

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

MONALISA FERREIRA AZEVEDO

**DUAS NOVAS MUTAÇÕES ENVOLVIDAS NA SÍNDROME DE
RESISTÊNCIA AO HORMÔNIO TIREOIDEANO: ALTERAÇÃO NO
RECEPTOR DO HORMÔNIO E DEFEITO NA SÍNTESE DE
SELENOPROTEÍNAS**

BRASÍLIA

2008

MONALISA FERREIRA AZEVEDO

**DUAS NOVAS MUTAÇÕES ENVOLVIDAS NA SÍNDROME DE
RESISTÊNCIA AO HORMÔNIO TIREOIDEANO: ALTERAÇÃO NO
RECEPTOR DO HORMÔNIO E DEFEITO NA SÍNTESE DE
SELENOPROTEÍNAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves

BRASÍLIA

2008

TERMO DE APROVAÇÃO

MONALISA FERREIRA AZEVEDO

DUAS NOVAS MUTAÇÕES ENVOLVIDAS NA SÍNDROME DE RESISTÊNCIA
AO HORMÔNIO TIREOIDEANO: ALTERAÇÃO NO RECEPTOR DO
HORMÔNIO E DEFEITO NA SÍNTESE DE SELENOPROTEÍNAS

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no
Curso de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina
da Universidade de Brasília, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis da Rocha Neves
Faculdade de Ciências da Saúde, UnB

Prof. Dr. Cesar Luiz Boguszewski
Faculdade de Medicina, UFPR

Profa. Dra. Ana Luiza Maia
Faculdade de Medicina, UFRGS

Prof. Dr. Luiz Augusto Casulari Roxo da Motta
Faculdade de Ciências da Saúde, UnB

Prof. Dr. Joel Russomano Veiga
Faculdade de Medicina, UnB

Brasília, 12 de dezembro de 2008.

Ao meu querido pai, Fábio Azevedo, meu grande exemplo de vida, e de quem a saudade é infinita...

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar vida, saúde e inteligência, e por me conceder o privilégio de chegar até aqui, e poder agradecer às pessoas maravilhosas que cruzaram o meu caminho...

À minha querida mãe, Marta, aos meus irmãos, Martinha e Fabinho, e à minha sobrinha, Maria Eduarda, por todo o amor, carinho e apoio da vida inteira.

Ao Prof. Francisco Neves, com quem aprendi muito mais durante esses anos do que eu poderia imaginar, pelo incentivo, pela confiança e pela amizade.

À minha querida amiga, Dra. Luciana Naves, pelo exemplo, pelo apoio sempre incondicional e irrestrito, e pela amizade verdadeira e de todas as horas.

Ao grande parceiro, mais que amigo, Gustavo Barra, por tudo!

Às grandes amigas Angélica e Ligiane, não apenas pela colaboração na realização desse trabalho, mas principalmente pelo companheirismo e pela amizade. À tia Maura, ao tio Herivelto, e aos meus queridos amigos e familiares, que estão ao meu lado sempre.

Aos amigos queridos, Mônica Tokarnia, Adriana Furtado, Miza e Luiz Augusto Casulari, pela parceria no cotidiano, pelo incentivo e paciência... Ao Luiz Cláudio Castro, pela confiança e ajuda na realização do trabalho.

Aos médicos residentes, queridos, Érica, Rodrigo, Aline, Ingrid, Denise e Alexandre, pela colaboração, carinho e apoio.

A toda a família da Sara Lorena, principalmente à Ana Maria e à Fátima, que me confiaram a responsabilidade de cuidar da saúde dos seus filhos, e me ajudaram imensamente nas descobertas desse trabalho.

Ao Laboratório Sabin, especialmente à amiga Lara, pela colaboração e suporte à realização desse trabalho.

Aos amigos da Farmacologia Molecular, em especial à Karime, Juana, Rilva, Andrea Montoyama, Cristina e Luiz Simeoni, pelo carinho e companheirismo ao longo desses quatro anos.

E a todos os colegas do HUB, da UnB e do HBDF que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

As ações dos hormônios tireoidianos nos tecidos-alvo requerem diversas etapas, e mutações que interferem em algumas delas têm sido identificadas em humanos, nos últimos anos. O defeito melhor caracterizado envolve o gene do receptor do hormônio tireoidiano β (TR β), e resulta num fenótipo clínico conhecido como Síndrome de Resistência ao Hormônio Tireoidiano (SRHT). Nós descrevemos uma grande família brasileira portadora de uma nova mutação que afeta o gene do TR β . Uma paciente de 14 anos de idade apresentou concentrações plasmáticas elevadas de T₄ e T₃ livres, associadas a TSH não-suprimido. O diagnóstico de SRHT foi estabelecido pela identificação da mutação I431V no gene do TR β . Dezesesseis parentes assintomáticos da probanda também são afetados pela mutação. Estudos funcionais mostram que a mutação I431V exerce efeito dominante negativo sobre o TR selvagem, basicamente, por prejudicar a liberação do correpressor SMRT, ligante-dependente. A presença desta mutação reduz a potência, mas não afeta a eficácia da ação do hormônio tireoidiano, o que está de acordo com a apresentação clínica de eumetabolismo dos indivíduos afetados. Por outro lado, uma descrição recente definiu que defeitos no metabolismo dos hormônios tireoidianos podem produzir um fenótipo bastante similar ao observado nos pacientes portadores de mutações no TR. A geração do hormônio tireoidiano ativo, ou a sua inativação, no local de ação, ocorre mediada pelas desidases. A síntese dessas enzimas requer a incorporação do aminoácido selenocisteína, através da recodificação do códon de parada UGA, num processo único que cria a classe de proteínas denominadas selenoproteínas. Em humanos, já foram descritas pelo menos 25 diferentes selenoproteínas, embora a maioria delas ainda não tenha sido completamente caracterizada. Até os dias atuais, o mecanismo de síntese das selenoproteínas não foi totalmente esclarecido, no entanto, alguns fatores, como a proteína SBP2, estão definitivamente envolvidos. Nós descrevemos uma paciente de 11 anos de idade, que apresentou quadro de baixa estatura com idade óssea atrasada, déficit auditivo parcial, miopatia periférica progressiva, caracterizada por hipotonia e fraqueza, semi-ptose palpebral à esquerda, com estrabismo divergente homolateral, escoliose moderada, com lordose dorsal e desvio lateral da coluna, além de alterações nos níveis circulantes dos hormônios tireoidianos. Os níveis séricos de TSH da paciente eram discretamente elevados, com T₄ e T₃ reverso altos, enquanto os níveis de T₃ estavam baixos, alterações hormonais estas sugestivas de um defeito no metabolismo dos hormônios tireoidianos. Adicionalmente, os níveis séricos de glutathionaperoxidase e de selênio total estavam reduzidos. Mutações no TR β foram excluídas por seqüenciamento genético. Duas novas mutações do tipo *nonsense* afetando o gene SBP2 foram encontradas nessa paciente, configurando uma mutação em heterozigose composta. A investigação da família mostrou tratar-se de herança de padrão recessivo. Uma vez que a SBP2 é essencial para a síntese de selenoproteínas, esse defeito produziu um efeito generalizado sobre as diversas selenoproteínas, associado a um fenótipo que não havia sido descrito na literatura previamente. A descrição dessa nova síndrome abre uma nova perspectiva na compreensão do papel fisiológico das selenoproteínas, em seres humanos.

Palavras-chave: Resistência ao Hormônio Tireoidiano, Receptor do Hormônio Tireoidiano, Corregulador; Mutação; Desiodase; Selenoproteína.

ABSTRACT

Thyroid hormone actions on target tissues require several steps, and mutations interfering with some of them have been identified in humans, in the last years. The best characterized defect involves thyroid hormone receptor β (TR β) gene, and results on a clinical phenotype known as Resistance to Thyroid Hormone (RTH). We describe a large Brazilian family harboring a novel mutation affecting TR β gene. A 14-year-old girl was found to have elevated free T₄ and free T₃ plasma concentrations in coexistence with unsuppressed TSH. The diagnosis of RTH was verified by identification of a novel mutation (I431V) in the TR β gene. Sixteen asymptomatic relatives of the probanda are also affected by the mutation. Functional studies showed that I431V mutant exerts dominant-negative effect on wild type TR β , mainly by impairment of ligand-dependent release of corepressor SMRT. The presence of this mutation reduces potency, but does not affect efficacy of thyroid hormone action, in accordance with the clinical picture of eumetabolism of the affected individuals. Otherwise, a recent description has postulated that defects on thyroid hormone metabolism may produce a phenotype quite similar to that seen in patients harboring TR β mutations. The generation of active thyroid hormone, or its inactivation, at the site of action, occurs mediated by deiodinases. The synthesis of these enzymes requires incorporation of the aminoacid selenocysteine, through recoding of the UGA stop codon, in a unique process that creates the class of proteins named selenoproteins. There have been described at least 25 different selenoproteins in humans, although the majority of them have not yet been fully characterized. Until nowadays, the mechanism of selenoproteins synthesis is not completely understood, but some factors such as SBP2 protein, are definitely involved. We describe an 11-year-old girl, who presented with short stature, delayed bone age, defective auditory function, progressive peripheral myopathy characterized by hypotonia and weakness, semi ptosis of the left eyelid with homolateral divergent strabism, moderate scoliosis with dorsal lordosis and lateral trunk deviation, accompanied by altered thyroid hormone levels. Patient's serum TSH was slightly elevated, with elevated T₄ and reverse T₃, while T₃ levels were low, all these hormonal alterations suggesting a thyroid hormone metabolism defect. Additionally, serum levels of glutathione peroxidase and total selenium were reduced. TR β mutations were ruled out by genetic sequencing. Two novel nonsense mutations affecting the SBP2 gene were found in this patient, configuring a compound heterozygous mutation. Family investigation showed that inheritance is recessive. Because SBP2 is epistatic to selenoproteins synthesis, this defect produced a generalized effect on selenoproteins, with a phenotype that had not been described previously in the literature. The description of this new syndrome comprises a new perspective on the comprehension of the physiological roles of selenoproteins in humans.

Key words: Thyroid hormone resistance; Thyroid hormone receptor; Coregulator; Mutation; Deiodinase; Selenoprotein.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AF1** – Função de Ativação 1
- AF2** – Função de Ativação 2
- CK** – Creatina-fosfoquinase
- D1** – Desiodase Tipo 1
- D2** – Desiodase Tipo 2
- D3** – Desiodase Tipo 3
- DBD** – Domínio de Ligação ao DNA
- DNA** – Ácido Desoxirribonucléico
- DR4** – Repetições Diretas da Seqüência AGGTCA Espaçadas por Quatro Nucleotídeos
- EC₅₀** – Concentração onde se obteve metade da resposta máxima
- EFSec** – Fator de Alongamento Sec-específico
- F2** – Palíndromo Invertido da Seqüência AGGTCA
- GPx** – Glutathione-peroxidase
- GST** – Glutathione S-transferase
- H** – Hélice
- HT** – Hormônio Tireoidiano
- IMC** – Índice de Massa Corporal
- Kd** – Constante de Dissociação
- LBD** – Domínio de Ligação ao Ligante
- LDL** – Colesterol de Baixa Densidade
- L-T₄** – Levotiroxina
- L-T₃** – Liotironina
- LUC** – Luciferase
- MCT** – Monocarboxilato
- N-CoR** – Correpresor de Receptores Nucleares
- NLS** – Região de Localização de Sinal

NES – Sinal de Exportação Nuclear

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RBD – Domínio de Ligação ao RNA

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

RGHT – Resistência Generalizada ao Hormônio Tireoidiano

RHHT - Resistência Hipofisária ao Hormônio Tireoidiano

RNA_m – RNA mensageiro

RNA_t – RNA transportador

RNA – Ácido Ribonucléico

RNM – Ressonância Nuclear Magnética

rT₃ – 3,5',3'-triiodotironina ou T₃ reverso

RXR – Receptor do Retinóide X

Sec – Selenocisteína

Sec-RNA_t – RNA_t da Selenocisteína

SECIS – Seqüência de Inserção da Selenocisteína

SECISBP2 ou SBP2 – Proteína Ligadora do SECIS

Sel – Selenoproteína

SEPN – Gene da Selenoproteína N

SHBG – Globulina Ligadora de Esteróides Sexuais

SMRT – Mediador do Silenciamento do Receptor do Ácido Retinóico e do Receptor do Hormônio Tireoidiano

SNP – Polimorfismo de um Único Nucleotídeo

SPS2 – Selenofosfato-sintetase Tipo 2

SRC-1 – Coativador de Receptores Nucleares 1

SRE – Elemento de Redefinição da Selenocisteína

SRHT – Síndrome de Resistência ao Hormônio Tireoidiano

T₄ – 3,5,3',5'-tetraiodotironina

T₃ – 3,5,3'-triiodotironina

TBG – Globulina Ligadora da Tiroxina

THRB – Gene do Receptor do Hormônio Tireoidiano Beta

TR – Receptor do Hormônio Tireoidiano

TRE – Elemento Responsivo Tireoidiano

TREpal – Palíndromo da Seqüência AGGTCA

TRH – Hormônio Liberador da Tireotrofina

TRIAC – Ácido Triiodotiroacético

TrxR – Tiorredoxina-redutase

TSH – Hormônio Estimulador da Tireóide

TTR – Transtirretina

WT – Wild Type

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Fisiologia Tireoidiana	13
1.1.1. Mecanismo Molecular de Ação do Hormônio Tireoidiano.....	14
1.2. Síndrome de Resistência ao Hormônio Tireoidiano	20
1.2.1. Síndrome de Resistência ao Hormônio Tireoidiano Associada a Defeitos no TR.....	21
1.2.2. Insensibilidade ao Hormônio Tireoidiano.....	29
1.2.2.1. Mutações no Gene da Proteína Transmembrana MCT8.....	29
1.2.2.2. Alterações no Metabolismo dos Hormônios Tireoidianos.....	30
1.3. As Enzimas Desiodases	32
1.3.1. Síntese das Desiodases.....	35
1.3.2. A Família das Selenoproteínas.....	39
2. OBJETIVOS	45
3. PACIENTES E MÉTODOS	46
3.1. Pacientes	46
3.2. Voluntários Sadios	46
3.3. Avaliação Clínica	47
3.4. Dosagens Hormonais	47
3.5. Investigação Genética	48
3.6. Ensaios in vitro	51
3.6.1. Plasmídeos.....	51
3.6.2. Cultura de Células.....	52
3.6.3. Método de Transfecção e Ensaio de Atividade da Enzima Luciferase...	52
3.6.4. Curvas Dose-Resposta e Efeito Dominante Negativo.....	53
3.6.5. Ensaio de GST.....	54
3.6.6. Ensaio de Ligação ao T ₃	54
3.6.7. Western Blotting.....	55

3.7. Análise Estatística.....	56
4. RESULTADOS.....	57
4.1. Uma nova mutação no gene do TRβ provoca Síndrome de Resistência ao Hormônio Tireoidiano.....	57
4.2. Uma nova mutação no gene SBP2 provoca uma síndrome resultante da deficiência de selenoproteínas.....	64
5. DISCUSSÃO.....	73
5.1. Uma nova mutação no gene do TRβ causa SRHT.....	73
5.2. Uma nova mutação no gene SBP2 causa uma nova síndrome resultante da deficiência de selenoproteínas.....	77
6. CONCLUSÕES.....	83
7.PERSPECTIVAS.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
APÊNDICE.....	92
ANEXOS.....	117

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Fisiologia Tireoidiana*

A glândula tireóide é um dos maiores órgãos especializados em função endócrina do organismo humano, e produz 3,5,3',5'-tetraiodotironina (T_4) e 3,5,3'-triiodotironina (T_3), que são hormônios essenciais para o crescimento e desenvolvimento normais, e que estão diretamente envolvidos na regulação de diversas funções homeostáticas, como produção de calor e de energia [1-3].

A regulação da produção hormonal tireoidiana é feita pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoidiano. O hormônio estimulador da tireóide (TSH) produzido pelas células tireotróficas da hipófise anterior sob estímulo do hormônio liberador da tireotrofina (TRH), ganha a circulação periférica e, na tireóide, liga-se a receptores específicos, e estimula todas as etapas da síntese do T_4 e do T_3 , bem como a sua liberação pela glândula. A síntese e a secreção do TSH e do TRH, por sua vez, são inibidas pelos hormônios tireoidianos (HTs), caracterizando um mecanismo de retroalimentação negativa [1, 4].

Em condições normais, todo o T_4 e cerca de 20% do T_3 circulantes são produzidos diretamente pela tireóide. Os 80% restantes do T_3 presente na circulação provêm da desiodação periférica do T_4 , através da ação das desidases tipo 1 (D1), e tipo 2 (D2). A maior parte da atividade biológica dos hormônios tireoidianos decorre dos efeitos celulares do T_3 , que possui maior afinidade pelo receptor do hormônio tireoidiano e é pelo menos 10 vezes mais potente que o T_4 . Existe, ainda, o 3,5',3'-triiodotironina ou T_3 reverso (rT_3), que é metabolicamente inativo, e é secretado em pequena quantidade pela tireóide. Sua produção provém quase totalmente da metabolização periférica do T_4 pela ação da desidase tipo 3, a D3 [1-3].

Os HTs, por serem pobremente solúveis em água, depois de liberados na circulação, ligam-se, de forma reversível, a proteínas plasmáticas. A globulina ligadora da tiroxina (TBG), glicoproteína de maior afinidade pelos HTs, carrega de 70 a 80% do T_3 e do T_4 presentes na circulação, enquanto a transtirretina (TTR) se liga a 10%, e a albumina transporta outros 15% dos HTs circulantes. Entre 3% e 6% do T_4 e do T_3 plasmáticos estão ligados a lipoproteínas [5].

Somente 0,03% do T₄ e 0,3% do T₃ estão livres na circulação, e apenas as frações livres são capazes de se ligar aos receptores específicos dos hormônios tireoidianos nos tecidos periféricos, e promover a atividade biológica. No entanto, a ligação dos HTs às proteínas plasmáticas aumenta suas meias-vidas e assegura uma distribuição regular e homogênea do hormônio nos diversos tecidos-alvo. A fração livre dos HTs entra nas células, principalmente, por transporte ativo, através de sistemas transportadores específicos, entre os quais se incluem diferentes famílias de proteínas carreadoras de solutos, ânions orgânicos, aminoácidos e transportadores monocarboxilato (MCT). Em uma menor parcela, os HTs são transportados por difusão passiva, através da membrana plasmática [5-7].

1.1.1. Mecanismo Molecular de Ação do Hormônio Tireoidiano

A ação dos HTs ocorre, basicamente, através da sua ligação a receptores específicos, presentes no núcleo celular, denominados receptores do hormônio tireoidiano (TRs), que desencadeia a regulação da transcrição gênica nos tecidos-alvo. Os TRs são fatores de transcrição ligante-dependentes que possuem, em sua estrutura, três domínios principais: o amino-terminal, o de ligação ao DNA (DBD) e o de ligação ao ligante (LBD), além de uma pequena região conhecida como dobradiça, que conecta o DBD ao LBD (figura 1) [8].

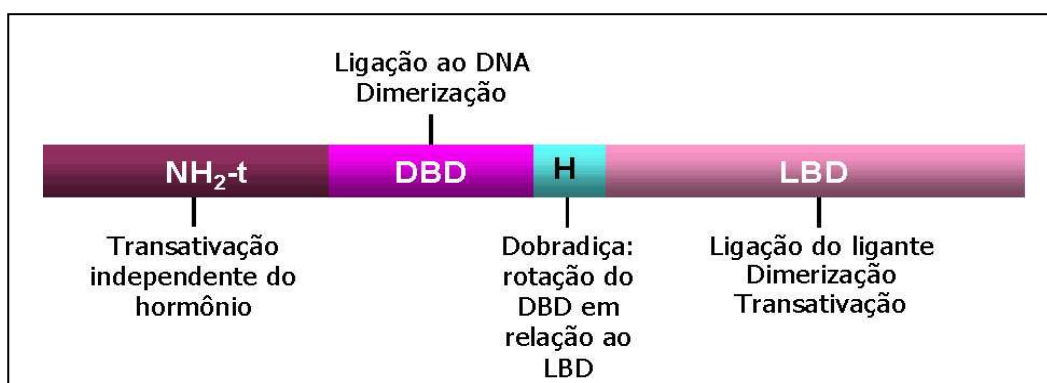


Figura 1: Representação esquemática linear da estrutura do receptor do hormônio tireoidiano, com seus domínios funcionais e respectivas funções. FONTE: Barra e cols., 2004; Arq Bras Endocrinol Metab.

O DBD possui duas seqüências de aminoácidos com resíduos de cisteína, que formam duas estruturas independentes em forma de alça, coordenadas por uma molécula de zinco, que são conhecidas como “dedos de zinco”, conforme ilustrado na figura 2. Três aminoácidos na base do primeiro dedo de zinco servem para determinar a seqüência de DNA específica, o elemento responsivo tireoidiano (TRE), ao qual se liga o receptor, enquanto outros aminoácidos no segundo dedo de zinco são importantes para a dimerização do TR com o receptor do retinóide X (RXR) [9, 10].

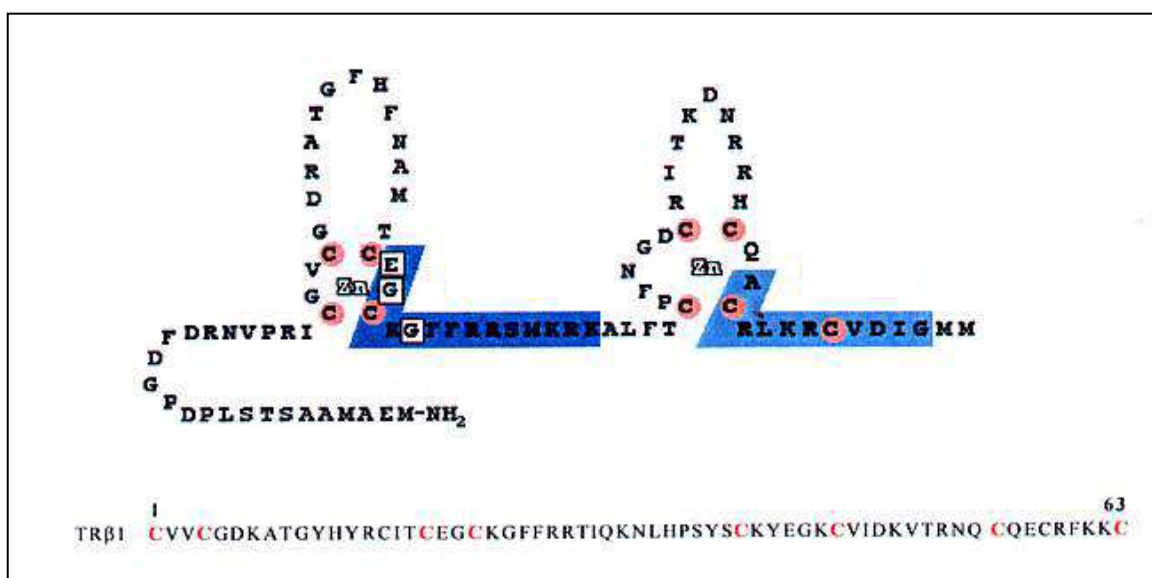


Figura 2: Estrutura e seqüência de aminoácidos do domínio de ligação ao DNA (DBD) do TR β_1 . Os 9 resíduos de cisteína destacados em vermelho são altamente conservados na superfamília de receptores nucleares. Observa-se o dobramento das 2 α -hélices na porção carboxi-terminal de cada dedo de zinco. A α -hélice de cada dedo se acopla diretamente à fenda maior do DNA, onde os três aminoácidos assinalados na base do primeiro dedo de zinco fazem contatos específicos com os pares de bases do DNA. FONTE: Adaptado de Barra e cols., 2004; Arq Bras Endocrinol Metab.

Os TRs modulam a expressão gênica através da sua ligação, no DNA, aos TREs, que estão localizados próximos à região promotora dos genes regulados pelo receptor. Os TREs são compostos por duas cópias imperfeitas do hexanucleotídeo AGGTCA, que podem estar arranjadas em diferentes orientações, incluindo repetições diretas espaçadas por quatro nucleotídeos quaisquer (DR4), palíndromo invertido espaçado por seis nucleotídeos quaisquer (F2), ou palíndromo sem nenhum espaçamento (TREpal) [11].

Aproximadamente 30 TREs naturais já foram identificados, sendo que a maioria é do tipo DR4, seguido pelo F2 e, mais raramente, o TREpal [3].

A porção amino-terminal do TR apresenta a propriedade de ativação da transcrição (transativação) na ausência do hormônio, denominada de função de ativação 1 (AF1). Essa é uma região relativamente pequena e, na maioria das vezes, a deleção dessa porção tem pouco efeito nas respostas transcricionais positivas ao hormônio tireoidiano [5, 12].

O domínio situado na região carboxi-terminal, LBD, confere especificidade ao ligante do receptor, e é importante para a formação de dímeros, além de atuar na associação do receptor com outras proteínas, como os co-repressores [13] e os co-ativadores [14], que participam nos processos de repressão ou de ativação da transcrição gênica. Além disso, o LBD contém uma superfície que é fundamental para a ativação transcricional, que se forma com a ligação do hormônio ao receptor. Após a ligação do HT, essa região, denominada função de ativação 2 (AF-2), passa a interagir-se com os co-ativadores, que permitirão a formação do complexo protéico envolvido na ativação da transcrição [11, 15].

Estudos recentes de cristalografia de raios X demonstraram que a estrutura tridimensional do LBD do TR é constituída por 12 α -hélices, numeradas de 1 a 12 (H1 a H12), e que o hormônio se aloja no interior do LBD, conforme mostrado na figura 3 [5, 16].

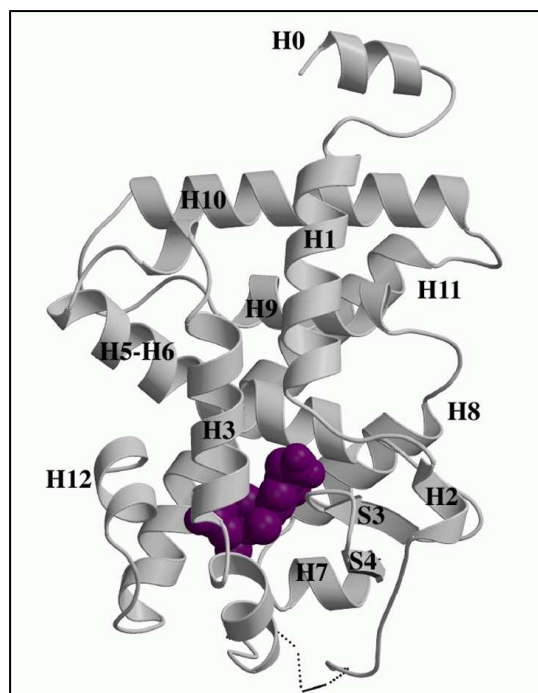


Figura 3: Representação esquemática da estrutura cristalográfica do LBD do TR β , mostrando as 12 α -hélices, e a localização do hormônio (em roxo) dentro do LBD. FONTE: Wagner e cols., 1995; Nature.

Existem dois subtipos de TRs, α e β , que são codificados por dois genes distintos, localizados nos cromossomos 17 e 3, respectivamente. As isoformas α_1 , β_1 , β_2 e β_3 , proteínas resultantes de processamento alternativo do RNA mensageiro (“*splicing*” alternativo) ou da utilização de promotores alternativos (figura 4), são capazes de se ligar aos HTs, e estão distribuídas de maneira heterogênea nos diversos tecidos-alvo [3, 8, 9, 17, 18]. Assim, o TR β_1 , por exemplo, é abundante no fígado, rins e cérebro, enquanto o TR α_1 é bastante expresso nos músculos esqueléticos e no miocárdio. Já a expressão do TR β_2 é observada, quase que exclusivamente, na hipófise anterior e em outras áreas do cérebro [8, 10]. Os HTs têm a mesma afinidade pelas isoformas do TR, e a expressão variada das isoformas de TRs pode constituir um mecanismo usado pelo T₃ para a regulação dos tecidos de forma seletiva [9].

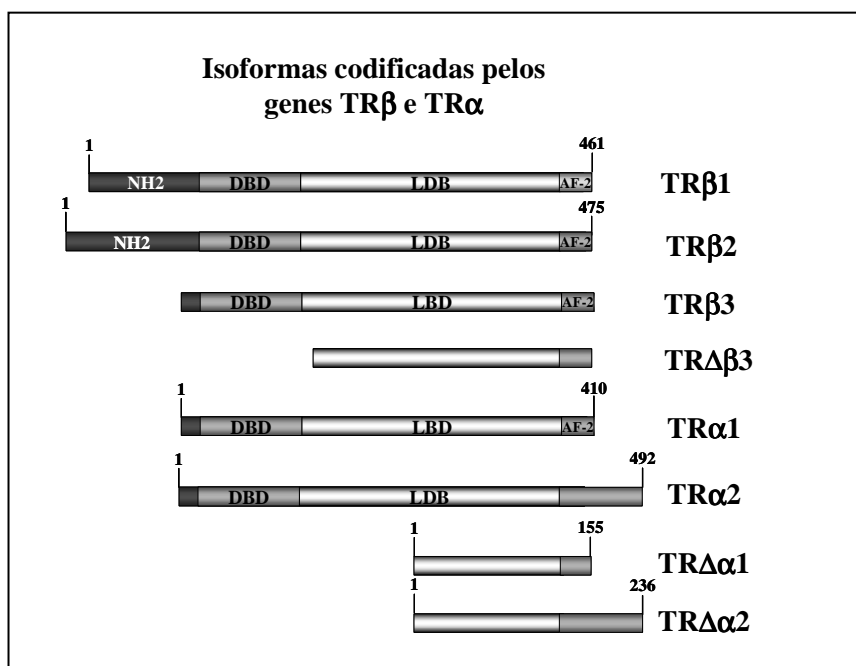


Figura 4: Estrutura primária das diferentes isoformas codificadas pelos genes do receptor do hormônio tireoidiano. As isoformas TR β 1, TR β 2, TR β 3 e TR $\Delta\beta$ 3 são codificadas pelo gene THRB através da utilização de promotores alternativos. O gene THRA, por *splicing* alternativo e também pela utilização de promotores alternativos, produz as proteínas TR α 1, TR α 2, TR $\Delta\alpha$ 1 e TR $\Delta\alpha$ 2. FONTE: Barra e cols., 2004; Arq Bras Endocrinol Metab.

As funções dos TRs são primariamente controladas pela presença do ligante. Na ausência do HT, os TRs ligam-se ao DNA na forma de monômeros, homodímeros ou, menos freqüentemente, formando heterodímeros com o receptor do retinóide X (RXR). Nessas condições, os TRs recrutam proteínas co-repressoras como N-CoR e SMRT que, por sua vez, fazem parte de um grande complexo, que mantém a cromatina compactada e reprime a transcrição gênica. A ligação do HT induz alterações conformacionais no TR, com formação preferencial de heterodímeros com o RXR e dissociação dos co-repressores, com subsequente recrutamento de co-ativadores, como SRC-1 e o complexo TRAP/DRIP. A partir daí, as histonas são acetiladas, relaxando a cromatina, o que facilita o acesso de outros fatores de transcrição e estimula o processo transcricional pela RNA polimerase, que irá resultar nos efeitos biológicos do hormônio (figura 5) [18-22].

