



Nota clínica

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

Joaquín Lado Abeal^{a,b,*}, Ramón Albero Gamboa^c, David Araujo Vilar^{a,d}, Olga Barca Mallo^a, Ignacio Bernabeú Morón^d, María Teresa Calvo^e, Isabel Castro Piedras^{a,b}, Jesús Martín Calamata^f, Fernando Palos Paz^a, Roberto Peinó^d, Diego Peteiro^{a,d} y Berta Victoria^a

^a UETeM, Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, La Coruña, España

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

^c Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, España

^d Servicio de Endocrinología y Nutrición, Complejo Hospitalario de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, La Coruña, España

^e Unidad de Genética Médica, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, España

^f Servicio de Pediatría, Hospital Obispo Polanco, Teruel, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 29 de agosto de 2010

Aceptado el 16 de noviembre de 2010

On-line el 23 de junio de 2011

Palabras clave:

Síndrome de resistencia a la acción de las hormonas tiroideas

Receptor beta de las hormonas tiroideas

Gen *THRB*

Mutación

Keywords:

Thyroid hormone resistance syndrome

Thyroid hormone beta receptor

THRB gene

Mutation

RESUMEN

Fundamento y objetivo: La resistencia a la acción de las hormonas tiroideas (SRHT) es un síndrome causado mayoritariamente por mutaciones en el gen receptor beta de las hormonas tiroideas (*THRB*). Se estudian cinco familias con fenotipo de SRHT.

Pacientes y método: Se realizó secuenciación de *THRB*. Se evaluó la respuesta a triyodotironina (T3) y efecto dominante negativo de los mutantes *in vitro* y se estudiaron los mecanismos de resistencia en sujetos sin mutación *THRB* cuantificando en cultivos de fibroblastos cambios de expresión en los genes *regulator of calcineurin 2 (ZAK14)* y *Kruppel-like factor 9 (BTEB)*.

Resultados: Tres casos presentaron mutaciones en *THRB*: R243Q, R320C, R429Q, dando lugar a receptores TRβ con menor respuesta a T3. R243Q y R320C ejercen efecto dominante negativo. Un sujeto sin mutación *THRB* presentó cambios de expresión en *ZAK14* y *BTEB* similar a R230C, mientras que el otro mostró niveles de expresión superiores a los controles.

Conclusiones: Mutaciones heterocigotas en *THRB* causaron tres de los casos de SRHT estudiados. Uno de los casos con SRHT sin mutación se comporta a nivel molecular como los portadores de mutación, mientras que en el otro la resistencia no está mediada por TRβ.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Clinical and molecular study of five families with resistance to thyroid hormones

ABSTRACT

Background and objective: Resistance to thyroid hormone (RTH) is a syndrome mostly caused by mutations in *thyroid hormone receptor beta* gene (*THRB*). We present five families with RTH phenotype. **Patients and methods:** *THRB* gene sequencing. *In vitro* studies to evaluate the mutants response to thyroid hormones and their dominant negative effect. Mechanism of resistance in patients with RTH without *THRB* mutations quantifying expression of *regulator of calcineurin 2 (ZAK14)* and *Kruppel-like factor 9 (BTEB)* genes in patients fibroblast cultures.

Results: *THRB* mutations were found in three cases: R243Q, R320C, R429Q. Mutants showed a decreased response to T3. R243Q and R320C had a strong dominant negative effect. One subject without *THRB* mutation showed changes in *ZAK14* and *BTEB* expression similar to R320C and the other showed expression levels higher than normal controls.

Conclusions: Three cases of RTH were caused by *THRB* heterozygous mutations but in two cases mutations were not found. *THRB* mutation carriers and one of the patients without mutations share a similar mechanism of resistance and in the other subject RTH is TRβ independent.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: joaquin.lado@ttuhsc.edu (J. Lado Abeal).

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 hormonas tiroideas (HT)¹. Sin embargo, a nivel clínico pueden coexistir datos de hipotiroidismo e hipertiroidismo en un mismo paciente, debido a la diferente expresión de los distintos tipos de receptores nucleares tiroideos entre tejidos^{1,2}. El SRHT se manifiesta a nivel bioquímico con valores elevados de tiroxina (T4) y/o triyodotironina (T3) e inapropiadamente normales o elevados de hormona estimulante del tiroides (TSH).

