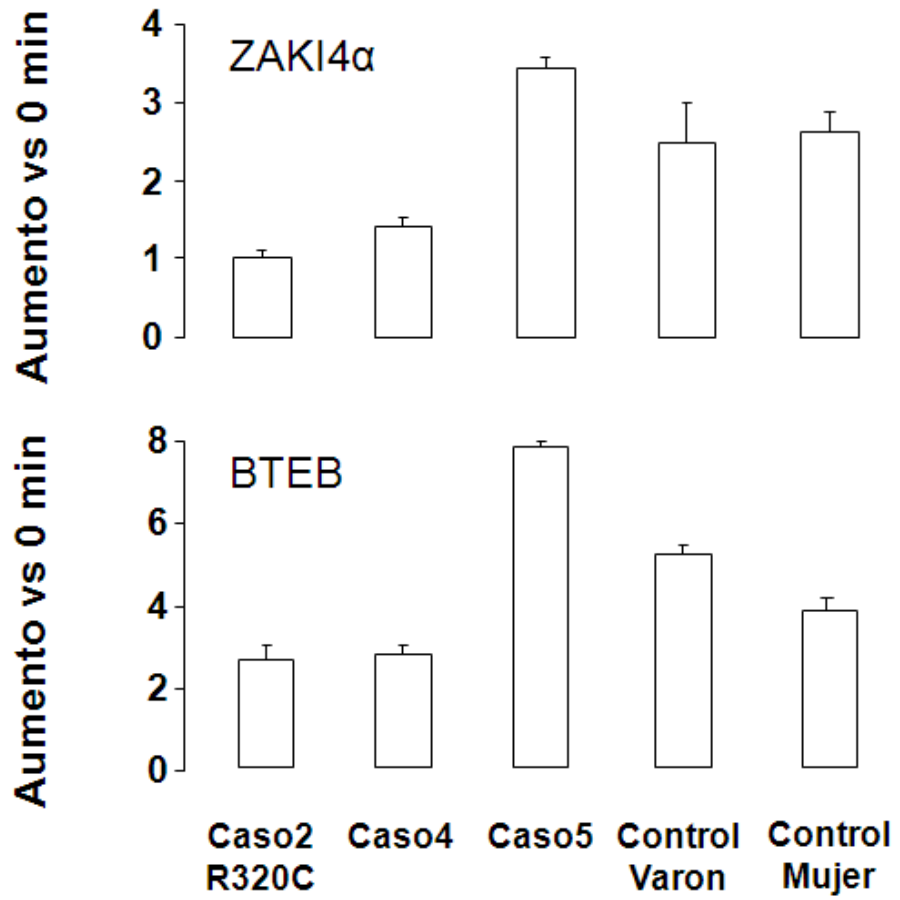


Figura 4



TSH, mIU/L (n:0,41-4,94)	5,09	4,20	2,51	1,25	2,80
FT4, ng/dL (n:0,85-1,69)	2,49	2,45	2,20	1,30	1,42
FT3, pg/mL (n:2,53-4,29)	5,81	6,22	6,30	3,28	3,50