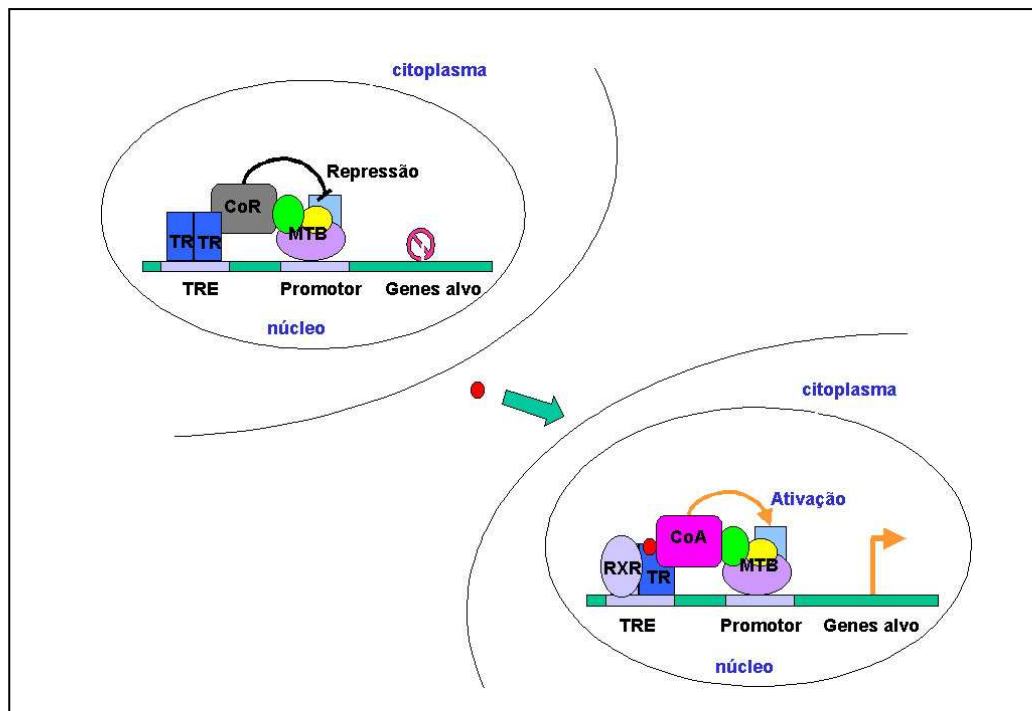


Figura 5: Ilustração do mecanismo de ação do hormônio tireoidiano. Na ausência de T_3 , o TR se encontra ligado ao TRE como homodímero, associado a proteínas co-repressoras (CoR), que atuam inibindo a maquinaria de transcrição basal (MTB). A ligação do T_3 ao TR (círculo vermelho) induz uma mudança conformacional que conduz a dissociação dos homodímeros (TR/TR) e associação de heterodímeros (TR/RXR), liberação dos co-repressores e associação com proteínas co-ativadoras (CoA), que agem sobre a MTB, ativando a transcrição de genes alvo. FONTE: Barra e cols., 2004; Arq Bras Endocrinol Metab.

Alguns efeitos dos HTs ocorrem em frações de segundos, e não são inibidos pela adição de ciclohexamida, substância que bloqueia a síntese protéica, sugerindo que essas ações do T_3 e o T_4 não são mediadas pela regulação da transcrição gênica. De fato, o HT exerce ação na membrana plasmática e no citosol, independente da ligação ao TR, que envolve interação com segundos mensageiros, canais iônicos e fosforilação oxidativa. Os HTs ativam cinases e calmodulina, estimulam a captação de glicose em diversos tecidos e modulam o transporte intracelular do cálcio, através dessa ação não-genômica. Entretanto, a importância fisiológica desses achados ainda não é totalmente conhecida, e o impacto desses efeitos para o organismo é reconhecidamente menos importante que as ações mediadas pelos TRs [23-25].

1.2. Síndrome de Resistência ao Hormônio Tireoidiano

O conceito de resistência hormonal foi introduzido por Fuller Albright e cols., em 1937, com a primeira descrição de pseudo-hipoparatiroidismo. A partir de então, as pesquisas direcionadas às diversas etapas envolvidas na mediação da ação hormonal culminaram com a identificação dos receptores hormonais [26].

Diante de quadros de aparente redução na efetividade da ação hormonal, vários mecanismos fisiopatológicos podem ser cogitados para justificar a incapacidade da ação do hormônio, entre eles: a) o hormônio seria biologicamente inativo, devido a anormalidades estruturais da molécula; b) o hormônio poderia interagir com outra substância, por exemplo, uma proteína carreadora, cuja alteração qualitativa e/ou quantitativa reduziria o acesso do hormônio ao tecido; c) haveria uma redução da disponibilidade do hormônio ao tecido, devido a um defeito na membrana celular; d) ocorreria um defeito na transformação química do hormônio da forma inativa para a forma ativa; e) haveria um defeito no receptor através do qual a ação hormonal é mediada; f) haveria um defeito na propagação do sinal pós-receptor [26].

A Síndrome de Resistência ao Hormônio Tireoidiano (SRHT) caracteriza-se por uma reduzida responsividade dos tecidos-alvos aos hormônios tireoidianos [26]. O primeiro relato data de 1967, quando Refetoff descreveu dois irmãos, filhos de pais consangüíneos, que apresentavam quadro de surdo-mudez, idade óssea atrasada e bócio, com níveis elevados de T_4 circulante [27]. Vinte e um anos depois, Usala e cols. demonstraram, pela primeira vez, a associação entre o locus do $TR\beta$, no cromossomo 3, e o fenótipo de SRHT [28].

Diversos mecanismos fisiopatológicos podem estar envolvidos na SRHT, incluindo defeitos no transporte intracelular, no metabolismo ou na ação dos HTs. No entanto, a partir da descrição de mutações localizadas no gene do TR, têm-se denominado de SRHT os casos nos quais a ação dos HTs é defeituosa devido à alteração genética no receptor [19].

O termo “Insensibilidade aos HTs” tem sido proposto mais recentemente para, de uma maneira mais ampla, englobar todos os defeitos que possam interferir com a atividade biológica do HT [29], inclusive os recém-descobertos

defeitos genéticos que promovem alterações no transporte transmembrana [30, 31] e no metabolismo dos HTs pelas desidases [32].

1.2.1. Síndrome de Resistência ao Hormônio Tireoidiano Associada a Defeitos no TR

A SRHT é uma condição bastante rara. Desde os primeiros relatos de mutações envolvendo o gene do TR, da década de 1980 [33], até os dias atuais, foram descritos cerca de 1000 casos na literatura [34]. O padrão de herança é autossômico dominante, e todas as mutações descritas ocorrem no TR β 1, e afetam o LBD ou a região de dobradiça. A exceção é o primeiro caso relatado, que tinha padrão de herança autossômica recessiva [27].

Há descrições de substituições, deleções, inserções e duplicações de nucleotídeos, alterando a estrutura do gene [22, 35]. Substituições de apenas um nucleotídeo, resultando na troca de um aminoácido, são a alteração mais comum, descrita em 325 das 343 famílias portadoras de mutação no TR conhecidas. Em outras quatro famílias, a substituição de um nucleotídeo resultou em um códon de parada e, nas famílias restantes, deleções ou inserções de nucleotídeos ocasionaram a formação de proteínas truncadas [29].

Considerando-se que existem, até o momento, 125 mutações conhecidas, algumas famílias compartilham a mesma mutação, e existe comprovação de que as mutações surgiram independentemente [29, 36]. A mutação R338W foi identificada em 29 famílias não-relacionadas, e é a mais freqüente [29]. Em 2007, Sato e cols. descreveram uma nova mutação, G347A, numa paciente que apresentava tireoidite crônica associada ao quadro de SRHT [37]. As mutações M310L [38], A317T, R438H, P453T e 463X (c.1358dupC) [39] foram identificadas no Brasil.

A maioria das mutações está localizada na porção carboxi-terminal do receptor, entre os éxons 9 e 10 do gene do TR β , no domínio de ligação ao hormônio (LBD). Essas regiões são consideradas “regiões quentes” (ou “hotspots”) para mutações (figura 6) [22, 35, 39].

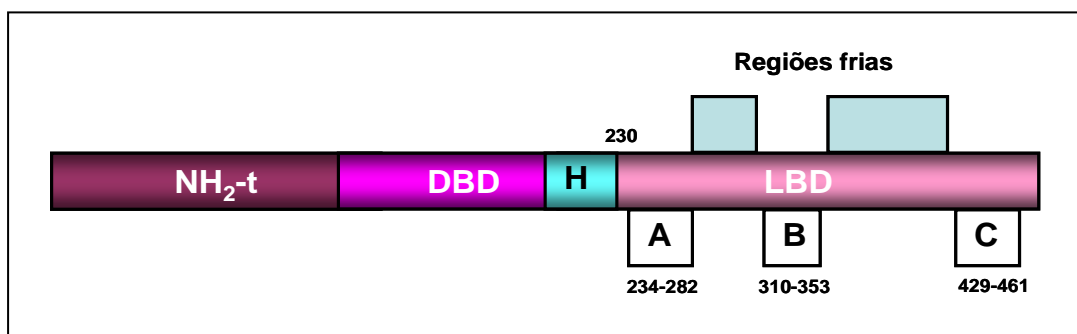


Figura 6: Localização das mutações no gene do TR β associadas com a SRHT. As mutações encontradas no TR β ocorrem agrupadas em três áreas do domínio de ligação ao T₃. As posições dos aminoácidos, onde as mutações foram encontradas, estão indicadas nos quadrados (A, B, C). A região fria de 28 e 75 aminoácidos não contém mutações que causam SRHT. FONTE: Adaptado de Carvalho e cols., 2004; Arq Bras Endocrinol Metab.

Na presença de mutações no gene do TR, a base molecular para o distúrbio seria que o defeito estrutural do receptor resultaria em prejuízo da ligação do HT e/ou em alteração na interação com os co-reguladores. A severidade da resistência é variável, na dependência do impacto da alteração no receptor sobre essas funções [40, 41].

A geração de modelos animais reproduzindo as mutações identificadas em seres humanos [42, 43], aliada aos estudos *in vitro* e em culturas de células, tem sido de valor inestimável para a compreensão da fisiologia tireoidiana, e para a elucidação da fisiopatologia da SRHT [29]. Foi demonstrado que os TRs mutantes interferem com a função dos TRs normais, ocasionando o chamado efeito dominante negativo. Os receptores mutantes, embora apresentem defeito na regulação da atividade transcricional, preservam a capacidade de se ligar ao TRE e de formar homo e heterodímeros. Sendo assim, o TR mutante irá competir e bloquear a ligação do TR normal, o que resulta em ação periférica defeituosa dos HTs [44]. Esse efeito dominante negativo pode explicar a resistência à ação do hormônio, bem como o padrão de herança dominante da SRHT. De fato, indivíduos heterozigotos com deleção do TR β não manifestam o fenótipo de SRHT, ou seja, a ausência de um alelo não interfere com a função do alelo normal (figura 7) [21, 22, 45].

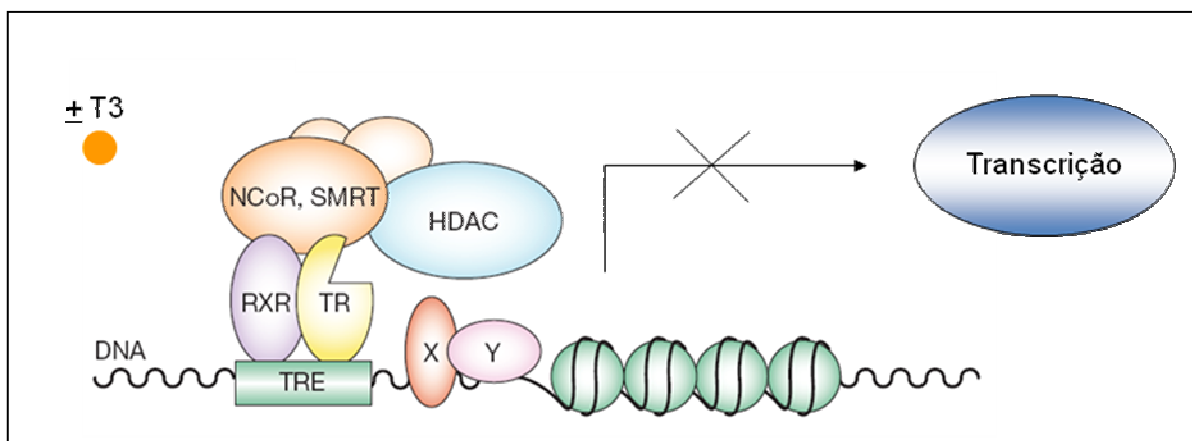


Figura 7: Ilustração do efeito dominante negativo exercido pelo TR mutado sobre o TR normal. Vide texto. HDAC: histona-deacetilase. FONTE: O autor, 2008.

Nos pacientes portadores de SRHT por mutações no gene do TR β , os sinais, sintomas e anormalidades laboratoriais advêm da resposta reduzida ao HT pelos tecidos periféricos, hipófise e hipotálamo, resultando em uma retroalimentação negativa anormal do T₃ sobre o TSH e o TRH (figura 8) [46].

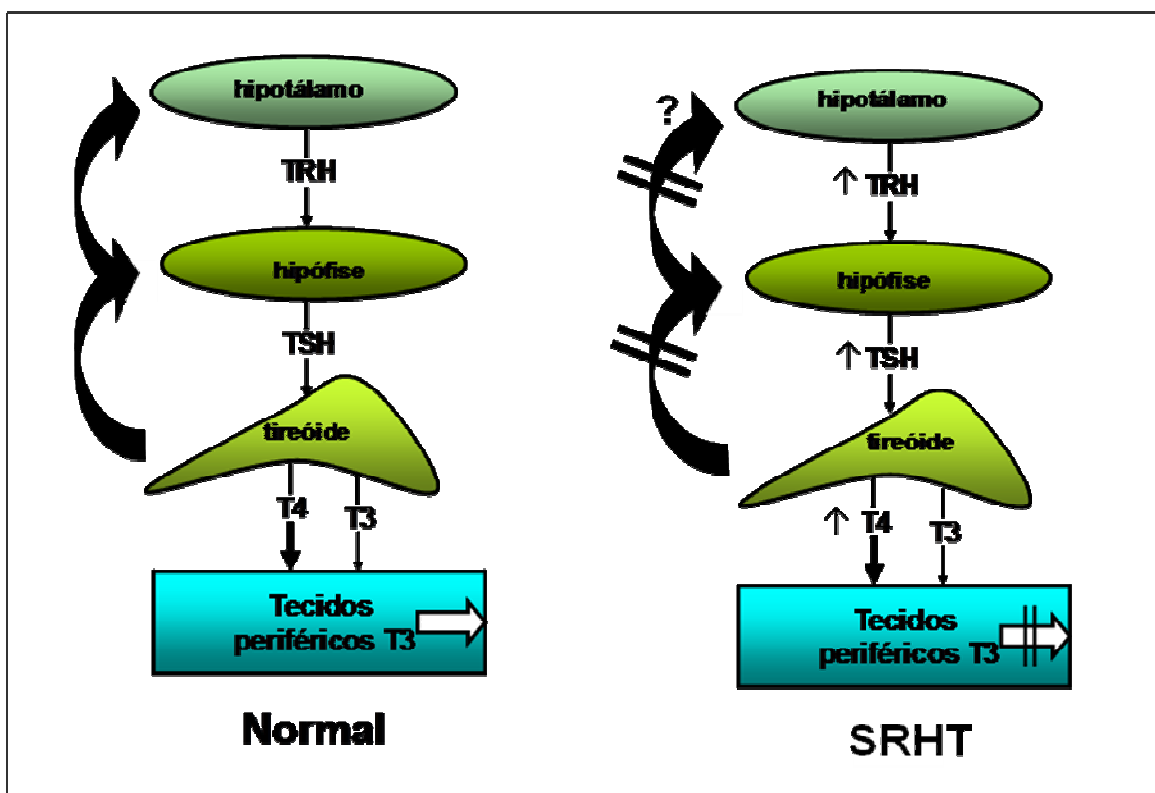


Figura 8: Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. Em condições normais, o hipotálamo secreta TRH, o qual estimula a hipófise a produzir TSH que, por sua vez, estimula a tireóide a produzir, principalmente, T₄. O T₄ é metabolizado, nos tecidos periféricos, em T₃. O HT exerce retroalimentação negativa sobre o hipotálamo e a hipófise. Na SRHT, o mecanismo inibitório está prejudicado, devido à sensibilidade reduzida da hipófise ao HT, resultando em níveis séricos de TSH elevados, com secreção aumentada de T₄. Os tecidos periféricos também apresentam sensibilidade reduzida ao HT na SRHT. FONTE: Adaptado de Carvalho e cols., 2004; Arq Bras Endocrinol Metab.

Uma característica da SRHT é a ausência de manifestações clínicas específicas. Os sintomas, quando presentes, variam muito de um paciente para outro [47]. Os achados mais comuns são bócio, comportamento hiperativo, dificuldade de aprendizado, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e taquicardia sinusal. A presença de bócio é a manifestação mais freqüente, e até 75% dos pacientes apresentam taquicardia. Nessas circunstâncias, não é incomum o diagnóstico errôneo de hipertireoidismo de etiologia auto-imune [29]. A tabela 1 mostra a freqüência dos principais sinais e sintomas observados na SRHT.

Manifestação Clínica	Freqüência (%)
Bócio	66-95
Taquicardia	33-75
Distúrbios emocionais	60
Comportamento hipercinético	33-68
Déficit de atenção e hiperatividade	40-60
Dificuldade de aprendizagem	30
Retardo mental (QI < 70)	4-16
Perda auditiva neurossensorial	10-22
Baixa estatura	18-25
Idade óssea atrasada > 2DP	29-47
Índice de massa corporal diminuído	33
Infecções recorrentes de ouvido e orofaringe	55

Tabela 1: Principais sintomas relacionados à SRHT, com sua freqüência representada em percentual. QI: quociente intelectual; DP: desvio-padrão. FONTE: Adaptado de Refetoff e cols., 2007; Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.

Na maioria dos pacientes que não foram previamente tratados, a resistência aos hormônios tireoidianos nos tecidos periféricos é compensada pela elevação dos níveis séricos de T₃ e T₄ livres, mantendo-se um estado de eumetabolismo. Assim, a maioria dos indivíduos são assintomáticos. O grau dessa compensação, entretanto, é variável entre os indivíduos, bem como entre os diferentes tecidos, e evidências clínicas e laboratoriais de deficiência e de excesso de HTs podem coexistir. Por exemplo, um paciente com SRHT pode apresentar retardo do crescimento, idade óssea atrasada e dificuldade de aprendizado (sugerindo hipotireoidismo), associados a hiperatividade e taquicardia (sugerindo hipertireoidismo). A taquicardia ocorre devido à hiperestimulação do TR α , que predomina no tecido cardíaco [18, 19, 30, 48-50]. Sintomas francos de hipotireoidismo podem surgir em pacientes que tenham sido submetidos a tratamento prévio para controle dos níveis circulantes elevados de HTs [29].

Tradicionalmente, a SRHT vem sendo subdividida em dois tipos principais: Resistência Generalizada ao Hormônio Tireoidiano (RGHT) e Resistência Hipofisária ao Hormônio Tireoidiano (RHHT). Os pacientes que apresentam quadro de eumetabolismo, com TSH próximo do normal, são

classificados como portadores de RGHT, ou seja, o defeito é compensado pelos elevados níveis de HTs [33]. Já um pequeno número de indivíduos que apresentam sinais de hipermetabolismo, como taquicardia e agitação, são definidos como portadores de RHHT [51]. Entretanto, em alguns casos, indivíduos com a mesma mutação e, às vezes, pertencendo à mesma família, foram classificados como tendo RGHT e RHHT. Posteriormente, estudos clínicos demonstraram que a resposta dos marcadores periféricos à ação do HT estava igualmente atenuada nos dois grupos. Ainda não foi descrito um modelo molecular para explicar estas duas síndromes [26, 35], e diversos autores concluíram tratar-se de partes do espectro de uma mesma doença. Sendo assim, recomenda-se que a distinção entre RGHT e RHHT seja abolida [33, 51, 52].

No paciente não-tratado, níveis séricos elevados do T_4 livre e TSH não-suprimido são condições *sine qua non* para o diagnóstico de SRHT. O T_3 também se eleva, mantendo uma proporção $T_3:T_4$ normal, diferentemente do observado na tireotoxicose auto-imune, na qual ocorre aumento desproporcional do T_3 em relação ao T_4 . Os níveis de TSH estão geralmente normais ou levemente aumentados, no entanto a bioatividade é relativamente alta. Isso explica o desenvolvimento de bócio, mesmo sem elevações consideráveis do TSH sérico [29, 53]. Os anticorpos anti-tireoidianos, anti-tireoperoxidase e anti-tireoglobulina, são negativos, exceto nas raras ocasiões em que coexiste uma tireoidite auto-imune [29, 46].

Na ausência de doenças concomitantes, uso de drogas ou alterações nas globulinas transportadoras de HTs, o principal diagnóstico diferencial é o adenoma hipofisário produtor de TSH (figura 9), que pode ser descartado pela dosagem de subunidade alfa sérica e por exame de imagem hipofisária. Na SRHT, os níveis de subunidade alfa circulantes são normais, e a Ressonância Nuclear Magnética mostra a Sela Túrcica de aspecto normal, enquanto nos adenomas secretores de TSH, a subunidade alfa encontra-se elevada e o tumor hipofisário normalmente é visualizado no exame de imagem. E ainda, na SRHT, a resposta do TSH ao TRH é normal ou exagerada, ao contrário do que ocorre no adenoma secretor de TSH [26]. O diagnóstico definitivo é estabelecido pela

demonstração de mutação no gene do TR β , que ocorre em aproximadamente 85% dos casos [29, 43].

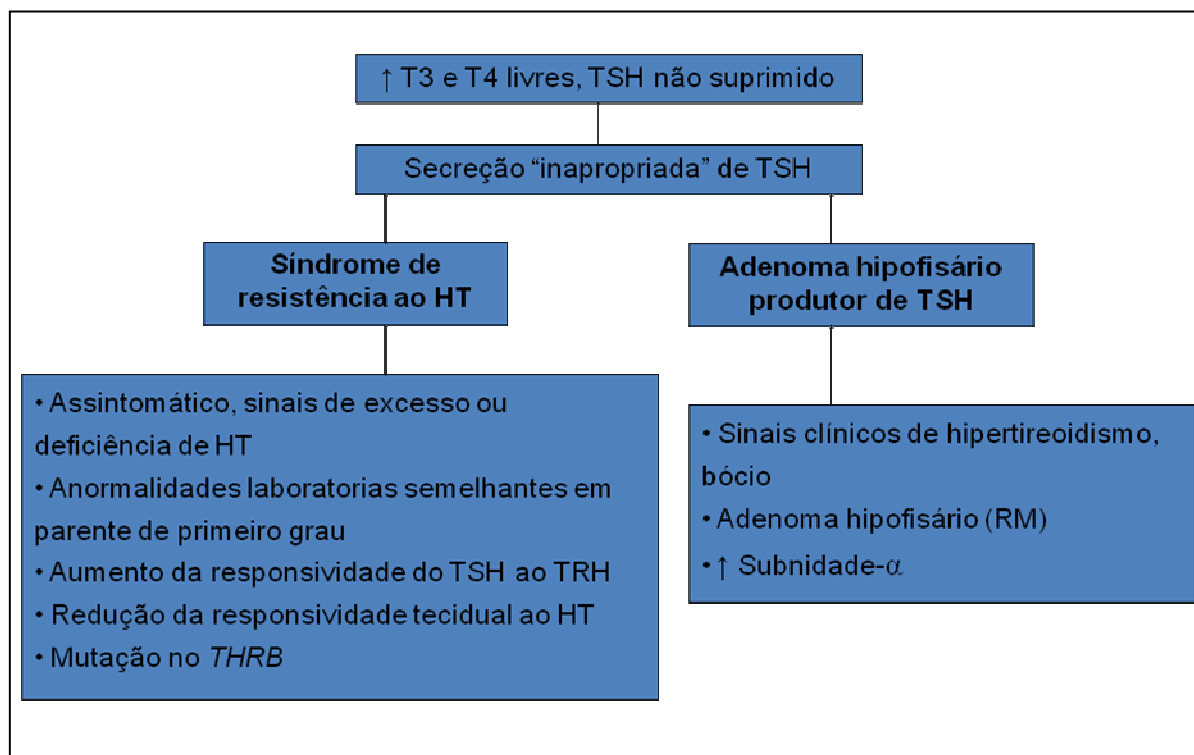


Figura 9: Principal diagnóstico diferencial da SRHT. FONTE: O autor, 2008.

Nos casos em que não se evidencia qualquer mutação, a resistência tecidual pode ser demonstrada através da administração, a cada três dias, de doses crescentes de T₃ (50, 100 e 200 µg), com dosagens concomitantes de T₃ e T₄ livres, TSH após estímulo com TRH, colesterol, creatina-fosfoquinase (CK), ferritina e globulina ligadora de esteróides sexuais (SHBG). Atenuação do estímulo à SHBG e ferritina, e inibição da supressão do TSH, colesterol e CK, são compatíveis com SRHT [29].

Até o momento, inexistente tratamento capaz de corrigir especificamente o defeito e, como a maior parte dos pacientes são assintomáticos, uma vez que a resistência tecidual ao HT é compensada pela elevação dos níveis circulantes dos hormônios, em geral, nenhum tratamento é necessário. A taquicardia pode ser controlada com o uso de agentes beta-bloqueadores, como o atenolol. É

importante ressaltar que nenhuma intervenção deve ser realizada com o único objetivo de normalizar os níveis séricos de HTs [29, 54].

Nos pacientes previamente tratados erroneamente com radioiodo, pode não haver elevação compensatória dos HTs suficiente para a manutenção do eumetabolismo, e a administração cautelosa de doses supra-fisiológicas de levotiroxina pode ser necessária. Em crianças, atenção especial deve ser voltada para o crescimento, maturação óssea e desenvolvimento neurológico, e, em alguns casos, a administração de levotiroxina pode ser feita em doses crescentes, com avaliações periódicas da taxa de metabolismo basal, balanço nitrogenado, dosagem sérica de SHBG, idade óssea e velocidade de crescimento, para ajuste de dose da medicação [29, 55].

Casos raros de crescimento e desenvolvimento atrasados, associados a hipermetabolismo e taquicardia severa não-responsiva a beta-bloqueadores, foram descritos em pacientes portadores de mutações do tipo “*frameshift*”, onde existe mudança no padrão de leitura, com uma extensa seqüência carboxi-terminal “*nonsense*”, produzindo uma molécula de TR β truncada [40]. Nessas circunstâncias, a redução temporária dos níveis circulantes de HTs com o uso de análogos da somatostatina pode ser necessária e, se ineficaz, a administração judiciosa de drogas anti-tireoidianas ou do ácido triiodotiroacético (TRIAC) pode ser tentada [29].

Um estudo publicado em 2004 mostrou uma taxa de abortamentos aumentada em mulheres portadoras de SRHT [56], no entanto intervenções durante a gestação ainda são um tópico controverso. Dhingra e cols., numa publicação bastante recente, avaliaram a evolução da gestação de três mulheres assintomáticas, portadoras de mutações no gene THRB. As três pacientes desenvolveram bócio durante a gestação, e uma delas apresentou supressão dos níveis de TSH, necessitando intervenção medicamentosa. Todos os bebês nasceram saudáveis, e as dosagens hormonais tireoidianas foram normais com uma semana de vida [57]. O diagnóstico pré-natal é importante para o manejo adequado da mãe e do feto durante a gestação, prevenindo-se a instituição de tratamentos desnecessários, e o aconselhamento familiar deve ser encorajado, especialmente em famílias cujos

membros afetados apresentam evidências de retardo do crescimento e do desenvolvimento [29].

1.2.2. Insensibilidade ao Hormônio Tireoidiano

A maioria dos pacientes portadores da SRHT apresenta alterações no gene do TR β , que são as responsáveis pela reduzida responsividade dos órgãos-alvo aos HTs. No entanto, as descrições de pacientes que apresentam o fenótipo da síndrome, porém sem mutações no TR, têm mostrado que a expressão dos efeitos dos HTs requer, não apenas que a estrutura do receptor esteja íntegra, mas também que as quantidades de T₃ disponíveis no meio intracelular sejam adequadas, e que toda a maquinaria celular funcione de forma integrada e perfeita, para resultar no efeito hormonal [29].

O termo “SRHT não-TR” tem sido utilizado para as situações onde o fenótipo é de SRHT, porém a presença de mutações no gene do TR β foi excluída por seqüenciamento genético. Isso ocorre em aproximadamente 15% das famílias e, em muitas delas, a possibilidade de mosaicismos nos TRs alfa e beta também foi excluída. A primeira descrição é de 1996 [58], e a expressão clínica e bioquímica é, em geral, indistinguível da SRHT causada por mutações no TR. Extensas investigações foram realizadas em algumas dessas famílias, em busca de alterações em genes que codificam co-reguladores, no entanto nenhuma mutação foi encontrada [29].

1.2.2.1. Mutações no Gene da Proteína Transmembrana MCT8

Entretanto, esse cenário se modificou a partir de 2004, quando duas publicações independentes correlacionaram mutações no gene da proteína transmembrana MCT8 e insensibilidade ao hormônio tireoidiano, em pacientes que apresentavam retardo mental associado a anormalidades motoras, num contexto clínico conhecido como Síndrome de Allan-Herndon-Dudley [30,31]. Nos três anos subseqüentes, foram identificadas outras 25 famílias portadoras de defeitos genéticos na proteína MCT8, sugerindo-se que a incidência da síndrome seja maior que a suspeitada inicialmente [29].

A herança é ligada ao cromossomo X, e as alterações dos níveis séricos de HTs observadas são elevação do T_3 e redução do rT_3 , com T_4 reduzido e TSH normal ou discretamente elevado. Os homens afetados apresentam fenótipo exuberante, com déficit cognitivo severo, enquanto as mulheres portadoras apresentam apenas discretas alterações nas dosagens hormonais tireoidianas [30,31].

O gene MCT8 pertence a uma família de genes cujos produtos catalisam o transporte transmembrana de monocarboxilatos, como lactato, piruvato e corpos cetônicos. Em 2003, Friesema e cols. demonstraram que o gene de ratos, homólogo ao MCT8 humano, é um transportador específico de HTs para o interior das células [59], e estudos posteriores mostraram que, na presença de mutações nessa proteína, ocorre redução significativa na entrada de T_4 e de T_3 nas células, principalmente do sistema nervoso central [29, 60]. Não foram observadas alterações nos níveis séricos e urinários de aminoácidos orgânicos, incluindo lactato, piruvato e carnitina, nos pacientes portadores da doença [29].

As descrições de mutações no gene MCT8 confirmaram que a SRHT pode ocorrer por outros defeitos genéticos além das mutações no gene do TR. Além disso, essas descrições constituíram prova definitiva de que o transporte transmembrana dos HTs ocorre, principalmente, com gasto energético, é mediado por proteínas transportadoras específicas, e corresponde a um mecanismo de regulação periférica da ação dos HTs [61].

1.2.2.2. Alterações no Metabolismo dos Hormônios Tireoidianos

Por outro lado, as alterações no metabolismo dos HTs podem, também, ser responsáveis por perturbações na homeostase tireoidiana e, até recentemente, todos os defeitos conhecidos resultavam de situações adquiridas. A Síndrome do Enfermo Eutireóideo, condição presente em, aproximadamente, 75% dos pacientes hospitalizados [62], é caracterizada por uma típica redução dos níveis circulantes de T_3 com elevação do rT_3 sérico, aliada a variáveis alterações nos níveis circulantes de TSH e de T_4 , de acordo com o tipo e a severidade da doença de base [63]. Questiona-se se essa síndrome corresponderia a uma resposta adaptativa ao estresse catabólico, ou se representaria uma entidade patológica com necessidade de reposição

hormonal tireoidiana. Vários ensaios controlados que utilizaram suplementação com HTs na Síndrome do Enfermo Eutireóideo não mostraram benefício dessa intervenção para os pacientes tratados [64].