La incidencia de SRHT se estima en 1 de 40.000 nacidos vivos³. Aunque la mayoría obedece a mutaciones autosómico dominantes en el gen receptor beta de las hormonas tiroideas (*THRB*), en un 15% las causas se desconocen^{1,3}. Los receptores (TR β) mutados tienen una menor afinidad por T3⁴ y ejercen un efecto dominante negativo sobre el receptor *wildtype* (WT)⁵.

Se presenta un estudio clínico-molecular de cinco casos con fenotipo de SRHT.

Métodos

Sujetos

Caso 1. Varón de 28 años con bocio nodular grado 2, que presenta TSH 2,57 μ U/ml (normal -n- 0,41-4,94), T4 libre (FT4) 2,4 ng/dl (n 0,85-1,69), T3 libre (FT3) 6,88 pg/ml (n 2,53-4,29). Su madre, hijo y dos hermanos presentaban fenotipo bioquímico similar.

Caso 2. Mujer de 58 años remitida para evaluación de hipertiroidismo (TSH 5,09 μ U/ml, FT4 2,49 ng/dl, FT3 5,81 pg/ml). Refería hiperactividad desde la infancia, sin síntomas de hipertiroidismo, y no presentaba bocio.

Caso 3. Mujer de 34 años remitida por hipertirodismo (TSH 3,58 μ U/ml, FT4 2,01 ng/dl, FT3 5,54). Refería ansiedad, hiperactividad y palpitaciones. Presentaba bocio difuso y pequeño.

Caso 4. Mujer de 51 años, con trastorno bipolar, remitida para estudio de hipertiroidismo (TSH 4,45 μ U/ml, FT4 1,89 ng/dl, FT3 5,23 pg/ml). Refería palpitaciones y presentaba bocio difuso y pequeño. Los anticuerpos antiperoxidasa (AbTPO) y antitiroglobulina (AbTG) fueron negativos. La gammagrafía tiroidea mostró captación aumentada, la resonancia magnética (RM) de hipófisis no mostró anomalías y la densitometría ósea fue normal.

Caso 5. Niño ecuatoriano de 6 años, remitido para estudio de hipertiroidismo (TSH 2,51 mIU/L, FT4 2,2 ng/dL, FT3 6,3 pg/mL). La talla era de 107,8 cm (percentil 10-25, niños ecuatorianos) y el peso de 20,5 kg (percentil 50)⁶. El examen físico fue normal. Su edad ósea correspondía a la cronológica. Los AbTPO y AbTG fueron negativos. Una RM hipofisaria no mostró anomalías. Un test de TRH (100 μ g en bolus) mostró TSH sérica a 0 min de 3,27 μ U/ml, a 30 min de 22,27 μ U/ml y a 60 min de 17,29 μ U/ml.

Análisis genético

Se realizó una secuenciación de exones 3 a 10 del gen *THRB* sobre muestras de ADN procedentes de linfocitos (condiciones de extracción, reacción en cadena de la polimerasa [PCR] y secuencia de oligonucleótidos disponibles a petición). En los casos 4 y 5 se utilizó cDNA procedente de fibroblastos para investigar anomalías en el *splicing* del gen.

Estudios funcionales in vitro

Construcción de los plásmidos

Los vectores de expresión *THRB* R243Q y R320C se generaron por mutagénesis dirigida (Quickchange II Site Direct Mutagenesis

kit, Stratagene, Alemania) sobre un vector *THRB* WT clonado en pcDNA1⁷. El vector *THRB* R429Q se generó sustituyendo 301 bp del pcDNA1-*THRB* WT por un fragmento similar procedente del paciente portador de R429Q⁷.

Transfección de plásmidos

Se emplearon células HepG2 (ECACC, UK) cultivadas en un medio y condiciones estándar⁷. Las transfecciones se realizaron en triplicados y al menos en 2 ocasiones.

