MARIA IZABEL CHIAMOLERA

ASPECTOS CLÍNICOS E MOLECULARES DA RESISTÊNCIA AOS HORMÔNIOS TIROIDIANOS

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo, 2006

MARIA IZABEL CHIAMOLERA

ASPECTOS CLÍNICOS E MOLECULARES DA RESISTÊNCIA AOS HORMÔNIOS TIROIDIANOS

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.
Orientador: Rui M. B. Maciel
Co-orientador: Francisco A. R. Neves
Coordenador: Sérgio A. Dib

São Paulo, 2006

Ficha Catalográfica

Chiamolera, Maria Izabel.

Aspectos Clínicos e Moleculares da Resistência aos Hormônios Tiroidianos. / Maria Izabel Chiamolera. --São Paulo, 2006.

viii, 116p.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós Graduação em Ciências.

Título em inglês: Clinical and Molecular Aspects of Resistance to Thyroid Hormone.

1. Resistência ao Hormônio Tiroidiano. 2. Receptor do Hormônio Tiroidiano. 3. Mutações. 4. Diagnóstico. 5. Coativador

Das utopias

Se as coisas são inatingíveis... ora!

não é motivo para não quere-las...

Que tristes os caminhos, se não fora

a mágica presença das estrelas!”

Mario Quintana

"Ou Acharemos o caminho ou então o construiremos"

Aníbal

Dedico esta tese à minha família.

Aos meus pais, Joana e Alfieri, por todo o apoio, carinho e dedicação, por terem sido exemplos maravilhosos de trabalho e honestidade e por me ensinarem a construir meu caminho com esforço e persistência.
Aos meus irmãos, Alfieri Junior e Murilo, pela ajuda com livros, exemplos e sugestões e, sobretudo, por "suportarem" a nem sempre conveniente tarefa de "irmãos mais velhos".
E a minha "irmãzinha", Pupi, pela companhia, pelas sábias sugestões e bom humor.

Agradecimentos

Agradeço a meu orientador, Dr. Rui Monteiro de Barros Maciel, graças a seu exemplo e sua evidente paixão pela medicina, pela ciência e pelo ensino, consegui começar minha vida acadêmica e científica. Acho que um de seus maiores méritos é tornar o nosso, mais que um ambiente de trabalho, um ambiente familiar.

Ao Dr. Francisco Neves, pela oportunidade única de trabalhar com ele e com sua equipe, que com seu bom humor e calma me fez sentir parte desta equipe.

Aos meus companheiros nessa jornada em Brasília, Rut e Gustavo, que se tornaram mais amigos do que colaboradores, e a todo o pessoal do Laboratório de Farmacologia Molecular: Luis, Cristina, Rilva, Rani, Priscila, Elaine, Lara, Tiago, Fanny, Marlon.

Aos colaboradores de São Carlos, Dr. Igor Polikarpov e Lucas, que trazem uma nova luz ao meu conhecimento científíco, pela grande disponibilidade e dedicação.

Agradeço especialmente ao Dr. Sérgio, Dra. Gisah, Dra. Elizabeth, Dra. Ângela, Dr Rodrigo, Dra. Ana Patrícia, Dra. Marilene, Dra. Marilia, Dra. Célia e Dra. Lea, por me cederem seus pacientes ou dados, e colaborarem tão prontamente esclarecendo minha dúvidas.

Aos meus amigos queridos da Endocrinologia da Escola Paulista de Medicina, que no decorrer destes anos compartilharam alegrias, frustrações, conquistas, derrotas, uniões, projetos, realizações, enfim... tudo que a vida trouxe e ainda irá trazer.

Danielle, Rosa Paula e Cléber pelo companheirismo, por trazerem alegria com suas observações inteligentes e bem humoradas, por sua disponibilidade e por terem me ensinado tanto, não só sobre medicina, mas sobre a vida e a amizade.

Magnus, Tânia, Claudia Nakabashi, Claudia Akemi, Márcio, Maria Regina, Denise, Patrícia, Fernando, Bete e Teresa Vieira por compartilharem comigo o seu entusiasmo acadêmico e humano, pela companhia, alegria e dedicação, e pelos momentos agradáveis de convívio.

Teresa Kasamatsu, Ilda, Ângela, Yeda, Amaryllis e Giba pelo suporte técnico e emocional nas "crises celulares" e outras mais, e por fazerem isso com visível carinho e amizade;

Gisele, Gustavo, Flávia, Rosana, Valter, Felipe, Kelly, Ivone e Lilian pela ajuda inestimável, amizade, as conversas e todo o apoio nos momentos difíceis.

Janete, pelo seu exemplo, seu estímulo e as conversas agradáveis.

Agradeço a todos do ambulatório de tiróide, por estes anos maravilhosos de aprendizado, amizade e crescimento: Dr. Furlaneto, que foi o meu primeiro grande exemplo de endocrinologista, Dra. Luiza, Dr. Jairo, Stamato, Ricardo, João Roberto.

Às minhas amigas queridas Sílvia, Carol e Regina, pelo companheirismo inabalável nos anos de residência e, mesmo com a distância, pela amizade.

A todos os residentes, pós-graduandos da Disciplina de Endocrinologia, principalmente aqueles com os quais convivi mais de perto e que de um modo ou de outro foram importantes e me ajudaram no caminho, com os quais eu aprendi muito: Manuel, Mariana, Juliana, Elisa, Monique e Monike, Roberta, Rogério, Marcelo, Ricardo, Janaína, Camila, Michele, André pelo estímulo e ajuda.

Às minhas amigas de toda a vida: Keila, Elaine, Ana Paula e Luciana que já se conformaram com as minhas ausências, e apesar da distância eu sei que vocês estão aí, e a minha grande amiga Alessandra Barros, de toda a minha vida "epemista", obrigada por sempre acreditar em mim e sempre estar do meu lado.

Aos docentes da disciplina de Endocrinologia que são responsáveis pela minha formação médica e científica, aguçaram minha curiosidade e formaram a base para este trabalho: Dra. Ana, Dra. Regina, Dra. Ieda, Dr. Julio, Dr. Gilberto Vieira, Dr. Cláudio Kater, Dra. Marize.

Às Dras. Maria Tereza Nunes e Edna Kimura por muitos apoios logísticos, e pela agradável oportunidade de convívio.

À CAPES pelo apoio financeiro no início deste trabalho.

Sumário

Agradecimentos – 6

Sumário - 9

1. Apresentação - 10

2. Introdução - 13

3. Artigo 1 - A Brazilian Database of Resistance to Thyroid Hormone: identification of 17 new cases and 6 novel mutations in the thyroid hormone receptor β gene - 24

4. Artigo 2 - The Proline in Codon 452 of TRβ Plays a Critical Role in the Interaction with Corepressor and Coactivator - 43

5. Capítulo do livro "Endocrinologia", editado por Mário J. A. Saad, Rui M. B. Maciel e Berenice B. Mendonça intitulado "Resistência aos hormônios da tiróide" – 75

6. Considerações e Conclusões - 113

APRESENTAÇÃO

Nesta Tese de Doutorado, realizada parcialmente com bolsa da CAPES e com auxílio à pesquisa da FAPESP, apresento, de acordo com as recomendações do Conselho Especial do Programa de Pós-Graduação em Endocrinologia da Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 3 trabalhos completos apresentados na forma de 2 manuscritos intitulados: a) "The Proline in Codon 452 of TRβ Plays a Critical Role in the Interaction with Corepressor and Coactivator", de autoria de Maria Izabel Chiamolera, Rutnéia P. Pessanha, Gustavo B. Barra, Rosa Paula M. Biscolla, Magnus R. Dias da Silva, Sérgio A. Dib, Gisah A. Carvalho, Francisco A. R. Neves e Rui M. B. Maciel e b) "A Brazilian Database of Resistance to Thyroid Hormone: identification of 17 new cases and 6 novel mutations in the thyroid hormone receptor β gene", de autoria de Maria Izabel Chiamolera, Léa M. Z. Maciel, Célia R. Nogueira, Gisah A. Carvalho, Suemi Marui, Rodrigo Moreira, Gustavo L. R. Daré, Silvânia S. Teixeira, Denise Perone, Sérgio A. Dib, Elizabeth X. Bianchini, Ângela M. Spínola e Castro, Ana P. Carvalho, and Rui M. B. Maciel, que serão submetidos à revista Thyroid e 1 capítulo do livro "Endocrinologia", editado por Mário J. A. Saad, Rui M. B. Maciel e Berenice B. Mendonça intitulado "Resistência aos hormônios da tiróide", de autoria de Maria Izabel Chiamolera e Gisah A. de Carvalho.

O interesse na linha de pesquisa sobre Síndrome de Resistência aos Hormônios Tiroidianos e aspectos funcionais dos Receptores dos Hormônios Tiroidianos derivou-se da presença, em nosso ambulatório, de pacientes que necessitavam de maior esclarecimento diagnóstico, para os quais uma pesquisa molecular das mutações causadoras da síndrome poderia esclarecer definitivamente tal diagnóstico.

No decorrer do trabalho, ao detectarmos novas mutações que não haviam sido caracterizadas funcionalmente, cresceu meu interesse em capacitar nosso laboratório para estudar funcionalmente os Receptores dos Hormônios Tiroidianos e fomos buscar a colaboração do Prof. Francisco Neves e sua equipe do Laboratório de Farmacologia

Molecular da Universidade de Brasília, com os quais aprendi uma série de técnicas atualmente em uso em nosso laboratório e que puderam ser aplicadas em outras linhas de pesquisa em andamento.

Além dos trabalhos apresentados nesta tese, durante o doutorado em endocrinologia participei de outras publicações que contribuíram para meu aprendizado e formação. São elas:

1."Paralisia periódica hipocalêmica tirotóxica, uma urgência endócrina: revisão do quadro clínico e genético de 25 pacientes". MR Dias da Silva, MI Chiamolera, TS Kasamatsu, JM Cerutti, RMB Maciel. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia** 2004; 48: 196-215;

2."Assessment of disease activity in patients with Graves' ophthalmopathy by practical methods for the measurement of urinary glycosaminoglycans and serum hyaluronan". JRM Martins, RP Furlanetto, LM Oliveira, A Mendes, CC Passerotti, MI Chiamolera, AJ Rocha, PG Manso, HB Nader, CP Dietrich, RMB Maciel. **Clinical Endocrinology** 2004; 60: 726-733

3."Dosagem de tiroglobulina no líquido obtido da lavagem da agulha da punção aspirativa para o diagnóstico de metástases em linfonodos cervicais do carcinoma diferenciado de tiróide. RPM Biscolla, ES Ikejiri, MC Mamone, CCD Nakabashi, VP Andrade, TS Kasamatsu, F Crispim, MI Chiamolera, DM Andreoni, CC Camacho, JGH Vieira, RP Furlanetto, RMB Maciel. Aceito para publicação nos **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**

4."Regulação neuroendócrina da tiróide". MI Chiamolera, DM Andreoni e RMB Maciel, capítulo do livro "Neuroendocrinologia Clínica e Cirúrgica", editado por A Cukiert e B Liberman, Lemos Editorial, São Paulo, 2002, pp. 129-137

5."Adenoma hipofisário secretor de TSH". DM Andreoni, MI Chiamolera e RMB Maciel, capítulo do livro "Neuroendocrinologia Clínica e Cirúrgica", editado por A Cukiert e B Liberman, Lemos Editorial, São Paulo, 2002, pp. 371-377

6."Avaliação da função tiroidiana". RMB Maciel, MI Chiamolera, DM Andreoni, capítulo do livro "Neuroendocrinologia Básica e Aplicada", editado por J. Antunes-Rodrigues, AC Moreira, LLK Elias, M de Castro. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 2005, pp 262-278

7."Distúrbios da tiróide na mulher". MI Chiamolera, DM Andreoni, RMB Maciel, capítulo do livro "Endocrinologia Ginecoloógica: Aspectos contemporâneos", editado por José Mendes Aldrighi, Editora Atheneu, São Paulo, 2005, pp 255-276

8."Adenoma hipofisário secretor de TSH". DM Andreoni, MI Chiamolera e Rui M. B. Maciel, capítulo do livro Endocrinologia, editado por Mário J. A. Saad, Rui M. B. Maciel e Berenice B. Mendonça, Editora Atheneu, 2007, no prelo

Introdução

Os Receptores do Hormônio Tiroidiano

Desde meados dos anos 80 foram clonados e identificados dois diferentes Receptores de Hormônio Tiroidiano (TRs), os TR alfa e beta, tais proteínas são codificadas por dois diferentes genes, localizados respectivamente no cromossomo 17 e 3. Cada um desses genes codifica várias isoformas das proteínas através de splincing alternativo, o TR alfa gerando duas proteínas distintas TR alfa 1 e 2 (TRα-1 e TRα-2), e o gene do TR beta levando à síntese das proteínas TR beta 1 e 2 (TRβ-1 e TRβ-2). Todas as isoformas ligam ao DNA, e com exceção do TRα-2 todas as outras interagem com o Hormônio Tiroidiano (T3) e tem função de transativação gênica. O TRα1 tem presença preponderante no coração, músculo esquelético e gordura marrom, o TRβ-1 em cérebro, fígado e rim e o TRβ-2 em hipófise anterior, áreas específicas do hipotálamo, do cérebro em desenvolvimento e da orelha interna (1).