As recentes descobertas de que, nos pacientes criticamente enfermos, a atividade da D3 está aumentada, e que a atividade da D2, ao contrário do que se acreditava anteriormente, também está estimulada, indicam que o catabolismo aumentado dos HTs exerce um papel importante no surgimento das alterações hormonais tireoidianas observadas na Síndrome do Enfermo Eutireóideo. A atividade da D1 está reduzida nessas circunstâncias [61, 65].

Em 2005, o espectro das alterações no metabolismo dos HTs foi ampliado, a partir da descoberta de mutações genéticas causando prejuízo na síntese das desidases [32]. Dumitrescu e cols. estudaram duas crianças, de famílias não-relacionadas, uma de origem árabe e a outra irlandesa, que procuraram atendimento médico devido a baixa estatura, com idade óssea atrasada. Os níveis séricos de TSH e de T_4 livre eram elevados, com T_3 livre reduzido e rT_3 alto, sem nenhuma outra alteração hormonal associada. Durante o seguimento, os dois pacientes apresentaram estirão de crescimento na fase puberal, com recuperação da estatura normal. A hipótese de que as alterações hormonais tireoidianas poderiam ser consequência de um defeito na conversão periférica de T_4 em T_3 foi reforçada após a observação de que, quando comparadas aos familiares normais, as crianças afetadas necessitaram da administração de doses maiores de T_4 , mas não de T_3 , para suprimir o TSH [32].

A atividade enzimática da desidase tipo 2, medida em culturas de fibroblastos obtidos da pele dos pacientes, mostrou-se reduzida, em comparação com a de indivíduos controles saudáveis. Entretanto, a expressão do RNA mensageiro da D2 não foi diferente da observada nos indivíduos normais, sugerindo que a atividade reduzida da desidase seria consequência de um defeito pós-transcricional. A avaliação genética mostrou uma mutação pontual (*missense*), em homozigose (R540Q) em uma das famílias, e uma mutação em heterozigose composta na outra família, afetando o gene SECISBP2, que está envolvido na síntese das desidases. O padrão de herança observado é autossômico recessivo [32].

1.3. As Enzimas Desiodases

As necessidades de HTs no organismo variam de acordo com o tecido, o tipo celular e o período da vida e, para prover o suprimento hormonal intracelular adequado, as células regulam não apenas a entrada e saída de HTs, mas também sua síntese e metabolismo. Nesse sentido, uma fina regulação é exercida pelas enzimas desiodases, que ativam e inativam os HTs no seu próprio local de ação [29]. A via de ativação acontece pela desiodação, no anel externo (ou anel fenólico) da molécula do T_4 , que resulta na formação do T_3 , e é catalisada por duas desiodases, D1 e D2. Por outro lado, tanto o T_4 quanto o T_3 podem ser inativados, através da desiodação do anel interno (ou anel tirosil), pela enzima D3, formando rT_3 e T_2 , respectivamente (figura 10) [61, 66].

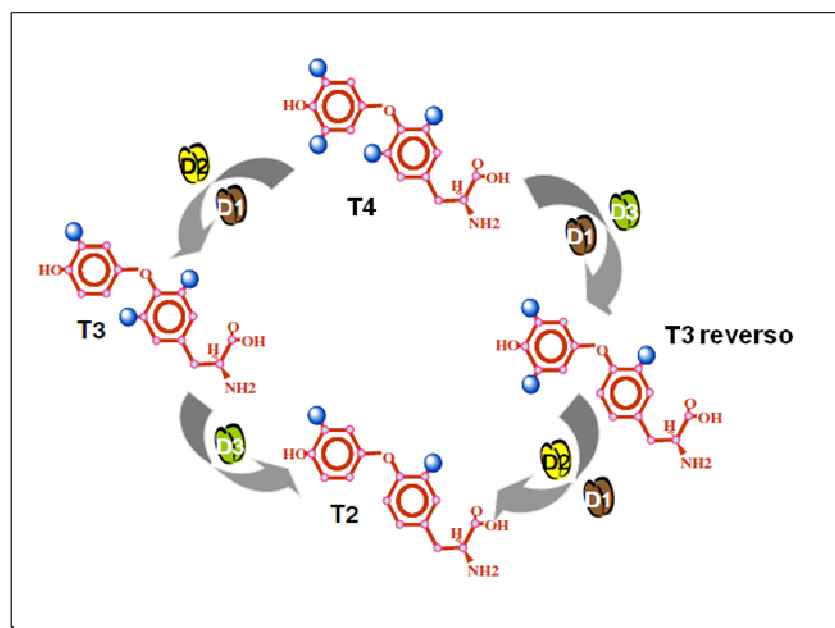


Figura 10: Representação esquemática do metabolismo das iodotironinas pelas desiodases. Fonte: Adaptado de Gereben e cols., 2008; Endocr Rev.

As três moléculas de desiodases são proteínas integrais de membrana, diméricas, de 29 a 33 kDa, que possuem alta similaridade entre si, e compartilham uma estrutura geral comum, composta de um segmento transmembrana único presente na porção amino-terminal, e várias alfa hélices e fitas beta, pregueadas, que formam as estruturas secundárias dos domínios globulares. Interessantemente, no sítio ativo das enzimas, existe o raro

aminoácido selenocisteína (Sec), que é crítico para a reação de desiodação catalisada pelas três desiodases [65, 67, 68]. Assim, as desiodases, ou selenodesiodases, fazem parte do grupo das selenoproteínas, que possuem em comum a característica de apresentar selenocisteína compondo a molécula (figura 11).

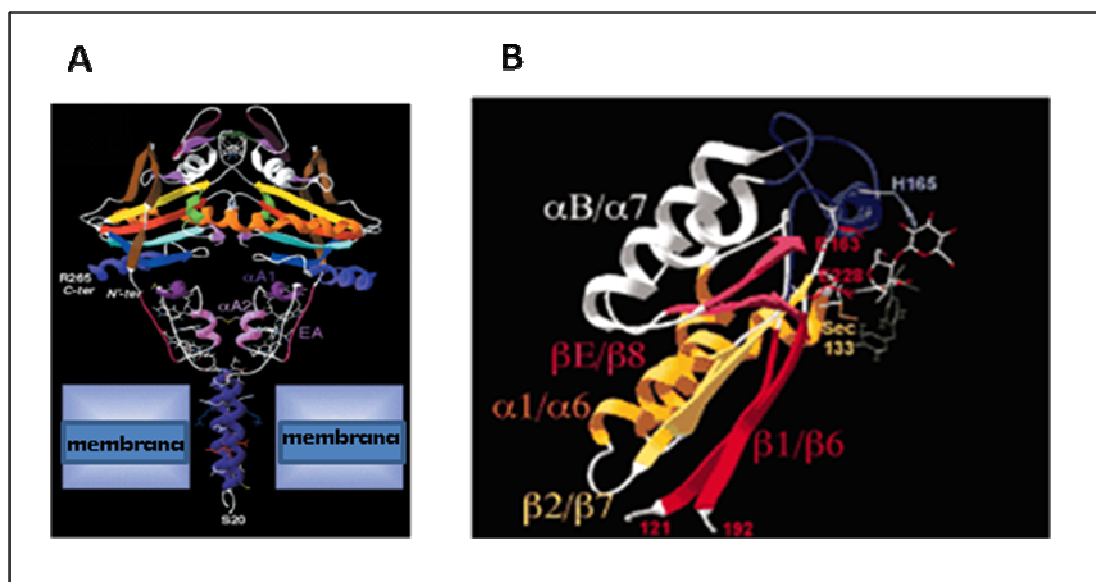


Figura 11: Modelo proposto para a estrutura tridimensional da D2, com suas diversas alfa hélices e fitas beta. A: As desiodases são proteínas de membrana, que se dispõem na forma de homodímeros. B: O sítio catalítico da enzima, localizado na porção carboxi-terminal, é um “bolso” que contém a selenocisteína. FONTE: Adaptado de Callebaut e cols., 2003; J Biol Chem.

As desiodases são expressas de maneira heterogênea nos diversos tecidos do organismo, e sua síntese é regulada em nível de transcrição, de tradução e de metabolização, pelas alterações no ambiente intracelular. Sabe-se que, nos estados de hipertireoidismo, a D1 exerce um papel importante na elevação dos níveis circulantes de T_3 , e que essa desiodase é inibida por drogas como o propiltiouracil e a amiodarona [65].

A D2 é a principal desiodase, está expressa de maneira mais universal e possui afinidade três vezes maior pelo T_4 que a D1. A meia-vida da D2 é bastante curta, por isso sua atividade pode variar muito rapidamente. Na vigência de hipotireoidismo, a expressão e a atividade da D2 são aumentadas, o oposto ocorrendo no hipertireoidismo, o que denota um papel importante dessa enzima na homeostase dos hormônios tireoidianos. Adicionalmente, a

D2 exerce um papel crítico na ativação dos HTs no hipotálamo e na hipófise, participando do controle da alça de retroalimentação negativa tireoidiana [65].

A D3 é, normalmente, expressa no sistema nervoso central e na placenta, e inativa o T_4 e o T_3 , convertendo-os, respectivamente, em rT_3 e T_2 , ambas as moléculas desprovidas de atividade biológica TR-mediada conhecida. Os efeitos combinados da D2 e da D3 compõem um elegante mecanismo pelo qual alterações recíprocas em suas atividades permitem adaptação às disponibilidades de iodo no ambiente interno do organismo [61].

A localização subcelular das desidases tem importância, já que o suprimento de HTs provém do plasma, no entanto os efeitos hormonais ocorrem no núcleo das células. A D1 e a D3 estão localizadas na membrana plasmática, enquanto a D2 se localiza no retículo endoplasmático. A presença da D1 na membrana plasmática explica o fato de que o T_3 gerado no fígado e no rim via D1, rapidamente se equilibra com o T_3 plasmático, e contribui pobremente para a ocupação dos TRs nesses tecidos. O T_3 gerado pela D2, dentro do citosol, tem maior potencial de acesso ao TR, pela própria proximidade do retículo endoplasmático com o núcleo celular [61].

As desidases exercem um papel importante em diversos sistemas celulares dos vertebrados, tanto durante o período embrionário quanto na vida adulta. Notadamente, na vida adulta, as desidases tipo 2 e tipo 3 participam da regulação da homeostase energética [61]. Já durante o desenvolvimento do organismo, a atividade dessas enzimas influencia a regulação da proliferação de condrócitos e a formação óssea, e é necessária para o desenvolvimento adequado da audição. Em roedores com deleção do gene da D2, as concentrações de T_3 no cérebro são bem inferiores às observadas nos controles selvagens, e o fenótipo é de deficiência auditiva aliada a dificuldades na execução de tarefas de agilidade [69].

No hipotireoidismo congênito, situação onde a insuficiência de T_3 para os tecidos periféricos provém de um defeito na síntese hormonal tireoidiana, a expressão fenotípica pode ser bem mais grave. É possível que, na deficiência de D2, mecanismos compensatórios contribuam para os achados mais brandos, observados no modelo animal [61].

Diversos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) nos genes das desidases já foram descritos em humanos, no entanto a relevância científica

desses achados ainda não foi estabelecida. O SNPs são mais comuns no gene da D2, e o melhor caracterizado é o Thr92Ala, comum em diversos grupos étnicos, em especial nos Índios Pima. Alguns SNPs foram, também, descritos nos genes da D1 e da D3. Inexistem, até o momento, relatos de mutações envolvendo os genes das desidases, em seres humanos [61].

1.3.1. Síntese das Desidases

A síntese das desidases é comum à de todas as selenoproteínas, e tem como característica a utilização do selênio. O selênio inorgânico, elemento mineral presente no solo e essencial para a vida, é absorvido pelas plantas, e convertido a formas orgânicas, principalmente os aminoácidos selenometionina e selenocisteína [70].

A selenometionina é o principal composto de selênio, presente em diversos cereais e em leguminosas, e serve como o grande precursor para a síntese de selenocisteína, nos animais. No homem, a principal fonte de selenometionina são os alimentos de origem animal, e os níveis teciduais de selênio são diretamente influenciados pelo padrão alimentar que, por sua vez, é definido pelas diferenças geográficas na disponibilidade de selênio no solo [70].

A selenocisteína (Sec), considerada o vigésimo primeiro aminoácido, é a forma biologicamente mais ativa do selênio, e é incorporada a proteínas específicas do organismo para formar as selenoproteínas, num processo evolutivamente conservado. Na maioria das circunstâncias, nos animais, o códon UGA é interpretado como um códon de parada. No entanto, esse códon também pode ser reconhecido pela molécula de RNA transportador da Sec (Sec-RNAt), que possui um anticódon complementar para UGA, que orienta a inserção de uma Sec, numa circunstância única, que não foi descrita para nenhuma outra espécie de RNAt [70]. É através desse sistema que o organismo controla a expressão de toda a família das selenoproteínas, inclusive das desidases [71].

Assim, a incorporação da Sec, durante a tradução, é feita através da leitura de um códon UGA [72]. Ao contrário dos outros aminoácidos, a Sec é sintetizada universalmente no seu próprio RNAt, utilizando-se a serina como

intermediária. Inicialmente, uma quinase conhecida como PSTK fosforila o seril-Sec-RNAt, para formar O-fosfo-seril-Sec-RNAt. A seguir, o antígeno hepático solúvel (proteína SLA) desfosforila o O-fosfo-seril-Sec-RNAt. Por fim, a proteína selenofosfato sintetase tipo 2 (SPS2) medeia a etapa final de geração do selênio ativo, para formação da selenocisteína. Interessantemente, para a síntese de Sec, é necessária a atuação da enzima SPS2, que corresponde, na realidade, a uma selenoproteína [61, 70].

O Sec-RNAt é necessário, porém não é suficiente para a inserção da Sec a partir do códon UGA. O determinante universal da leitura é o chamado elemento SECIS (seqüência de inserção da selenocisteína), que corresponde a uma estrutura secundária em forma de alça, localizada na região 3', não-codificadora, do RNA mensageiro, e em alguns casos bastante distante do códon UGA (figura 12) [70].

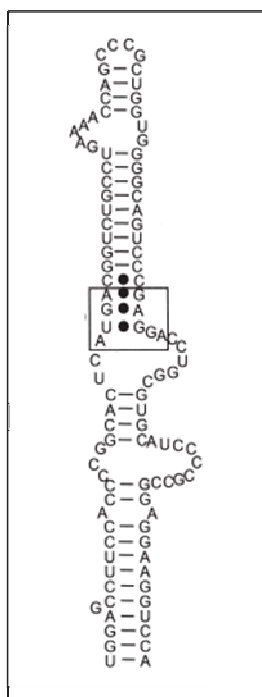


Figura 12: Representação esquemática de uma das formas de elemento SECIS, presente no RNAm de selenoproteínas humanas. Em destaque, o chamado “core”, região de ligação das proteínas SBP2 e L30. FONTE: Adaptado de Caban e cols., 2006; Cell Mol Life Sci.

Além do elemento SECIS, outro fator envolvido na incorporação da Sec é o recém-descoberto elemento de redefinição de selenocisteína (SRE), uma estrutura em forma de alça localizada no RNAm, presente em algumas, mas

não em todas as selenoproteínas, e que parece ser um modulador positivo da eficiência da inserção da Sec [73].

Além dos fatores presentes no RNAm, chamados de elementos atuantes “cis”, a codificação da Sec requer a ação cooperativa de diversas outras proteínas (fatores “trans”), e os mecanismos envolvidos nesse processo ainda são pouco compreendidos. A proteína ligadora do SECIS (SECISBP2) [74] e o fator de alongamento Sec-específico (EFSec) [75], aliados às recém-descobertas proteínas L30 [76], Secp43 e SLA [77] são os principais fatores “trans” envolvidos.

A proteína ligadora do elemento SECIS, conhecida como SECISBP2, ou simplesmente SBP2, é expressa de maneira ubiqüitária nos tecidos, e é codificada por diversos transcritos, alguns deles expressos somente nos testículos. Várias isoformas são formadas por processamento alternativo do RNAm (*splicing* alternativo), embora a contribuição de cada uma delas para a síntese das selenoproteínas ainda esteja em investigação [70].

Estruturalmente, a SBP2 possui um domínio de ligação ao RNA (RBD), uma região de localização de sinal (NLS) na porção amino-terminal, uma região NLS carboxi-terminal, dois sinais de exportação nuclear (NESs) na porção carboxi-terminal, um domínio funcional dispensável para a ligação à SECIS, porém necessário para a atividade de incorporação da Sec, e um domínio de interação ribossômica, cujo papel ainda não foi precisamente definido. A SBP2 é uma proteína grande, de 854 aminoácidos e, intrigantemente, os primeiros 400 aminoácidos da molécula não são necessários para a função de incorporação da Sec (figura 13) [70].

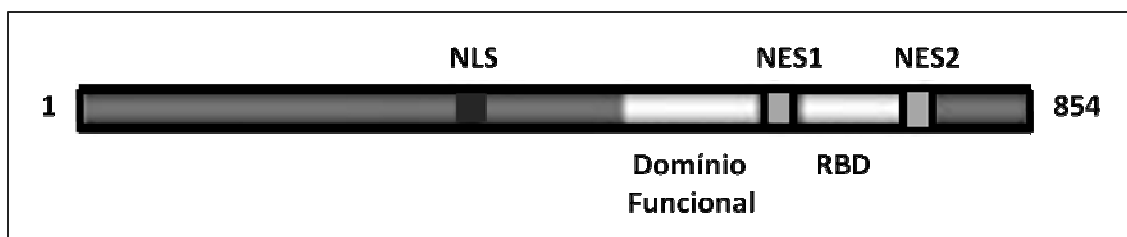


Figura 13: Representação esquemática da estrutura linear da proteína SBP2. NLS: região de localização de sinal; NES: sinal de exportação nuclear; RBD: domínio de ligação ao RNA. FONTE: Adaptado de Papp e cols., 2007; Antioxid Redox Signal.

Apesar da identificação de diversos componentes envolvidos, o mecanismo pelo qual os ribossomos promovem a incorporação de selenocisteína nos códons UGA permanece em investigação, e diversos modelos têm sido propostos para descrevê-lo. Postula-se que, para que o UGA codifique a inserção de uma selenocisteína, e não a terminação da tradução da cadeia peptídica, é necessário que a proteína SBP2 se ligue ao RNAm da selenoproteína, na seqüência SECIS, localizada na extremidade 3'. O complexo formado pela SBP2 ligada ao SECIS, por sua vez, interage com o EFSec, que se liga à selenocisteína localizada no RNAt específico (Sec-tRNA Sec), permitindo ao ribossomo a inserção desse aminoácido na seqüência polipeptídica, no códon UGA. Subseqüentemente, uma alteração conformacional no elemento SECIS promove o deslocamento da SBP2, e a ligação da proteína L30, ancorando o complexo SECIS ao ribossomo e potencializando a incorporação da selenocisteína [61].

A localização subcelular e as interações moleculares entre os diversos elementos descritos exercem influência sobre a síntese das selenoproteínas. A SBP2 possui diversas seqüências de localização nuclear, e as trocas da SBP2 com o EFSec, entre citoplasma e núcleo, podem ser moduladas pelo estado de oxidação celular. O papel da Secp43 ainda não está completamente esclarecido, no entanto, tem sido demonstrado que essa proteína é capaz de interagir diretamente, ou de facilitar a interação entre os vários componentes envolvidos, estimulando a incorporação de selenocisteína na molécula de selenoproteína (figura 14) [61].

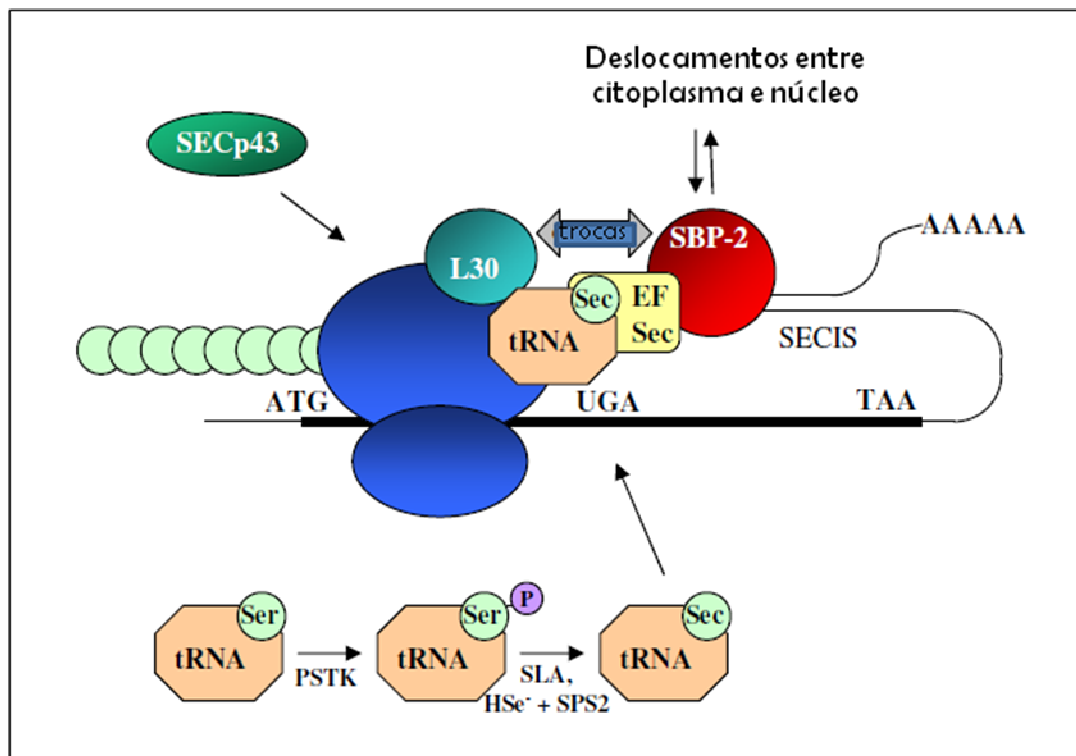


Figura 14: Representação esquemática da síntese de selenoproteínas. Vide texto. FONTE: Adaptado de Gereben e cols., 2008; Endocr Rev.

O papel da SBP2 na promoção da leitura do códon UGA é importante na definição de uma “hierarquia” na síntese de selenoproteínas, já que alguns elementos SECIS têm afinidade maior pela SBP2 que outros [78, 79]. Estudos em culturas de células têm demonstrado que uma maior afinidade pela SBP2 pode garantir a tradução de uma determinada selenoproteína, em detrimento das outras, em condições de baixa disponibilidade de SBP2 [79].

1.3.2. A Família das Selenoproteínas

Além das três desidases, existem pelo menos 22 outras selenoproteínas no organismo humano, sendo que a maioria delas ainda não possui função conhecida (tabela 2). As selenoproteínas são necessárias em diversos processos celulares, como a biossíntese de nucleotídeos para formação do DNA, a redução de proteínas oxidadas, a regulação da

sinalização redox, a espermatogênese, o transporte e a estocagem do selênio, além da metabolização dos HTs [70, 80].

Selenoproteína	Função
Glutationa-peroxidases (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4, GPx6), SelK, SelR, SelW	Enzimas anti-oxidantes
Tiorredoxina-redutases (TrxR1, TrxR2, TrxR3)	Sinalização redox
Desiodases (D1, D2, D3)	Metabolismo dos hormônios tireoidianos
SPS2	Síntese de selenocisteína
SelP	Transporte e estocagem de selênio
Sel15, SelM, SelN, SelS, SelH, Sell, SelO, SelT, SelV	Desconhecida

Tabela 2: As 25 selenoproteínas humanas estão listadas e agrupadas de acordo com sua principal função. Sel: selenoproteína. FONTE: Adaptado de Papp e cols., 2007; Antioxid Redox Signal.

Camundongos “*Knockout*” para o Sec-RNA_t apresentam morte intra-uterina, o que demonstra que a expressão das selenoproteínas é essencial para o desenvolvimento do organismo [81]. Pelo menos três selenoproteínas, as tiorredoxina-redutases tipo 1 e tipo 2, e a glutathione-peroxidase tipo 4, estão envolvidas na embriogênese, uma vez que deleções nos genes dessas proteínas, em camundongos, resultam em morte embrionária [82].

Além disso, num estudo recente, que avaliou o impacto da deleção do Sec-RNA_t sobre as células endoteliais e o miocárdio de camundongos, foi evidenciado que as selenoproteínas exercem um papel crucial no desenvolvimento e na funcionalidade dessas células [83].

As tiorredoxina-redutases (TrxR) compreendem um grupo de enzimas com papel importante na regulação redox celular. A TrxR1 é expressa no núcleo e citoplasma, a TrxR2 na mitocôndria e a TrxR3, nos testículos. Essas enzimas também estão envolvidas em diversas vias de sinalização celular, através do controle da atividade de fatores de transcrição, como NF- κ B, AP-1 e P53, bem como na regulação da proliferação celular [82].

As glutathiona-peroxidases (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 e GPx6) são conhecidas por catalisarem a redução do peróxido de hidrogênio e dos hidroperóxidos orgânicos, protegendo as células do estresse oxidativo. A GPx3 é uma proteína glicosilada secretada para os compartimentos extracelulares, possui eficaz atividade antioxidante no plasma, e tem sido amplamente utilizada como um marcador do status de selênio no organismo. A GPx4 está envolvida na maturação dos espermatozoides e na fertilidade masculina [70].

Em regiões do nordeste da China, onde as concentrações de selênio no solo são baixíssimas, foi descrita uma cardiomiopatia potencialmente fatal, conhecida como Doença de Keshan. A doença surge quando existe deficiência de selênio, aliada a infecção pelo vírus Coxsackie B, e pode ser prevenida pela suplementação com selênio. Uma cardiomiopatia semelhante à Doença de Keshan é observada em camundongos “*Knockout*” para a GPx1, infectados pelo vírus Coxsackie, sugerindo que a GPx1 está intimamente relacionada à proteção contra agentes virais [82, 84].

A selenoproteína P (SelP), diferentemente das demais selenoproteínas, é capaz de incorporar vários resíduos de selenocisteína em cada molécula da proteína. Em humanos, são dez resíduos por molécula protéica. A SelP é secretada para o plasma pelo fígado, na forma glicosilada, e contém, aproximadamente, 50% do selênio plasmático. O principal papel atribuído à SelP é o de transportar e de fornecer selênio para os diversos órgãos e tecidos periféricos [70]. Interessantemente, camundongos “*Knockout*” para a SelP não apresentam qualquer distúrbio do eixo tireoidiano, nem prejuízo na expressão das desidases. Esses dados sugerem que o eixo tireoidiano não utiliza essa selenoproteína como principal fonte de selênio [85].

Além disso, a SelP atua como quelante de metais pesados, prevenindo neurotoxicidade, tem ação protetora sobre as células endoteliais e astrócitos contra o dano oxidativo, e também inibe a oxidação das moléculas de colesterol de baixa densidade (LDL). Estudos sugerem, ainda, que a SelP, expressa localmente, exerce um papel protetor importante sobre o tecido cerebral, e que a deficiência dessa selenoproteína, no Sistema Nervoso Central, pode estar diretamente envolvida no desenvolvimento da Doença de Alzheimer e de outras patologias neurológicas [70].

A selenoproteína 15 (Sel15) foi uma das primeiras a serem descritas, no entanto sua função ainda não foi esclarecida. Já a selenoproteína N (SelN) é a única selenoproteína diretamente ligada a doenças e, ao contrário das demais, sua caracterização partiu do conhecimento de um fenótipo de perda de função. Em 2001, Moghadaszadeh e cols. identificaram a presença de mutações no gene da SelN, em pacientes portadores de um tipo de distrofia muscular congênita associada à Síndrome da Espinha Rígida [86]. Um ano depois, Ferreira e cols. encontraram mutações nesta mesma selenoproteína, em 12 famílias de pacientes portadores da Doença Multiminicore, que corresponde a uma miopatia periférica de início precoce, que cursa com hipotonia, fraqueza muscular, rigidez de coluna e insuficiência respiratória, e tem padrão de herança autossômico recessivo [87].

Coletivamente, essas doenças têm sido denominadas miopatias SEP- relacionadas, entretanto, a caracterização funcional da SelN ainda não foi obtida, e o mecanismo molecular relacionado ao surgimento das alterações fenotípicas permanece como objeto de estudo [70]. Num trabalho publicado em 2003, evidenciou-se que esta selenoproteína é expressa em diversos tecidos humanos, inclusive no músculo esquelético, e que a expressão tecidual no indivíduo adulto é proporcionalmente bem menor que a observada em tecidos fetais, sugerindo um papel da SelN no desenvolvimento precoce do organismo [88].

A selenoproteína SPS2 está envolvida na biossíntese da selenocisteína que, intrigantemente, é necessária para a sua própria síntese. Várias outras selenoproteínas, como a SelW, SelM, SelR, SelS e SelK possuem expressão tecidual parcialmente conhecida, porém as funções não estão completamente esclarecidas. E ainda, algumas selenoproteínas como a SelH, SelO, SelT, SelV, entre várias outras, não foram caracterizadas até os dias atuais [70].

O balanço redox é um processo regulatório essencial para diversas vias celulares. Entretanto, qualquer desequilíbrio na regulação redox intracelular leva a um estado de estresse oxidativo, durante o qual proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos e outras macromoléculas podem se acumular e causar dano severo. O estresse oxidativo parece ser um componente essencial no processo de envelhecimento, e tem sido implicado em diversas doenças. As selenoproteínas, por participarem da regulação redox, exercem um papel

crítico sobre as diversas funções celulares vitais, e são essenciais para a prevenção de doenças, principalmente as neoplasias malignas [70].

Com base nessas informações, diversos ensaios clínicos têm sido realizados, com o objetivo de investigar a eficácia do selênio como agente profilático para o câncer. O primeiro estudo duplo-cego foi o “Nutritional Prevention of Cancer”, que mostrou benefício da suplementação de selênio oral, na prevenção de câncer de pulmão, próstata, cólon e reto, embora a incidência de câncer de pele não-melanoma não tenha sido alterada pela intervenção [89]. Atualmente, diversos outros estudos estão em andamento, inclusive dois grandes estudos multicêntricos, e, num futuro próximo, os reais benefícios dessa abordagem deverão ser elucidados [90, 91].

Além da regulação através da síntese, as desidases são controladas por mecanismos pós-tradução. Ao todo, são 12 genes conhecidos, envolvidos na síntese e degradação das desidases. A D2 possui uma meia-vida de, aproximadamente, 40 minutos, que pode ser reduzida pela exposição a concentrações fisiológicas de T_4 . Essa regulação da atividade da D2 pelo substrato corresponde a uma alça regulatória potente e veloz, capaz de controlar, eficientemente, a síntese e as concentrações intracelulares de T_3 , de acordo com as disponibilidades de T_4 . A degradação das desidases no meio intracelular pode ocorrer através da conjugação às proteínas ubiquitinas, num processo denominado ubiquitinação. A enzima conjugada à ubiquitina pode, então, ser degradada no complexo proteossoma, ou ser deubiquitinada, voltando à forma não-conjugada [61].