El efecto dominante negativo se investigó cotransfectando *THRB* WT y mutados a una relación WT:MUTADO de 1:1, 1:2 y 1:4. La concentración total de plásmidos fue de 5 ng por pocillo, utilizando como reportero el plásmido PAL3-Luc (1 μ g) y T3 10⁻⁷M.

Ensayo de movilidad electroforética

Mediante transcripción y traducción *in vitro*, empleando reticulocitos de conejo (Invitrogen, España) en presencia de [35S] cisteína, se obtuvieron [35S]TR β WT y mutantes (243Q, 320C, 429Q). Como secuencia de unión a TR β se eligió un DR4 (AGCTTCAGGTCACAGGAGGTCAGA), marcado con ³²P-ATP (T4 Polinucleotide Kinase, Promega, España). Los ³²P-DR4 se incubaron con los TR β sintetizados *in vitro* (condiciones disponibles a petición); finalizada la incubación se añadieron 20 μ L de tampón de carga (Native Sample Buffer, Biorad, Madrid), separándose las muestras en geles verticales de poliacrilamida no desnaturante seguido de autorradiografía (condiciones disponibles a petición).

Cultivos de fibroblastos y estudios de expresión génica

T3 estimula la expresión de los genes *regulator of calcineurin 2* (*RACN2*, *ZAK14*) y *Kruppel-like factor 9* (*KLF9*, *BTEB*). Con la finalidad de profundizar en los mecanismos de resistencia de los sujetos sin mutación en *THRB*, se estudió la respuesta de estos genes en cultivos de fibroblastos procedentes de los propositus 2, 4, 5 y de un varón y una mujer sanos. La técnica de cultivo se describió previamente⁷. Después de una incubación en placas de 24 pocillos durante 24 hr en medio estándar y libre de HT, se añadió T3 (2 x 10⁻⁹ M) al medio, recogiendo los fibroblastos al tiempo 0 y 24 hr. El ARN total se extrajo mediante TRIzol (Invitrogen, Barcelona), procediendo a cuantificar la expresión de *ZAK14* y *BTEB* mediante PCR en tiempo real⁸.

Análisis de datos

Los resultados de transfección y de expresión génica se analizaron con el programa SPSS 14.0 (Chicago, Illinois). La comparación entre grupos se realizó mediante la t de Student.

Resultados

Análisis genético

Todas las mutaciones encontradas en *THRB* fueron heterocigotas. El caso 1 presentó la mutación c.728G>A en el exón 7, causando la sustitución de arginina por glutamina en el codón 243 (R243Q). El propositus heredó la mutación de su madre, siendo portadores todos los familiares con fenotipo bioquímico de SRHT. El caso 2 presentó la mutación c.958C>T en el exón 9, cambiando la arginina del codón 320 por cisteína (R320C). Al no disponer de ADN de los progenitores, se desconoce si heredó la mutación o si es una mutación *de-novo*. El caso 3 presentó la mutación c.1286G>A en el exón 10, cambiando la arginina del codón 429 por glutamina (R429Q). La mutación no se encontró en sus progenitores ni hermanos, lo que sugiere que es una mutación *de-novo*. En los casos 4 y 5 no se detectaron mutaciones en *THRB* ni anomalías en su *splicing*.

Estudios funcionales *in vitro*

TRβ WT y los mutantes mostraron capacidad de unión a DR4 (fig. 1A); TRβ WT se disoció de DR4 con dosis fisiológicas de T3 (10⁻⁹ M), mientras que los mutantes requirieron dosis suprafisiológicas de T3, superiores para 243Q y 320C respecto a 429Q (fig. 1A). Así mismo, todos los receptores indujeron actividad luciferasa con dosis crecientes de T3 (fig. 1B), aunque la respuesta de 243Q y 320C fue inferior al WT para todas las dosis empleadas (fig. 1B), mientras que para 429Q las diferencias fueron significativas sólo a 10⁻⁹ M. 243Q y 320C ejercieron un efecto dominante negativo sobre el TRβ WT, efecto que para 429Q requirió una cantidad de mutante 4 veces superior al WT (fig. 2A).