O TR pertence à superfamília dos receptores nucleares, a mesma dos receptores dos esteróide, da vitamina D, do ácido retinóico, das prostaglandinas e de outros receptores órfãos (para os quais não há ligantes conhecidos). Por pertencer a esta família, o TR guarda grande similaridade estrutural com seus membros, contando três principais domínios: o amino-terminal, o de ligação ao DNA (DBD) e o de ligação ao ligante (LBD) (1).

O domínio amino-terminal possui uma função de ativação transcricional independente do ligante, denominada função de ativação 1 (AF-1), contudo a importância desta função para o TR ainda não é totalmente conhecida (1).

O DBD tem como principal função a ligação ao DNA, situa-se na porção central do receptor e é organizado por dois segmentos estruturais conhecidos como dedos de zinco, cada um composto por quatro cisteínas coordenadas com íons zinco, existem neste domínio pontos de ligação aos DNA (as regiões P-box e A-box), e pontos de heterodimerização principalmente com o receptor do retinóide X (RXR) (T-box e D-box) (Fig. 1) (1,2).

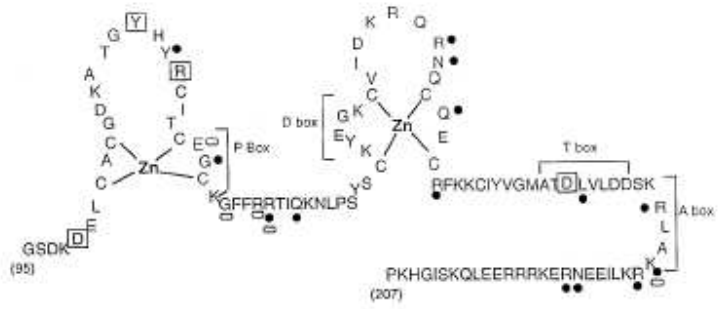


Figura 1 – Domínios de ligação ao DNA do TRβ, mostrando os "dedos de zinco" e os pontos de contato com o DNA. Os quadrados indicam regiões de heterodimerização com o RXR (1).

O LBD localiza-se na região carboxi-terminal, possui funções variadas como a homo e a heterodimerização do receptor, a localização nuclear, a dissociação das "heat shock proteins", a interação com proteínas corepressoras e co-ativadoras e a repressão basal do TR sem o ligante. Mas, provavelmente, a função primordial é exercida quando ocorre a interação com o hormônio e por conseqüência ocorre a ativação da transcrição dos genes positivamente regulados pelo T3, pois o LBD possui uma superfície que faz contato com o hormônio, e que é fundamental para a ativação transcricional, essa região é denominada função de ativação 2 (AF-2). Após a ligação do hormônio, essa região passa a interagir com os co-ativadores e recrutar a maquinaria de transcrição basal. Estruturalmente o LBD se organiza como uma bolsa hidrofóbica na qual o ligante se insere profundamente, esta bolsa é formada por 12 alfa-hélices formando uma superfície hidrofóbica, com a ligação do hormônio ocorre uma modificação na conformação da cavidade na qual a hélice 12, a mais carboxi-terminal, se movimenta, fechando a cavidade, liberando os corepressores e expondo sítios de interação com proteínas co-ativadoras (1,2).

O TR, como já foi citado, age como um fator de transcrição dependente do T3 e atua ligando-se a seqüências específicas no DNA denominadas elementos responsivos

aos hormônios tiroidianos (TRE), que estão localizados na região promotora dos genes alvos, tais seqüências possuem duas cópias imperfeitas de um hexanucleotídeo (AGGTCA), que podem estar arranjadas em diferentes orientações e com espaçamentos diversos (fig. 2). O TR liga-se ao TRE de diversas formas, podendo atuar como monômeros (somente um TR), homodímeros (TR-TR) ou heterodímeros com o receptor do retinóide X (RXR) (TR-RXR). A formação dos heterodímeros de TR-RXR aumenta a ligação do receptor ao DNA e estimula a transcrição gênica (3).

Quando dissociado do T3, o TR está localizado principalmente no núcleo, podendo estar tanto em solução quanto ligado ao DNA através dos TREs. Na ausência do ligante, o receptor associa-se a proteínas conhecidas como corepressoras, que atuam reprimindo a transcrição gênica em genes positivamente regulados pelo T3 (fig. 3), ou ativam a transcrição em genes negativamente regulados (como é o caso dos genes do TSH e do TRH). Quando ocorre a ligação do hormônio ao receptor, essa associação se desfaz, na presença do hormônio tiroidiano a hélice 12 encontra-se aberta, com a ligação do T3 a hélice se dobra sobre o TR expondo sítios de ligação aos co-ativadores promovendo o desligamento dos corepressores, a seguir proteínas coativadoras são recrutadas para estimular a transcrição do gene alvo (fig. 4) (1,2).

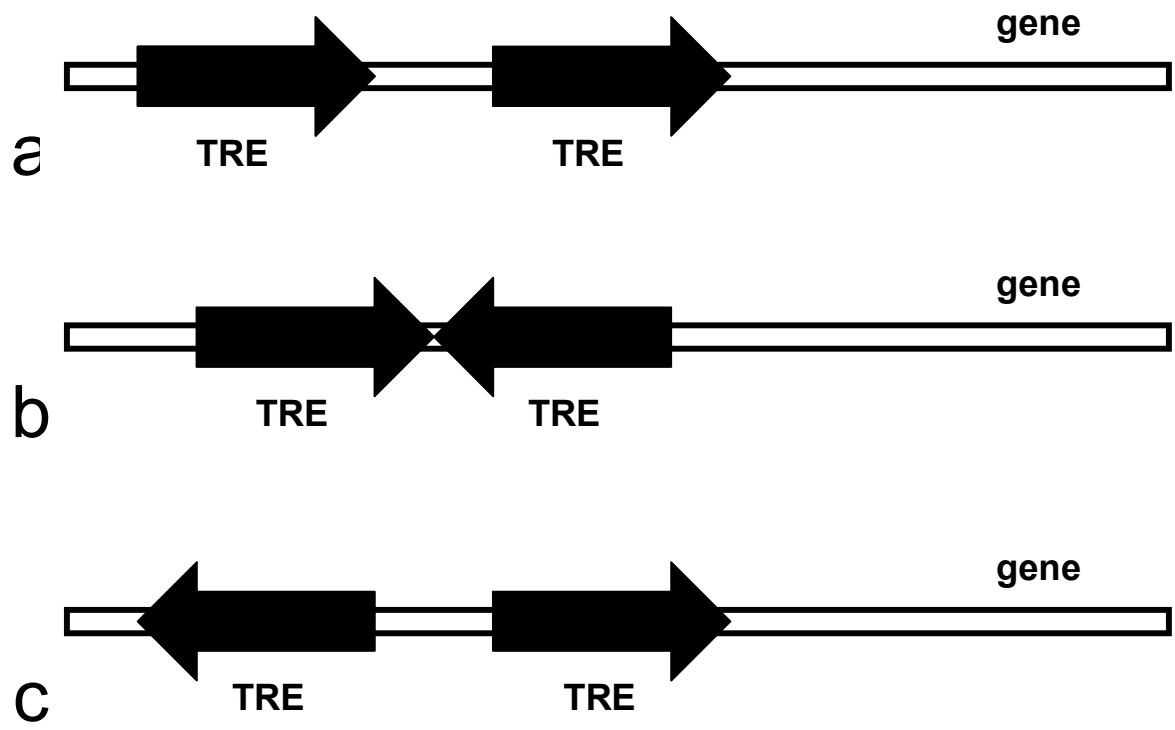


Figura 2 – Os elementos responsivos aos hormônio tiroidianos (TRE) são compostos por seqüências consenso dos nucleotídeos a(g)ggtc(g)a que se repetem e podem apresentar a orientação de repetição direta (a) com separação de 4 nucleotídeos, palíndromos (b), e palíndromos invertidos (c).

Os corepressores são capazes de interagir com o TR na ausência de T3, tanto em solução como quando o TR está ligado aos seus TREs, os principais corepressores para o TR são o NcoR (do inglês Nuclear Receptor Correpressor) e o SMRT (do inglês silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor). Esses corepressores são capazes de interagir com outros repressores formando um complexo de corepressores, onde cada componente parece ter a sua própria importância (2).

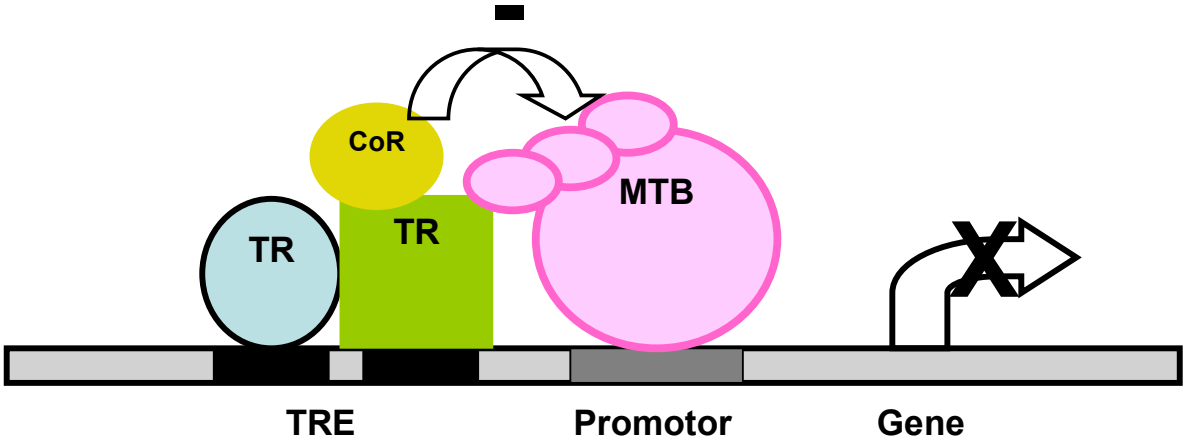


Figura 3 – Efeito supressivo do TR não ligado, responsivos ao T3 (a). Os homodímeros TR/TR não ligados se associam aos co-repressores (CoR) e exercem um efeito supressivo nos genes positivamente regulados pelo TRE, reprimindo a maquinaria de transcrição basal (MTB).

Por outro lado, os co-ativadores não são específicos, podendo associar-se com vários outros membros da superfamília dos receptores nucleares. O TR interage com os co-ativadores da família p160 (proteínas com 160kD), que tem como principais componentes as seguintes proteínas: co-ativadores de receptores esteróides 1 (SRC-1 ou NCoA1), fator transcricional intermediário 2 (TIF2, GRIP1, SRC-2 ou NCoA2), e o ativador dos receptores de hormônio tiroidiano e do ácido retinóico (ACTR, pCIP, AIB1, RAC3, TRAM-1, SRC-3 ou NCoA3) (1,2).