A recente descrição de duas famílias portadoras de mutações no gene da proteína SBP2 [32] ilustra, claramente, que defeitos genéticos na síntese de selenoproteínas podem resultar em alterações na atividade das desidases, e provocar alterações no metabolismo dos HTs. No entanto, embora tenha sido observada uma reduzida atividade enzimática das desidases e da GPx, aliada a uma reduzida expressão de SeIP nos pacientes portadores das mutações, inesperadamente, o fenótipo observado foi praticamente normal. Uma vez que a SBP2 está envolvida na síntese de toda uma família de proteínas, o esperado seria uma expressão fenotípica exuberante, com inúmeras anormalidades. Essas observações sugerem que nem todas as selenoproteínas tiveram sua

síntese acentuadamente prejudicada pela presença da mutação. [29, 78, 79, 92].

Esses achados corroboram o conceito da existência de uma “hierarquia” na preservação das selenoproteínas, supostamente produzida pelas taxas de degradação e pelas demandas funcionais das selenoproteínas, em circunstâncias de deprivação de selênio [93, 94]. Dessa forma, selenoproteínas de meia-vida curta e de alta demanda de função, como a D2, devem ser as primeiras a falhar, na presença de algum defeito na maquinaria de incorporação da selenocisteína [29]. Além disso, a escassez de sintomatologia clínica pode se justificar pelo fato de os defeitos observados nos pacientes serem parciais. Essas interpretações, entretanto, ainda carecem de confirmação, uma vez que fenótipos mais severos relacionados a mutações no gene da SBP2 não foram descritos na literatura, até o momento.

2. OBJETIVOS

1. Realizar investigação genética para mutações no gene do TR β , numa paciente com suspeita clínica de SRHT.
2. Realizar investigação genética para mutações no gene SBP2, numa paciente com suspeita clínica de defeito nas desidases.
3. Investigar o padrão de transmissão das mutações possivelmente encontradas.
4. Investigar os efeitos *in vitro* da possível mutação no gene do TR β sobre a função hormonal.
5. Descartar a possibilidade de polimorfismos no gene SBP2.
6. Avaliar as repercussões da possível mutação no gene SBP2 sobre as diversas selenoproteínas.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1. Pacientes

Iniciamos a investigação genética e clínica da família da paciente portadora da mutação no gene do TR β , analisando os parentes de primeiro grau. Uma vez que a mãe da paciente era portadora da mutação, partimos para investigar os parentes de primeiro grau desta. A avó materna da paciente também é portadora da mutação, o que justificou a avaliação dos parentes de primeiro grau dela, para construção do heredograma. Os indivíduos envolvidos na pesquisa, portadores da mutação, foram submetidos a dosagens séricas de TSH, T₄ e T₃ livres.

Na investigação genética e clínica da família da paciente portadora da mutação em heterozigose composta, localizada no gene SBP2, também iniciamos pelos parentes de primeiro grau. Como encontramos uma mutação em cada um dos pais da paciente, partimos para a investigação dos parentes de primeiro grau de cada um deles, para elaboração do heredograma. Os indivíduos pertencentes a esta família, portadores de pelo menos uma das duas mutações, foram submetidos a dosagens séricas de TSH, T₄ e T₃ livres, T₃ reverso, selênio e glutathiona-peroxidase (GPx).

Todos os sujeitos participaram voluntariamente do estudo, e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

3.2. Voluntários sadios

Selecionamos 100 indivíduos sadios, residentes no Distrito Federal, que participaram como voluntários da pesquisa, para rastreamento das mutações, com o objetivo de se afastar a possibilidade de polimorfismos no gene SBP2. Outros 26 voluntários sadios, pertencentes à mesma comunidade onde vive a

paciente com suspeita clínica de defeito no metabolismo dos HTs, foram selecionados para realização de dosagem sérica de selênio.

Todos os indivíduos envolvidos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

3.3. Avaliação Clínica

As pacientes portadoras de mutações, bem como os indivíduos pertencentes às suas famílias, foram avaliadas clinicamente por médico endocrinologista, através de anamnese e exame físico geral e direcionado a patologias tireoidianas.

A paciente portadora da mutação no gene SBP2, além de realizar as dosagens hormonais referidas, foi submetida a avaliação neurológica, ortopédica, endocrinológica, genética, oftalmológica, respiratória e audiométrica.

Os indivíduos voluntários sadios foram avaliados sumariamente, através de anamnese e exame físico geral, para se descartar a possibilidade de patologias endócrinas.

3.4. Dosagens hormonais

As dosagens hormonais de TSH, T₄ e T₃ livres foram realizadas através do método de quimioluminescência, utilizando-se o Kit ADVIA CENTAUR (Equipamento Centaur, Siemens). Os valores de referência de normalidade para o método (VR) foram: TSH de 0,3 a 5,0 µUI/L; T₄ livre de 0,75 a 1,8 ng/dL; T₃ livre de 0,30 a 0,51 ng/dL. O T₃ reverso foi dosado por radioimunoensaio, através do kit ADALTIS, com VR de 8 a 40 ng/dL. A dosagem de selênio sérico foi feita pelo método de absorção atômica (forno de grafite), sendo que os valores de referência foram de 50 a 150 µg/L. A glutatona-peroxidase (GPx) foi dosada por método enzimático, VR de 27,5 a 73,5 U/g Hb.

3.5. *Investigação Genética*

As amostras de sangue obtidas por venopunção de todos os indivíduos envolvidos nos estudos genéticos foram colocadas em tubos contendo EDTA (BD Vacutainer System), e o DNA dos leucócitos periféricos foi obtido a partir do método de extração Chelex-100 [95].

Para investigação genética de mutação no gene do TR, foram amplificados os éxons 9 e 10 do TR β , através da técnica de PCR. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados foram os citados na tabela 3. Na reação de PCR, foram utilizados 5 μ l de DNA genômico, 0,2mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 50ng de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas Inc., Hanover, MD), tampão de reação e sulfato de magnésio fornecido e usado de acordo com o sugerido pelo fabricante, resultando em um volume final de 50 μ L. A amplificação foi realizada em um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc. Waltham, MA). As condições da reação foram: desnaturação a 94°C por 3 minutos, anelamento a 55°C por 30s e extensão a 72°C (30s), seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 60°C (30s) e extensão a 72°C (30s). Ao término do ciclo, uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Em seguida, os produtos da amplificação foram purificados por meio enzimático (sistema "EXO-SAP"). Num volume de 10 μ l do produto de PCR, foram acrescentados 1U de exonuclease I (Biolabs) e 1U de fosfatase alcalina de camarão (*shrimp alkaline phosphatase* - Promega). Em seguida, o produto foi incubado a 37°C por 30 min e depois a 80°C por 20 min.

Os exons amplificados foram analisados, por seqüenciamento direto, utilizando-se o seqüenciador automático ABI-377 (Perkin-Elmer Corp., Foster City, CA, EUA) com 50ng dos mesmos iniciadores utilizados na amplificação.

A análise, os alinhamentos e as comparações entre as seqüências foram realizados com o auxílio de softwares especializados: clustalw (Chenna, Sugawara *et al.*, 2003), pDRAW32 (AcaClone Software), chromas (Technelysium Pty LTD) e sequencher (Gene Codes corporation).

Oligonucleotídeo iniciador	Seqüência
TR β 9 F	AGTGAATTCACAGAAGGTTATTCCTATTGC
TR β 9 R	GATCTGCAGGCTCTTTGGATGCCCACTAAC
TR β 10 F	AGTCTGCAGAGGCCTGGAATTGGACAAAGC
TR β 10 R	GGAATTATGAGAATGAATTCAGTCAGT

Tabela 3: Descrição dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene do TR β . Na primeira coluna, aparece o número do exon e a orientação. F: senso (forward); R: anti-senso (reverse). Na segunda coluna aparece a descrição da seqüência.

Na investigação dos familiares da paciente portadora da mutação no gene do TR β , apenas o éxon 10 foi amplificado, nas mesmas condições. A análise genética foi feita através da técnica de RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”), utilizando-se a enzima de restrição BclI (Fermentas Inc., Hanover, MD, EUA). A mutação descrita cria um segundo sítio de clivagem para esta enzima no éxon 10, permitindo, então, a diferenciação de bandas à análise em gel de poliacrilamida, nos indivíduos afetados.

Para avaliação do gene SBP2 na paciente portadora da mutação em heterozigose composta, os 17 éxons que compõem o gene foram amplificados por PCR, utilizando-se os iniciadores descritos na tabela 4. Na reação de PCR, foram utilizados 5 μ L de DNA genômico, 0,2mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 50ng de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,25U da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas Inc., Hanover, MD), tampão de reação e sulfato de magnésio fornecido e usado de acordo com o sugerido pelo fabricante, resultando em um volume final de 50 μ L. A amplificação foi realizada em um termociclador Tc-312 (Techne Inc. Burlington, NJ). As condições da reação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 54°C por 30s e extensão a 72°C por 1 minuto, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos da amplificação foram purificados como descrito para a investigação de mutação no TR. Os exons amplificados foram analisados, utilizando-se o seqüenciador automático ABI-377 (Perkin-Elmer Corp., Foster City, CA) com os mesmos iniciadores utilizados na amplificação.

Oligonucleotídeo iniciador	Seqüência
SBP2 1 F	CGCTTTGCTGTGACGCACTT
SBP2 1 R	GCAGGCGGACGGACTGAG
SBP2 2 F	ACCTCTTGGGTCTTTTTGTTTGTAT
SBP2 2 R	AGAGCATTCTCTCATCATCTG
SBP2 3 F	CAGAAAAGCTTCTTGGTTTGC
SBP2 17 R	CACCAGGCTTTTAGAGAAGATT
SBP2 3 R	ACTATAAAAAAGGTTAAAGCAGCAAAAT
SBP2 4 F	TGTGTCCTTTAGTTGGTTGCTT
SBP2 4 R	GGTCTCATTCTTGGAGTAGTCA
SBP2 5 F	CGGTAAGAGTTACGGTGTTTTGAC
SBP2 5 R	GGCTTCCCCCAATACATCCT
SBP2 6 F	CAAAGTGTCTGGATTTTGATATG
SBP2 6 R	CAACTGCACTGGAGTTAAAAA
SBP2 7 F	TGCATGTTTGAGTAACATAAGGA
SBP2 7 R	AACCATCATCACCATCCATC
SBP2 8 F	AGGGGATGAGGAACCTAAT
SBP2 8 R	GCCCTGGAGATTTTCACTTA
SBP2 9 F	AAGGGACCTTACTGAAGAATGA
SBP2 9 R	CATTTAGTTGAGCCAGAAGAGTT
SBP2 10 F	TGTA AAAAGAAAAGCACAGTTTGTATAGT
SBP2 10 R	CACAGGTCCTTATCTATGCT
SBP2 11 F	GGACAAGCTGGGGGTGACT
SBP2 11 R	AATCTAAGAGCTGGGAGAATAACTATGG
SBP2 12 F	GGCACTAAGAGGCACATTGC
SBP2 12 R	AGTCCTGGAGAGTTTGCTCA
SBP2 13 F	GTCTGTGAATGTGGTGGTTGT
SBP2 13 R	CTCTCCCTGAATGCGTGTA
SBP2 14 F	TTGGGAATGGGGGAAGATG
SBP2 14 R	AAAACCACAAAGAAAACGAGTTGTCA
SBP2 15 F	ATAGATGGGTGTGTTGCTAAGAA
SBP2 15 R	GTGGCTCCTCCTCAATGAC
SBP2 16 F	GCATGAGGTCCACATTACCC
SBP2 16 R	AGGCAATGGGCTGGACTTAC
SBP2 17 F	CTGCTGGTTTTCTTACAGGAG

Tabela 4: Descrição dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene SECISBP2 (SBP2). Na primeira coluna, aparece o número do exon e a orientação. F: senso (forward); R: anti-senso (reverse). Na segunda coluna, aparece a descrição da seqüência.

Na investigação dos parentes de primeiro grau da paciente portadora da mutação, apenas os éxons 3 e 16 do gene SECISBP2, onde estão localizadas as mutações, foram amplificados por PCR, nas mesmas condições descritas acima. A análise genética foi feita através da técnica de RFLP, utilizando-se a enzima HpyF3I (Fermentas Inc., Hanover, MD) para avaliação da mutação no éxon 3, e a enzima Cfr13I (Fermentas Inc., Hanover, MD) para avaliação da mutação no éxon 16.

Na análise genética dos parentes de primeiro grau dos pais da paciente, foi estudado o éxon 3, enquanto para os parentes de primeiro grau da mãe da paciente, estudamos o éxon 16.

Na avaliação dos indivíduos voluntários sadios, os éxons 3 e 16 foram amplificados por PCR, e a investigação das mutações foi realizada através da técnica de RFLP, utilizando-se as duas enzimas de restrição, HpyF3I e Cfr13I.

3.6. Ensaios *in vitro*

3.6.1. Plasmídeos

Para realização de estudos funcionais, utilizamos os seguintes plasmídeos: genes-repórter induzíveis por T₃, contendo duas cópias dos TREs associadas às seqüências que codificam a enzima luciferase (LUC); vetores de expressão em mamíferos (pCMX) contendo a seqüência do TR e a do RXR; vetores de expressão de fusão em GST (pGEX) contendo a seqüência dos correguladores SMRT e SRC-1 e do receptor RXR. Os detalhes da construção desses plasmídeos foram descritos previamente [96-98].

O vetor pCMX-hTR β_1 (doado pelo Prof. John Baxter), que contém o cDNA do TR β_1 humano e o promotor do citomegalovírus (CMV) associado a seqüências que codificam a enzima luciferase (LUC), foi utilizado na construção dos plasmídeos contendo a mutação I431V (pCMX-hTR β_1 I431V e pGEX-hTR β_1 I431V).

A técnica empregada foi a de mutagênese sítio-dirigida (Quick Change Site-Directed Mutagenesis, Stratagene). O plasmídeo pCMX-hTR β_1 foi amplificado por PCR, utilizando-se os primers: I431V FWD: 5'-

ACAGATCTGCGGATGGTAGGAGCCTGCCATG-3' e I431V REV: 5'-CATGGCAGGCTCCTACCATCCGCAGATCTGT-3'. Em seguida, foi aplicada a enzima Dpn I, para digestão do DNA metilado e exclusão dos plasmídeos nativos. O material foi, então, transformado em bactérias *E. coli* DH5 α , e posteriormente, purificado através da técnica de Miniprep (Quiagen Plasmid Maxi Kit). A seguir, a região de interesse foi amplificada por PCR. Os plasmídeos contendo a mutação, selecionados através da técnica de restrição enzimática (utilizando-se a enzima BclI), foram seqüenciados para confirmação.

3.6.2. Cultura de Células

Células derivadas de promonócitos humanos (U937), obtidas do Centro de Cultura de Células da Universidade da Califórnia, São Francisco, EUA (UCSF), foram cultivadas em meio RPMI 1640, contendo 10% de soro de recém-nato bovino com 2mM de glutamina, 50U/mL de penicilina e 50 μ g/mL de estreptomicina, e mantidos em incubadora a 37 $^{\circ}$ C com 5% de CO $_2$.

3.6.3. Método de Transfecção e Ensaio de Atividade da Enzima Luciferase

O método de eletroporação foi utilizado para a transfecção das células mantidas em cultura. As células U937 foram coletadas por centrifugação e suspensas (9 milhões) em 0,5mL de solução PBS (Phosphate Buffered Saline) contendo 0.1% dextrose. A seguir, as células foram misturadas a 4 μ g do plasmídeo-repórter e de 0,5 μ g a 2,5 μ g do vetor de expressão dos TRs. Utilizamos ainda, para verificar a eficiência da transfecção, o plasmídeo, pCMX β GAL, que expressa a β -galactosidase. O β -gal secretado ao meio de cultura pelas células transfectadas foi medido conforme descrito anteriormente [99].

As células com o DNA foram suspensas e transferidas para uma cuveta e, após manutenção em temperatura ambiente por 5 minutos, eletroporadas utilizando-se um gerador de pulso Bio-Rad com voltagem de 0,3 volts e 960 μ F.

As células eletroporadas, em seguida, foram transferidas para recipientes contendo 4mL de meio RPMI 1640 com 10% soro fetal bovino, ressuspensas e colocadas em triplicata em placas de 12 poços (1mL/poço). A seguir, as células foram incubadas por 24hs a 37°C com etanol (controle) ou diferentes concentrações (nM) de T₃.

Para o ensaio da enzima luciferase, as células foram transferidas para tubos de eppendorf de 1,5mL e centrifugadas por 1 minuto a 13.000 rpm. O sobrenadante foi aspirado e descartado, enquanto que o precipitado celular foi lisado e solubilizado pela adição de 150µL de 0,25m TRIS-HCl, pH 7,6 contendo 0,5% de Triton X-100 a 0.1%. O lisado celular foi misturado com o substrato para enzima luciferase (Luciferase Assay System – Promega) e a medida da atividade desta enzima foi quantificada em um luminômetro (Turner). Os resultados apresentados são a média de pelo menos três experimentos representativos.

3.6.4. *Curvas Dose-Resposta e Efeito Dominante Negativo*

As transfecções para construção de curvas dose-resposta para os diversos TREs foram realizadas conforme descrito acima, e as células foram incubadas com concentrações crescentes de T₃, que variaram de 10⁻¹⁰M até 10⁻⁶M.

Para avaliação do efeito dominante negativo, o vetor pCMV-hTRβ F451X foi utilizado como controle positivo, uma vez que esta mutação induz, sabidamente, efeito dominante negativo intenso sobre o TR. A concentração de T₃ utilizada nos experimentos foi de 100nM.

A partir dos valores de leitura de luciferase obtidos, foram calculadas as taxas de ativação, em DR4, F2 e TRE_{pal}, ou de repressão, no elemento responsivo do TSH, conforme descrito no quadro a seguir:

Taxa de ativação = leitura da LUC com T₃ / leitura da LUC sem T₃

Taxa de repressão = 100 – (leitura da LUC com T₃ x 100) / leitura da LUC sem T₃

3.6.5. Ensaio de GST (Glutathione S-Transferase)

Para a síntese *in vitro* do receptor marcado com radioisótopo, utilizamos o Kit de lisado de reticulócitos TNT (Promega), a metionina marcada com S^{35} , e os vetores pCMX TR β 1 e pCMX TR β 1 I431V. As proteínas de fusão GST SRC-1 (381-882), GST-RXR (molécula inteira) e GST-SMRT (987-1491) foram preparadas utilizando-se protocolos tradicionais (Pfizer, New York, NY, EUA).

Os plasmídeos foram transformados em bactérias BL21, cultivadas em meio 2x LB, precipitadas e ressuspensas em tampão TST 1x (50mM de Tris pH 7,5; 150mM de NaCl; e 0,05% de Tween 20) com 1mM de DTT, 0,5mM de fluoreto fenil-metil-sulfonil, e coquetel inibidor de protease 1:1000 (Sigma, St. Louis, MO, EUA). A seguir, a solução foi incubada com lisozima e sonicada (três ciclos de 2,5 min, amplitude de 70%, um pulso por segundo com pausa de 5 min entre cada ciclo). Os debris foram precipitados e o sobrenadante foi incubado por 2 horas com 500 μ l de glutathione-sefarose 4B equilibrados com TST 1x.

A seguir, as proteínas foram lavadas com TST 1x contendo 0,05% de Nonidet P-40, e ressuspensas em TST 1x com 1mM de DTT, 0,5mM de fenil-metil-sulfonil-fluoreto, coquetel inibidor de protease 1:1000 (Sigma), e glicerol 50%, e estocadas a -20°C . Todos os procedimentos foram realizados a 4°C . Para o ensaio de ligação, a suspensão contendo 4 μ g de proteína de fusão GST foi incubada com 3 μ l de proteína marcada com S^{35} em 150 μ l de tampão TST 1x com 0,1% de Nonidet P-40, 0,1% de Triton X-100, 1 mM de DTT, e 2 g/ml de soro fetal bovino, na presença de 10^{-6}M de T_3 ou veículo. Após duas horas de incubação a 4°C , nova lavagem foi realizada, utilizando-se o mesmo tampão, e as proteínas fusionadas foram analisadas em gel de SDS-poliacrilamida a 10%, e visualizadas por auto-radiografia.

3.6.6. Ensaio de Ligação ao T_3

Os TRs foram sintetizados utilizando-se o Kit de lisado de reticulócitos TNT (Promega), e as afinidades de ligação ao T_3 foram determinadas através

de um ensaio de ligação por saturação. Nesse experimento, 15 fmol de cada proteína sintetizada *in vitro* foram incubados “overnight”, a 4°C, com diferentes concentrações de [¹²⁵I]T₃ (PerkinElmer Life Sciences), em 100µL de tampão E400 (400mM de NaCl, 20mM de KPO₄, pH 8, 0,5mM de EDTA, 1,0mM de MgCl₂, e 10% de glicerol), com 1mM de monotioglicerol, e 50µg de histona de timo (Calbiochem). O [¹²⁵I]T₃ ligado foi isolado por fluxo de gravidade através da passagem em 2ml de coluna Sephadex G-25 (Amersham Biosciences), e quantificado usando-se um contador gama (Cobra II – PACKARD, Austrália). As curvas de ligação foram construídas por regressão não-linear, e os valores da constante de equilíbrio de dissociação (Kd) foram calculados utilizando-se o modelo de saturação de sítio único, contido na versão 4.00 do programa Prism (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

3.6.7. Western blotting

A concentração de proteína no soro foi determinada pelo método de Bradford, e a mesma quantidade de proteína no soro da paciente portadora da mutação no gene SBP2 e de dois indivíduos controles saudáveis foi desnaturada por aquecimento em tampão de amostra Laemmli contendo mercaptoetanol, analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, e transferida eletroforeticamente, em sistema semi-seco (solução de transferência: 250mM de Tris-base, 1920mM de glicina e 20% de etanol, pH 8,3), para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF, Millipore®). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de leite em pó desnatado a 5% em tampão TBS-T (200mM de Tris-base, 5M de NaCl e 0,1% de Tween 20, pH 7,5), durante 1 hora, em temperatura ambiente. Em seguida ao bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo primário, em solução bloqueadora 1%, durante 12 horas, a 4°C e, em seguida, com o anticorpo secundário acoplado à enzima peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP), também em solução bloqueadora 1%, durante 1 hora, em temperatura ambiente. As proteínas marcadas com os anticorpos foram visualizadas por quimioluminescência em filme radiográfico (sistema de detecção ECL Plus, Amersham®). Os seguintes anticorpos foram utilizados: selenoproteína P, porção amino-terminal (sc-22637); selenoproteína P, porção carboxi-terminal

(sc-22639); albumina (sc-51515); e IgG anti-cabra acoplado à HRP (sc-2020), todos obtidos da companhia *Santa Cruz Biotechnology*.

3.7. Análise Estatística

Os dados obtidos nos ensaios *in vitro* seguiram distribuições normais, e foram submetidos ao teste t de Student ou ao ANOVA complementado com o teste de significância Student Newman-Keuls Multiple Comparison. O programa Graph Pad Prism, versão 4.0 (Prism version 4.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA) foi usado para análise estatística e construção das curvas dose-resposta e dos gráficos. As diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Uma nova mutação no gene do TR β provoca Síndrome de Resistência ao Hormônio Tireoidiano

Descrevemos o caso de uma paciente de 14 anos de idade, natural e procedente de Cachoeiro do Itapemirim – ES - Brasil, que procurou atendimento médico com queixa de aumento do volume tireoidiano, sem quaisquer outros sintomas. Desenvolvimento neuropsicomotor normal. A menarca ocorreu aos 12 anos, e os ciclos menstruais são regulares. Não há história de uso de medicações ou de patologias concomitantes. Exame físico segmentar e neurológico normais, inclusive frequência cardíaca normal e ausência de bócio. A avaliação laboratorial mostrou TSH de 1,92 μ UI/L (VR 0,3 – 5,0); T₃ livre de 0,78ng/dL (VR 0,3 – 0,51); e T₄ livre de 2,31 ng/dL (VR 0,75 – 1,8), em repetidas ocasiões. A dosagem de anticorpo anti-tireoperoxidase foi negativa, e a ultrassonografia de tireóide, normal. A RNM de sela túrcica realizada mostrou hipófise normal.

Na investigação genética, o seqüenciamento do produto de PCR, nas duas direções, mostrou a presença de uma mutação “missense” (A \rightarrow G) em heterozigose, no exon 10 do gene do TR β (figura 15 A e B), cuja conseqüência é a troca da Isoleucina 431 por uma Valina (I431V). Tal mutação não havia sido descrita na literatura previamente.

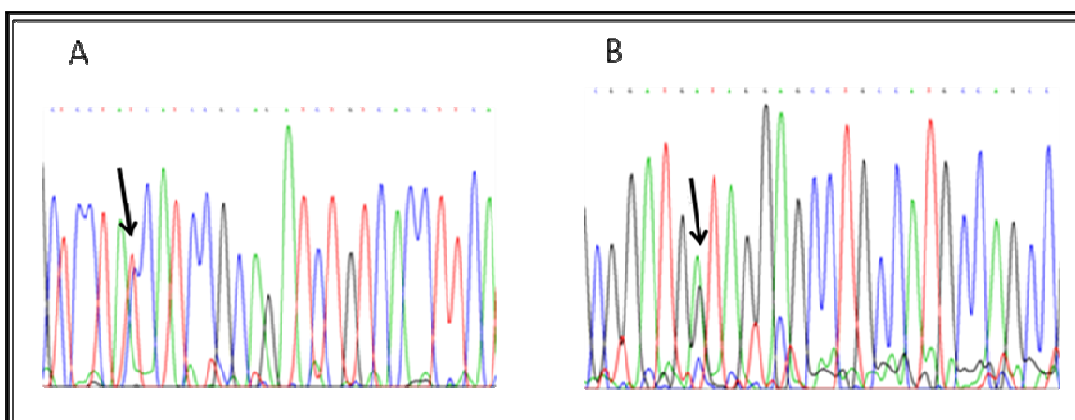


Figura 15: Eletroferograma do exon 10 evidenciando a mutação (I431V), indicada pelas setas. A) Seqüenciamento do produto de PCR no sentido antisense; B) Seqüenciamento do produto de PCR no sentido senso.

A investigação da família, realizada pelo método de RFLP, revelou a presença da mesma mutação em 16 parentes da paciente (figura 16), abrangendo três gerações. Destes, 12 apresentaram níveis de TSH normais, com T_4 e/ou T_3 livres aumentados. Em dois indivíduos, as dosagens de TSH, T_4 e T_3 livres foram normais. Os resultados das dosagens hormonais dos indivíduos afetados estão ilustrados na figura 17.

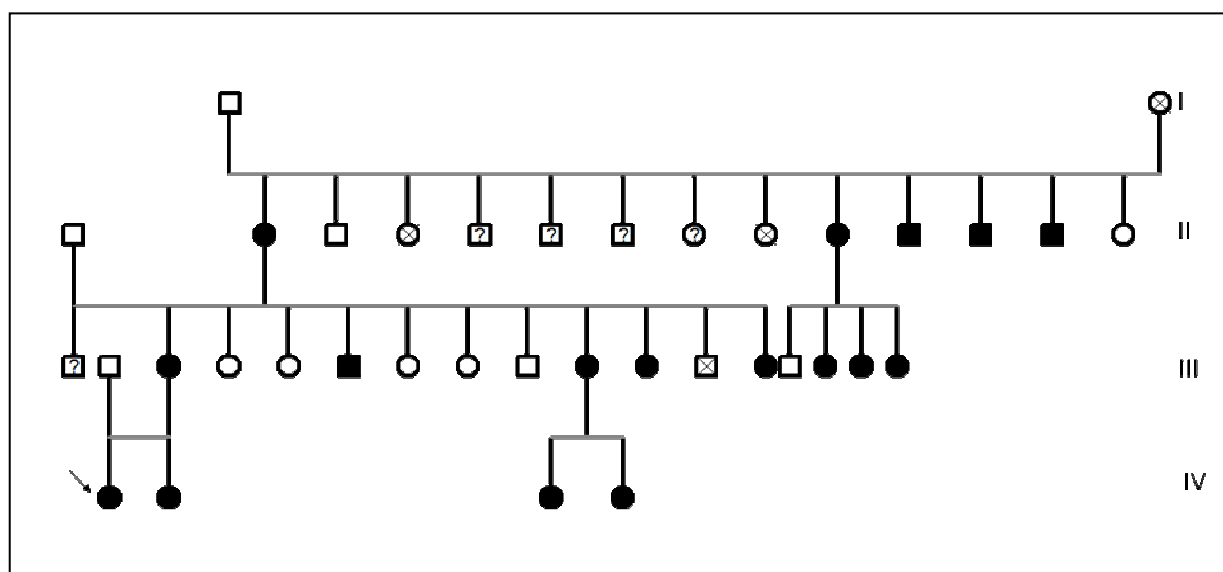


Figura 16: Heredograma da família portadora da mutação I431V no gene do $TR\beta$. A possibilidade de consangüinidade foi excluída. Os símbolos fechados representam os indivíduos afetados, símbolos abertos correspondem aos membros da família não-afetados. A seta indica a paciente probanda. Os indivíduos marcados com (?) não realizaram a investigação genética, e os indivíduos assinalados com um X são falecidos.

A mutação aqui descrita, em consonância com as descrições anteriores de mutações no gene do $TR\beta$, tem padrão de herança autossômico dominante. Uma tia da paciente probanda, também portadora da mutação, apresentou TSH sérico elevado (51mUI/L), com T_4 livre no limite inferior do valor de referência e T_3 livre baixo, além de dosagem de anticorpos anti-tireoperoxidase positiva, configurando o diagnóstico de hipotireoidismo primário concomitante (dados não-incluídos na figura). Todos os indivíduos afetados eram assintomáticos, inclusive a paciente hipotireóideia.

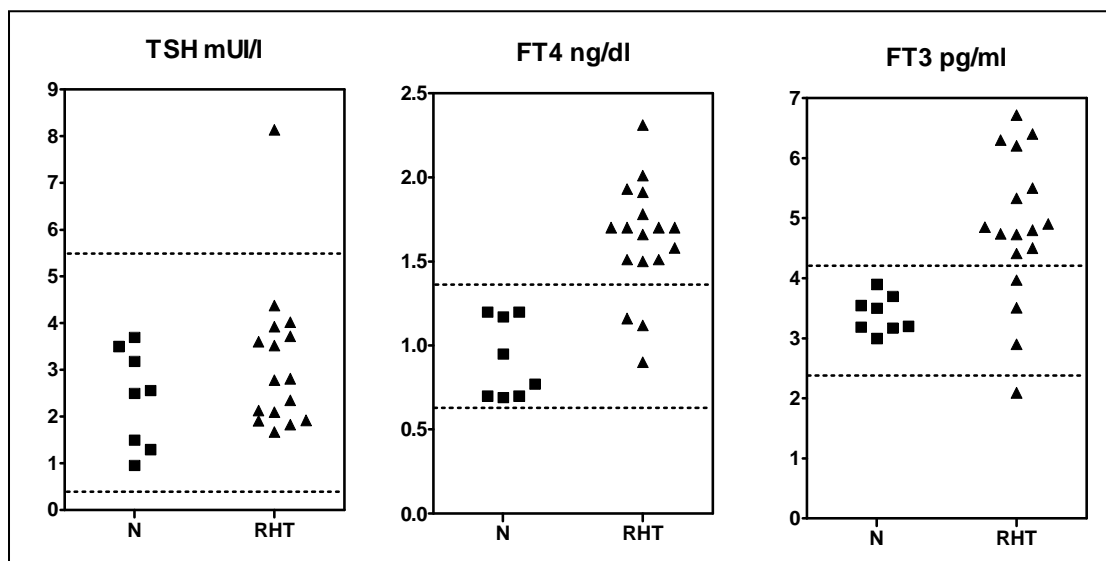


Figura 17: Dosagens hormonais tireoidianas de membros da família portadora de Resistência ao Hormônio Tireoidiano. N: membros da família não-afetados pela mutação; RHT: membros portadores da mutação; FT4: T_4 livre; FT3: T_3 livre. As linhas pontilhadas indicam os limites de referência da normalidade.