Estudios de expresión génica en fibroblastos

En los fibroblastos control la expresión de *BTEB* aumentó de 2-2,5 veces y de *ZAK14* 4-4,8 veces tras 24 hr de incubación con T3 (fig. 2B). En fibroblastos heterocigotos para R320C no se observaron cambios en *ZAK14*, aumentando *BTEB* 2,5 veces (fig. 2B). Los fibroblastos de los sujetos sin mutaciones en *THRB* respondieron de forma diferente (fig. 2B): los del propositus 4 respondieron de forma similar a R320C y en los del propositus 5 se observó un aumento superior al de los controles.

Discusión

La elevación en sangre de T4 y/o T3 con valores normales o aumentados de TSH no es habitual. Tras descartar la presencia en suero de un factor que interfiere con la determinación hormonal⁹ o de un tumor hipofisario secretor de TSH¹⁰, la causa más probable es SRHT, cuyo diagnóstico se establece con certeza en caso de encontrar mutación en *THRB*⁴.

En nuestro estudio, 3 de los 5 casos con sospecha de SRTH presentaron mutaciones en *THRB*. Estas mutaciones han sido descritas con anterioridad, localizándose en la región de unión a la T3 y en la parte del receptor que separa a ésta del dominio de unión al ADN. La elevada mutagenicidad de estas regiones se debe a la presencia de nucleótidos G y/o C y CpG⁴.

El SRTH no obedece a haploinsuficiencia y la delección de un alelo TRβ no causa SRTH, sino que se debe al efecto dominante negativo de los mutantes⁴. Nuestros estudios mostraron que 243Q ejerce efecto dominante negativo, permaneciendo unido al DR4 incluso con dosis elevadas de T3. 243Q no tiene alterada su capacidad de unión al ADN, de heterodimerización y de unión a correpresores^{11,12}; curiosamente 243Q se une con normalidad a T3¹³, pero esta capacidad disminuye cuando se une al ADN, perdiendo además la capacidad de liberarse del correpresor NCoR¹¹. 320C ejerce efecto dominante negativo y tiene poca capacidad de unión a T3, requiriéndose dosis altas de T3 para disociarse de DR4¹⁴. El portador de R429Q presentó manifestaciones clínicas de hipertiroidismo; *in vitro* este mutante respondió de forma similar al TRβ WT, requiriendo dosis menores de T3 que los otros mutantes para disociarse de DR4. 429Q se ha relacionado con resistencia central¹⁵, ya que ejerce un mayor efecto sobre la transactivación inducida por las HT sobre genes inhibidos que por los estimulados por T3 (por ejemplo, PAL3-Luc)⁴. Dado que la subunidad alfa de TSH y el TRH son inhibidos por T3, los sujetos portadores de 429Q debieran de presentar una alteración en *feedback* tiroideo a nivel central¹⁶, como se ha demostrado *in vitro*¹⁷, lo que explicaría la elevación de la TSH y los síntomas de hipertiroidismo al no existir resistencia periférica.

En los casos 4 y 5 no se encontraron mutaciones en *THRB*. Nuestros resultados *in vitro* sugieren que los mecanismos de resistencia son diferentes para cada uno de ellos. En el caso 4, la respuesta de *ZAK14* y *BETB* fue similar al portador R320C, sugiriendo un mecanismo de resistencia mediado por un defecto en la acción del