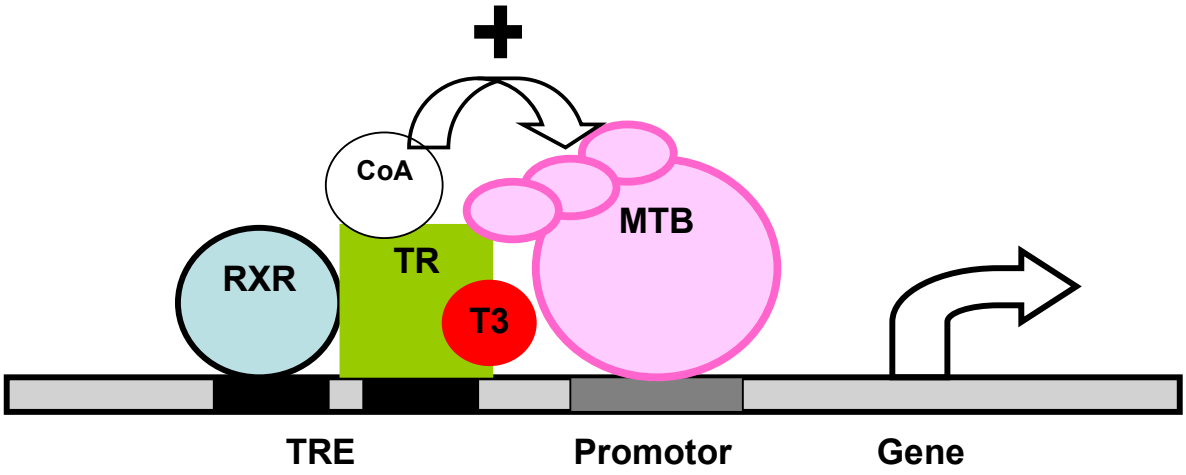


Figura 4 – Efeito positivo do complexo TR/RXR ativado pelo T3. Formação do complexo TR/T3, resultando na dissociação do CoR, ocupação do TRE pelos heterodímeros TR/RXR e recrutamento do co-ativador (CoA) para amplificar a transcrição dos genes positivamente regulados pelo TRE.

A Resistência aos Hormônios Tiroidianos

A síndrome de Resistência aos Hormônios Tiroidianos (RTH) é uma síndrome clínica descrita pela primeira vez em 1967 por Samuel Refetoff, caracteriza-se pela hiposensibilidade variável dos tecidos aos Hormônios Tiroidianos (TH), o que leva à alterações bioquímicas específicas: elevação dos níveis séricos de T3 e T4 com "inapropriada" não-supressão do TSH, na ausência de doenças agudas, drogas ou alterações das proteínas séricas ligadoras dos HT (tabela 1). Além disso, doses suprafisiológicas de HT não suprimem o TSH como seria esperado (4).

Achados Laboratoriais	Normal[a]	RHT[b]
T_4 (pmol/L)	12,8 – 24,4	41 ± 2,1
T_3 (pmol/L)	3,8 – 8,4	11,4 ± 1,5
TSH (mU/L)	0,5 – 4,5	3,15 ± 0,3

[a] Normal = valores normais na população geral.
[b] RHT = valores médios dos testes de função tireoidiana nos pacientes com RHT.

Tabela 1: Tabela com média de dosagens hormonais dos pacientes com RHT (5).

Na literatura, até o momento, foram descritos mais de 700 casos com uma prevalência de 1:50.000 recém nascidos, 80% na forma familiar. A síndrome apresenta um padrão de herança, predominantemente, autossômico dominante, e apenas uma família foi descrita com padrão recessivo. Apresenta também, uma grande heterogeneidade clínica, com sintomatologia variando de paciente para paciente e mesmo entre membros da mesma família, podendo apresentar desde sintomas de hipotiroidismo até sintomas de tirotoxicose, tendo como sintomas mais prevalentes o bócio, hiperatividade, taquicardia e déficit de audição (5). Figura 5

As primeiras descrições de mutações no TRβ correlacionadas com a RTH foram no início da década de 90, desde então o TRβ foi arrolado como o principal elemento para explicar as alterações da síndrome, 80 a 85% dos indivíduos com RHT possuem mutações no TRβ, foram identificadas até o momento um total de 122 diferentes mutações no gene do TRβ, com 46 ocorrendo em mais de uma família. Em um estudo realizado com 142 famílias somente 21 famílias não apresentaram mutações no TRβ, e até o presente momento, não foram identificados mutações em outros elementos que possam explicar essa síndrome (6). A maioria das mutações ocorreu em três regiões hot spot (ou Clusters) no domínio de ligação ao ligante (LBD) entre os exons 7 e 10, o maior número são de mutações missense (substituição de um único nucleotídeo), mas

também foram descritas mutações nonsense (substituição de um único nucleotídeo gerando um ponto de parada prematuro), deleções e inserções (5).

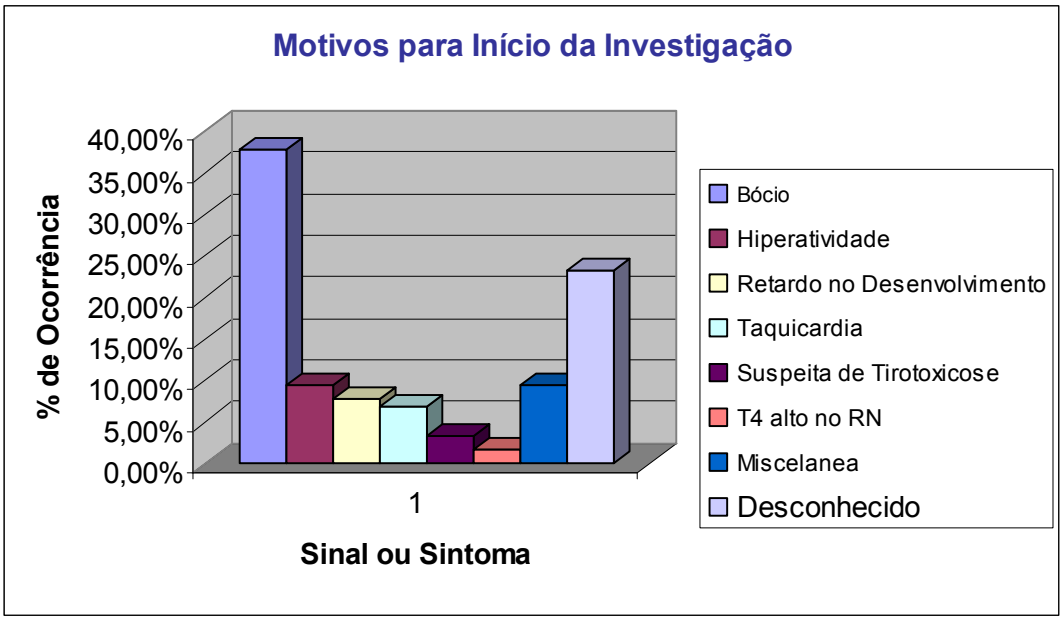


Figura 5: Porcentagem de Sinais ou Sintomas com apresentação inicial em série de pacientes com RHT. Adaptado de Refetoff S, www.thyroidmanager.org.

As mutações levam principalmente a uma diminuição ou a uma abolição da afinidade do TR ao T3, conseqüentemente o corepressor não é totalmente liberado e a transcrição do gene alvo não é ativada. Em alguns casos, a afinidade com o T3 não é tão afetada a ponto de explicar a alteração na liberação dos corepressores e no recrutamento dos co-ativadores, nesses casos, provavelmente, existam outros defeitos estruturais nos sítios de ligação destas proteínas que justifiquem tais alterações, como, por exemplo, falha na interação com co-ativadores (5).

Em uma família o padrão de herança foi autossômico recessivo, nessa família foi descrita uma deleção de toda a sequência codificante do TRβ, esses indivíduos apresentavam as características bioquímicas típicas de RHT além de surdo-mudez e visão monocromática, o quadro se explica pela complexa perda do gene que é

necessário para a maturação coclear e o desenvovimento do cone fotoreceptor que atua na visão para a cor (4). Animais Experimentais que expressam somente um alelo do gene do TRβ não têm anormalidades clínicas ou laboratoriais (1, 4). Enquanto indivíduos heterozigotos para mutação apresentam sinais e sintomas da RHT, apesar de possuírem um alelo normal, tal fato pode ser explicado pelo Efeito Negativo Dominante no qual os receptores mutados interferem na ação dos receptores normais, múltiplos mecanismos moleculares explicariam tal efeito. As proteínas mutantes podem inibir a ação da proteína nativa por competirem pela ligação ao TRE, fato demonstrado por Nagaya e cols (7), observando mutações no DBD que impediam a ligação ao DNA e por sua vez atenuavam a atividade dominante negativa. Outros estudos demonstraram que o dímero TR nativo / TR mutado é inativo, e em mutantes em que se impede a dimerização o efeito também é atenuado (2). Além disso, a interação aos correpressores é mais intensa nos TRs mutados que tem o efeito negativo dominante, que mesmo com a ligação do hormônio tal interação não se desfaz e a não liberação do correpressor impede a ativação da maquinaria de transcrição basal nos genes positivamente regulados pelo T3 (2, 5).

Um ponto que não foi totalmente esclarecido em nenhum dos estudos até o momento, é a grande diferença entre o grau de resistência nos diversos tecidos e entre indivíduos com a mesma mutação, tal fato deve acontecer devido à combinação de múltiplos fatores tais como: a diferente distribuição das diversas isoformas entre os vários tecidos, a ação dos co-ativadores e o ambiente da região promotora dos genes regulados pelo T3, e até mesmo o Efeito Negativo Dominante tecido-específico (1).

A literatura não consegue estabelecer uma correlação clínico-molecular nesta síndrome, ou seja, não consegue explicar os diversos sinais e sintomas apenas pelo tipo de mutação e pela região do TR na qual ela se encontra. Mostrando que outros elementos além do TR também são importantes para a correta ação do T3, outro fato que corrobora essa hipótese é que 10 a 15% das famílias com todas as características da

síndrome não apresentam mutações no TR, mostrando que outro cofator de transcrição provavelmente esta envolvido na gênese da RHT nessas familias (4, 8).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Yen PM** 2001 Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. Physiol Rev 81:1097-1142
2. **Barra GB, Velasco LF, Pessanha RP, Campos AM, Moura FN, Dias SM, Polikarpov I, Ribeiro RC, Simeoni LA, Neves FA** 2004 [Molecular mechanism of thyroid hormone action]. Arq Bras Endocrinol Metabol 48:25-39
3. **Ribeiro RC, Apriletti JW, Wagner RL, West BL, Feng W, Huber R, Kushner PJ, Nilsson S, Scanlan T, Fletterick RJ, Schaufele F, Baxter JD** 1998 Mechanisms of thyroid hormone action: insights from X-ray crystallographic and functional studies. Recent Prog Horm Res 53:351-392; discussion 392-354
4. **Refetoff S, Weiss RE, Usala SJ** 1993 The syndromes of resistance to thyroid hormone. Endocr Rev 14:348-399
5. **Carvalho GA, Ramos HE** 2004 [Thyroid hormone resistance syndrome]. Arq Bras Endocrinol Metabol 48:83-92
6. **Lado-Abeal J, Dumitrescu AM, Liao XH, Cohen RN, Pohlenz J, Weiss RE, Lebrethon MC, Verloes A, Refetoff S** 2005 A de novo mutation in an already mutant nucleotide of the thyroid hormone receptor beta gene perpetuates resistance to thyroid hormone. J Clin Endocrinol Metab 90:1760-1767
7. **Nagaya T, Madison LD, Jameson JL** 1992 Thyroid hormone receptor mutants that cause resistance to thyroid hormone. Evidence for receptor competition for DNA sequences in target genes. J Biol Chem 267:13014-13019
8. **Reutrakul S, Sadow PM, Pannain S, Pohlenz J, Carvalho GA, Macchia PE, Weiss RE, Refetoff S** 2000 Search for abnormalities of nuclear corepressors, coactivators, and a coregulator in families with resistance to thyroid hormone without mutations in thyroid hormone receptor beta or alpha genes. J Clin Endocrinol Metab 85:3609-3617

Artigo 1

A Brazilian Database of Resistance to Thyroid Hormone: identification of 17 new cases and 6 novel mutations in the thyroid hormone receptor β gene

Maria Izabel Chiamolera, Léa M. Z. Maciel, Célia R. Nogueira, Gisah A. Carvalho, Suemi Marui, Rodrigo Moreira, Gustavo L. R. Daré, Silvânia S. Teixeira, Denise Perone, Sérgio A. Dib, Elizabeth X. Bianchini, Ângela M. Spínola e Castro, Ana P. Carvalho, and Rui M. B. Maciel

Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP (MIC,SAD, EXB,AMSC,RMBM); Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP (LMZM,GLRD); Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP (CRN,SST,DP); Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR (GAC); Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP (SM); Instituto Estadual de Endocrinologia e Diabetes, Rio de Janeiro, RJ (RM, APC); Hospital Geral de Bonsucesso, Rio de Janeiro, RJ (MA)

Correspondence: Rui M. B. Maciel, M.D., Ph.D.
Laboratory of Molecular Endocrinology, Division of Endocrinology, Department of Medicine, Universidade Federal de São Paulo
Rua Pedro de Toledo 781, 12o. andar
04039-032 São Paulo, SP, Brazil
Phone: 55-11-5084-5231 e-mail: rmbmaciel-endo@pesquisa.epm.br

Running title: Brazilian database of RTH
Key Words: Resistance to thyroid hormone (TRH), Brazil, Thyroid Hormone Receptor Beta (TRβ), Molecular Diagnosis, treatment, TRβ mutations

Abstract

Resistance to Thyroid Hormone (RTH) is a disease inherited as an autossomal dominant trait, which laboratorial findings include elevated thyroid hormone (TH) and nonsuppressed thyrotropin (TSH) levels. RTH could be either relatively asymptomatic or associated with thyrotoxic features. Until now, there is only one Brazilian kindred described with RTH due to a mutation in the Thyroid Hormone Receptor β (TRβ). The present study analyses additional 17 Brazilian patients with typical laboratorial and clinical characteristics of RTH. The patients show higher values of TSH and analogous values of free T4 when compared to previous described patients in the literature. Tachycardia, goiter, attention-deficit/hyperactivity disorder and learning disabilities were the main symptoms in our cases, but we also described a coincident thyroid cancer. The patients were submitted to genetic analysis using direct sequencing techniques. In 14 patients heterozygous single nucleotide substitutions in TRβ were found, being 13 different missense mutations including 6 novel, one small insertion and 2 patients without mutations in TRβ gene.