Com o objetivo de avaliar o impacto da alteração estrutural provocada pela mutação encontrada sobre a função do receptor, realizamos estudos funcionais. Para definir a potência e eficácia do TR β I431V, em comparação com o TR β nativo (wt), realizamos ensaios de transfecção transitória com um gene-repórter contendo os diversos elementos responsivos ao TR.

Como podemos observar na figura 19A, quando comparamos a ação do mutante TR β I431V à do TR β wt em DR4, principal elemento responsivo positivo presente no organismo humano, observamos um desvio para a direita da curva dose-resposta do TR β I431V (EC_{50} TR β wt $9,91 \times 10^{-9}$ M; EC_{50} TR β I431V $3,01 \times 10^{-8}$ M). No entanto, em doses mais altas, a resposta máxima induzida pelo T_3 foi a mesma para os dois receptores (figura 18A). Em F2 e TREpal, também observamos um discreto desvio para a direita das curvas dose-resposta do TR mutante (figuras 18B e 18C). Em F2, o EC_{50} para o TR β wt foi de $1,63 \times 10^{-8}$ M versus $8,17 \times 10^{-8}$ M para o TR β I431V, e em TREpal, os valores de EC_{50} foram $1,06 \times 10^{-8}$ para o TR β wt versus $3,26 \times 10^{-8}$ para o TR β I431V. A soma desses resultados sugere que o TR β I431V é menos potente (EC_{50}) que o TR nativo, apesar de possuir uma eficácia (resposta máxima) normal.

A seguir, nós avaliamos as propriedades transcricionais do mutante sobre o promotor do $TSH\alpha$, que corresponde a um gene-alvo regulado negativamente pelo TR. Utilizando-se a proporção 1 μ g de plasmídeo TR β wt ou TR β I431V para 4 μ g do plasmídeo contendo o elemento responsivo, observamos desvio para a direita da curva dose-resposta, conforme mostrado na figura 18D.

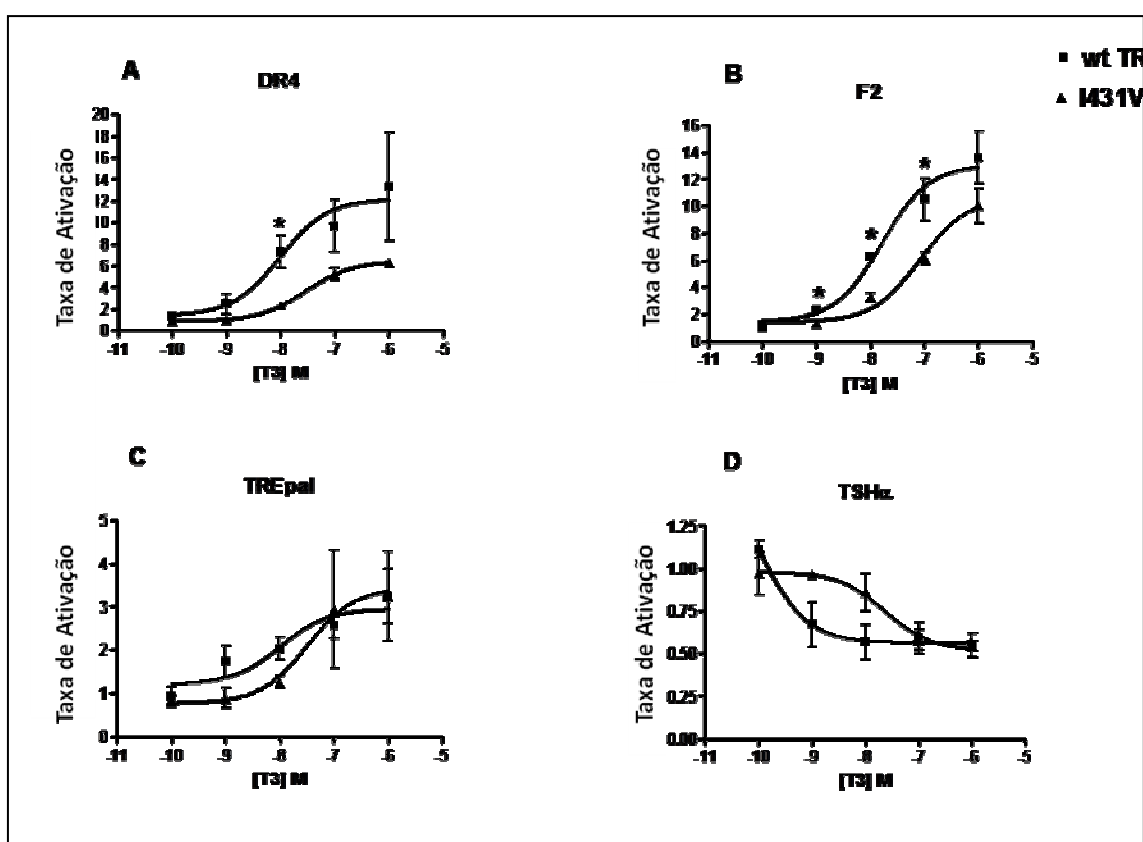


Figura 18: Efeitos transcricionais de doses crescentes de T_3 nos elementos responsivos DR4 (A), F2 (B), TREpal (C) e TSH (D). Os valores de ativação para cada concentração de T_3 correspondem à média de determinações em triplicatas. * $p < 0,05$.

Todos esses resultados, em conjunto, demonstram que a nova mutação I431V prejudica a potência do TR, sem afetar sua eficácia, sugerindo uma redução da afinidade do receptor mutante pelo hormônio tireoidiano.

Em seguida, decidimos avaliar o efeito dominante negativo do TR β I431V sobre TR β nativo. Já está bem estabelecido na literatura que, na

fisiopatogenia da SRHT, o TR mutado atrapalha o funcionamento do TR nativo, ou seja, exerce um efeito dominante negativo. Como podemos observar na figura 19A, a taxa de ativação da transcrição mediada por T_3 nas células transfectadas com os dois plasmídeos (TR β wt e TR β I431V), em iguais proporções, foi cerca de 50% menor que a observada nas células transfectadas apenas com o TR selvagem, no elemento responsivo DR4. O mesmo resultado foi observado em relação à taxa de repressão, avaliada no elemento responsivo do TSH (figura 19B).

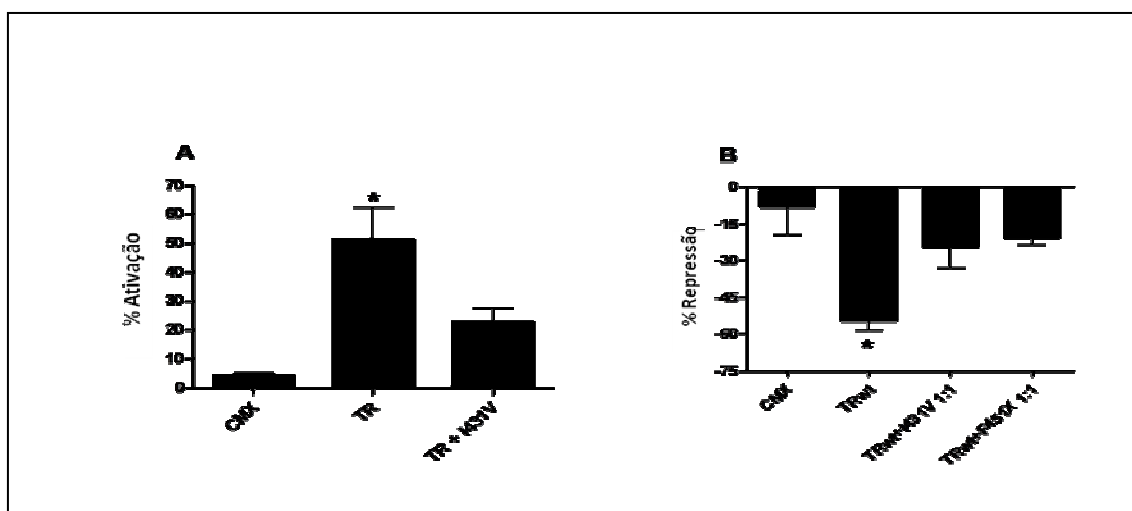


Figura 19: Efeito dominante negativo exercido pelo TR I431V sobre o TR wt. A: Taxas de ativação em DR4. B: Taxas de repressão no elemento responsivo do TSH. O valor das taxas de ativação e de repressão para cada vetor é a média das determinações em triplicatas. * $p < 0,05$.

Para complementar a determinação da análise funcional do mutante TR β I431V, examinamos a capacidade de ligação a corretores, através de ensaio de GST. Observamos na figura 20A que, quando comparado ao TR β wt, o mutante TR β I431V ligado ao T_3 não aumentou significativamente o recrutamento do coativador SRC-1, em baixas concentrações do hormônio. Por outro lado, a ligação a correpressores do TR β I431V foi maior que a do TR nativo (figura 20B). Entretanto, a capacidade do TR β I431V formar heterodímeros com o RXR foi comparável à do TR β wt (figura 21).

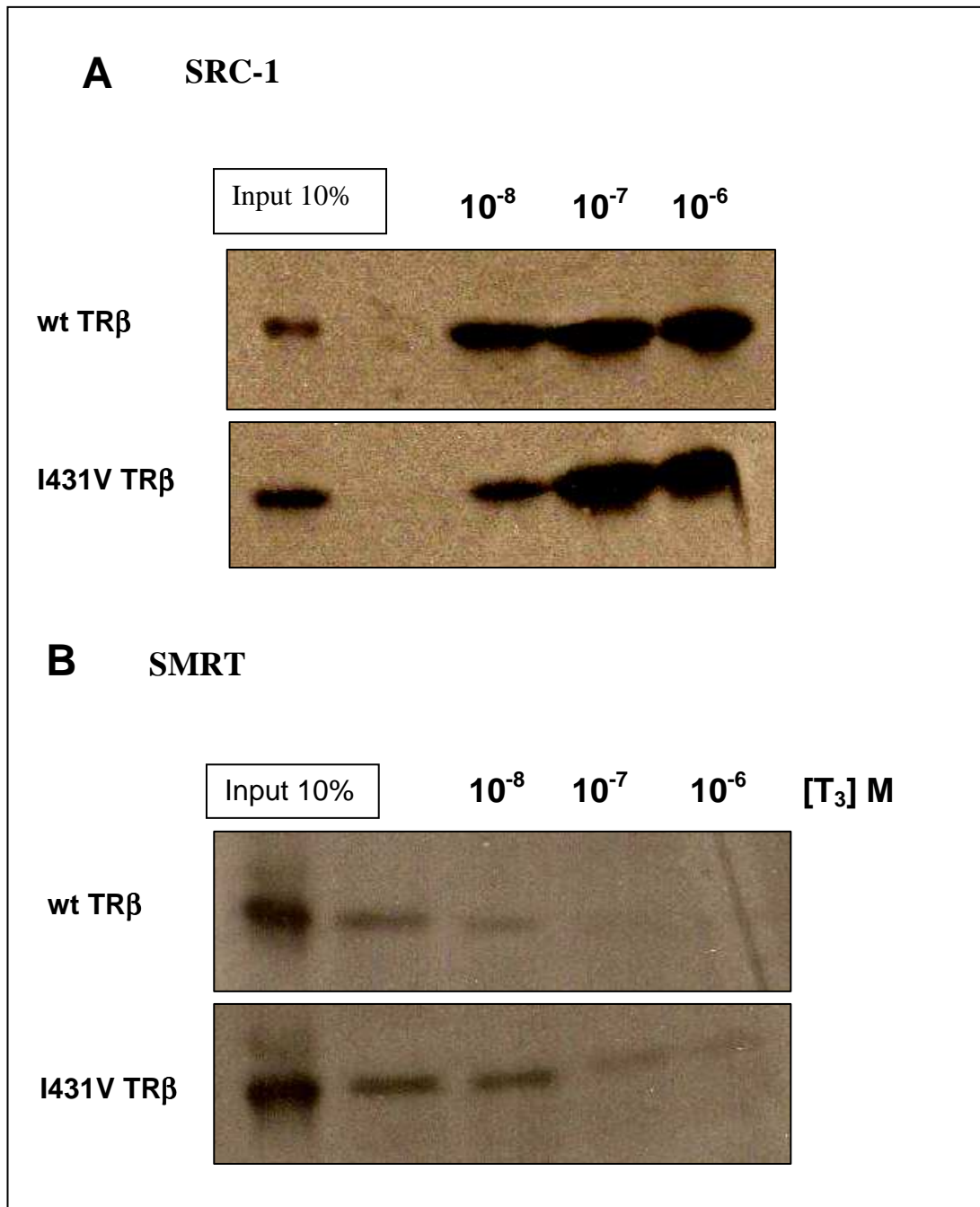


Figura 20: Auto-radiografias de géis de poliacrilamida usados para separar TRs marcados ligados a co-reguladores, em ensaio de GST. A: O recrutamento de SRC-1 pelo I431V TR β é prejudicado, em baixas concentrações de T₃, em comparação ao wt TR β . B: O mutante I431V TR β retém o correpressor SMRT de maneira mais intensa que o wt TR β .

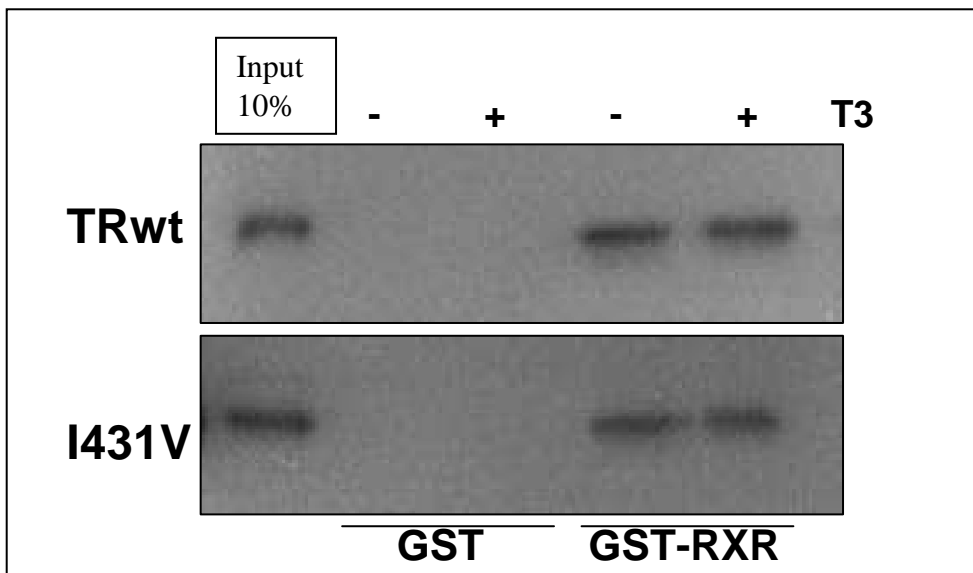


Figura 21: Auto-radiografias de ensaio de GST, mostrando heterodimerização normal do I431V TR β com o RXR.

Para finalizarmos, avaliamos a afinidade do TR β I431V pelo T₃. Conforme ilustrado no gráfico da figura 22, o K_d do TR mutante foi maior (0,49nM) que o apresentado pelo TR wt (0,18nM), demonstrando uma menor afinidade do receptor mutado pelo hormônio tireoidiano.

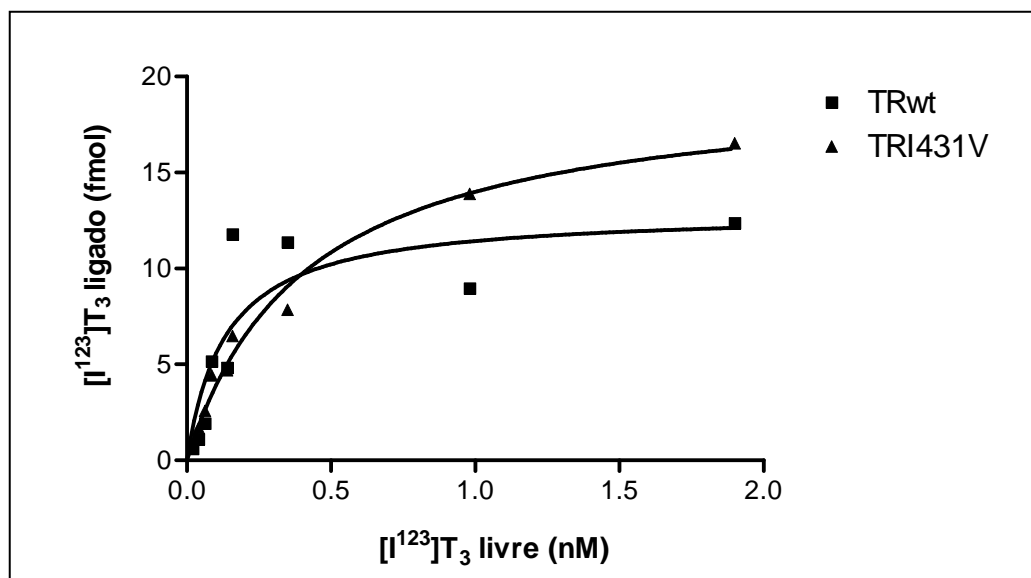


Figura 22: Curva de afinidade do I431V TR β pelo T₃, em comparação com o wt TR β . TR β I431V (▲), TR β wt (■). A afinidade (K_d) do TR β I431V pelo T₃ foi 2,6 vezes menor que a do TR β wt.

4.2. Uma nova mutação no gene *SBP2* provoca uma síndrome resultante da deficiência de selenoproteínas

Apresentamos o caso de uma paciente de 11 anos de idade, natural e procedente de Planaltina – DF, que foi avaliada pela primeira vez aos 11 meses de vida, apresentando quadro de baixa estatura, dismorfias com fâscies infiltrada, pescoço curto, protrusão lingual, clinodactilia, atraso no desenvolvimento psicomotor com comprometimento cognitivo, hipotonia notada desde o quarto mês de vida, e hiporreflexia tendinosa profunda. Não houve intercorrências durante a gestação, nem durante o parto.

A investigação clínica, realizada nos primeiros anos de acompanhamento, mostrou perfil bioquímico normal, cariótipo 46,XX, triagem para erros inatos do metabolismo negativa e cromatografia de aminoácidos normal, além de eletroencefalograma e eletroneuromiografia normais. As dosagens hormonais revelaram: TSH de 9,36 μ UI/L (VR 0,3 a 5,0 μ UI/L), T₄ livre de 4,28 ng/dL (VR 0,75 a 1,8 ng/dL), T₃ total de 56 ng/dL (VR 84 a 172 ng/dL) e rT₃ de 49,31ng/dl (VR 8 a 40). Ultrassonografia de tireóide mostrou uma glândula de morfologia preservada, e as dosagens de auto-anticorpos anti-tireoidianos, anti-tireoperoxidase e anti-tireoglobulina, foram negativas, afastando-se a possibilidade de doenças tireoidianas auto-imunes. Nesse momento, nenhum tratamento foi instituído.

Nos anos subseqüentes, a paciente evoluiu com retardo mental, transtorno da linguagem verbal, obesidade e baixa estatura. As dosagens hormonais tireoidianas foram repetidas em diversas ocasiões, havendo manutenção dos achados observados inicialmente. Nenhuma outra alteração hormonal foi evidenciada ao longo do seguimento, e os exames complementares mostraram estruturas ósseas normais à radiografia, no entanto a idade óssea se manteve sempre bastante atrasada em relação à idade cronológica. Aos três anos e oito meses de idade cronológica, a idade óssea era de dois anos.

Ao longo do acompanhamento, surgiu desproporção entre os membros inferiores, escoliose e semi-ptose palpebral unilateral, de instalação lenta e progressiva. Houve, ainda, surgimento de neuropatia periférica sensitiva generalizada simétrica, afetando os membros inferiores, evidenciada a partir

dos 9 anos de idade, através de eletroneuromiografia e potencial evocado somatossensitivo. Outros exames realizados ao longo do acompanhamento foram eletrocardiograma, ecocardiograma, ultrassonografia de abdome, e dosagens séricas de creatina-fosfoquinase (CK) e de aldolase, todos normais.

Aos 8 anos e 4 meses de idade, a paciente iniciou reposição hormonal com levotiroxina (L-T₄) associada a liotironina (L-T₃), medicações que foram manipuladas através de metodologia de baixa confiabilidade. O tratamento foi mantido por, aproximadamente, quatro meses, de maneira bastante irregular e sem acompanhamento adequado das dosagens hormonais.

Aos 9 anos de idade, a paciente iniciou reposição com L-T₄, na dose de 3,4 µg/Kg/dia, dose considerada bastante elevada para a faixa etária, e muito superior àquelas comumente utilizadas no tratamento do hipotireoidismo. Após 15 dias de uso da L-T₄, houve apenas normalização do TSH sérico, sem supressão, e os níveis de T₄ livre se elevaram de maneira considerável, enquanto o T₃ se manteve abaixo do limite inferior dos valores de referência. A dose de L-T₄ foi, então, aumentada para 4,4 µg/Kg/dia e, após dois meses de tratamento, houve supressão do TSH (figura 23).

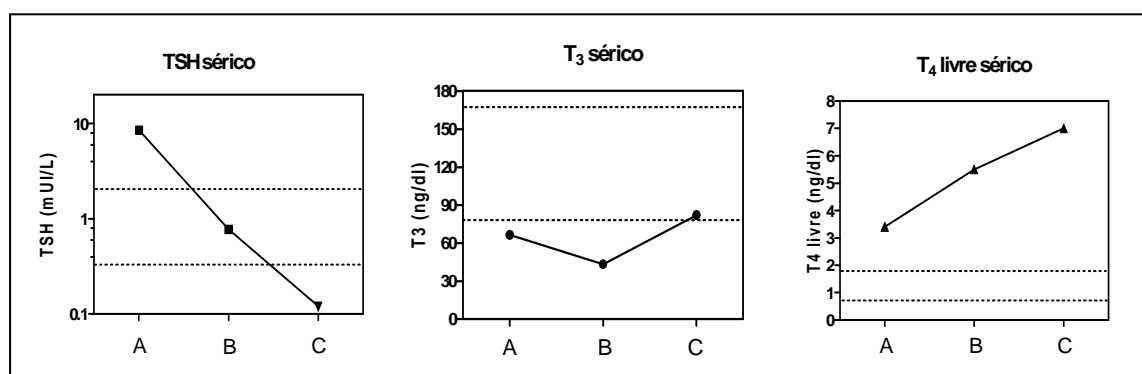


Figura 23: Resultados das dosagens hormonais tireoidianas da paciente, durante a administração diária de L-T₄. A: Valores iniciais. B: Valores após 15 dias da administração de L-T₄, na dose de 3,4 µg/Kg/dia. C: Valores após 60 dias da administração de 4,4 µg/Kg/dia de L-T₄.

Aos 9 anos e 8 meses de idade, foi suspensa a levotiroxina, e iniciou-se tratamento com L-T₃, em doses crescentes, com normalização dos níveis séricos de TSH, T₄ livre e T₃. Atualmente, a paciente está em uso de 0,42 µg/Kg/dia de L-T₃, e as dosagens hormonais mostram: TSH de 0,71mUI/L, T₄

livre de 1,3 ng/dl, T₃ livre de 3,3 pg/ml e rT₃ de 53,4 ng/100mL (VR 9 a 35 ng/100mL).

Ao exame clínico, a paciente apresenta, no momento, aos 11 anos e 11 meses de idade, baixa estatura, obesidade com índice de massa corporal (IMC) de 23 Kg/m², déficit cognitivo importante, fraqueza muscular proximal moderada, mais proeminente na musculatura coxo-femoral, semi-ptose palpebral unilateral à esquerda com estrabismo divergente homolateral, quinto quirodáctilo esquerdo curto, dismetria dos membros inferiores de 1,5cm à direita, hiporreflexia tendinosa profunda, genu varo e marcha eqüina. Os primeiros sinais de puberdade surgiram aos 11 anos, e atualmente a genitália é púbere, em estágio puberal 3 de Tanner. Na coluna, observa-se leve rigidez, escoliose e lordose lombar. (figura 24).



Figura 24: Fotos da paciente, mostrando a desproporção entre os membros inferiores, a obesidade de padrão centrípeto, a semi-ptose palpebral à esquerda e os quintos quirodáctilos curtos, especialmente à esquerda.

Avaliação otorrinolaringológica demonstra disacusia mista de grau moderado bilateralmente, sem alterações de tronco encefálico. A espirometria mostrou exploração ventilatória normal, com Capacidade Vital de 79% do previsto para a estatura. Entretanto, os valores máximos de pressão expiratória e inspiratória mostraram-se gravemente reduzidos. Em conjunto, esses achados são atribuídos à importante redução de força da musculatura respiratória. A RNM de membros inferiores mostrou acentuada hipotrofia bilateral da musculatura axial adutora, com intensa infiltração gordurosa. O comprometimento é difuso, porém mais proeminente nos músculos sartório, bíceps femoral e glúteo.

Dosagem de IGF-I, realizada por quimioluminescência, mostrou-se normal para a idade e sexo. As figuras 25 e 26 mostram, respectivamente, a curva de crescimento e peso, e a curva de IMC da paciente.

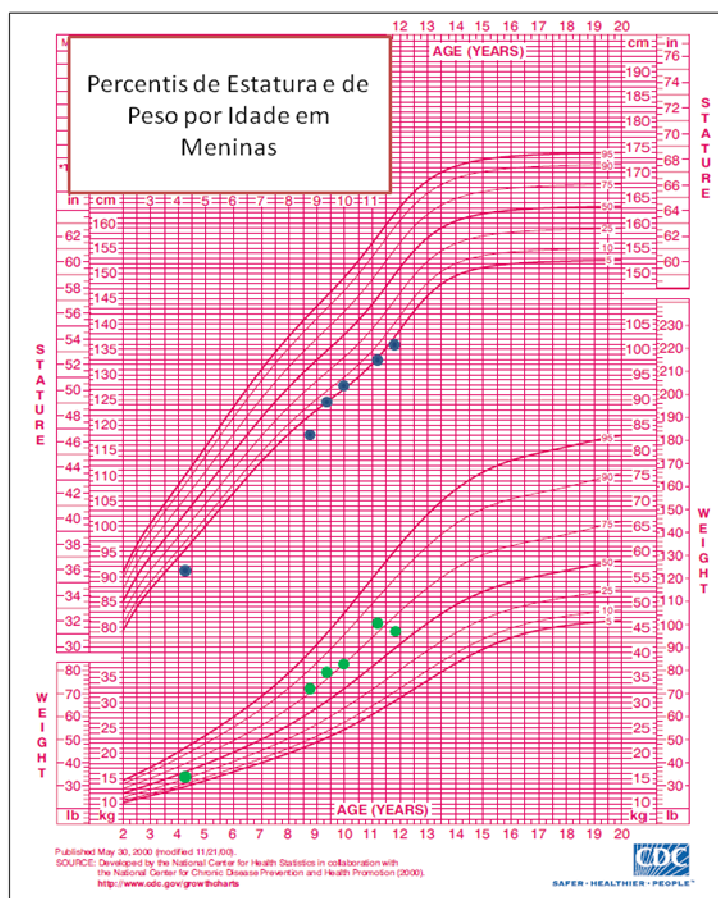


Figura 25: Gráfico do canal de crescimento da paciente. Acima, estão plotados os valores de estatura, de acordo com a idade (círculos azuis). Abaixo, a plotagem dos valores de peso, de acordo com a idade (círculos verdes). A estatura-alvo, calculada a partir da altura dos pais, é de 158cm.

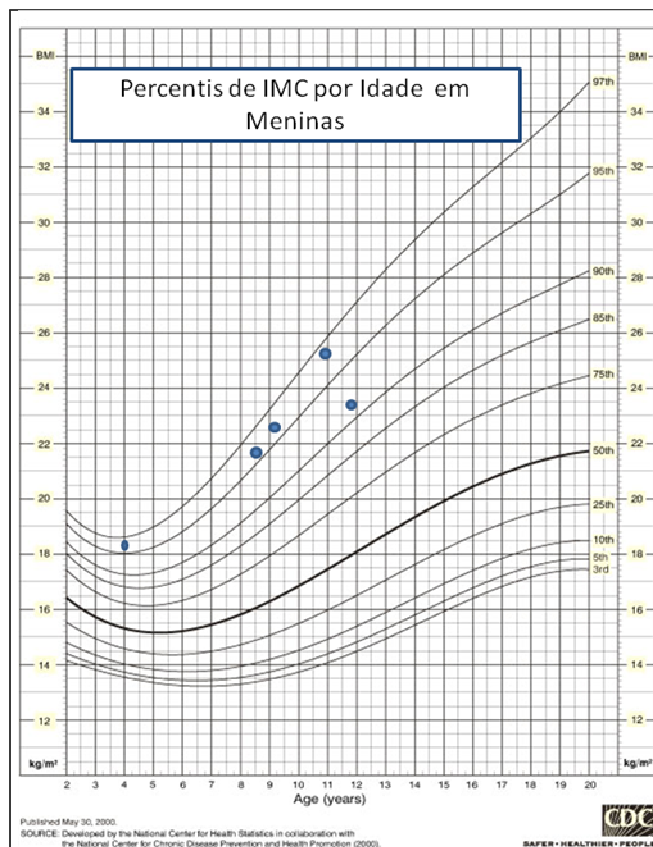


Figura 26: Gráfico dos valores de IMC, de acordo com a idade da paciente. Note-se que, ao longo de todo o acompanhamento, até os 11 anos de idade, o IMC se manteve acima do percentil 95 para a idade e sexo.

A suspeita clínica de SRHT nos levou a realizar investigação genética. Embora os níveis de T_3 da paciente estivessem reduzidos, dado que não é esperado nos pacientes portadores de SRHT por defeitos no TR, nossa investigação começou pelo gene do $TR\beta$, por serem estes os responsáveis por 85% dos casos de SRHT.

A investigação genética não mostrou mutações nos éxons 9 e 10, que correspondem aos *hot spots* para mutações no gene do $TR\beta$. Então, frente à suspeita clínica de defeito na conversão periférica de T_4 em T_3 , decidimos investigar a possibilidade de alterações congênitas que pudessem prejudicar a síntese de desidases.

Considerando que as alterações hormonais tireoidianas observadas na paciente aqui descrita se assemelhavam às descritas nos pacientes portadores de mutações no gene $SBP2$ [32], que está envolvido na síntese de várias selenoproteínas, decidimos investigar a possibilidade da existência de alterações envolvendo o metabolismo do selênio. Para isso, determinamos os

níveis séricos de glutationa-peroxidase (GPx3) e de selênio. Os resultados mostraram uma diminuição significativa da GPx sérica, cujo valor foi de 11U/gHb (VR 27,5 a 73,5), e do Selênio total, cujo valor foi inferior a 10 µg/L (VR 50 a 150).

Diante desses resultados, decidimos seqüenciar o gene SBP2, e a análise mostrou a presença de duas novas mutações “nonsense” em heterozigose, a primeira localizada no éxon 3 (R120X), e a segunda no éxon 16 do outro alelo (R770X), configurando uma mutação em heterozigose composta (figura 27A e 27B).