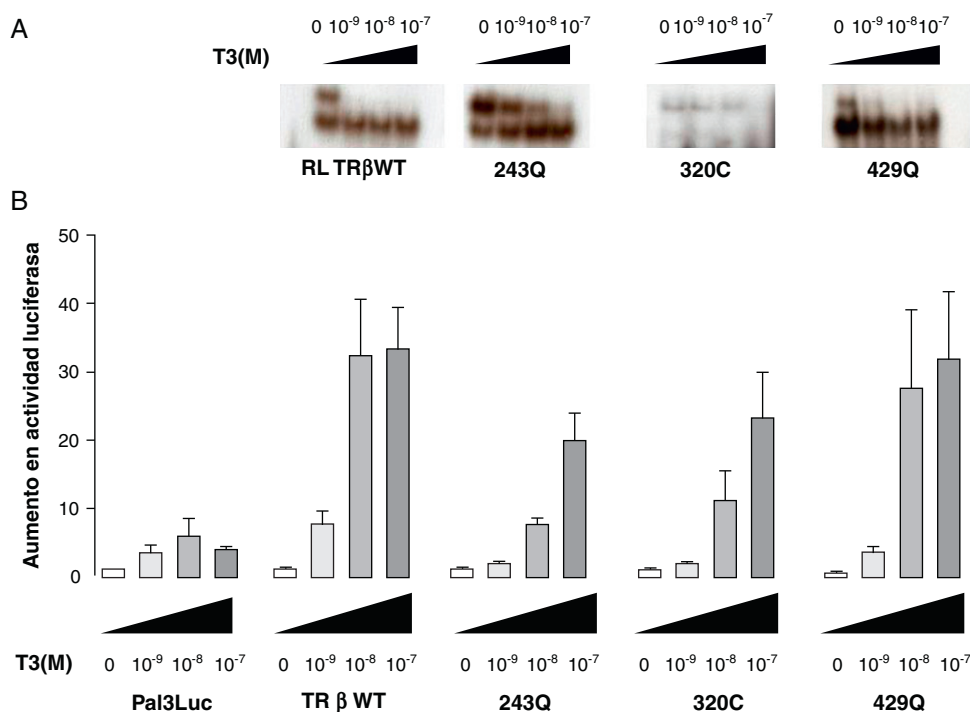


Figura 1. A. Unión-disociación del ADN. Mediante ensayos de movilidad electroforética (EMSA) se comprobó que tanto TRβ *wildtype* como los tres mutantes se unen a una secuencia DR4; el receptor *wildtype* se disoció de la unión al ADN con dosis fisiológicas de triyodotironina (T3), permaneciendo los mutantes unidos; R243Q y R320C requirieron las dosis más elevadas de T3 para disociarse. B. Actividad luciferasa en células HepG2 transfectadas con diferentes receptores. Tanto TRβ *wildtype* como los mutantes estimularon la actividad luciferasa del plásmido Palx3-Luc, sugiriendo que se unen a éste y a la hormona tiroidea; R243Q y R320C presentaron una respuesta menor que el TRb *wildtype* para todas las concentraciones de T3, mientras con R429Q la respuesta fue inferior para 10⁻⁹ M, pero no para dosis superiores.