Introduction

Resistance to thyroid hormone (RTH) is a rare disease characterized by the variable resistance of peripheral and pituitary tissues to the action of thyroid hormones and is usually inherited as an autossomal dominant trait. The phenotype presents characteristic of both hypo- and hyperthyroidism and the most common clinical findings are goiter, tachycardia, attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), learning disabilities and delayed bone age (1-3).

The most important laboratorial findings are the elevation of serum free thyroxine (FT4) and free triiodothyronine (FT3) concentrations with the persistance of normal or slightly elevated serum thyrotropin (TSH), in the absence of intercurrent illness, use of drugs, or alterations of thyroid hormone (TH) transport serum proteins. The suppressive effect of only higher doses of exogenous TH on the secretion of pituitary TSH and on the metabolic responses in peripheral tissues is also of relevance (1, 4).

RTH can be classified as Generalized Resistance to TH (GRTH), when the patients are eumetabolic and maintain a near normal serum TSH concentration, or selective Pituitary Resistance to TH (PRTH), when patients present restless or tachycardia, appear to be hypermetabolic, and present high levels of TH and nonsuppressed TSH (4).

The precise incidence of RTH is difficult to determine because most of the current routine neonatal screening programs are based on the determination of TSH, and RTH is rarely identified by this method (5). The literature shows the occurrence of one case per 40,000 live births in a neonatal survey that employs T4 concentration (6). Current published cases surpass 1,000 (4).

Familial occurrence of RTH has been documented in approximately 75% of cases (4) and previous familiar studies showed that about 85% of the families presented mutations in the thyroid hormone receptor (TR) ß gene, located on

chromosome 3 (7). The known mutations are positioned in three hot spots encoding the Ligand-Binding Domain (LBD) of the receptor in the last exons of the gene (exons 7, 8, 9 and 10), the 12-helix of this domain formed a hydrophobic pocket where the T3 buried in. Consequently, the ability of the mutant proteins to bind T3 is moderately or markedly reduced and their ability to activate or repress target gene expression is impaired (1,4).

Until now there is only one Brazilian kindred described with RTH and mutation in TRβ (8); in the present study we have analyzed 17 new patients from centers throughout Brazil with RTH, in addition to the case already described, and report a consolidated Brazilian database with molecular diagnosis of RHT, being 6 novel mutations.

Subject and Methods

Subjects

17 affected subjects were included in the study, 13 from the state of São Paulo, 2 from the state of Paraná and 2 from the state of Rio de Janeiro. All subjects had classical clinical and laboratorial findings of RTH based in elevated levels of serum iodothyronines with nonsuppressed TSH. Data of thyroid function tests were depicted in Table 1.

Serum TSH, free T4, free T3, and thyroid antibodies were measured by similar immunometric methods in the different centers presenting < 10% of intra- and interassay coefficients of variation between them.

DNA extraction and sequencing

DNA from all subjects were submited to molecular diagnosis in one of the four centers (Universidade Federal de São Paulo, Universidade Estadual Paulista, Universidade de São Paulo-Ribeirão Preto and Universidade de São Paulo-São Paulo), which used the same protocol for the identification of mutations in TRβ in patients with RTH, reviewed and approved by the Ethical Committee of these Universities. After written informed consent from patients, genomic DNA from peripheral-blood lymphocytes was extracted by standard methods, using GFX Genomic Blood Purification Kit®, following the manufacturer's recommendations (Amersham Biosciences, England).

Exons 7, 8, 9 and 10 were amplified by Polimerase Chain Reaction (PCR). Reactions were performed employing 100 ng of genomic DNA in 25 μL volume, containing 100 μmol/L of each deoxy-NTP, 0.75 mmol/L MgCl2, 1U Taq polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) and 30 pmol of the specific primer. Primer sequences to search mutations were designed using the program PRIMER3 (free at http://compbio.epm.br/primer) (Table 2). Conditions to generate PCR products

were an initial phase of 5 min at 95C, followed by 30 cycles of 30 seconds at 95C, an annealing step of 1 min at 60C, and an extension step of 1 min at 72C. PCR-products were visualized in agarose gel with ethidium bromide.

The products of PCR were submitted to direct sequencing in both orientations, using ABI Prism Big Dye Primer cycle-sequencing Kit with Amplitaq DNA polymerase on the ABI 3100 sequencer (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

Results

Hormone levels and clinical features

The results of thyroid function tests of the 17 new cases and the previous described case, when off of drug therapy, are summarized in Table 1. They are 9 females and 9 males and the age of diagnosis ranged from 2 months to 63 years, with a mean of 16 years. All patients exhibited biochemical abnormalities which are characteristic of RTH, such as elevated concentrations of serum FT4 (mean 3.3 ng/dL, range 2.0-6.4 ng/dL), and a failure to suppress TSH secretion (mean 5.9 mU/L, range 1.0–35.0 mU/L). 2/14 cases tested for the presence of thyroid antibodies were positive.

In 7 cases the presence of thyrotoxic symptoms led to the diagnosis, but 4 cases had few clinical signs other than a goiter, and 4 had ADHD and learning disabilities. One patient (patient 1) had laboratorial alterations observed during the neonatal thyroid screening and his laboratorial data during the first year of life is showed in Table 3. Two patients came to medical attention due to their difficulty to gain weight; patient 2, for example, had her weight under the 3th percentile and height above the 10th percentile; patient 3 had a complaint of persistent high temperature.

In 15/17 cases the thyroid ultra-sound has revealed a goiter and 12/12 who were submitted to pituitary MRI showed normal results.

Three of the patients have undergone unsuccessful radioiodine therapy to ablate the thyroid. Six patients have undergone treatment with anti-thyroid drugs, and or TRIAC, and or beta blocker. Four patients did not receive any kind of therapy. Patient 1 received thyroid hormone in his first days of life but the treatment was interrupted with six months, as showed at table 3. In one patient a partial thyroidectomy was made, but the goiter has grown up again.

The mother of patient 6 was submitted to total thyroidectomy by a papillary thyroid microcarcinoma.

Genetic studies. After the suspicious clinical diagnosis of RTH was confirmed by thyroid function tests, an autosomal dominant mode of inheritance was documented through direct sequence of DNA in 5 kindreds; 7 cases were clearly sporadic, since both parents were unaffected. In the remaining 6 kindreds the inheritance pattern could not be established because no other affected family members were identified and one or both parents were not available for analyses.

In 16 cases the affected individuals were found to be heterozygous for a mutation in the TRβ gene (Table 4), but in 2 cases (cases 1 and 9), despite the fact that they presented clearly the diagnosis of RTH, we were unable to find any TRβ gene mutations. Fifteen different mutations were identified, comprising 6 novel and 9 previously described (Figure 1).

Most of the mutations were single nucleotide substitutions resulting in a codon change, and all of them are located in the Ligand Binding Domain (LBD), with the exception of patient 17, who presents a small insertion of a Cytosine (C) in position 1644 that results in a frameshift mutation in codon 454 with a premature stop codon in 463 (Table 4). The mutation P453T appeared in 2 unrelated kindreds.

Discussion

RHT is a rare syndrome which main feature is an impairment of feedback regulation within the pituitary-thyroid axis, manifested by elevated serum free thyroid hormone concentrations, together with a nonsuppressed TSH level.

The objective of this study is to report a Brazilian consortium of patients with RTH, collecting 17 new patients exhibiting the clinical and biochemical abnormalities of the syndrome, occurring sporadically or in a dominantly inherited manner, and one patient who has already been described (patient 18) (8). Sixteen out of the 18 cases follow the present recommendations to confirm the diagnosis of RTH, which are clinical findings suspicious of hyper or hypothyroidism, elevated levels of free T4 with nonsuppressed TSH, and a positive genetic study of mutations in the TRβ gene (4). In these 18 patients we identified 15 different mutations in the TRβ gene, being 6 of them novel, but in two patients no mutations were found.

Our patients, similarly to what was described in the literature, presented wide variable clinical manifestations with the presence or absence of thyrotoxic features, goiter or ADHD and learning disabilities.

The mean TSH values of our patients was higher than other series (5.9 vs. 3.5 mU/L), but the mean free T4 is similar to the values presented in the literature (3,3 ng/dL or 42,5 pmol/L vs. 39 pmol/L) (9). Two patients had positive thyroid antibodies. The mother of one of these patients, who also harbors mutation T277I, presented a papillary thyroid microcarcinoma. The finding of coincident thyroid cancer and RTH was already described (3, 10).

Most of the times these patients were misdiagnosed as having hyperthyroidism and, in consequence, were submitted to several forms of treatment, as patients in other series. Most of the patients neither need nor respond to any kind of used therapy (3, 4).

All the mutations found in our series were located at the LBD, as all the mutations described in the literature, some of the were in aminoacids that made direct

contact with T3, and others, as mutations at the Prolines 452 and 453, were outside the Binding Pocket formed by the 12 helix of LBD, and did not made direct contact with T3 (Fig. 2).

The 8 mutations already described are P453A, P453T, R338W, R320L, A317T, R438H, M310L, the insertion of a C in1644 position and M442T (8, 9, 11-15); with the exception of M442T mutation, the remain had their molecular characteristics very well described in the literature (table 4).

Our patient with R338W has been found, as most of the patients in the literature with this mutation, with Pituitary RTH (PRTH). Several studies showed that probably this mutation may tend to be associated with the phenotype of PRTH; this mutant TR binds to T3 only 9% in relationship to wild type receptor (9, 16-18). The mutations A317T, R320L, R438H, P453A and P453T had reduction of the affinity for T3 to 20%, 9%, 23%, 17% and 20% of the normal TRβ, respectively (9, 15, 18, 19).

The novel mutations were located in codons where other mutations have already been described, except P452L. All the other mutations described in those codons have variable phenotypes, both Pituitary RTH and Generalized RTH. Moreover all mutations lost the affinity to T3 and some of them, as the mutation T277A, also impaired cofactors recruitment (3, 9, 15,16,18, 20-22).

In the literature the mutation P453T is described as a common TRβ mutation (23). In our series of patient this is the only one that occurred in more then one kindred. Our series also presented one patient with the mutation R338W, that is also a very frequent mutation described in the literature in more than 25 different families (4).

The literature showed that 15% of families and 7% of cases presented RTH without mutation in TBβ or α, in our database 11% of our patients did not present TRβ mutationt, otherwise with classical clinical and laboratorial findings of RTH (4).

This is the first time that a Brazilian series of patients with RTH is described. The frequent mutations P453T and R338W are also present in our population, as the

clinical and laboratorial characteristics of RTH. We also described 6 new mutations, including the mutation P452L in a codon where no other mutation has been described before.