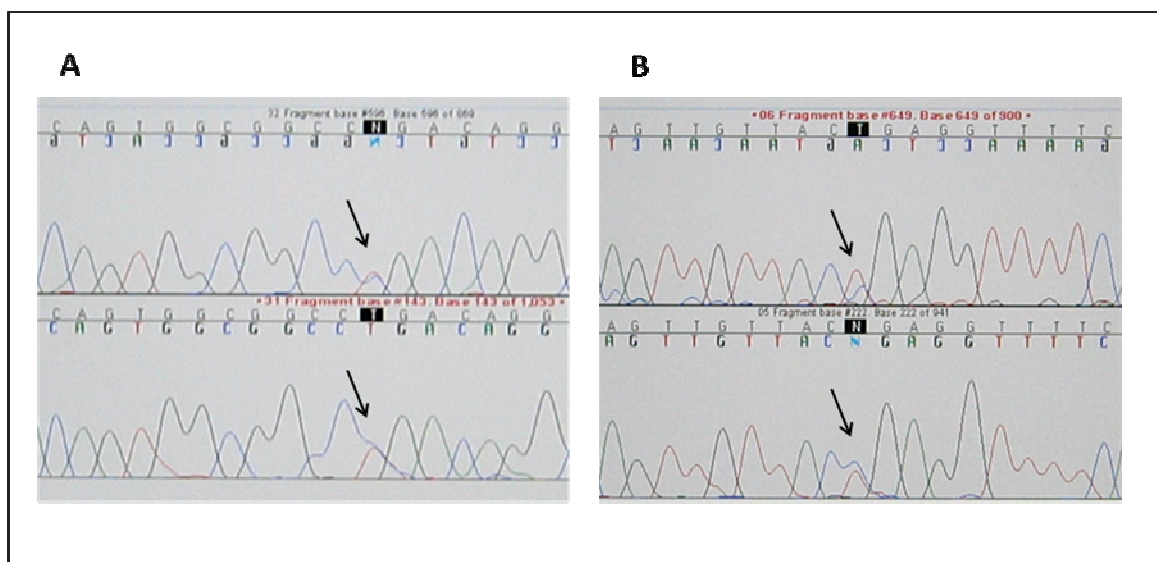


Figura 27: Eletroferograma dos éxons 3 e 16 do gene SBP2, mostrando a mutação em heterozigose composta. A: Éxon 3, com a mutação R120X, indicada pelas setas. B: Éxon 16, com a mutação R770X, indicada pelas setas. As imagens superiores correspondem ao seqüenciamento do produto de PCR no sentido senso; Imagens inferiores: seqüenciamento no sentido antisenso.

Os dois alelos dos éxons 3 e 16 do gene SBP2, de 100 indivíduos voluntários sadios, foram amplificados por PCR, e analisados pela técnica de RFLP. As mutações descritas na paciente não foram encontradas em nenhum dos 200 alelos, descartando-se, assim, a possibilidade de tratar-se de polimorfismos no gene SBP2.

A seguir, procedemos ao rastreamento genético familiar, que demonstrou que a mutação do éxon 3 foi herdada do pai da paciente, enquanto a mutação do éxon 16 foi herdada da mãe. O heredograma da figura 28 mostra

os membros da família portadores de uma ou outra mutação, em heterozigose. As dosagens de TSH, T₄ livre, T₃ livre e T₃ reverso de todos os familiares portadores foram normais. O padrão de herança observado foi recessivo.

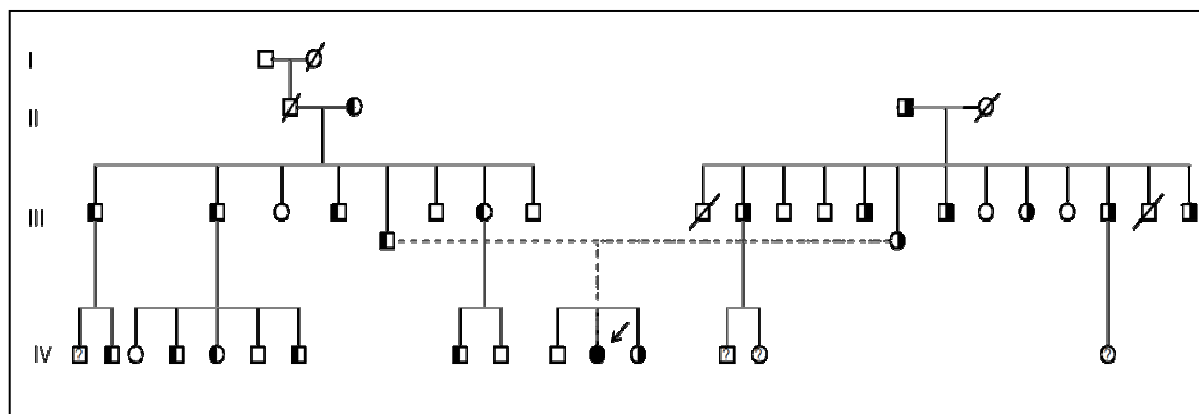


Figura 28: Heredograma da família portadora da mutação em heterozigose composta, afetando o gene SBP2. A possibilidade de consangüinidade foi excluída. O símbolo fechado, indicado pela seta, representa a paciente afetada. Os símbolos semi-fechados à esquerda representam os indivíduos portadores da mutação R120X, em heterozigose, e os símbolos semi-fechados à direita correspondem aos heterozigotos para a mutação R770X. Símbolos abertos correspondem aos membros da família não afetados. Os indivíduos marcados com (?) não realizaram a investigação genética.

Interessantemente, as dosagens de selênio sérico dos parentes de primeiro grau da paciente, heterozigotos para uma ou outra mutação, mostraram-se próximas do limite inferior do valor de referência para o método, conforme mostra a tabela 5.

Indivíduo portador heterozigoto	Selênio Sérico
Pai da paciente	60 µg/L
Mãe da paciente	38 µg/L
Irmã da paciente	51 µg/L

Tabela 5: Resultados das dosagens de selênio sérico dos parentes de primeiro grau da paciente, portadores de mutação no gene SBP2 em heterozigose. Valores de referência para o método: 46 a 143 µg/L.

É reconhecido que os limites de normalidade para os níveis circulantes de selênio são variáveis entre as diversas populações, na dependência da oferta de selênio a partir do solo. No Brasil, inexistente padronização para os

valores de referência de normalidade de selênio sérico. Para afastarmos a possibilidade de que as mutações em heterozigose pudessem alterar a economia do selênio no organismo dos indivíduos portadores, decidimos avaliar os níveis circulantes de selênio em indivíduos voluntários saudáveis, pertencentes à mesma comunidade onde vive a paciente.

Realizamos a dosagem laboratorial em 26 indivíduos, quinze do sexo feminino e onze do sexo masculino, com faixa etária que variou de 8 a 67 anos (média de 36,3 anos), e os resultados estão mostrados na figura 29. Todos os indivíduos avaliados apresentaram valores de selênio sérico abaixo do valor mediano dos limites considerados normais. A média global dos valores obtidos foi de 52,7 $\mu\text{g/L}$, com desvio-padrão de 11,8.

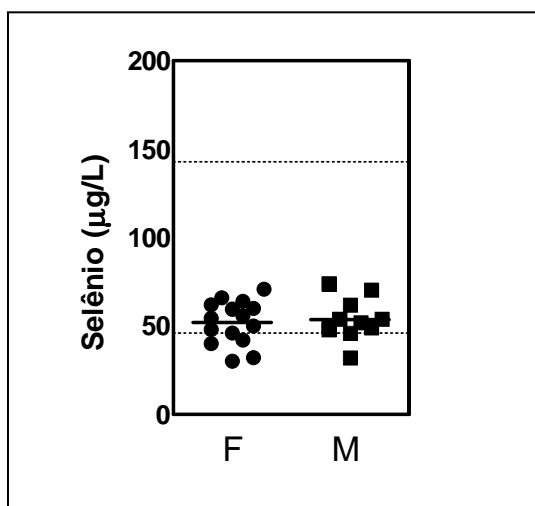


Figura 29: Resultados das dosagens de selênio sérico em 26 indivíduos voluntários saudáveis. F: sexo feminino; M: sexo masculino. As linhas pontilhadas representam os limites de referência considerados normais para o método, e as linhas cheias correspondem à média dos valores de selênio sérico, entre os indivíduos do sexo masculino e feminino.

Por fim, realizamos a determinação dos níveis séricos de selenoproteína P da paciente, através da técnica de Western Blotting. A figura 30 mostra que os níveis de SelP da paciente são discretamente reduzidos, em comparação com os níveis observados no soro de um controle sadio.

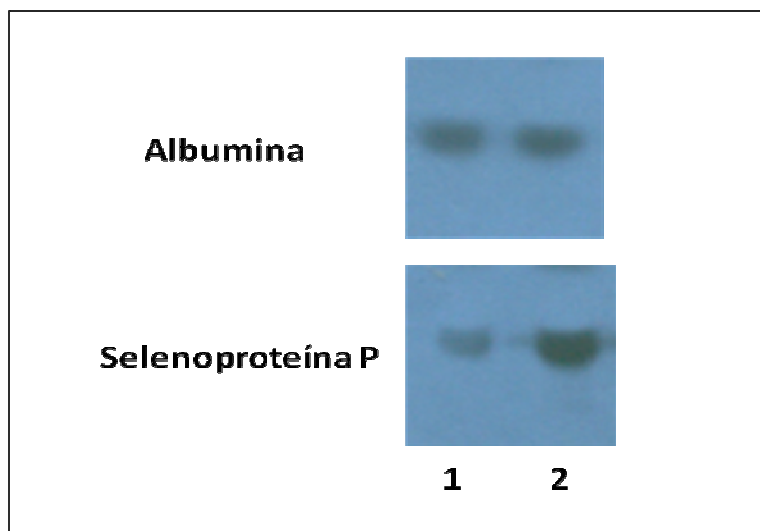


Figura 30: Níveis séricos de SelP, quantificados por Western Blotting. 1: soro da paciente 20 μ g; 2: soro controle 20 μ g. A albumina foi utilizada como controle interno.

Diante desses resultados, decidimos iniciar suplementação oral com selenometionina para a paciente. Após trinta dias de tratamento, na dose de 200 μ g/dia, os níveis séricos de selênio se elevaram para 58 μ g/L. Já as dosagens hormonais tireoidianas se mantiveram estáveis com o tratamento (TSH 1,2 mUI/L, T₄ livre 1,0 ng/dl e T₃ livre 3,2 pg/ml). A monitorização da paciente, em longo prazo, poderá evidenciar os potenciais benefícios dessa intervenção.

5. DISCUSSÃO

5.1. Uma nova mutação no gene do TR β causa SRHT

A Síndrome de Resistência ao Hormônio Tireoidiano (SRHT) é uma condição hereditária rara, induzida por defeitos que reduzem a responsividade dos órgãos-alvo aos hormônios tireoidianos [26]. A incidência precisa da doença é desconhecida, mas estima-se a ocorrência de um caso para cada 40.000 nascidos vivos [100].

O diagnóstico de SRHT deve ser suspeitado em todo paciente que apresente níveis elevados de T₄ e de T₃ livres na circulação, com TSH não-suprimido, na ausência de doenças intercorrentes, uso de medicações ou alterações nas globulinas transportadoras de HTs. No diagnóstico diferencial, a possibilidade de um adenoma hipofisário secretor de TSH deve ser descartada. Para isso, alguns exames complementares podem ser úteis, como a dosagem de sub-unidade alfa circulante, o teste de estímulo com TRH, e a RNM de sela túrcica [26].

Nós descrevemos o caso de uma paciente assintomática, que apresentou alterações hormonais sugestivas de SRHT. Embora o quadro clínico não fosse sugestivo de tumor hipofisário secretor de TSH, pela ausência de bócio e de sintomas de hipertireoidismo, esse diagnóstico foi definitivamente afastado pela imagem hipofisária normal, evidenciada à RNM.

O gene do TR β (THRB) consiste de 10 éxons, e todas as mutações já descritas afetam os quatro últimos, que codificam a região de dobradiça do receptor ou, mais freqüentemente, a porção carboxi-terminal, conhecida como LBD [101]. Na maioria dos casos, a presença da mutação acarreta prejuízo da ligação do HT ao receptor ou da ativação da transcrição gênica (16). Até os dias atuais, já foram descritas pelo menos 124 mutações afetando o gene THRB, dentre as quais as mutações pontuais são as mais freqüentes [38, 102, 103]. A maior família relatada na literatura é composta de 36 indivíduos portadores da mutação G344A [104].

A mutação aqui descrita resulta numa alteração no códon 431, na hélice 11 do LBD do TR β , conforme ilustra a figura 18. Esse resíduo está orientado para o interior da estrutura do receptor. Mutações nesta região, mais especificamente no códon 429, normalmente se apresentam fenotipicamente como um quadro de SRHT predominantemente hipofisária [105, 106].

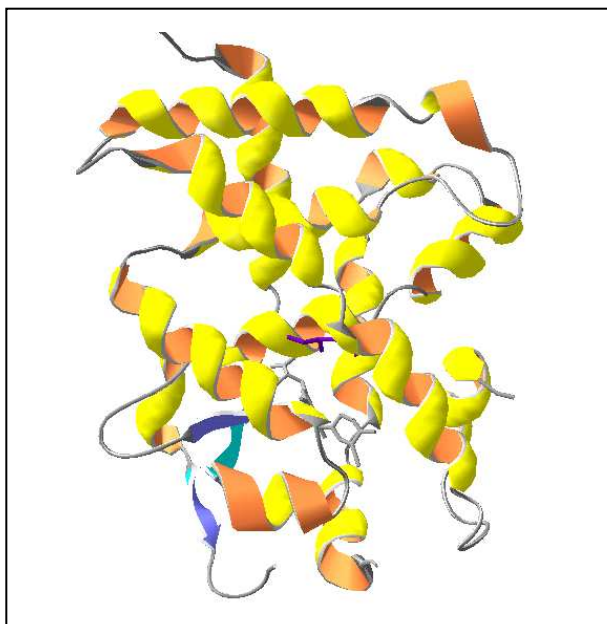


Figura 31: Estrutura cristalográfica proposta para o domínio de ligação ao hormônio do TR β humano, mostrando a localização da substituição de aminoácido no mutante I431V, na hélice 11 (em roxo). O T₃ está representado em cinza.

Outra mutação afetando o códon 431, I431T, foi descrita numa paciente que apresentava quadro clínico de SRHT predominantemente hipofisária [107]. Posteriormente, Safer e cols., num estudo que avaliou a atividade *in vitro* desse mutante, demonstraram a existência de resistência generalizada ao HT, na presença da mutação I431T [52].

No nosso estudo, o mutante I431V TR β também apresentou efeito dominante negativo tanto em DR4 como no promotor do TSH, comportando-se bioquimicamente como resistência generalizada ao HT. Tanto o mutante I431V quanto o I431T apresentaram redução na afinidade pelo T₃, de leve a moderada, o que pode ser explicado pelo fato de que tanto a valina quanto a isoleucina possuem um grupo hidrofóbico compondo a estrutura. Consonante com esses achados, em concentrações elevadas de T₃, o mutante I431V

recuperou a capacidade de recrutar o coativador SRC-1, e de regular a transcrição gênica.

Interessantemente, no mutante I431V, a dissociação do co-repressor dependente de T_3 foi marcadamente menor que a esperada para o grau de prejuízo de afinidade do receptor mutado pelo hormônio. Mesmo com altas doses de T_3 , e com recrutamento normal do co-ativador SRC-1, o mutante I431V ainda se liga ao SMRT. Resultados similares foram observados com outros TRs mutantes. Mutações localizadas na região AF-2, porção do LBD envolvida na transativação induzida pelo HT, como a mutação L454S, apresentam comportamento semelhante. Nesse mutante, a dissociação do co-repressor NCoR, na presença do hormônio, é bastante prejudicada, em comparação com a do TR selvagem [108].

Estudos anteriores do nosso grupo têm demonstrado que diversos TRs mutantes interagem de maneira aberrante com co-repressores. Para dois mutantes, P453A e P453H, envolvendo um resíduo de prolina que antecede uma hélice anfipática na porção carboxi-terminal, a dissociação de co-repressores é prejudicada. Além do mais, quando mutações artificiais capazes de abolir a interação com co-repressores são introduzidas em TRs mutantes, o efeito dominante negativo do TR mutante desaparece [109].

Outra mutação, R383H, localizada na alça entre as hélices H9 e H10, prejudica a liberação de co-repressores e induz SRHT [105, 110]. Essas propriedades também ocorrem com a mutação R429Q, que está localizada na hélice 11 [109]. Entretanto, no mutante R429Q, existe um prejuízo maior na atividade transcricional dos genes regulados negativamente pelo TR [105], ao contrário do mutante I431V, que apresenta, igualmente, prejuízo da atividade dos genes responsivos positivos e negativos.

Nós também demonstramos, através de ensaio de ligação ao T_3 , que o mutante I431V apresenta uma reduzida afinidade pelo HT. Analisados em conjunto, esses resultados são congruentes com o quadro clínico de eumetabolismo apresentado pelos indivíduos portadores da mutação.

Embora não exista tratamento para corrigir especificamente o defeito genético na SRHT, a identificação de mutações nos TRs estabelece o diagnóstico definitivo da doença, evitando-se a realização de investigações clínicas, por vezes demoradas e dispendiosas. Além disso, a avaliação

genética pode prevenir a instituição de tratamentos equivocados, e permite a realização do rastreamento familiar.

A apresentação clínica da SRHT é bastante variável, inclusive entre membros de uma mesma família, portadores de uma determinada mutação, e até em um mesmo indivíduo, ao longo da vida. Assim, o acompanhamento em longo prazo, o diagnóstico pré-natal e um aconselhamento familiar adequado são muito importantes, e se tornam possíveis com a realização da investigação genética.

Nesse estudo, nós descrevemos uma grande família portadora de uma nova mutação no gene do TR β , que prejudica a dissociação de co-repressores e induz a SRHT. Embora a maioria dos indivíduos heterozigotos tenha apresentado apenas alterações mínimas nas dosagens hormonais tireoidianas, dois membros afetados têm níveis circulantes de HTs normais, o que ilustra a variabilidade fenotípica característica da doença. O estabelecimento do diagnóstico dessa mutação permitirá o seguimento clínico e o aconselhamento familiar dos indivíduos portadores heterozigotos. Ademais, os conhecimentos sobre as mutações que afetam o TR têm sido de grande contribuição para uma melhor compreensão, não apenas da fisiopatologia da SRHT, mas também da própria fisiologia tireoidiana.

5.2. Uma nova mutação no gene *SECISBP2* causa uma nova síndrome resultante da deficiência de selenoproteínas

As desiodases são selenoproteínas que catalisam a desiodação das iodotironinas, e são importantes na ativação e na inativação dos HTs, nos diversos órgãos e tecidos (1-5). Defeitos adquiridos que ocasionam alteração na função das desiodases são comuns, sendo observados na restrição calórica e em doenças crônicas não-tireoidianas [66]. Entretanto, a descoberta de defeitos genéticos envolvendo as desiodases é bastante recente, e até o momento foram descritos apenas dois casos na literatura [32].

Na vigência de um defeito nas desiodases, a reduzida conversão de T_4 em T_3 , pela ação ineficiente da D1, tem repercussão, principalmente, sobre os hormônios circulantes, e o defeito na D2 tem maior impacto sobre os hormônios teciduais. Além disso, a conversão de rT_3 em T_2 , normalmente realizada pela D1 hepática, nessas condições, está diminuída. O resultado é a observação de níveis circulantes de T_4 e de rT_3 aumentados, com T_3 diminuído e TSH elevado [80].

A síntese das selenodesiodases requer a incorporação do aminoácido selenocisteína na molécula, e o mecanismo subjacente, comum às diversas selenoproteínas, ainda não está completamente esclarecido, embora se conheça que diversos componentes estão envolvidos. A proteína SECISBP2, ou SBP2, cujo gene está localizado no cromossomo 9 e possui 17 éxons, é um dos fatores essenciais nesse processo [70, 80]. É interessante que a inserção da selenocisteína acontece num códon UGA, conhecido por representar um códon de parada. Dessa forma, na presença de mutações no gene SBP2, pode ocorrer prejuízo na incorporação da selenocisteína, o que resulta na sinalização de término precoce na síntese protéica no códon UGA, gerando uma proteína truncada [79].

A recente descrição de mutações no gene SBP2, em pacientes que apresentam alterações no metabolismo dos HTs, suporta claramente esse conceito [32]. Entretanto, nas duas famílias descritas na literatura, ao contrário do esperado, o fenótipo apresentado pelos indivíduos afetados foi extremamente brando, o que limita as conclusões a respeito do impacto dessas mutações sobre o organismo humano.

No presente trabalho, nós descrevemos o caso de uma paciente de 11 anos e 11 meses de idade, portadora de duas novas mutações, ambas do tipo *nonsense*, em heterozigose composta, afetando o gene SBP2. A paciente apresenta um fenótipo exuberante, com alterações neurológicas caracterizadas por hipotonia precoce, neuropatia sensitiva periférica, alterações motoras e déficit cognitivo, associadas a alterações no metabolismo dos HTs, com prejuízo estatural e deficiência auditiva parcial. Doenças de herança genética recessiva e, em especial, mutações do tipo *nonsense*, costumam estar associadas a alterações clínicas severas, e a expressão fenotípica observada aqui é congruente com as mutações encontradas.

O tratamento realizado com levotiroxina em doses elevadas não foi suficiente para suprimir os níveis de TSH da paciente, diferentemente do observado com o uso de liotironina. Apenas após o uso de 4,4 µg/Kg/dia de L-T₄, os valores de TSH séricos da paciente caíram abaixo de 0,2 mUI/L. Esses achados sugerem, fortemente, um defeito na metabolização do T₄, mediada pela desidase tipo 2.

Outro dado que corrobora a presença de defeito no metabolismo dos HTs, na paciente descrita, é a semelhança do fenótipo com o observado em modelos animais. Camundongos transgênicos, com dupla deleção para os genes das desidases tipo 1 e tipo 2, apresentam níveis séricos elevados de TSH, com níveis bastante altos de T₄, T₃ baixo e rT₃ elevado, associado a um quadro de retardo do crescimento e defeito na função auditiva [29]. Já os camundongos “*knockout*” para a D2 apresentam TSH e T₄ aumentados, com T₃ normal, além de déficit auditivo e retardo do crescimento [111].

Infelizmente, não foi possível realizarmos cultura de fibroblastos da paciente. Intrigantemente, em duas tentativas distintas, realizadas por grupos de pesquisa diferentes, não houve crescimento, em cultura de células, dos fibroblastos obtidos por biópsia de pele da paciente. Várias selenoproteínas são expressas nos fibroblastos, e a maioria delas não possui função conhecida [70]. Assim, uma possibilidade seria que, na presença da mutação na SBP2, a expressão reduzida de algumas selenoproteínas nos fibroblastos teria impedido o crescimento adequado dessas células em placas de cultura.

De todas as 25 selenoproteínas conhecidas até o momento, apenas a GPx e a SelP são secretadas para o plasma, e a quase totalidade do selênio

circulante está na forma orgânica, incorporado a essas selenoproteínas [80]. Os níveis séricos reduzidos de selênio total, GPx e SeIP observados na paciente, são compatíveis com a deficiência global de selenoproteínas.

Os níveis circulantes de SeIP da paciente, determinados por Western Blotting, estão apenas discretamente reduzidos em relação aos do controle. Esse resultado sugere que a mutação na SBP2 não afeta a síntese de todas as selenoproteínas com a mesma intensidade. O mecanismo envolvido nessa seletividade não está esclarecido, mas é possível que ela ocorra em função de que a proteína SBP2 não possui a mesma afinidade pelos diversos elementos SECIS [78, 79].

Além disso, um recente trabalho, que investigou o comportamento *in vitro* da proteína SBP2 com uma das mutações descritas por Dumitrescu e cols., mostrou que o mutante SBP2 R540Q apresenta importante diminuição da ligação aos elementos SECIS da GPx1 e das desidases tipo 1 e tipo 2, porém a ligação aos elementos SECIS da GPx4 e da TrxR1 estava preservada [78]. Num outro estudo, foi demonstrado que o elemento SECIS da SeIP é o que tem maior prioridade na interação com a SBP2, enquanto os elementos SECIS da GPx e da D1 estão entre as últimas prioridades. Desta forma, é possível que mutações na SBP2 modifiquem a sua afinidade pelo elemento SECIS em algumas, mas não em todas as selenoproteínas [112].

Considerando-se os conhecimentos atuais sobre a estrutura primária da SBP2, a mutação R120X, observada em um alelo da paciente, gera uma proteína truncada com deleção completa do domínio funcional e do domínio de ligação ao RNA. Já no que se refere à mutação R770X, a deleção do segmento 771-854 diminui a capacidade da proteína se ligar ao RNA, pois para essa função é fundamental a presença do segmento entre os aminoácidos 520 a 777 [78, 112]. É interessante observar que uma mutação com uma única substituição de aminoácido (G669R) na SBP2 diminui significativamente sua atividade funcional e sua capacidade de se ligar ao RNA [113]. Conseqüentemente, a mutação em heterozigose levou a uma diminuição importante da atividade funcional da SBP2, incluindo uma redução na sua capacidade de ligação ao RNA. Novos estudos deverão esclarecer se o mutante R770X se liga com diferentes afinidades aos elementos SECIS das diferentes selenoproteínas.

A avaliação clínica e genética da família da paciente mostrou que a doença tem padrão de herança autossômico recessivo, a exemplo das outras duas famílias descritas previamente. De fato, todos os indivíduos heterozigotos para qualquer das duas mutações se mostraram completamente assintomáticos, inclusive com dosagens hormonais tireoidianas normais.

Curiosamente, as dosagens de selênio sérico dos parentes de primeiro grau da paciente, portadores de uma das mutações em heterozigose, mostraram resultados limítrofes, próximos do valor mínimo de referência para o método. A suspeita de que tanto a mutação R120X como a R770X, em heterozigose, poderiam promover alterações na economia do selênio no organismo, nos levou a realizar dosagens aleatórias de selênio sérico, em indivíduos voluntários sadios, pertencentes à mesma comunidade onde vive a paciente. Os resultados mostraram que, nessa subpopulação, os níveis médios de selênio sérico são inferiores aos observados nas populações previamente estudadas, o que pode ser explicado por uma menor disponibilidade de selênio na alimentação, nesse grupo de indivíduos. Sendo assim, nós concluímos que os indivíduos heterozigotos, portadores da mutação R120X ou da mutação R770X no gene SBP2, não apresentam qualquer expressão fenotípica relacionada à alteração genética observada.

A paciente descrita apresenta, além do fenótipo resultante do defeito no metabolismo dos HTs, um quadro de alterações neurológicas, tanto cognitivas quanto motoras, que não podem ser explicadas pelo defeito na síntese das desidases. Em 2001, foram descritas mutações no gene da selenoproteína N (SEPN1) como causadoras de um novo tipo de distrofia muscular congênita, associada à rigidez espinhal [86].

A partir daí, diversos outros relatos surgiram na literatura, e atualmente, as miopatias relacionadas à SeIN compreendem quatro desordens autossômicas recessivas, caracterizadas por alterações morfológicas musculares distintas, a saber: a distrofia muscular congênita com rigidez espinhal, a doença multimínico, a miopatia desmina-relacionada com inclusões corpúsculo de Mallory-símbles, e a desproporção tipo fibrosa congênita [86, 87, 114, 115].

Recentemente, um estudo publicado por Schara e cols. demonstrou que a expressão fenotípica nas miopatias SeIN-relacionadas é bastante variável, e

que não parece existir correlação entre fenótipo e alterações musculares histopatológicas, ou entre fenótipo e genótipo. A apresentação clínica mais freqüentemente observada tem sido a do surgimento precoce de hipotonia muscular, escoliose e espinha rígida, aliada a fraqueza muscular proximal leve a moderada e de progressão lenta, com prejuízo da função respiratória em graus variáveis de severidade. A análise histopatológica pode mostrar alterações típicas, como as lesões conhecidas como minicores, porém, em alguns pacientes, os achados são inespecíficos [116].

A paciente aqui descrita apresenta hipotonia muscular observada desde os primeiros meses de vida, hiporreflexia tendinosa profunda, fraqueza muscular proximal, predominantemente axial, afetando a cintura pélvica, com comprometimento adicional da musculatura facial, evidenciada pela semi-ptose palpebral, e escoliose. Todos esses achados são freqüentemente observados em pacientes portadores da miopatia SeIP-relacionada.

A função respiratória da paciente, avaliada através de espirometria, mostrou-se prejudicada pelo componente de fraqueza muscular, embora a capacidade vital não tenha sido comprometida. Além disso, a RNM axial mostrou hipotrofia da musculatura axial dos membros inferiores. Esses achados confirmam a presença de uma miopatia de fenótipo idêntico ao observado em pacientes com mutações no gene SEPN1.

Alterações cardiovasculares relacionadas a mutações no gene da SeIN são bastante raras, tendo sido descritos apenas distúrbios da condução, evidenciados ao eletrocardiograma, com ecocardiograma normal [117]. Na paciente aqui descrita, nenhuma alteração cardiovascular foi evidenciada até o momento. No entanto, acompanhamento criterioso se faz necessário, considerando-se o potencial papel das selenoproteínas sobre a função miocárdica, sugerido pelos estudos de Shrimali e cols. [83].

A SeIN é uma selenoproteína de localização intra-celular, cuja expressão é maior nas fases de desenvolvimento embrionário, e se reduz intensamente após o nascimento. Até o momento, as funções da SeIN são desconhecidas [70]. Na paciente portadora da mutação no gene SBP2 aqui descrita, as alterações fenotípicas são altamente sugestivas de que o defeito na síntese das selenoproteínas afetou diretamente a atividade da SeIN, de maneira similar ao observado em pacientes portadores de mutações no gene SEPN1.

Por outro lado, a paciente descrita apresenta peso acima do considerado normal para a idade, com acúmulo de gordura, predominantemente, na região abdominal, e infiltração gordurosa observada na musculatura dos membros inferiores, além de um déficit cognitivo importante. A deficiência de desidases não pode explicar esses achados. Outras alterações observadas na paciente, como desproporção entre os membros inferiores, quintos quirodáctilos curtos e genu varo, não foram descritas nos pacientes portadores de miopatias SeIN-relacionadas. É provável que esse conjunto de alterações represente a consequência de defeitos na ação de outras selenoproteínas.

Diversas selenoproteínas estão, sabidamente, envolvidas em mecanismos de proteção do organismo contra algumas doenças, em especial o câncer. Por essa razão, o interesse na melhor caracterização dessa família de proteínas tem sido crescente e, além da recente definição de algumas funções importantes, estudos futuros devem trazer contribuições valiosas aos conhecimentos nessa área [70].

Nesse estudo, não se observou nenhuma neoplasia maligna na única paciente da família, portadora da mutação nos dois alelos. Entretanto, esse aspecto não pôde ser adequadamente avaliado, uma vez que a paciente tem apenas onze anos de idade. Vários ensaios clínicos têm sugerido benefícios no uso de compostos de selênio para prevenção de neoplasias [90, 91]. Na vigência do defeito na incorporação do selênio resultante da mutação referida, esse tratamento pode ser especialmente benéfico. A paciente está em tratamento com selenometionina, com o objetivo de aumentar o aporte de selênio e, assim, de certa forma, amenizar os efeitos da alteração genética. O seguimento clínico será essencial para esclarecer potenciais benefícios da administração de selênio, nesse contexto.

Os nossos achados não apenas confirmam o conceito de que defeitos na proteína SBP2 promovem alterações na metabolização periférica dos HTs, mas também demonstram claramente a associação dessas alterações hormonais com um fenótipo clínico de defeito congênito de desidases, que não havia sido descrito na literatura previamente. E mais, nossos resultados mostram, pela primeira vez, a correlação entre deficiência de selenoproteínas e um fenótipo de alterações neurológicas cognitivas e periféricas, com repercussões tanto sobre a função sensitiva quanto motora.