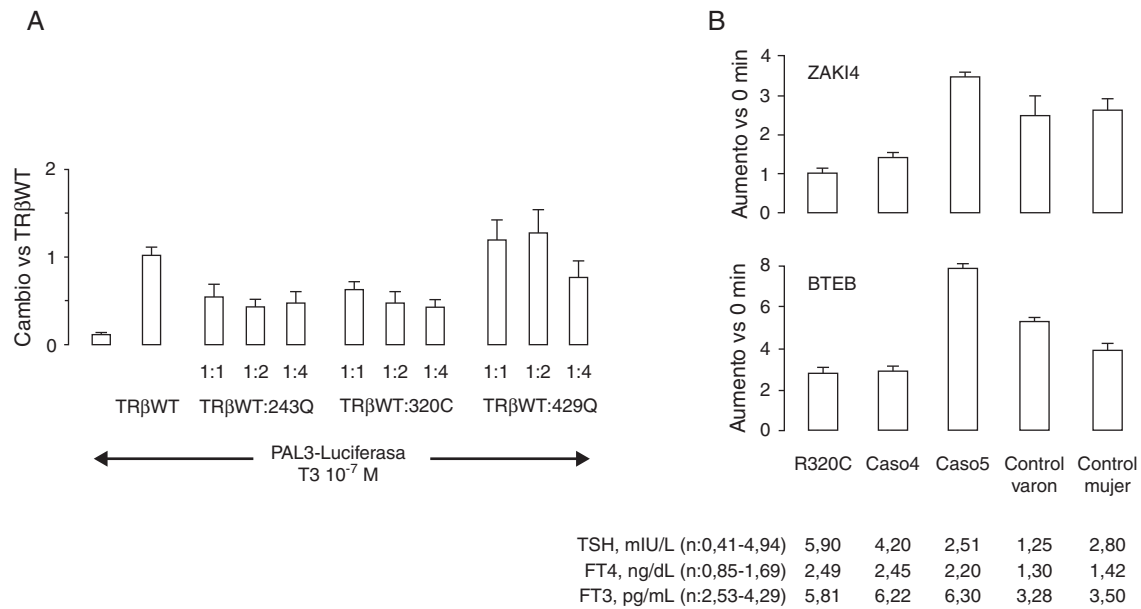


Figura 2. A. Efecto dominante negativo. Los mutantes R243Q y R320C ejercieron un potente efecto dominante negativo sobre el receptor *wildtype* evidente con una relación *wildtype*:mutante 1:1; el efecto del receptor R429Q sólo se observó a concentraciones cuatro veces superiores del receptor mutado. B. Expresión génica en cultivos de fibroblastos. El aumento en la expresión de *ZAKI4* y *BTEB* en cultivos de fibroblastos tratados con triyodotironina (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 al de los sujetos controles.

TRβ. En el sujeto 5 se observó un aumento en *ZAKI4* y *BTEB* superior a los controles, lo que prueba que estos fibroblastos incorporan T3 y no son resistentes a la acción de la hormona; la elevación en suero de T3 sugiere que no existe un defecto en la conversión de T4 en T3; aunque se podría hipotetizar que existe una resistencia central, la RM de hipófisis fue normal y el paciente no presentaba hipertiroidismo. Dado que *ZAKI4* y *BTEB* están regulados por TRβ¹⁸, no podemos descartar una mutación en TRAlfa, aunque en humanos no se han descrito mutaciones naturales en TRAlfa y se desconoce el fenotipo que pudieran presentar.

Financiación

Este trabajo fue financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS (proyecto PI030401 a JL-A), Ministerio de Educación (proyecto SAF2006-02542 a JL-A) y Xunta de Galicia (proyectos PGDIT04PXIC20801PN y PGDIT06PXIB 208360PR a JL-A).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Al profesor Samuel Refetoff de la Universidad de Chicago por la cesión de los plásmidos PAL3-Luc y pcDNA1-THRB.

Bibliografía

- Refetoff S, Weiss RE, Usala SJ. The syndromes of resistance to thyroid hormone. *Endocr Rev.* 1993;14:348-99.
- 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.
- Refetoff S, Dumitrescu AM. Syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone: genetic defects in hormone receptors, cell transporters and deiodination. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2007;21:277-305.
- 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.
- Yen PM, Chin WW. Molecular mechanisms of dominant negative activity by nuclear hormone receptors. *Mol Endocrinol.* 1994;8:1450-4.
- Monnier C, Vercauteren M, Susanne C. Estudio de crecimiento de la población escolar de Quito (Ecuador). *Antropologie.* 2003;5:9-20.
- 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;90:1760-7.
- Rodriguez-Perez A, Palos-Paz F, Kaptein E, Visser TJ, Dominguez-Gerpe L, Alvarez-Escudero J, et al. Identification of molecular mechanisms related to nonthyroidal illness syndrome in skeletal muscle and adipose tissue from patients with septic shock. *Clin Endocrinol.* 2008;68:821-7.
- Despres N, Grant AW. Antibody interference in thyroid assays: a potential for clinical misinformation. *Clin Chem.* 1988;44:440-54.
- Beck-Peccoz P, Persani L, Mannavola D, Campi I. Pituitary tumours: TSH-secreting adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23:597-606.
- 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.
- Collingwood TN, Wagner R, Matthews CH, Clifton-Bligh RJ, Gurnell M, Rajanayagam O, et al. A role for helix 3 of the TRβ ligand-binding domain in coactivator recruitment identified by characterization of a third cluster of mutations in resistance to thyroid hormone. *EMBO J.* 1998;17:4760-70.
- 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.
- 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;94:607-15.
- 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-b receptors? *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80:3246-56.
- Iglesias P, Diez JJ. Posibilidades terapéuticas en la resistencia hipofisaria selectiva a las hormonas tiroideas. *Med Clin (Barc).* 2008;130:345-50.
- 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;269:32713-6.
- 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.