References:

1. Refetoff S, Weiss RE, Usala SJ 1993 The syndromes of resistance to thyroid hormone. Endocr Rev 14:348-399
2. Beck-Peccoz P, Chatterjee VK 1994 The variable clinical phenotype in thyroid hormone resistance syndrome. Thyroid 4:225-232
3. Brucker-Davis F, Skarulis MC, Grace MB, Benichou J, Hauser P, Wiggs E, Weintraub BD 1995 Genetic and clinical features of 42 kindreds with resistance to thyroid hormone. The National Institutes of Health Prospective Study. Ann Intern Med 123:572-583
4. Refetoff S 2004 chapter: 16A Resistance to Thryroid Hormone, in www.thyroidmanager.org. In:
5. Weiss RE, Balzano S, Scherberg NH, Refetoff S 1990 Neonatal detection of generalized resistance to thyroid hormone. Jama 264:2245-2250
6. Lafranchi SH, Snyder DB, Sesser DE, Skeels MR, Singh N, Brent GA, Nelson JC 2003 Follow-up of newborns with elevated screening T4 concentrations. J Pediatr 143:296-301
7. Lado-Abeal J, Dumitrescu AM, Liao XH, Cohen RN, Pohlenz J, Weiss RE, Lebrethon MC, Verloes A, Refetoff S 2005 A de novo mutation in an already mutant nucleotide of the thyroid hormone receptor beta gene perpetuates resistance to thyroid hormone. J Clin Endocrinol Metab 90:1760-1767
8. Furlanetto TW, Kopp P, Peccin S, Gu WX, Jameson JL 2000 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 71:520-526
9. Adams M, Matthews C, Collingwood TN, Tone Y, Beck-Peccoz P, Chatterjee KK 1994 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 94:506-515
10. Taniyama M, Ishikawa N, Momotani N, Ito K, Ban Y 2001 Toxic multinodular goitre in a patient with generalized resistance to thyroid hormone who harbours the R429Q mutation in the thyroid hormone receptor beta gene. Clin Endocrinol (Oxf) 54:121-124
11. Takeda K, Weiss RE, Refetoff S 1992 Rapid localization of mutations in the thyroid hormone receptor-beta gene by denaturing gradient gel electrophoresis in 18 families with thyroid hormone resistance. J Clin Endocrinol Metab 74:712-719
12. Boothroyd CV, Teh BT, Hayward NK, Hickman PE, Ward GJ, Cameron DP 1991 Single base mutation in the hormone binding domain of the thyroid hormone receptor beta gene in generalised thyroid hormone resistance demonstrated by single stranded conformation polymorphism analysis. Biochem Biophys Res Commun 178:606-612
13. Weiss RE, Weinberg M, Refetoff S 1993 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 91:2408-2415
14. Bayer Y, Fasshauer M, Paschke R 2004 The novel missense mutation methionine 442 threonine in the thyroid hormone receptor beta causes thyroid hormone resistance: a case report. Exp Clin Endocrinol Diabetes 112:95-97
15. Parrilla R, Mixson AJ, McPherson JA, McClaskey JH, Weintraub BD 1991 Characterization of seven novel mutations of the c-erbA beta gene in unrelated

kindreds with generalized thyroid hormone resistance. Evidence for two "hot spot" regions of the ligand binding domain. J Clin Invest 88:2123-2130

16. **Ando S, Nakamura H, Sasaki S, Nishiyama K, Kitahara A, Nagasawa S, Mikami T, Natsume H, Genma R, Yoshimi T 1996 Introducing a point mutation identified in a patient with pituitary resistance to thyroid hormone (Arg 338 to Trp) into other mutant thyroid hormone receptors weakens their dominant negative activities. J Endocrinol 151:293-300**
17. **Wan W, Farboud B, Privalsky ML 2005 Pituitary resistance to thyroid hormone syndrome is associated with T3 receptor mutants that selectively impair beta2 isoform function. Mol Endocrinol 19:1529-1542**
18. **Collingwood TN, Adams M, Tone Y, Chatterjee VK 1994 Spectrum of transcriptional, dimerization, and dominant negative properties of twenty different mutant thyroid hormone beta-receptors in thyroid hormone resistance syndrome. Mol Endocrinol 8:1262-1277**
19. **Aksoy DY, Gurlek A, Ringkananont U, Weiss RE, Refetoff S 2005 Resistance to thyroid hormone associated with autoimmune thyroid disease in a Turkish family. J Endocrinol Invest 28:379-383**
20. **Collingwood TN, Wagner R, Matthews CH, Clifton-Bligh RJ, Gurnell M, Rajanayagam O, Agostini M, Fletterick RJ, Beck-Peccoz P, Reinhardt W, Binder G, Ranke MB, Hermus A, Hesch RD, Lazarus J, Newrick P, Parfitt V, Raggatt P, de Zegher F, Chatterjee VK 1998 A role for helix 3 of the TRbeta ligand-binding domain in coactivator recruitment identified by characterization of a third cluster of mutations in resistance to thyroid hormone. Embo J 17:4760-4770**
21. **Macchia E, Agostini M, Sarkissian G, Giorgilli G, Canale D, Scartabelli G, Margotat A, Torresani J, Pinchera A 1998 Detection of a new de novo mutation at codon 251 of exon 8 of thyroid hormone receptor beta gene in an Italian kindred with resistance to thyroid hormone. J Endocrinol Invest 21:226-233**
22. **Mannavola D, Vannucchi G, Fugazzola L, Cerutti N, Persani L, Beck-Peccoz P 2002 Genetic analyses and evaluation of peripheral parameters of thyroid hormone action for the differential diagnosis of RTH. A novel heterozygous missense mutation (M334T) discovered. J Endocrinol Invest 25:RC4-6**
23. **Wu SY, Sadow PM, Refetoff S, Weiss RE 2005 Tissue responses to thyroid hormone in a kindred with resistance to thyroid hormone harboring a commonly occurring mutation in the thyroid hormone receptor beta gene (P453T). J Lab Clin Med 146:85-94**

Patient	Age	Sex	Initial Presentation	TSH	free T4	Antibodies	Thyroid US	Pituitary MRI	Previous Treatment
1	2m	M	Lab Findings	3.5	2.6	neg	-	-	TH
2	1y2m	F	Low weight	3.6	2.4	neg	normal	-	none
3	1y2m	M	Low weight	3.7	3.9	neg	DG	-	-
4	4y	M	ADHD + LD	3.8	2.2	neg	DG	normal	none
5	4y	M	Tachycardia	3.9	6.4	neg	DG	-	MTZ, β-Blocker, PT
6	5y	M	ADHD + LD	3.10	3.9	neg	DG	normal	TRIAC
7	6y	F	Goiter	3.11	3.2	pos	DG	-	-
8	9y	F	Goiter	3.12	2.6	neg	DG	normal	MTZ
9	13y	M	ADHD + LD	3.13	2.0	neg	normal	normal	-
10	13y	M	Tachycardia	3.14	2.5	neg	DG	normal	none
11	17y	F	Tachycardia	3.15	2.4	pos	DG	normal	MTZ
12	24y	M	Tachycardia	3.16	2.4	neg	DG	normal	131 Iodine
13	24y	F	Tachycardia	3.17	2.1	neg	DG	normal	PTU
14	27y	F	Tachycardia	3.18	3.2	neg	DG	normal	MTZ, TRIAC, β-Blocker
15	29y	M	Goiter	3.19	2.5	neg	DG	normal	131 Iodine
16	56y	F	Goiter	3.20	6.0	neg	DG	normal	None
17	63y	F	Tachycardia	3.21	3.1	neg	DG	normal	131 Iodine
18*	17y	F	ADHD + LD	3.22	5.2	neg	DG	-	-
mean	16y		-	3.23	3.3	-	-	-	-

TSH normal range: 0.45 a 4.5 mUI/L; Free T4 normal range: 0.7 a 1.5 ng/dL;

Table 1. Clinical Characteristics and Hormone Data of Patients

All the informations were about the index case.

ADHD: Attention-deficit/Hyperactivity disorder; LD: Learning disabilities
neg: negative; pos: positive
US: Ultrasound; DG: Diffuse Goiter;
MRI: Magnetic Resonance Imaging
MTZ: Metimazol; PTU: Propylthiouracil PT: Partial Thyroidectomy, TH: thyroid hormone;
* case already published (4)

Exon	Primer sense	Primer antisense	TM
7	gcatctgtgtgccttgtctc	tcccaaggtgatgaggactg	60°
8	gagggcctattaaagcaatgg	ttcctggaaactgatgaaac	60°
9	ctggcatttttgcatttgtt	agcaaaagctctttggatgc	60°
10	ggcctggaattggacaaag	cccaaataatccctcccaac	60°

Tabela 2 – Primers to Amplify and Sequence Exons of TRβ
Primers designed using the program PRIMER3 (free at http://compbio.epm.br/primer)
TM: Temperature of Melting

Age	FT4	TSH	LT4
20 d	0.7	125.0	none
27 d	1.7	43.1	25 µg
02 m	3.3	3.1	25 µg
05 m	3.2	2.0	25 µg
06 m	3.7	5.9	25 µg
07 m	2.8	10.6	none
09 m	2.7	3.5	none
10 m	2.7	2.9	none
11 m	2.9	10.4	none
1 year	2.7	2.5	none

TSH normal range: 0.45 a 4.5 mUI/L; Free T4 normal range: 0.7 a 1.5 ng/dL;

Table 3 – Laboratorial Evolution of patient 1
Patient 1 received LT4 until six months when was confirmed the diagnosis of RTH.

FT4 – Free Thyroxine; LT4 - Levothyroxine

Patient	Codon Change	Inheritance	Published Mutations in this Codon	Ref.
1	none	Sp	-	-
2	R320G	Sp	R-H, R-L, R-C	-
3	A 317T*	NK	A-T	15
4	P453A*	F	P-T, P-A, P-S, P-H	9
5	P453T*	Sp	P-T, P-A, P-S, P-H	15
6	T277I	F	T-A	-
7	R320L*	Sp	R-H, R-L, R-C	9
8	R438H*	F	R-C, R-H	12
9	none	Sp	-	-
10	R338W*	Sp	R-W, R-L	13
11	P453T*	NK	P-T, P-A, P-S, P-H	15
12	A317V	F	A-T	-
13	M334L	NK	M-T, M-R	-
14	P452L	Sp	-	-
15	C1644i frsh 454 (stop463)*	NK	C1644i frsh 454 (stop463)*	11
16	M442T*	NK	M-V, M-T	14
17	G251V	NK	G-E	-
18*	M310L*	F	M-T, M-L, M-I	8

Tabela 4 – Genetic Analysis

Aminoacids Changes and Codon number, Presumed Mode of Inheritance, Aminoacids Changes already published in each Codon and the reference of the mutations already published. Ref. – is the reference of the mutation found in our series.

Sp: Sporadic, NK: Not Known, F: Familiar

* - mutation already published

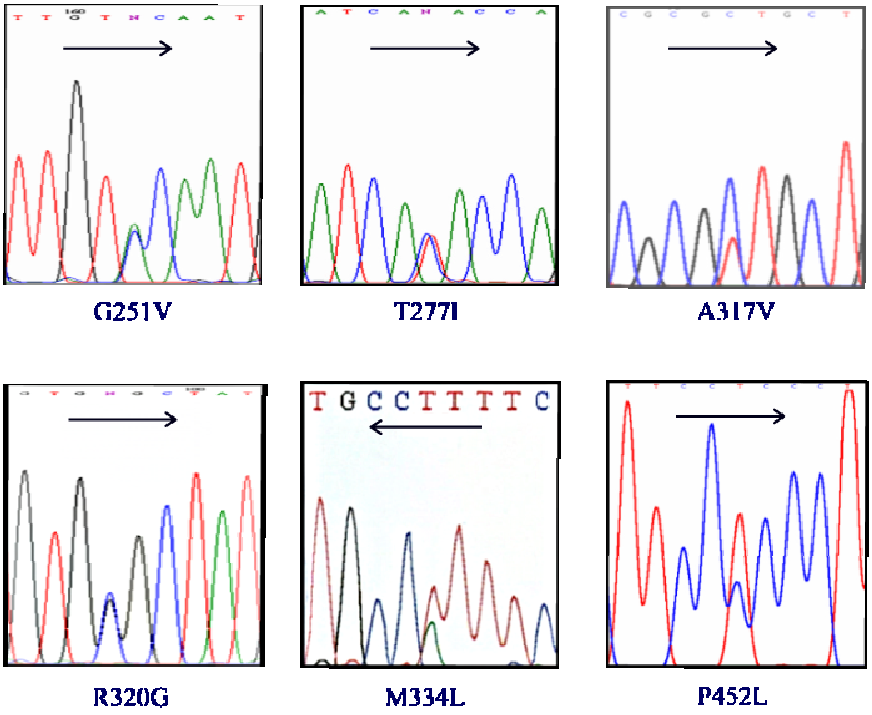


Figure 1 – The six novel mutations
Automated direct sequence analysis of the six novel TRβ mutants, showing from left to right heterozygous alters codon 251 from Guanine (G) to Valine (V), codon 277 Threonine (T) to Isoleucine (I), codon 317 Alanine (A) to Valine (V), codon 320 Arginine (A) to Guanine (G), codon 334 Methionine (M) to Leucine (L) and codon 452 Proline (P) to Leucine (L). The arrows shows the direction of the sequence, almost all sense, except M334L with a antisense direction.