6. CONCLUSÕES

Descrevemos uma nova mutação, I431V, que afeta o gene do TR β , e tem padrão de transmissão autossômico dominante. Estudos funcionais *in vitro* demonstraram que a presença da mutação prejudica a potência, sem alterar a eficácia do receptor em regular a transcrição gênica.

Além disso, descrevemos uma nova mutação em heterozigose composta, que afeta o gene SBP2, numa paciente que apresenta um fenótipo exuberante de deficiência de selenoproteínas. A possibilidade de a alteração genética encontrada corresponder a polimorfismo foi descartada pela análise de 200 alelos de indivíduos sadios.

7. PERSPECTIVAS

A Síndrome de Resistência ao Hormônio Tireoidiano abrange uma série de situações patológicas, que incluem desde as clássicas descrições de mutações no gene do TR até as recentes descobertas de mutações em genes relacionados à metabolização periférica dos HTs.

A descrição de uma nova mutação afetando o gene do TR, nesse estudo, traz relevantes contribuições não apenas para o entendimento da fisiopatologia da SRHT e de seu padrão de expressão clínica, mas também para uma melhor compreensão da própria fisiologia tireoidiana. O acompanhamento clínico desses pacientes trará informações adicionais sobre o impacto individual da mutação encontrada, nos diferentes períodos da vida.

De relevância ainda maior é a primeira descrição de duas novas mutações no gene da SBP2, em heterozigose composta, causando um fenótipo de alterações múltiplas e extensas, apresentada aqui. Nosso estudo abre uma nova perspectiva no conhecimento das funções das diversas selenoproteínas, no organismo humano. Modelos experimentais das mutações aqui descritas poderão constituir, no futuro, armas valiosas para uma compreensão mais abrangente e completa do papel dos compostos de selênio sobre as diversas funções orgânicas.

REFERÊNCIAS

1. Azevedo M.F., S.B., Maia L., Leal E, *Interpretação dos testes de função tiroídiana*, in *Endocrinologia Clínica*. 2006: Rio de Janeiro. p. 219-239.
2. Ribeiro, R.C., et al., *The molecular biology of thyroid hormone action*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **758**: p. 366-89.
3. Yen, P.M., *Physiological and molecular basis of thyroid hormone action*. Physiol Rev, 2001. **81**(3): p. 1097-142.
4. Larsen, P.R., Davies, T.F., Schlumberger, M., Hay, I.D., *Thyroid Physiology and Diagnostic Evaluation of Patients with Thyroid Disorders*, in *Williams Textbook of Endocrinology*. P.R. Larsen, Kronenberg, H.M., Melmed, S., Polonsky, K.S., Editor. 2003, Saunders: Philadelphia. p. 331-373.
5. Ribeiro, R.C., et al., *Mechanisms of thyroid hormone action: insights from X-ray crystallographic and functional studies*. Recent Prog Horm Res, 1998. **53**: p. 351-92; discussion 392-4.
6. Hennemann, G., et al., *Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability*. Endocr Rev, 2001. **22**(4): p. 451-76.
7. Friesema, E.C., et al., *Thyroid hormone transporters*. Vitam Horm, 2005. **70**: p. 137-67.
8. Lazar, M.A., *Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities*. Endocr Rev, 1993. **14**(2): p. 184-93.
9. Brent, G.A., *The molecular basis of thyroid hormone action*. N Engl J Med, 1994. **331**(13): p. 847-53.
10. Ribeiro, R.C., et al., *X-ray crystallographic and functional studies of thyroid hormone receptor*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1998. **65**(1-6): p. 133-41.
11. Ribeiro, R.C., P.J. Kushner, and J.D. Baxter, *The nuclear hormone receptor gene superfamily*. Annu Rev Med, 1995. **46**: p. 443-53.
12. McKenna, N.J., R.B. Lanz, and B.W. O'Malley, *Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology*. Endocr Rev, 1999. **20**(3): p. 321-44.
13. Horlein, A.J., et al., *Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor*. Nature, 1995. **377**(6548): p. 397-404.
14. Glass, C.K., D.W. Rose, and M.G. Rosenfeld, *Nuclear receptor coactivators*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 222-32.
15. Wu, Y., B. Xu, and R.J. Koenig, *Thyroid hormone response element sequence and the recruitment of retinoid X receptors for thyroid hormone responsiveness*. J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 3929-36.
16. Wagner, R.L., et al., *A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor*. Nature, 1995. **378**(6558): p. 690-7.
17. Flamant, F. and J. Samarut, *Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice*. Trends Endocrinol Metab, 2003. **14**(2): p. 85-90.
18. Cheng, S.Y., *Thyroid hormone receptor mutations and disease: beyond thyroid hormone resistance*. Trends Endocrinol Metab, 2005. **16**(4): p. 176-82.
19. Barra, G.B., et al., *[Molecular mechanism of thyroid hormone action]*. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2004. **48**(1): p. 25-39.

20. Velasco, L.F., et al., *Thyroid hormone response element organization dictates the composition of active receptor*. J Biol Chem, 2007. **282**(17): p. 12458-66.
21. Oetting, A. and P.M. Yen, *New insights into thyroid hormone action*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2007. **21**(2): p. 193-208.
22. Yen, P.M., *Molecular basis of resistance to thyroid hormone*. Trends Endocrinol Metab, 2003. **14**(7): p. 327-33.
23. Bassett, J.H., C.B. Harvey, and G.R. Williams, *Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions*. Mol Cell Endocrinol, 2003. **213**(1): p. 1-11.
24. Davis, P.J. and F.B. Davis, *Nongenomic actions of thyroid hormone*. Thyroid, 1996. **6**(5): p. 497-504.
25. Lin, H.Y., et al., *Identification of the putative MAP kinase docking site in the thyroid hormone receptor-beta1 DNA-binding domain: functional consequences of mutations at the docking site*. Biochemistry, 2003. **42**(24): p. 7571-9.
26. Refetoff, S., R.E. Weiss, and S.J. Usala, *The syndromes of resistance to thyroid hormone*. Endocr Rev, 1993. **14**(3): p. 348-99.
27. Refetoff, S., L.T. DeWind, and L.J. DeGroot, *Familial syndrome combining deaf-mutism, stuppled epiphyses, goiter and abnormally high PBI: possible target organ refractoriness to thyroid hormone*. J Clin Endocrinol Metab, 1967. **27**(2): p. 279-94.
28. Usala, S.J., et al., *Tight linkage between the syndrome of generalized thyroid hormone resistance and the human c-erbA beta gene*. Mol Endocrinol, 1988. **2**(12): p. 1217-20.
29. Refetoff, S. and A.M. Dumitrescu, *Syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone: genetic defects in hormone receptors, cell transporters and deiodination*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2007. **21**(2): p. 277-305.
30. Dumitrescu, A.M., et al., *A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene*. Am J Hum Genet, 2004. **74**(1): p. 168-75.
31. Friesema, E.C., et al., *Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation*. Lancet, 2004. **364**(9443): p. 1435-7.
32. Dumitrescu, A.M., et al., *Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism*. Nat Genet, 2005. **37**(11): p. 1247-52.
33. Sakurai, A., 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**(22): p. 8977-81.
34. Refetoff, S., *Resistance to thyroid hormone*, in *Werner and Ingbar's The Thyroid: a Fundamental and Clinical Text*, L.E. Braverman, Utiger, R.E., Editor. 2005, Lippincott, Williams and Wilkins: Philadelphia. p. 1109-1129.
35. Beck-Peccoz, P. and V.K. Chatterjee, *The variable clinical phenotype in thyroid hormone resistance syndrome*. Thyroid, 1994. **4**(2): p. 225-32.
36. Weiss, R.E., M. Weinberg, and 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**(6): p. 2408-15.
37. Sato, H., et al., *Evaluation of thyroid hormone action in a case of generalized resistance to thyroid hormone with chronic thyroiditis: discovery of a novel heterozygous missense mutation (G347A)*. Endocr J, 2007. **54**(5): p. 727-32.

38. Furlanetto, T.W., et al., *A novel mutation (M310L) in the thyroid hormone receptor beta causing resistance to thyroid hormone in a Brazilian kindred and a neonate*. *Mol Genet Metab*, 2000. **71**(3): p. 520-6.
39. Magalhaes, P.K., et al., *Clinical features and genetic analysis of four Brazilian kindreds with resistance to thyroid hormone*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2007. **67**(5): p. 748-53.
40. Wu, S.Y., et al., *A novel thyroid hormone receptor-beta mutation that fails to bind nuclear receptor corepressor in a patient as an apparent cause of severe, predominantly pituitary resistance to thyroid hormone*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(5): p. 1887-95.
41. Chatterjee, V.K., et al., *Thyroid hormone resistance syndrome. Inhibition of normal receptor function by mutant thyroid hormone receptors*. *J Clin Invest*, 1991. **87**(6): p. 1977-84.
42. Furuya, F., et al., *Novel functions of thyroid hormone receptor mutants: beyond nucleus-initiated transcription*. *Steroids*, 2007. **72**(2): p. 171-9.
43. Florkowski, C.M., et al., *Thyroid hormone resistance: the role of mutational analysis*. *Intern Med J*, 2006. **36**(11): p. 738-41.
44. Jameson, J.L., *Mechanisms by which thyroid hormone receptor mutations cause clinical syndromes of resistance to thyroid hormone*. *Thyroid*, 1994. **4**(4): p. 485-92.
45. Yen, P.M., et al., *New insights on the mechanism(s) of the dominant negative effect of mutant thyroid hormone receptor in generalized resistance to thyroid hormone*. *J Clin Invest*, 1992. **90**(5): p. 1825-31.
46. Carvalho, G.A. and H.E. Ramos, *[Thyroid hormone resistance syndrome]*. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2004. **48**(1): p. 83-92.
47. Brucker-Davis, F., 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**(8): p. 572-83.
48. Refetoff, S., et al., *Resistance to thyrotropin and other abnormalities of the thyrotropin receptor*. *Recent Prog Horm Res*, 1996. **51**: p. 97-120; discussion 120-2.
49. Ribeiro, R.C., et al., *Definition of the surface in the thyroid hormone receptor ligand binding domain for association as homodimers and heterodimers with retinoid X receptor*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(18): p. 14987-95.
50. Mamasiri, S., et al., *Mosaicism of a thyroid hormone receptor-beta gene mutation in resistance to thyroid hormone*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(9): p. 3471-7.
51. Hayashi, Y., et al., *Selective pituitary resistance to thyroid hormone produced by expression of a mutant thyroid hormone receptor beta gene in the pituitary gland of transgenic mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **245**(1): p. 204-10.
52. Safer, J.D., et al., *Isoform variable action among thyroid hormone receptor mutants provides insight into pituitary resistance to thyroid hormone*. *Mol Endocrinol*, 1997. **11**(1): p. 16-26.
53. Persani, L., et al., *Evidence for the secretion of thyrotropin with enhanced bioactivity in syndromes of thyroid hormone resistance*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994. **78**(5): p. 1034-9.
54. Beck-Peccoz, P., et al., *Syndromes of hormone resistance in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2006. **20**(4): p. 529-46.

55. Kim, T.J. and S. Travers, *Case report: thyroid hormone resistance and its therapeutic challenges*. *Curr Opin Pediatr*, 2008. **20**(4): p. 490-3.
56. Anselmo, J., et al., *Fetal loss associated with excess thyroid hormone exposure*. *JAMA*, 2004. **292**(6): p. 691-5.
57. Dhingra, S., et al., *Resistance to thyroid hormone in pregnancy*. *Obstet Gynecol*, 2008. **112**(2 Pt 2): p. 501-3.
58. Weiss, R.E., et al., *Dominant inheritance of resistance to thyroid hormone not linked to defects in the thyroid hormone receptor alpha or beta genes may be due to a defective cofactor*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996. **81**(12): p. 4196-203.
59. Friesema, E.C., et al., *Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(41): p. 40128-35.
60. Friesema, E.C., et al., *Mechanisms of disease: psychomotor retardation and high T3 levels caused by mutations in monocarboxylate transporter 8*. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2006. **2**(9): p. 512-23.
61. Gereben, B., et al., *Cellular and Molecular Basis of Deiodinase-Regulated Thyroid Hormone Signaling*. *Endocr Rev*, 2008.
62. Adler, S.M. and L. Wartofsky, *The nonthyroidal illness syndrome*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2007. **36**(3): p. 657-72, vi.
63. Koenig, R.J., *Regulation of type I iodothyronine deiodinase in health and disease*. *Thyroid*, 2005. **15**(8): p. 835-40.
64. Brent, G.A. and J.M. Hershman, *Thyroxine therapy in patients with severe nonthyroidal illnesses and low serum thyroxine concentration*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1986. **63**(1): p. 1-8.
65. Gereben, B., et al., *Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences*. *Cell Mol Life Sci*, 2008. **65**(4): p. 570-90.
66. Bianco, A.C., et al., *Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases*. *Endocr Rev*, 2002. **23**(1): p. 38-89.
67. Croteau, W., et al., *Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(28): p. 16569-75.
68. Callebaut, I., et al., *The iodothyronine selenodeiodinases are thioredoxin-fold family proteins containing a glycoside hydrolase clan GH-A-like structure*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(38): p. 36887-96.
69. Galton, V.A., et al., *Thyroid hormone homeostasis and action in the type 2 deiodinase-deficient rodent brain during development*. *Endocrinology*, 2007. **148**(7): p. 3080-8.
70. Papp, L.V., et al., *From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health*. *Antioxid Redox Signal*, 2007. **9**(7): p. 775-806.
71. Leinfelder, W., et al., *Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine*. *Nature*, 1988. **331**(6158): p. 723-5.
72. Lee, B.J., et al., *Identification of a selenocysteyl-tRNA(Ser) in mammalian cells that recognizes the nonsense codon, UGA*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(17): p. 9724-7.
73. Howard, M.T., et al., *Recoding elements located adjacent to a subset of eukaryal selenocysteine-specifying UGA codons*. *EMBO J*, 2005. **24**(8): p. 1596-607.
74. Copeland, P.R., et al., *A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs*. *EMBO J*, 2000. **19**(2): p. 306-14.

75. Fagegaltier, D., et al., *Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation*. EMBO J, 2000. **19**(17): p. 4796-805.
76. Chavatte, L., B.A. Brown, and D.M. Driscoll, *Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(5): p. 408-16.
77. Xu, X.M., et al., *Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble liver antigen, in the selenoprotein synthesis machinery*. J Biol Chem, 2005. **280**(50): p. 41568-75.
78. Bubenik, J.L. and D.M. Driscoll, *Altered RNA binding activity underlies abnormal thyroid hormone metabolism linked to a mutation in selenocysteine insertion sequence-binding protein 2*. J Biol Chem, 2007. **282**(48): p. 34653-62.
79. Squires, J.E., et al., *SBP2 binding affinity is a major determinant in differential selenoprotein mRNA translation and sensitivity to nonsense-mediated decay*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(22): p. 7848-55.
80. Kohrle, J., et al., *Selenium, the thyroid, and the endocrine system*. Endocr Rev, 2005. **26**(7): p. 944-84.
81. Bosl, M.R., et al., *Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(11): p. 5531-4.
82. Lu, J. and A. Holmgren, *Selenoproteins*. J Biol Chem, 2008.
83. Shrimali, R.K., et al., *Selenoprotein expression is essential in endothelial cell development and cardiac muscle function*. Neuromuscul Disord, 2007. **17**(2): p. 135-42.
84. Moghadaszadeh, B. and A.H. Beggs, *Selenoproteins and their impact on human health through diverse physiological pathways*. Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 307-15.
85. Schomburg, L., et al., *Synthesis and metabolism of thyroid hormones is preferentially maintained in selenium-deficient transgenic mice*. Endocrinology, 2006. **147**(3): p. 1306-13.
86. Moghadaszadeh, B., et al., *Mutations in SEPNI cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome*. Nat Genet, 2001. **29**(1): p. 17-8.
87. Ferreira, A., et al., *Mutations of the selenoprotein N gene, which is implicated in rigid spine muscular dystrophy, cause the classical phenotype of multimincore disease: reassessing the nosology of early-onset myopathies*. Am J Hum Genet, 2002. **71**(4): p. 739-49.
88. Petit, N., et al., *Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(9): p. 1045-53.
89. Clark, L.C., et al., *Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group*. JAMA, 1996. **276**(24): p. 1957-63.
90. Lippman, S.M., et al., *Designing the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT)*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(2): p. 94-102.
91. Stratton, M.S., et al., *Selenium and prevention of prostate cancer in high-risk men: the Negative Biopsy Study*. Anticancer Drugs, 2003. **14**(8): p. 589-94.
92. Low, S.C., et al., *SECIS-SBP2 interactions dictate selenocysteine incorporation efficiency and selenoprotein hierarchy*. EMBO J, 2000. **19**(24): p. 6882-90.

93. Copeland, P.R., *Regulation of gene expression by stop codon recoding: selenocysteine*. *Gene*, 2003. **312**: p. 17-25.
94. Kohrle, J., *Selenium and the control of thyroid hormone metabolism*. *Thyroid*, 2005. **15**(8): p. 841-53.
95. Walsh, P.S., D.A. Metzger, and R. Higuchi, *Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material*. *Biotechniques*, 1991. **10**(4): p. 506-13.
96. Feng, W., et al., *Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors*. *Science*, 1998. **280**(5370): p. 1747-9.
97. Webb, P., P. Nguyen, and P.J. Kushner, *Differential SERM effects on corepressor binding dictate ERalpha activity in vivo*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(9): p. 6912-20.
98. Leitman, D.C., et al., *Thyroid hormone activation of transcription is potentiated by activators of cAMP-dependent protein kinase*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(36): p. 21950-5.
99. Sambrook, J.F., E. F.; Maniatis, T. , *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1989.
100. Lafranchi, S.H., et al., *Follow-up of newborns with elevated screening T4 concentrations*. *J Pediatr*, 2003. **143**(3): p. 296-301.
101. Kim, J.H., et al., *A newly identified insertion mutation in the thyroid hormone receptor-beta gene in a Korean family with generalized thyroid hormone resistance*. *J Korean Med Sci*, 2007. **22**(3): p. 560-3.
102. Frank-Raue, K., et al., *Severe form of thyroid hormone resistance in a patient with homozygous/hemizygous mutation of T3 receptor gene*. *Eur J Endocrinol*, 2004. **150**(6): p. 819-23.
103. Kong, A.P., et al., *Resistance to thyroid hormone in a Chinese family with R429Q mutation in the thyroid hormone receptor beta gene*. *Hong Kong Med J*, 2005. **11**(2): p. 125-9.
104. Kvistad, P.H., et al., *Retarded bone growth in thyroid hormone resistance. A clinical study of a large family with a novel thyroid hormone receptor mutation*. *Eur J Endocrinol*, 2004. **150**(4): p. 425-30.
105. Flynn, T.R., et al., *A novel C-terminal domain in the thyroid hormone receptor selectively mediates thyroid hormone inhibition*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(52): p. 32713-6.
106. Cohen, R.N., et al., *The nuclear corepressors recognize distinct nuclear receptor complexes*. *Mol Endocrinol*, 2000. **14**(6): p. 900-14.
107. Adams, M., et al., *Genetic analysis of 29 kindreds with generalized and pituitary resistance to thyroid hormone. Identification of thirteen novel mutations in the thyroid hormone receptor beta gene*. *J Clin Invest*, 1994. **94**(2): p. 506-15.
108. Tagami, T., et al., *A novel natural mutation in the thyroid hormone receptor defines a dual functional domain that exchanges nuclear receptor corepressors and coactivators*. *Mol Endocrinol*, 1998. **12**(12): p. 1888-902.
109. Yoh, S.M., V.K. Chatterjee, and M.L. Privalsky, *Thyroid hormone resistance syndrome manifests as an aberrant interaction between mutant T3 receptors and transcriptional corepressors*. *Mol Endocrinol*, 1997. **11**(4): p. 470-80.
110. Clifton-Bligh, R.J., et al., *A novel TR beta mutation (R383H) in resistance to thyroid hormone syndrome predominantly impairs corepressor release and negative transcriptional regulation*. *Mol Endocrinol*, 1998. **12**(5): p. 609-21.

111. Schneider, M.J., et al., *Targeted disruption of the type 2 selenodeiodinase gene (DIO2) results in a phenotype of pituitary resistance to T4*. Mol Endocrinol, 2001. **15**(12): p. 2137-48.
112. Caban, K. and P.R. Copeland, *Size matters: a view of selenocysteine incorporation from the ribosome*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(1): p. 73-81.
113. Copeland, P.R., V.A. Stepanik, and D.M. Driscoll, *Insight into mammalian selenocysteine insertion: domain structure and ribosome binding properties of Sec insertion sequence binding protein 2*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(5): p. 1491-8.
114. Clarke, N.F., et al., *SEPNI: associated with congenital fiber-type disproportion and insulin resistance*. Ann Neurol, 2006. **59**(3): p. 546-52.
115. Ferreiro, A., et al., *Desmin-related myopathy with Mallory body-like inclusions is caused by mutations of the selenoprotein N gene*. Ann Neurol, 2004. **55**(5): p. 676-86.
116. Schara, U., et al., *The phenotype and long-term follow-up in 11 patients with juvenile selenoprotein N1-related myopathy*. Eur J Paediatr Neurol, 2008. **12**(3): p. 224-30.
117. Flanigan, K.M., et al., *Congenital muscular dystrophy with rigid spine syndrome: a clinical, pathological, radiological, and genetic study*. Ann Neurol, 2000. **47**(2): p. 152-61.

APÊNDICE

Artigo aceito para publicação na Revista “Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia”

A Novel Mutation of Thyroid Hormone Receptor Beta (I431V) Impairs Corepressor Release, and Induces Thyroid Hormone Resistance Syndrome

Monalisa Ferreira Azevedo^{1,3}, Gustavo Barcelos Barra^{1,2}, Ligiane Dantas de Medeiros¹, Luiz Alberto Simeoni¹, Luciana Anselmi Naves³, Francisco de Assis da Rocha Neves¹

Affiliations:

¹ Laboratory of Molecular Pharmacology, Faculty of Health Sciences, University of Brasília – UnB, Brasília, DF, Brazil.

² Sabin Institute and Laboratory of Clinical Analysis, Brasilia, DF, Brazil.

³ Section of Endocrinology, University Hospital of Brasilia, Faculty of Medicine, University of Brasilia - UnB, Brasilia, DF, Brazil.

Correspondence to:

Francisco de Assis Rocha Neves

Laboratório de Farmacologia Molecular

Universidade de Brasília

Caixa Postal 4473

70919-970 – Brasília, DF

Fax: (61) 33474622

e-mail: chico@unb.br

Abreviate title: Thyroid Hormone Resistance Syndrome

Abstract

Resistance to thyroid hormone (RTH) is a rare disorder characterized by variable tissue hyporesponsiveness to thyroid hormone, usually caused by mutations in the thyroid hormone receptor beta (TR β). We describe a large Brazilian family harboring a novel mutation affecting TR β gene and inducing RTH. A 14-year-old girl was found to have elevated free T₄ and free T₃ plasma concentrations in coexistence with unsuppressed TSH and a questionable goiter. The diagnosis of RTH was verified by identification of a novel mutation (I431V) in the TR β gene. Sixteen asymptomatic relatives of the probanda are also affected by the mutation. Functional studies showed that I431V mutation exerts dominant-negative effect on wild type TR β , mainly by impairment of ligand-dependent release of corepressor SMRT. The presence of this mutation reduces potency, but does not affect efficacy of thyroid hormone action, in accordance with the clinical picture of eumetabolism of the affected individuals.

Keywords: Thyroid hormone resistance; Thyroid hormone receptor; Coregulator; Mutation

Resumo

A Resistência ao Hormônio Tireoideano (RHT) é uma doença rara, causada por variável hiporresponsividade dos tecidos aos hormônios tireoideanos, usualmente causada por mutações no receptor beta do hormônio tireoideano (TR β). Descrevemos uma grande família brasileira portadora de uma nova mutação afetando o gene do TR β , induzindo RHT. Uma paciente de 14 anos de idade apresentou concentrações plasmáticas elevadas de T₄ e T₃ livres, associadas a TSH não-suprimido e bócio questionável. O diagnóstico de RHT foi estabelecido pela identificação da mutação I431V no gene do TR β . Dezesesseis parentes assintomáticos da probanda também são afetados pela mutação. Estudos funcionais mostram que a mutação I431V exerce efeito dominante negativo sobre o TR selvagem, basicamente, por prejudicar a liberação do correpressor SMRT ligante-dependente. A presença desta mutação reduz a potência, mas não afeta a eficácia da ação do hormônio tireoideano, o que está de acordo com a apresentação clínica de eumetabolismo dos indivíduos afetados.

Descritores: Síndrome de resistência ao hormônio tireoideano; Receptor do hormônio tireoideano; Corregulador; Mutação

INTRODUCTION

Thyroid hormone resistance (RTH) is a rare autosomal dominant disorder, characterized by reduced target tissues responsiveness to thyroid hormones (1). Since Refetoff et al. initially described this syndrome in 1967 (2), over 1,000 cases have been identified (3).

The hallmarks of the disorder are high levels of free thyroxine (FT₄) in serum, and elevated or inappropriately elevated levels of thyroid-stimulating hormone (TSH). Clinical phenotype is heterogeneous, varying between different families and also among affected members of the same family. Characteristically, there is a paucity of specific clinical manifestations. When present, the most common clinical findings are goiter, learning disabilities with or without hyperactive behavior, developmental delay, and sinus tachycardia. Symptoms of hypo and hyperthyroidism may coexist in the same patient, suggesting variable degrees of resistance in different tissues (4,5).

Thyroid hormone receptors (TRs) are ligand-dependent transcription factors, which mediate the biological activities of T₃. TRs exist in two isoforms that are encoded for by the THRA and THRB genes, which are located on chromosomes 3 and 17, respectively. The distribution of TRs α and β in the diverse organs is heterogeneous, although thyroid hormone has the same affinity for both isoforms (6).

TRs modulate gene expression by binding specific DNA sequences, known as thyroid response elements (TREs), found in the promoters of TR-regulated genes. TREs are composed of repeats of the consensus half-site AGGTCA in a variety of different orientations, including direct repeats spaced by four nucleotides (DR4), inverted palindromes (F2) and palindromes (TREpal) (7). TR activities are primarily controlled by the presence of ligand. Unliganded TRs recruit corepressor proteins such as N-CoR

and SMRT, which, in turn, form part of a large corepressor complex that represses transcription of nearby genes (8,9). Hormone binding induces conformation changes in TR that cause corepressor release and subsequent recruitment of coactivators such as GRIP1 and SRC-1 and the TRAP/DRIP complex (8,9). TR activities are, however, also influenced by choice of oligomeric state. TRs preferentially form heterodimers with retinoid X receptors (RXRs), but also function as homodimers or monomers (7,8).

The molecular basis of RTH in approximately 85% of subjects is heterozygous mutations of the thyroid hormone receptor (TR) β gene, resulting in impaired triiodothyronine (T_3) binding and/or transactivation function. The severity of resistance depends on the degree of impaired ligand binding and/or interaction with tissue-specific nuclear cofactors (10,11). Characterization of families and sporadic cases with RTH has shown that all the mutations are located in the ligand binding domain of TR β 1 and thus far, no mutations have been identified in the DBD or N-terminal region of TR β 1 (9). Moreover, no germline mutations in TR α 1 have been described in humans (6). Interestingly, in addition to being non-functional, the RTH mutants inhibit the action of their wild type counterparts. This dominant-negative effect by the mutant receptors may explain the dominant mode of inheritance as well as resistance to hormone action (8-9).

In this study, we describe the clinical findings and laboratory data from three generations of a large family harboring a novel TR β mutation (I431V), and evaluate the functional profile of this mutant TR β through *in vitro* and cell culture studies. Our data suggest that the mutant I431V TR β impairs corepressor release, leading to a clinical picture of RTH.

PATIENTS AND METHODS

Case Report

The proposita, a 14-year-old Brazilian girl, came to medical attention because of goiter. She had no other complaints, and had normal neurological and psychological development. On physical examination, she had normal stature, normal heart rate, and no neurological or other abnormalities. Serum TSH was 1,92 μ UI/L (normal range, 0,3–5,0), free T₄ (FT₄) was 2,31 ng/dL (normal range, 0,75–1,8), and free T₃ (FT₃) was 0,78 ng/dL (normal range, 0,3–0,51), on repeated occasions. Thyroid peroxidase antibody was negative, and thyroid ultrasonography was normal. Blood samples were obtained from all family members, all of them asymptomatic for thyroid diseases. Informed consents were obtained for this study approved by the Ethics Committee from the University of Brasilia.

Measurements of hormones in serum

FT₄, FT₃ and TSH were measured by chemiluminescence assay, using Kit ADVIA CENTAUR (Centaur, Siemens).

TR β sequencing

Genomic DNA of the proposita and her family members was extracted from 50 μ l whole blood by the Chelex-100 method (12), and exons 9 and 10 of the TR β were gene amplified through PCR, using the sense and antisense oligonucleotide primers described by Adams *et al* (13). The products of amplification were sequenced directly using the automated sequencing ABI-377 (Perkin-Elmer Corp., Foster City, CA, USA).

To examine the family members we used PCR based restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis since the sequence variant identified here introduces a new BccI (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA) recognition site in exon 10.

Plasmids

To perform functional studies, we used the following plasmids: T₃-inducible reporters containing two copies of each TRE driving luciferase expression, mammalian (pCMX) expression vectors for TR and RXR (14), GST fusion expression vectors (pGEX) for SMRT (15), SRC-1 (16) and RXR (14).

New TR mutants reported in our studies (pCMX-TR β I431V and pGEX-TRI431V) were created in existing vectors using QuikChange site-directed mutagenesis kits (Stratagene). The construct was checked for correct DNA insertion and presence of mutation by automated DNA sequencing ABI-377 (Perkin-Elmer Corp., Foster City, CA, USA).

Mammalian Cell Culture, Electroporation, and Luciferase Assays

Human promonocyte U937 cells were maintained at 37°C, 5% CO₂, subcultured in RPMI 1640 media with 10% newborn bovine serum, 2mM glutamine, 50units/ml penicillin, and 50 μ g/ml streptomycin. Transfections were carried out as described previously (17). After incubation for 24h at 37°C with ethanol or T₃, cells were collected by centrifugation, and pellets were solubilized by addition of 150 μ l of 0.25M Tris-HCl, pH 7.6, containing 0.1% Triton X-100. Luciferase activity was analyzed by standard methods (luciferase assay system, Promega). Experiments were performed in triplicate and expressed as fold induction \pm SEM.

Glutathione S-Transferase Pull-Down Assays

pCMX-TR β 1wt or pCMX-TRI431V vectors were used to produce radiolabeled full-length receptor *in vitro*, using the TNT-Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) and [³⁵S]methionine. GST SRC1a (381–882), GST-RXR (full-length), and GST-SMRT (987–1491) fusion proteins were prepared using conventional protocols (Pfizer, New York, NY). In brief, the plasmids were transformed into BL21, cultured into 2xLB medium, pelleted and resuspended in 1xTST buffer (50mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, and 0.05% Tween 20) with 1mM DTT, 0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and protease inhibitor cocktail 1:1000 (Sigma, St. Louis, MO). Then, the solution was incubated with lysozyme and sonicated (three 2.5-min cycles, amplitude 70%, 1 pulse/s with a break of 5 min between each cycle). The debris were pelleted and the supernatant was incubated for 2h with 500 μ l of glutathione-Sepharose 4B beads equilibrated with 1x TST. GST fusion protein beads were washed with 1x TST containing 0.05% Nonidet P-40 and resuspended in 1x TST with 1mM DTT, 0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride, protease inhibitor cocktail 1:1000 (Sigma), and 50% glycerol, and then stored at minus 20°C. All procedures above were carried out at 4°C. For the binding assay, the glutathione bead suspension containing 4 μ g of GST fusion protein was incubated with 3 μ l of ³⁵S-labeled protein in 150 μ l of 1x TST buffer with 0.1% Nonidet P-40, 0.1% Triton X-100, 1 mM DTT, and 2 g/ml bovine serum albumin, in the presence of 10⁻⁶M T₃ or vehicle. After a 2h incubation at 4°C, the beads were washed with the same incubation buffer. The beads with associated proteins were analyzed on 10% SDS-polyacrylamide gels and visualized by autoradiography.

T₃ Binding Assay

TRs were expressed using the TNT T7 quick coupled transcription translation system (Promega). The affinities of T₃ binding were determined using a saturation binding assay. 15 fmol of each *in vitro* translated protein were incubated overnight at 4°C with varying concentrations of [¹²⁵I]T₃ (PerkinElmer Life Sciences) in 100µl of E400 buffer (400mM NaCl, 20mM KPO₄, pH 8, 0.5mM EDTA, 1.0mM MgCl₂, 10% glycerol), 1mM monothioglycerol, and 50µg of calf thymus histones (Calbiochem). The bound [¹²⁵I]T₃ was isolated by gravity flow through a 2ml Sephadex G-25 (Amersham Biosciences) column and quantified using a gamma-counter (Cobra II – PACKARD, Austrália). Binding curves were fit by nonlinear regression, and equilibrium dissociation constant (Kd) values were calculated using the one-site saturation binding model, contained in the Prism version 4.00 program (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Statistics

Student's t-test or one-way analysis of variance followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test was employed for assessment of significance (Prism version 4.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Differences were considered to be significant at p<0.05.

RESULTS

A novel mutation was found in the TRβ of the proposita and her family

Sequencing of PCR products in both directions revealed an heterozygous missense mutation (A → G) in exon 10 of the TRβ gene, which resulted in replacement of a normal isoleucine for a valine at codon 431 (I431V).

Investigation of family members, by PCR based restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, showed other 16 heterozygous individuals (figure 1). Affected members are distributed through three generations, and none of them presented any thyroid related symptom or have had previously suspected RHT diagnosis.

Once the proposita showed only minimal phenotype alterations, characterized by normal physical examination, including absence of goiter and tachycardia, and mild elevation on FT₃ and FT₄ levels with unsuppressed TSH levels, we decided to investigate all the affected family members. Among these 16 individuals, all but three had serum thyroid hormone levels similar to those found in the proposita (figure 2). One affected patient's aunt had elevated TSH level (51mUI/L) with low-normal FT₄, reduced FT₃ and a positive test for thyroperoxidase autoantibodies, configuring concomitant primary hypothyroidism, not previously suspected (data not shown). Other two affected members presented normal hormonal dosages (figure 2). Moreover, all of them were completely asymptomatic, including the hypothyroid patient.

I431V reduces sensitivity, but does not affect efficacy of thyroid hormone action

The transcriptional properties of the I431V mutant were examined by transfection assays, using either the mutant or wild type TR β 1 isoform together with a reporter gene containing positively regulated thyroid hormone receptor response elements (TREs), in eukaryotes U937 cells. At lower T₃ concentrations, transient transfection studies with a reporter gene containing DR4, F2 and TREpal responsive element showed decreased transcriptional activation induced by TR β I431V. Otherwise, utilizing higher amounts of T₃, this defect has been overcome. Therefore, at 100 nM and 1 μ M T₃ concentrations, TR β I431V transcriptional activity was fully, and achieved the greater maximal response comparable to wt TR β 1 (figure 3A, B and C). EC50 values

obtained at DR4 responsive element were 33 fold greater for TR β I431V, compared to wt TR β (EC50 for wt TR β $9,91 \times 10^{-9}$ M; EC50 for TR β I431V $3,01 \times 10^{-8}$ M). Similar results were observed at F2 responsive element, where EC50 for TR β I431V was 5 fold greater than for wt TR β (EC50 for wt TR β $1,63 \times 10^{-8}$ M vs $8,17 \times 10^{-8}$ M for I431V TR β), and at TREpal, where it was 3 fold greater for TR β I431V (EC50 $1,06 \times 10^{-8}$ for wt TR β vs $3,26 \times 10^{-8}$ for I431V TR β).

Next, we examined the mutant transcriptional properties with the negatively regulated target gene promoter, *i.e.* the human pituitary TSH α subunit. At TSH promoter, TR β I431V showed a reduced capacity to repress transcription at lower T₃ concentrations (1nM and 10nM), but not at higher concentrations of 100 nM and 1 μ M. Therefore, the dose-response curve is also slightly shifted to the left, as shown in figure 3D. Collectively, these results showed that I431V TR β has impaired sensitivity, keeping the maximum response (efficacy) similar to wt TR β 1.

I431V exerts dominant-negative effect on TR β

Having established the functional capabilities of I431V TR β , the ability of this mutant to modulate the activity of wt TR β 1 (dominant negative effect) was examined. Wild type β receptor was co-transfected with equal concentrations of I431V. Under these conditions, I431V markedly inhibited both positive (DR4) and negative (TSH) transcriptional responses mediated by the wild type receptor (Figure 4).

I431V demonstrate impaired ligand-dependent release of SMRT

To further characterize whether the I431V mutant retained the ability to interact with nuclear co-factors, we performed GST pull down assay. Figure 5A shows that TR β I431V recruitment of the coactivator SRC-1 is slightly reduced, compared to TR β wt.

However, it is noteworthy that I431V TR β retains the corepressor SMRT stronger than does wt TR β , even at higher T₃ concentrations, such as 100 nM and 1 μ M (figure 5B). On contrary, I431V TR β heterodimerization with RXR was similar to wt TR β (figure 6).

I431V binding affinity is reduced

T₃ binding assay was performed to address thyroid hormone binding affinity of TR β I431V. Our results showed that TR β I431V affinity for T₃ was 2.6 times lower than TR β wt (Kd for TR β wt 0,188nM vs 0,49nM for I431V) .

DISCUSSION

RHT is an inherited condition induced by defects that reduce the responsiveness of the target tissues to thyroid hormone (1). The precise incidence is unknown, but it is estimated to be 1 case per 40,000 live births (18). In the untreated patient, elevation of serum free T₄ is a *sine qua non* requirement for the diagnosis of the syndrome (3,4).

Likewise, RHT diagnosis must be suspected in every patient that presents with persistent elevation of circulating free T₄ and free T₃, in association with nonsupressed serum TSH, and in the absence of intercurrent illness, drugs, or alteration of thyroid hormone transport serum proteins. Differential diagnosis must concern autonomous hypersecretion of TSH associated with pituitary adenomas. The tumors may be demonstrated by magnetic resonance imaging of the pituitary gland, or this diagnosis may be made by elevation of circulating α -subunit, or by failure of serum TSH to increase above the basal level in response to TRH (3).

Here, we describe an asymptomatic female patient that presented characteristic thyroid hormone levels alterations that narrowed the possibility of RHT. TSH hypersecretion was discharged by pituitary imaging that was normal.

The THRB gene consists of 10 exons (19); the aforementioned mutations are located in the last 4 exons, which code for the hinge region and, more frequently, the ligand-binding domain of the receptor, at the carboxyl-terminus of the TR β . The majority of these mutations result in a reduction in T₃-binding and/or an impairment in transactivation (20). There have been described at least 122 mutations affecting THRB gene, including deletions, insertions, and, much more frequently, point mutations (21-23). The largest family reported in the literature until nowadays is composed by 36 persons harboring a missense mutation at THRB gene (24).

The mutation identified in this family, results in an alteration in codon 431 in helix 11 (H11) of the ligand-binding domain of TR β , a residue oriented towards the interior of receptor's structure. Mutations affecting this region, at codon 429, normally present as a predominantly pituitary pattern of RHT in humans (10,25,26). Another mutation, also localized at codon 431, but resulting in a different amino acid substitution, I431T, has been previously described as causing predominantly pituitary RHT, concerning clinical presentation and TSH, T₃ and T₄ levels in serum obtained from the affected patient (9). Afterwards, in another study using reporter gene assays with positive and negative response elements, Safer et al. demonstrated that I431T mutation causes generalized resistance to thyroid hormone (27).

In our study, I431V TR β also showed a dominant negative effect upon positive (DR4) and negative (TSH promoter) regulated genes, behaving biochemically as a generalized resistance to thyroid hormone. In spite of the fact that I431T TR β mutant showed a moderate reduction of T₃ binding affinity, I431V mutant displayed a slightly

impairment in affinity. This difference can be explained by the fact that both valine and isoleucine have a hydrophobic side group. Consonant with these findings, at higher T_3 concentrations, the mutant I431V TR β recovered coactivator (SRC-1) recruitment, and retained the ability to regulate transcription.

Interestingly, in I431V mutant, T_3 ligand-dependent corepressor release was markedly lower than expected from the impaired ligand-binding affinity. Even at higher T_3 doses, with normal recruitment of SRC-1, I431V still binds to SMRT. Similar results were described in other RTH mutants. Mutations at the receptor carboxyl terminus in the ligand-inducible trans-activation function (AF-2) region, such as L454S, shows similar pattern. This mutant interacts stronger with nuclear receptor corepressor (NCoR) than does the wild-type receptor, and the T_3 -dependent release of NCoR is markedly impaired (28).

Other studies have shown that a number of RTH mutants interact aberrantly with corepressors. For two mutations (P453A and P453H), involving a proline residue that precedes an amphipathic helix at the receptor carboxy terminus, ligand-dependent corepressor release was markedly reduced. Furthermore, when introduced into a RTH mutant, artificial mutations that abolished corepressor interaction abrogated the dominant negative activity of RTH mutants (29). Another mutation, R383H, localized in the loop between H9 and H10, induces resistance to thyroid hormone and impairs corepressor release (25,30). These properties are shared by another mutant (R429Q), which is located in H11 (25). Notwithstanding, R429Q is associated with greater impairment of negative than positive transcriptional function. This finding differs from the I431V, since this RTH mutant impairs both positive and negative responsive genes (25).

We also showed a reduced affinity of the I431V mutant receptor for thyroid hormone. Altogether, these findings are consistent with the clinical picture of eumetabolism of the affected individuals.

Until nowadays, no specific treatment is available to correct the defect on RTH, and patients in euthyroidism should not be treated. However, follow-up of patients with RTH has fully been recommended, once the clinical presentation may vary among individuals with the same mutation or even in the same individual throughout lifetime (20,31).

In this study, we have described a large family harboring a novel mutation of TR β gene that impairs corepressor release, and induces thyroid hormone resistance syndrome. Although the majority of the heterozygous patients presented only minimal alterations in thyroid hormone levels, two of the affected individuals showed normal hormonal dosages, which illustrate the variability of clinical presentation that occurs in RTH, even among members of the same family. Knowledge about this illness is clinically relevant, at least for family counseling, and is also very important to contribute to a better comprehension of thyroid physiology.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Brazilian Research Council CNPq 486388/2006-9 and Finatec (02/2006 – Universidade de Brasilia). Disclosures: All the authors report no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Refetoff S, Weiss RE, Usala SJ. The syndromes of resistance to thyroid hormone. *Endocr Rev* 1993; 14:348-400.

2. Refetoff S, DeWind LT, DeGroot LJ. Familial syndrome combining deaf-mutism, stippled epiphyses, goiter and abnormally high PBI: possible target organ refractoriness to thyroid hormone. *JCEM* 1967; 27:279-294.
3. Refetoff S. Resistance to thyroid hormone. In: Braverman LE, Utiger RE, editors. *Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text*. 9th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins; 2005.p.1109–1129.
4. Beck-Peccoz P, Chatterjee VK. The variable clinical phenotype in thyroid hormone resistance syndrome. *Thyroid* 1994;4:225–32.
5. Mamasiri S, Yesil S, Domitrescu A, Liao X-H, Demir T, Weiss RE et al. Mosaicism of a Thyroid Hormone Receptor- β Gene Mutation in Resistance to Thyroid Hormone. *JCEM* 2006;91(9):3471-77.
6. Cheng SY. Thyroid hormone receptor mutations and disease: beyond thyroid hormone resistance. *Trends Endocrinol Metab* 2005;16:176-82.
7. Velasco LF, Togashi M, Walfish PG, Pessanha RP, Moura FN et al. Thyroid hormone response element organization dictates the composition of active receptor. *J Biol Chem*. 2007 282:12458-66.
8. Oetting A, Yen PM. New insights into thyroid hormone. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007;21(2):193-208.
9. Yen P M. Molecular basis of resistance to thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14:327-33.
10. Wu SY, Cohen RN, Simsek E, Senses DA, Yar NE, Grasberger H et al. A Novel Thyroid Hormone Receptor- β Mutation That Fails to Bind Nuclear Receptor Corepressor in a Patient as an Apparent Cause of Severe, Predominantly Pituitary Resistance to Thyroid Hormone. *JCEM* 2006;91(5):1887-95.

11. Chatterjee VK, Nagaya T, Madison LD, Datta S, Rentoumis A, Jameson JL
Thyroid hormone resistance syndrome. Inhibition of normal receptor function
by mutant thyroid hormone receptors. *J Clin Invest* 1991;87:1977-84.
12. Walsh PS MDHR. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA
for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 1991;
10(4):506-513.
13. Adams M, Matthews C, Collingwood T, Tone Y, Beck-Peccoz P, Chatterjee
KK. Genetic analysis of 29 kindreds with generalized and pituitary resistance to
thyroid hormone. *J Clin Invest* 1994;94:506-15.
14. Ribeiro RC, Feng W, Wagner RL, Costa CH, Pereira AC, Apriletti JW et al.
Definition of the surface in the thyroid hormone receptor ligand domain for
association as homodimers and heterodimers with retinoid X receptor. *J. Biol.
Chem* 2001;276:14987-95.
15. Webb P, Nguyen P, Kushner PJ. Differential SERM effects on corepressor
binding dictate ER α activity *in vivo*. *J Biol Chem* 2003;278:6912-20.
16. Feng W, Ribeiro RC, Wagner RL, Nguyen H, Apriletti JW, Fletterick RJ et al.
Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear
receptors. *Science* 1998;280:1747-49.
17. Leitman DC, Costa CH, Graf H, Baxter JD, Ribeiro RC. Thyroid hormone
activation of transcription is potentiated by activators of cAMP-dependent
protein kinase. *J. Biol. Chem* 1996;271:21950-55.
18. Lafranchi SH, Snyder DB, Sesser DE, Skeels MR, Singh N, Brent GA et al.
Follow-up of newborns with elevated screening T4 concentrations. *J Pediatr*
2003;143:296-301.

19. Kim JH, Park TS, Baek HS, Kim GH, Yoo HW et al. A newly identified insertion mutation in the thyroid hormone receptor- β gene in a Korean family with generalized thyroid hormone resistance. *J Korean Med Sci* 2007;22:560-3.
20. 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(2):277-305.
21. Furlanetto T, Kopp P, Peccin S, Gu WX, Jameson JL. A novel mutation (M310L) in the thyroid hormone receptor β causing resistance to thyroid hormone in a Brazilian kindred and a neonate. *Mol Genetics Metabol* 2000;71:520-6.
22. Frank-Raue K, Lorenz A, Haag C, Höppner W, Boll HU, Knorr D et al. Severe form of thyroid hormone resistance in a patient with homozygous/hemizygous mutation of T3 receptor gene. *Eur J Endocrinol* 2004;150:819-23.
23. Kong APS, Lam CW, Chan AOK, Yiu SF, Tiu SC. Resistance to thyroid hormone in a Chinese family with R429Q mutation in the thyroid hormone receptor beta gene. *Hong Kong Med J* 2005;11:125-9.
24. Kvistad PH, Lovas C, Boman H, Myking OL. Retarded bone growth in thyroid hormone resistance. A clinical study of a large family with a novel thyroid hormone receptor mutation. *Eur J Endocrinol* 2004;150:425-30.
25. 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.
26. Cohen RN, Putney A, Wondisford FE, Hollenberg AN. The nuclear corepressors recognize distinct nuclear receptor complexes. *Mol Endocrinol* 2000;14:900-14.

27. Safer JD, Langlois MF, Cohen R, Monden T, John-Hope D, Madura J et al. Isoform variable action among thyroid hormone receptor mutants provides insight into pituitary resistance to thyroid hormone. *Mol Endocrinol* 1997;11(1):16-26.
28. Tagami T, Gu WX, Peairs PT, West BL, Jameson JL. A novel natural mutation in the thyroid hormone receptor defines a dual functional domain that exchanges nuclear receptor corepressors and coactivators. *Mol Endocrinol* 1998;12(12):1888-902.
29. 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(4):470-80.
30. Clifton-Bligh RJ, de Zegher F, Wagner TN, Collingwood IF, Francois M, Van Helvoirt R, et al. A novel TR beta mutation (R383H) in resistance to thyroid hormone syndrome predominantly impairs corepressor release and negative transcriptional regulation. *Mol Endocrinol* 1998;12(5):609-21.
31. Beck-Peccoz P, Persani L, Calebiro D, Bonomi M, Mannavola D, Campi I. Syndromes of hormone resistance in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Best Pract Res Clinical Endocrinol Metab* 2006;20(4):529-46.

FIGURES

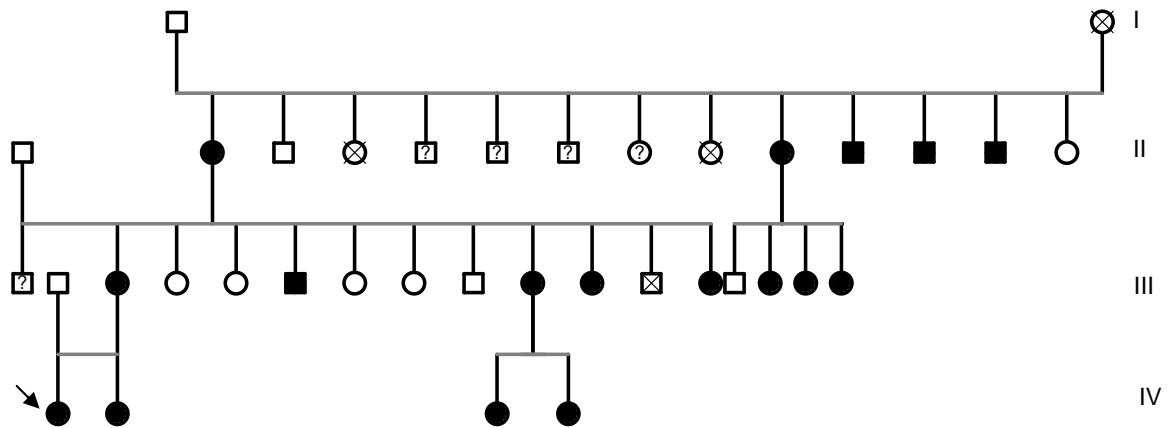


Figure 1: Pedigree of a family with thyroid hormone resistance. Consanguinity was ruled out. Closed symbols represent affected members; open symbols, unaffected members. The arrow indicates the probanda. Subjects marked with (?) declined genetic analysis.

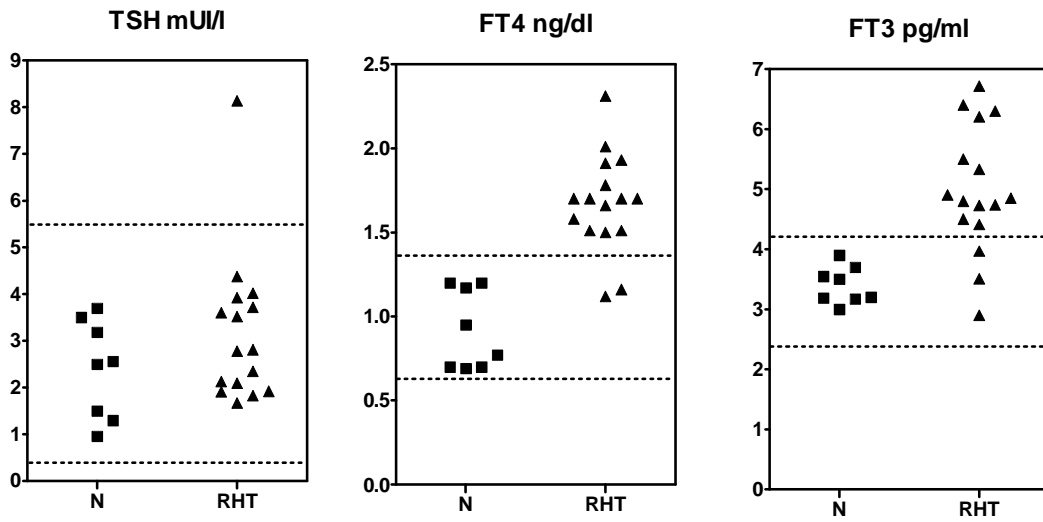


Figure 2: Hormone values in a family with thyroid hormone resistance syndrome (RHT).

N = unaffected first grade family members to persons with RHT. Dotted lines show normal ranges.

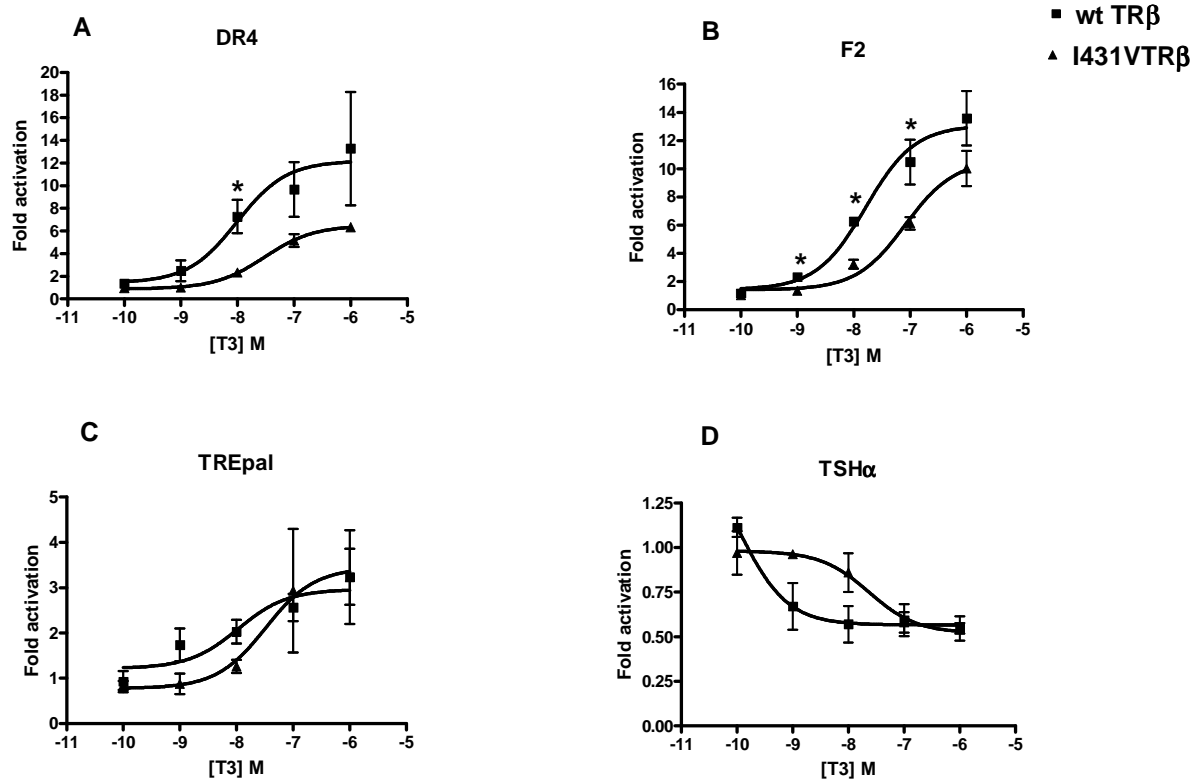


Figure 3: Transcriptional effects of increasing doses of T₃ at DR4, F2, TREpal and TSH responsive elements. U937 cells were cotransfected with I431V TRβ (▲) or wt TRβ (■), and with firefly luciferase reporter gene driven by a promoter containing the various responsive elements sequence. The activation value for each T₃ concentration is the mean of triplicate determinations.

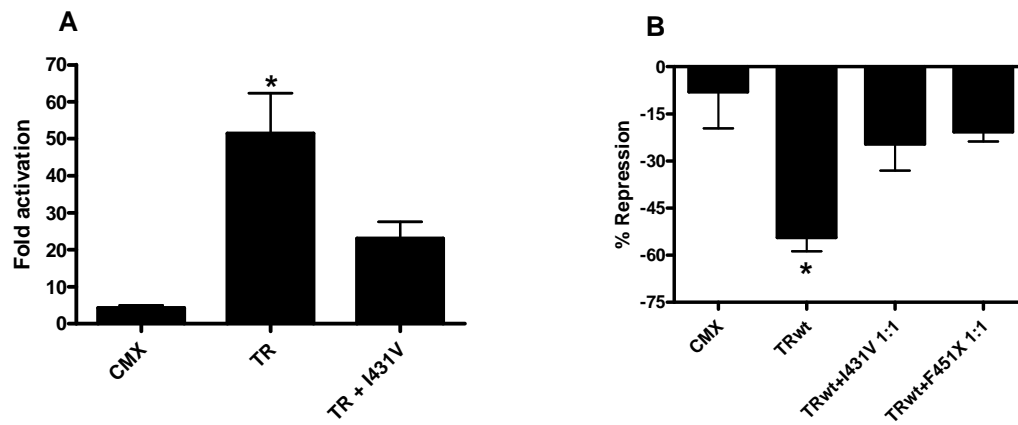


Figure 4: Dominant negative effect of I431V TR β . U937 cells were treated with 100nmol/liter of T₃. A: fold activation at DR4 responsive element. B: % of repression at TSH responsive element.

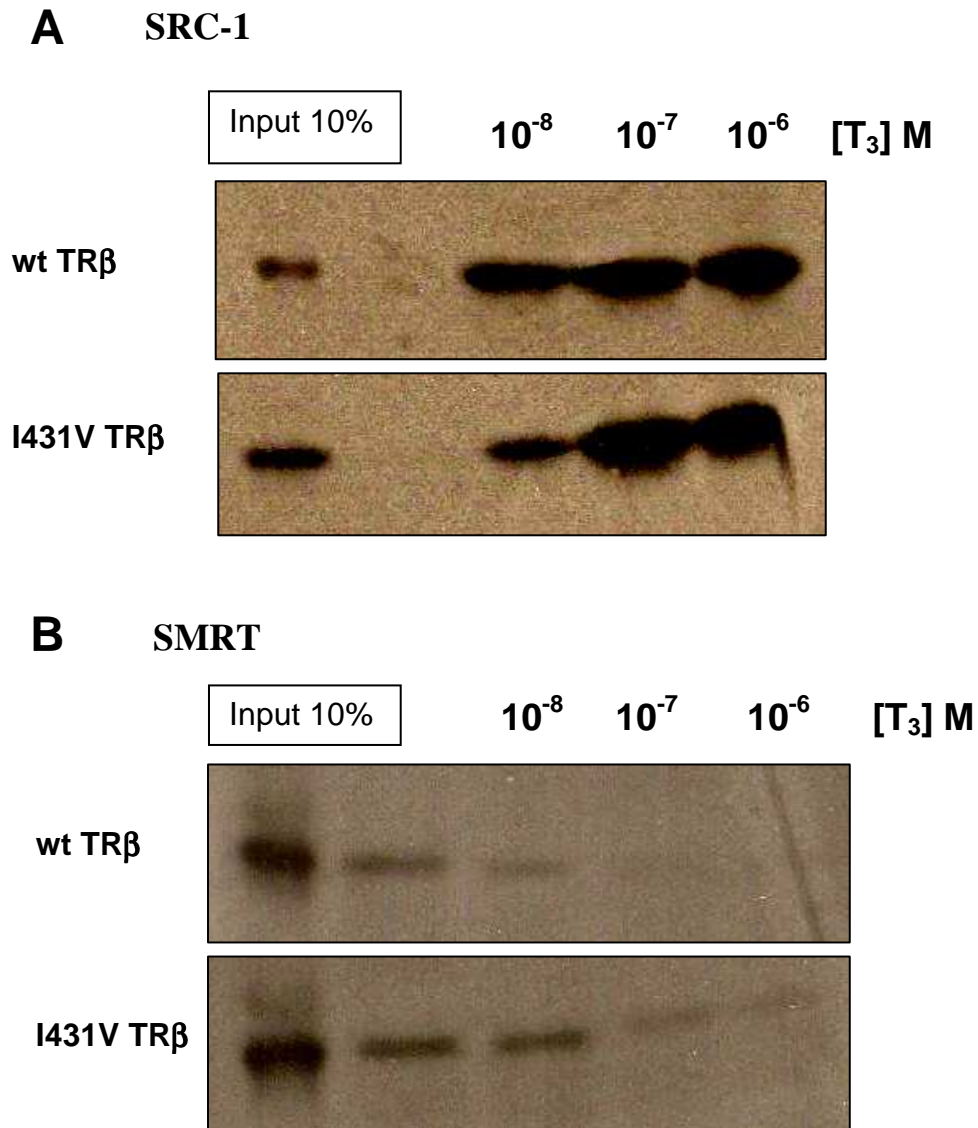


Figure 5: Autoradiograms of SDS-polyacrylamide gels used to separate labeled TRs bound to SRC-1 in pull-down assay, using different concentrations of T₃. A: SRC-1 recruitment by I431V TRβ is impaired at low concentrations of T₃. B: TRβ I431V retains the corepressor SMRT stronger than does TRβ wt.

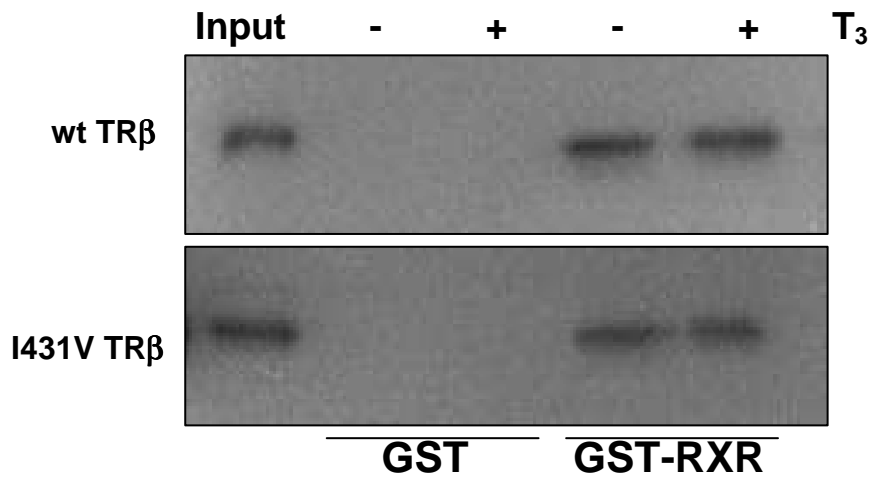


Figure 6: Autoradiograms of GST pull-down assay, showing normal heterodimerization of I431V TR β with RXR.

ANEXOS

1. Documento de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde – UnB, do projeto relacionado à mutação no TR.
2. Documento de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde – UnB, do projeto relacionado à mutação envolvendo a síntese de selenoproteínas.
3. Carta de aceitação do artigo intitulado: “A Novel Mutation of Thyroid Hormone Receptor Beta (I431V) Impairs Corepressor Release, and Induces Thyroid Hormone Resistance Syndrome”, para publicação na Revista “Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia”.