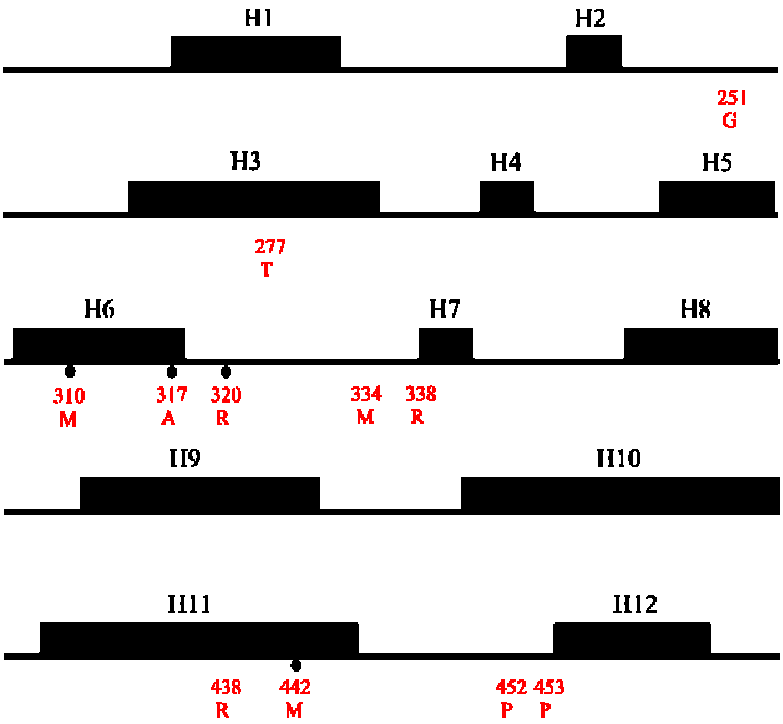


Figure 2 - Mutations positions in Thyroid Hormone Receptor Beta structure. Each black box represents one Helix numbered above, the codon where mutations are described in this paper are in red, with the respective wild type aminoacid, the dots represent the aminoacids that are in contact with T3 inside the binding pocket.

Artigo 2

A novel TRβ Mutation (P452L) in Resistance to Thyroid Hormone plays a Critical Role in the Interaction with Corepressor and Coactivator

Maria Izabel Chiamolera, Rutnéia P. Pessanha, Gustavo B. Barra, Lucas Bleicher, Rosa Paula M. Biscolla, Magnus R. Dias da Silva, Sérgio A. Dib, Gisah A. Carvalho, Igor Polikarpov, Francisco A. R. Neves, and Rui M. B. Maciel

Laboratory of Molecular Endocrinology, Division of Endocrinology, Department of Medicine, Escola Paulista de Medicina, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP (MIC, RPMB, MRDS, SAD, RMBM), Laboratory of Molecular Pharmacology, University of Brasília, Brasília, DF (RPP, GBB, FARN), Institute of Physics of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, SP (LB, IP) and Division of Endocrinology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR (GAC), Brazil

Correspondence: Rui M. B. Maciel, M.D., Ph.D.

Laboratory of Molecular Endocrinology, Division of Endocrinology, Department of Medicine, Universidade Federal de São Paulo

Rua Pedro de Toledo 781, 12o. andar

04039-032 São Paulo, SP, Brazil

Phone: 55-11-5084-5231 e-mail: rmbmaciel-endo@pesquisa.epm.br

Running title: TRβ's Proline 452 and Cofactors.

Key Words: Thyroid hormone receptor, Resistance to thyroid hormones, mutation, P452L, Coactivator, Helix-12.

Abstract

All mutations of Thyroid Hormone Receptor (TR) observed in Resistance to Thyroid Hormone (RTH) are in the receptor's ligand-binding domain (LBD). The 12 helixes of this domain form an hydrophobic pocket where the ligand is deeply buried. Upon ligand binding, the carboxy-terminal (Helix 12) undergoes major conformational changes, from a more open conformation to a closed one, resulting in dissociation of corepressor and formation of a surface that may determine whether coactivators can interact with TR, an essential requirement for TR transactivation function. In the present study, we report and characterize three mutations of the TRβ gene (P452L, A317V, and M442T) in Brazilian patients with RTH using conventional molecular methods including T3-binding assay, transient reporter gene transfection analysis in positive and negative regulated gene, glutathione-S-transferase (GST) pull-down assay, EMSA and homology modeling of the protein. At the luciferase assays, P452L exhibited a significant transcriptional impairment in both positive (DR4 and F2) and negative regulated genes (TRH) and did not recovered its transcriptional activity, even at supramaximal doses of T3, in spite of the fact that T3 binding was not as strongly altered as the other two mutants. In GST pull down assay, P452L failed to completely release the corepressor binding and exhibited almost no binding to the coactivator. These P452L characteristics (fail to transactivate reporter genes even at high doses of T3, to release corepressor and to interact with coactivator when T3 binding was only moderately diminished) were very similar to the known mutations at codon 453. Therefore, we suggest that both prolines could cause the same effect in TR structure, disturbing the interactions with both coactivator and corepressor not only by alteration in T3 binding, but mostly because both prolines may be responsible for a hinge function of helix 12, allowing its movement into the body of the LBD, inducing corepressor release and the formation of a coactivator interaction site.

Introduction

Resistance to Thyroid Hormone (RTH) is a dominantly inherited condition of impaired tissue responsiveness to thyroid hormone (TH). It is biochemicaly characterized by a nonsupressed TSH with elevated circulating T3 and T4 in patients with a great range of clinical manifestations that could have either features of hypothyroidism or hyperthyroidism, suggesting variable resistance in different tissues (1).

Genetic analysis had shown first a tight linkage between RTH syndrome and Thyroid Hormone Receptor β (TRβ) and this observation has been extended by the description of mutations in kindreds with RTH (2, 3). Since then, several missense, nonsense and frame-shift mutations have been described and the studies of the functional activity of the mutations have helped to built our knowledge about TRβ structure and function.

Thyroid Hormone Receptors (TR) alfa and beta are members of the nuclear receptor superfamily of ligand-mediated transcription factors (4). TRα gene is located in chromosome 17 and TRβ gene is located in chromosome 3. TRs are modular proteins, sharing a similar domain organization with the other family members formed by an amino-terminal domain, a central DNA-binding domain (DBD), a hinge region and a carboxy-terminal Ligand Binding Domain (LBD) region. The TRβ's LBD is where all the mutations described in RHT are located. This region mediates hormone binding, homodimerization, and heterodimerization with the retinoid X receptor (RXR) and interaction with co-regulators such as corepressors and coactivators (5-7).

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 (DR-4), inverted palindromes (F2) and palindromes (5). TRs preferentially form heterodimers with the retinoid X receptors (RXRs) although TR binds to DNA as either homodimers or

monomers (1), and the formation of homodimers or heterodimers with RXR is variable, depending on the configuration of TRE and the presence of ligand (8).

The LBD forms a hydrophobic pocket where ligand is buried deep and upon ligand binding, the carboxy-terminal region (Helix 12) undergoes major conformational changes, from a more open conformation to a closed one, to promote dissociation of corepressors such as N-CoR and SMRT and favor association of coactivators, including glucocorticoid receptor interacting protein (GRIP) and steroid receptor activator (SRC) (9,10).
The coactivators modulate transcription activity by altering and disrupting the repressive chromatin structure (13-16). In contrast, in the absence of T3, corepressors bind to TR to mediate transcriptional silencing on positive TREs and they potentiate histone deacetylase to repress the chromatin structure (12,15,16).

The molecular mechanisms which impair the function of TR mutants are reduced binding affinity for T3 and/or the impaired interaction with one of the cofactors involved in the mediation of TH effect (17,18). Therefore, these mutations spoil the transcriptional properties of TRβ (10). The identification of nuclear cofactors (co-activators and co-repressors) elucidate part of the molecular pathophysiology of the RTH, since these cofactors interact with distinct subdomains of thyroid receptors in a hormone-dependent manner (as mentioned above) and influence their contact with the basal transcriptional machinery (11, 19, 20). Moreover, RTH mutant receptor impairs the function of normal TRs by a dominant negative mechanism that involves the formation of inactive dimers between the mutant receptor and normal receptors which competes for DNA-binding sites (21-24).

In this study, we described three patients with RTH disease. Patient 1 and 2 showed a novel heterozygous missence mutation each in the TRβ gene, resulting in a substitution of a normal proline (CCC) by a mutant leucine (CTC) in codon 452 (P452L) and an alanine (GCT) substitution by a valine (GTT) in codon 317 (A317V) respectively. In patient 3 we observed a M442T mutation which was already described before (25). Using TR®1 functional assays and homology modeling, we demonstrated that P452L exhibited a strongly impairment on the transcriptional activity in both positive and negative regulated

genes which is not regained even at supramaximal doses of T3, in spite of the fact that T3 binding was only modestly reduced. In addiction, in GST pull down assay, P452L failed to completely release the corepressor binding and exhibited almost no binding to the coactivators. These P452L characteristics were very similar to the known mutations at codon 453. Therefore, we suggest that substitution of one of these prolines have the same effect in TR structure, since it disturbs the interactions with both coactivator and corepressor mostly because both prolines may affects the mobility of helix 12, allowing its movement into the body of the LBD, inducing corepressor release and the formation of a coactivator interaction surface.

Subjects and Methods

Subjects

We studied 3 Brazilian patients from apparently unrelated families with the diagnosis of RTH who presented unequivocal history and biochemical findings of RTH, showing elevated TSH levels in the presence of elevated serum TH (Table 1). The study was performed under institutionally approved protocols and signed written informed consents from all individuals who participated.

Patient 1 is a 27-year-old female who came to medical attention when she was 14 years old due to palpitations and a diffuse goiter. Laboratorial findings revealed an elevated fT4 level (3.2 ng/dL), an inappropriate normal TSH level (4.0 mUI/L), a normal TBG level, negative thyroid antibodies, and a normal pituitary on MRI. Treatment with methimazole and Triac did not reduce her cardiac rate, but she has responded to β-blockers. Her parents, healthy and nonconsanguineous and her only brother had normal thyroid function (Table 1).

Patient 2 is a 24-year-old male who was misdiagnosed as having hyperthyroidism when he was 12 years old and was treated with methimazole during 9 years, until a physician suspected of RTH due to a high fT4 level (2.4 ng/dL) in the presence of an inappropriate elevated TSH level (6.4 mUI/L) and a thyroid ultrasound showing a 60g diffuse goiter. His mother has a goiter and elevated TSH (13.2 mUI/L) and fT4 levels (2.0 ng/dL), but the thyroid function of his father and sister was normal (Table 1).

Patient 3 is a 56-year-old female who had diffuse goiter, elevated fT4 levels (> 6 ng/dL), normal TSH levels (2.5 mUI/L), normal TBG and α subunit levels (2300 mg/L, range 340-4000), normal response to the TRH test, and negative thyroid antibodies. Her mother and one of her sisters, who had a previous history of an altered thyroid function test, had normal thyroid function. Her father was already deceased at the time of the present investigation and she does not have children, preventing the complete genetic analysis of her family (Table 1).

TSH was measured by an immunofluorometric assay developed in our laboratory with a normal range between 0.3 and 4.5 mU/L (26). Free T4 and free T3 were measured by immunofluorimetric assays from Perkin-Elmer (normal values of 4.5-12 μg/dL and 0.6-1.5 ng/dl, respectively). Anti-thyroid peroxidase and anti-thyroglobulin antibodies were measured by radioimmunoassays (BRAHMS, Germany) and TBG and α subunit of glycoprotein hormones were measured by immunofluorimetric assays developed in our laboratory (27, 28).

DNA analysis

A research protocol for the identification of mutations in TRβ in patients with RTH was reviewed and approved by the Ethical Committee of the Federal University of São Paulo. After written informed consent from patients and relatives, genomic DNA from peripheral-blood lymphocytes was extracted by standard methods, using GFX Genomic Blood Purification Kit®, following the manufacturer's recommendations (Amersham Biosciences, England).

The four exons (7, 8, 9 and 10) where the hot spot regions for mutations are located, were amplified by Polimerase Chain Reaction (PCR). Reactions were performed employing 100 ng of genomic DNA in 25 μL volume, containing 100 μmol/L of each deoxy-NTP, 0.75 mmol/L MgCl2, 1U Taq polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) and 30 pmol of the specific primer. Primer sequences for searching mutations were designed using the program PRIMER3 (http://compbio.epm.br/primer) (Table 2). Conditions to generate PCR products were an initial phase of 5 min at 95C, followed by 30 cycles of 30 s at 95C, an annealing step of 1 min (temperature in Table 2), and an extension step of 1 min at 72C. PCR-products were visualized in an agarose gel with ethidium bromide.

The products of PCRs were submitted to direct sequencing in both orientations, using ABI Prism Big Dye Primer cycle-sequencing Kit with Amplitaq DNA polymerase and ABI 3100 sequencer (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

Functional Validation

Plasmids

Plasmids pCMX-hTRβ1 (containing promoters to CMV and T7, allowing expression in mammalian cells and transcription and translating at *in vitro* system) and pGEX-hTRβ wild type were submitted to Site-Directed Mutagenesis using Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) and primers with the appropriated nucleotide change for each mutation (Table 3). Sequences were reconfirmed by DNA sequencing (10, 29). Plasmids pGEX were expressed in BL-21 competent cells (0.5 M isopropulthiogalactoside added at OD600=0,8,6 hours) and the extract was used for the T3 binding assay, pCMX plasmids were used for in vitro transcription/translation and/or for transient expression analysis.

Firefly luciferase reporter plasmids containing thyroid response elements, with two copies of each TRE: DR4 (AGGTCAnnnnAGGTCA) or F2 (TGACCTnnnnnnAGGTCA) cloned upstream from the minimal thymidine kinase (TK) promoter-driven luciferase gene (LUC) (30). The TRH-LUC construct contains the human TRH promoter upstream of the luciferase gene.

TR-binding assays

L-[3'-^{125}I]Triiodothyronine (500 mCi/mg) was obtained from Amershan Biosciences (United Kingdom). Hormone binding was carried out as described by Wagner et al (31) in G-25 Sephadex column, and the T3-binding equilibrium dissociation constant (Kd) values were calculated from the competition data using the Prism computer program (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). The protein was obtained through the extract of transformed BL21 competent cells.

Cell Culture and Transfection Assays

Human promonocyte U937 cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% of newborn calf serum, penicillin 50 U/mL, streptomycin 50 μg/mL and glutamine 2 mM. For transfection assays, cells were collected by centrifugation and ressuspended in transfection solution (0.5 mL/ 1.0 x 10^7 cells) containing PBS, 100 mM calcium and 0.1% dextrose, transfection reactions contained 0,5 - 2,5 μg of the receptor plasmid (wild type and mutants) and 4 μg of the luciferase reporter plasmid (DR4, F2 or the TRH promoter). The cells were transferred to a cuvette and electroporated using a Gene Pulser II Electroporation System – Bio-Rad, US) at 0.300 mV, 0.950 μF. After that the cells were transferred to fresh RPMI 1640 medium, plated in twelve-well plates and treated in triplicates with ethanol or thyroid hormone (T3) at different concentrations for a dose-response curve. For the study of the Dominant Negative Effect the cells were exposed to 1 μg or 5 μg of TR plasmid (wild type or mutant in 1:1 or 1:5 proportion) and 4 μg of reporter plasmid (DR4 and F2), incubated with ethanol or T3 (10^{-4}M). After 20 to 24 hours of incubation at 37C, 5% CO_2 the cells were collected by centrifugation, lysed by the addition of 150 μL 1x lyses buffer (Promega) and assayed for luciferase activity using Luciferase Assay System (Promega, Madison, USA) and the luminescence was read at a luminometer (LUMAT LB 9501, Berthold, Germany). All transfection experiments were performed at least three times (32).

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

The protein used in the study of TR binding to TRE and the homo and heterodimerization made by EMSA were in vitro transcripted and translated using pCMX vectors (with TRβ, RXR and mutants cDNA) in a coupled transcription translation system TNT®T4 Quick (Promega, Madison, WI, USA), with addition of cold or ^{35}S-labeled methionine ([^{35}S] met, DuPont). The efficiency of translation of ^{35}S-labeled methionine was determined by sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis.

Gel shift assays were performed by mixing 20 fmoles of radiolabeled TRs from transcription translation system reaction with 10 ng of nonradiolabeled DR4 of F2

oligonucleotides and 1 μg nonspecific DNA poly dI-dC (Pharmacia LKB, Piscataway, NJ), and incubated in a binding buffer with final concentration in the assay 10 mM NaPO4, 0.5 mM MgCl2, 20 mM NaCl, 0.25mM EDTA, 5% glycerol, 0.1%MTG (monothioglycerol) in a 25 μL final volume reaction. After 20 minutes at room temperature, the mixture was loaded onto a 5% non-denaturing polyacrylamide gel that was previously run for 30 min at 200 volts. To separate the TR-DNA complexes, the gel was run at 4C for 90-180 minutes at 240 volts, using running buffer containing 6.7mM Tris-base (pH 7.5 for a 10x stock at room temperature), 1mM EDTA and 3.3 mM sodium acetate. After running, the gel had been extensively washed with 30% methanol and 10% glacial acetic acid, and amplified for 30 min (Amplifier, Amersham Pharmacia Biotech), dried, and exposed for autoradiography. The gel shown is representative of at least 3 independent experiments (33).

Glutathione-S-Transferase (GST) Assay

For these experiments full-lengths GRIP1 (563-1121), SRC1 (381-882) and SMRT (987-1491) were prepared in *E. coli* strain BL21 as a fusion protein with glutathione-S-transferase (GST) according to manufacturer's protocol (Pharmacia Biotech). The binding experiments were performed by mixing glutathione-linked Sepharose beads containing 10 μg of GST-coprotein fusion proteins (Coomasie Plus Protein Assay Reagent, Pierce) with 3 μL of the [^{35}S]-labeled wild type or mutant h TRβ1 in 150 μL of binding buffer (20 mM HEPES, 150 mM KCl, 25 mM MgCl2, 10% glycerol, 1 mM dithiothreiol, 0.2 mM phenylmethylsulfonylfluoride, and protease inibithor) containing 2ng/μL BSA for 2 h at 4C, with or without T3 10^4 M^{-1}. Beads were washed three times with 1 ml of binding buffer and heated to 100C for 3 min. Bound proteins were separated using 10% SDS-PAGE and visualized by autoradiography. Binding was quantified by phosphorimaging using ImageQuant/ Molecular Dynamics (30).

Computer Models

We have constructed computer models for the protein structure of the P452L mutant using homology modeling. We have chosen the structure of hTRβ complexed with GRIP1 (PDB code: 1BSX) as a template for model construction. GRIP1 is a coactivator of about 160kDa which presents LXXLL motifs, which are recognized by nuclear receptors. On this structure, the LBD domain of hTRβ was crystallized as a complex with an α-helix of GRIP1, showing the interactions between the receptor and the LXXLL sequence, which is common to a variety of coactivators.

We have produced 100 models with the *Modeller* program (34), which were validated using the softwares *Procheck* (35, 36), *Whatcheck (37)* and *Verify3D (38, 39)*. The best model was selected using as criteria the lower value for *Modeller*'s energy function and quality of the Ramachandran plot.

Results

Sequence Analysis

Sequencing exons 7-10 of TRβ gene of patients revealed that all three patients present missense heterozygous mutations. Patient 1 revealed a novel mutation with a substitution of a normal proline (CCC) by a mutant leucine (CTC) in codon 452 (P452L), but her parents exhibited a normal DNA sequence; this is a *de novo* mutation because both parents have a normal thyroid phenotype and absence of the TRβ gene mutation identified in Patient 1. Patient 2 also showed a novel mutation with a substitution of an alanine (GCT) by a valine (GTT) in codon 317 (A317V), mutation also observed in his mother's DNA sequence. Patient 3 showed a substitution of a methionine (ATG) by a threonine (ACG) in codon 442 (M442T); this mutation was already described in the literature, but since there was no functional analysis, we have decided to include it in this study (25). (Figure 1).

Functional Analysis

Firstly, we analyze the T3-binding dissociation coefficient (Kd) of the 3 mutants expressed in BL-21 competent cells and compared them to wild-type TR (wt-TRβ). The results showed that all mutants have lower affinity to T3, when we compared to wild-type TR. Consequently, the Kd values of wild-type TR (2.83×10^{-10}) were lower than P452L (2.29×10^{-9} M), A317V (3.61×10^{-9} M) and M442T (9.23×10^{-8} M).

Secondly, to study whether TRβ mutations modifies the ligand depended transactivation function, we have examined TR's abilities to modulate the transcription activity in U937 cells. To performed this assay, we cotransfected TRβ expression vectors encoding wt-TRβ or the mutant receptors (P452L, A317V or M442T) with a luciferase reporter gene driven by DR-4, F2 elements or the Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) promoter, positive and negative regulated reporter genes respectively. Dose-response experiments (Figure 2 and 3) showed that all three mutants lacked transcriptional

activation in the positive regulated elements, even in the presence of 10^{-6} M T_3. However, at greater doses of T_3, transcriptional activation varied among the mutants. In DR-4 response element, in spite of the fact that P452L exhibited the highest T3-binding affinity when compared with A317V and M442T, P42L mutant, even at the highest concentration of T_3, did not reach the maximum response as was observed with A317V and M442T (Figure 2). In F2 response element, the transcription activation property was lower in all the mutants in spite of a higher T_3 concentration, but was worst at all in P452L (Figure 2). Therefore, when compared to TRwt, the EC50 values of the three mutants were higher (Table 3). Analyzing the negatively regulated promotor, TRH-LUC, all RTH mutants also exhibited impaired T3-induced transcription repression, even at higher T3 doses (Figure 3 and Table 4).

Next we investigated the dominant negative effect of each RTH mutant and as we can observe in Figure 4, P452L, A317V and M442T inhibited TR◎1wt transcription activity, This phenomenon was more clearly at the ratio of 1:5 (wild type versus RTH mutant) when the co-transfection of P452L, A317V and M442T reduced the TR◎1wt activity at ratio 1:1 and 1:5 to 62 / 41%, 81 / 51% and 56 / 40% in DR-4 and 41 / 29%, 48 / 33% and 29 / 44% in F2 respectively.

Further, using gel mobility shift assays, we study the binding of the *in vitro* synthesized wt-TRβ and mutants to DNA at the TRE DR-4 and F2 . On DR-4 element all three mutants exhibited a moderately reduced heterodimer formation. For mutants P452L and A317V homodimer formation was also modestly diminished. The experiment using F2 response element showed that only M442T mutation caused a discreet loss in homodimer formation. As shown, on DR-4 element, the three RTH mutations slight reduced the binding of TRs as homodimers and heterodimers. However, on F2, the binding of RTH mutants homodimers and heterodimers were similar to TRwt, although P452 binding as heterodimers were slightly increased.

As was already described by others groups, these results demonstrated that the RTH mutants receptors differed in their ability to bind to DNA as homo or heterodimers

according with the type of TRE used, although this difference was small, since all of them succeed to bind DNA as in homo or heterodimer (10) (Figure 5).

We also determined whether these mutations disturb TR interaction with co-regulators, such as coactivators SRC and GRIP and corepressor SMRT. Using the GST-pull down assay we observed that the T_3-dependent dissociation of the corepressor SMRT from all the three mutants was impaired in comparison to the wt-TRβ. In addition, P452L, A317V and M442T were also unable to recruit coactivators as well as TR wild type, although P452L mutation had the strongest effect since none interaction was observed with both coactivators (Figure 6).

Finally, we have constructed computer models to analyze the interaction between P452L mutant and the GRIP1 peptide, which should reflect the docking of the coactivator on the mutated protein (Figure 7). It can be seen from this figure that the codon 452 appears just in the beginning of helix 12, upon which the coactivator should attach. The change of a proline to a leucine in this region would turn that portion of helix 12 more floppy, what could modify the direct contacts between the coactivator and the receptor and impairs transactivation activity.

Discussion

All mutations of human TR observed in resistance to thyroid hormone defined to date are in the receptor's ligand-binding domain (LBD). In the present study, we first report a novel RTH mutant, P452L, which is not capable to regulate transcription activity in positive and negative promoter genes. Additionally, we demonstrated that the lack of T3 response in the modulation of P452L transcriptional activity could be attributed mainly because this mutation completely disrupted TR interaction with co-regulators, the corepressor SMRT and the coactivators SRC and GRIP, in spite of fact that did not strongly reduce T3 binding affinity. Consequently, P452L shows a similar T3-binding affinity to A317V and better than M442T. However, in comparison to M442T and A317V, P452L exhibits the lowest transactivation function in positive and negative response elements.
Different from A317V and M442T which disturb the hormone binding pocket, P452L mutant is in a codon outside of the hydrophobic pocket, and is not in direct contact with T3, but is very close of the AF-2 sequence, a region highly conserved among many nuclear receptors, which consists of hydrophobic and negatively charged residues, which may form an amphipathic helix (constituted by a 9 amino acids at the extreme carboxyl terminus of TRβ, within helix 12). The AF-2 domain is important for ligand-dependent transcriptonal activation by other nuclear hormone receptors and could interact with co-activators and co-repressors (5, 17, 31, 40), mutations in the AF-2 region display normal T3 binding, DNA binding, and heterodimerization but are transcriptionally inactive in the presence of ligand probably because their inability to recruit coactivators (40).

No other mutants were described before at codon 452, but missense mutations were reported in the adjacent 453 proline (that immediately precedes the AF-2 sequence) and in 454 leucine (at the AF-2 domain). All the 453 mutants impaired activation of a reporter gene, even in the presence of supramaximal T3 concentration, as we demonstrated for P452L. Similar to P452L, the 453 and 454 mutants failed to release the co-repressor and were unable to interact with the co-activator in the presence of T3, even when T3 binding affinity were only mildly impaired (8, 17, 41). For this reason, it was

proposed that the codon 453 plays a critical role for corepressor release of the TR after hormone binding, and that defeated dissociation independent of hormone occupancy is one of the mechanisms of RTH in mutations located at this codon (17).

To further explain these phenomenon, Yoh at al (17) had proposed that the region where codon 453 is located behaves as a hinge region, which permitted a C-terminal tail (helix 12) of the receptor rotates from an exposed position in the absence of hormone to a new position laid against the body of the receptor in the presence of hormone. Therefore, mutations at this codon impaired this function (42). Indeed, the helix 12 acts as a dual functional domain: after the binding of T3 promotes its conformational changes, the corepressor is released and the coactivator is recruited.

Computer Modeling was not able to elucidate whether this mutation alters Helix 12 function, so further studies on TRs crystal structure will provide a better understanding of the real role of proline 452 in the action of TR.

Reinforcing the importance of coactivator interaction in the negative regulation transcription, Ortiga-Carvalho et al. recently described that the failure in repression of negative regulated genes could be explained by the abolished interaction with the coactivators and corepressors (43).

In conclusion, our three mutant TRβ receptors impaired essentially the transactivation and the interaction with the coregulator. A317V and M442T modify the binding pocket surface and impair T3 binding and P452L brings a new knowledge because even though modestly reduces T3 binding affinity it almost abolish T3 transcription regulation. We postulated, based in our findings with P452L (fail in the transactivation of reporter genes positive and negative regulated, in release corepressor and interact with coactivator even at high doses of T3) that the proline 452, as the proline 453, disturbs the interaction with both co-activator and co-repressor, by disrupting the hinge function of helix 12, not allowing this helix to settle in its right position. Probably P452L spoiled also the properties of the AF-2 domain.

References:

1. Refetoff, S., R.E. Weiss, and S.J. Usala, *The syndromes of resistance to thyroid hormone.* Endocr Rev, 1993. **14**(3): p. 348-99.
2. 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.
3. Usala, S.J., et al., *A base mutation of the C-erbA beta thyroid hormone receptor in a kindred with generalized thyroid hormone resistance. Molecular heterogeneity in two other kindreds.* J Clin Invest, 1990. **85**(1): p. 93-100.
4. Evans, R.M., *The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.* Science, 1988. **240**(4854): p. 889-95.
5. Yen, P.M., *Physiological and molecular basis of thyroid hormone action.* Physiol Rev, 2001. **81**(3): p. 1097-142.
6. Forman, B.M., et al., *A domain containing leucine-zipper-like motifs mediate novel in vivo interactions between the thyroid hormone and retinoic acid receptors.* Mol Endocrinol, 1989. **3**(10): p. 1610-26.
7. Glass, C.K., *Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers.* Endocr Rev, 1994. **15**(3): p. 391-407.
8. Collingwood, T.N., et al., *Spectrum of transcriptional, dimerization, and dominant negative properties of twenty different mutant thyroid hormone beta-receptors in thyroid hormone resistance syndrome.* Mol Endocrinol, 1994. **8**(9): p. 1262-77.
9. Darimont, B.D., et al., *Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions.* Genes Dev, 1998. **12**(21): p. 3343-56.
10. Feng, W., et al., *Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors.* Science, 1998. **280**(5370): p. 1747-9.
11. Ogryzko, V.V., et al., *The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases.* Cell, 1996. **87**(5): p. 953-9.
12. Monden, T., et al., *Leucine at codon 428 in the ninth heptad of thyroid hormone receptor beta1 is necessary for interactions with the transcriptional cofactors and functions regardless of dimer formations.* Thyroid, 2003. **13**(5): p. 427-35.
13. Onate, S.A., et al., *Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily.* Science, 1995. **270**(5240): p. 1354-7.
14. Hong, H., et al., *GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(10): p. 4948-52.
15. Urnov, F.D., et al., *Targeting of N-CoR and histone deacetylase 3 by the oncoprotein v-erbA yields a chromatin infrastructure-dependent transcriptional repression pathway.* Embo J, 2000. **19**(15): p. 4074-90.
16. Chen, J.D. and R.M. Evans, *A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors.* Nature, 1995. **377**(6548): p. 454-7.
17. 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.

18. Liu, Y., et al., *Lack of coactivator interaction can be a mechanism for dominant negative activity by mutant thyroid hormone receptors.* Endocrinology, 1998. **139**(10): p. 4197-204.
19. Nakajima, T., et al., *Analysis of a cAMP-responsive activator reveals a two-component mechanism for transcriptional induction via signal-dependent factors.* Genes Dev, 1997. **11**(6): p. 738-47.
20. Nagy, L., et al., *Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase.* Cell, 1997. **89**(3): p. 373-80.
21. Sakurai, A., et al., *Dominant negative transcriptional regulation by a mutant thyroid hormone receptor-beta in a family with generalized resistance to thyroid hormone.* Mol Endocrinol, 1990. **4**(12): p. 1988-94.
22. 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.
23. 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.
24. Kopp, P., K. Kitajima, and J.L. Jameson, *Syndrome of resistance to thyroid hormone: insights into thyroid hormone action.* Proc Soc Exp Biol Med, 1996. **211**(1): p. 49-61.
25. Bayer, Y., M. Fasshauer, and R. Paschke, *The novel missense mutation methionine 442 threonine in the thyroid hormone receptor beta causes thyroid hormone resistance: a case report.* Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2004. **112**(2): p. 95-7.
26. Vieira JGH, Kunii IS, Nishida SK, Matsumura LK, Russo EMK, Maciel RMB 1992 Development and application of an immunofluorimetric method for the determination of thyrotropin in sera and filter paper. Arq Bras Endocrinol Metab 36:7-12
27. Vieira JGH, Tachibana TT, Obara LH, Nishida SK, Lombardi MT, Maciel RMB 2002 Development of an immunofluorometric assay for thyroxine-binding globulin (TBG) and its application in cases of protein deficiency. J Bras Patol 38:255-260
28. Vieira JGH, Noguti KO, Macedo CD, Abucham J, Nishida SK, Weffort RVB, Kasamatsu TS. Development of na immunometric assay for the measurement of subunit of glucoprotein hormones. Arq Bras Endocrinol Metab 1993; 37: 69-74
29. Umesono, K., et al., *Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors.* Cell, 1991. **65**(7): p. 1255-66.
30. Ding, X.F., et al., *Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): multiple motifs with different binding specificities.* Mol Endocrinol, 1998. **12**(2): p. 302-13.
31. Wagner, R.L., et al., *Hormone selectivity in thyroid hormone receptors.* Mol Endocrinol, 2001. **15**(3): p. 398-410.
32. Ribeiro RC, Feng W, Wagner RL, Costa CH, Pereira AC, Apriletti JW, Fletterick RJ, Baxter JD. *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):14987-95.

33. Ribeiro, R.C., et al., *Heterodimerization and deoxyribonucleic acid-binding properties of a retinoid X receptor-related factor.* Endocrinology, 1994. **135**(5): 2076-85.
34. Sali A, Blundell TL 1993 Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. J Mol Biol 234:779-815
35. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM 1993 PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. J Appl Cryst 26:283-291
36. Morris AL, MacArthur MW, Hutchinson EG, Thornton JM 1992 Stereochemical quality of protein structure coordinates. Proteins 12:345-364
37. Hooft RWW, Vriend G, Sander C, Abola EE 1996 Errors in protein structures. Nature 381:272
38. Bowie JU, Luthy R, Eisenberg D 1991 A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. Science 253:164-170
39. Luthy R, Bowie JU, Eisenberg D 1992 Assessment of protein models with three-dimensional profiles. Nature 356:83-85
40. Tone, Y., et al., *Functional analysis of a transactivation domain in the thyroid hormone beta receptor.* J Biol Chem, 1994. **269**(49): p. 31157-61.
41. Zavacki, A.M., et al., *Dominant negative inhibition by mutant thyroid hormone receptors is thyroid hormone response element and receptor isoform specific.* Mol Endocrinol, 1993. **7**(10): p. 1319-30.
42. Wagner, R.L., et al., *A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor.* Nature, 1995. **378**(6558): p. 690-7.
43. Ortiga-Carvalho, T.M., et al., *Negative regulation by thyroid hormone receptor requires an intact coactivator-binding surface.* J Clin Invest, 2005. **115**(9): p. 2517-23.

	Patient 1	Patient 2	Patient 3
TSH	4,0 mUI/L (0,3 – 6,5)	6,4 mUI/L (0,3 – 4,5)	2,5 mUI/L (0,3 – 4,5)
fT4	3,2 ng/dL 0,9 – 1,8)	2,4 ng/dL (0,7- 1,5)	> 6,0 ng/dL (0,7-1,5)
TBG	12,3 μg/dL (10-19)	----------	18,0 μg/dL (10-19)
Antibodies	Negatives	Negatives	Negatives
α-subunit	----------	----------	2300 mg/dL (340-4000)
TRH test	----------	----------	Normal
Ultrasound	Difuse enlargement with textural alteration	Difuse enlargement - 60g	Difuse enlargement
I^{131} scan	Hypercaptation	Hypercaptation	----------
Pituitary MRI	Normal	Normal	Normal

Table 1: Laboratorial and Clinical Characteristics of the patients.

Exon	Primer sense	Primer antisense	TM
7	gcatctgtgtgccttgtctc	tcccaaggtgatgaggactg	60°
8	gagggcctattaaagcaatgg	ttcctggaaactgatgaaac	60°
9	ctggcatttttgcatttgtt	agcaaaagctctttggatgc	60°
10	ggcctggaattggacaaag	cccaaataatccctcccaac	60°

Table 2: Intronic primers used to perform the PCR reactions for amplification of the hot spot exons of TR, this primers were designed using the program PRIMER3 (free at http://compbio.epm.br/primer), and the melting temperatures (TM) used for each assay.

Mutant TR	Primer sense	Primer antisense	TM
A317V	ggagatcatgtcccttcgcgttgctgtgcgctatgacccg	cgggtcatagcgcacagcaacgcgaagggacatgatctcc	89,2°
M442T	gccgcttcctgcacacgaaggtggaatgcccc	ggggcattccaccttcgtgtgcaggaagcggc	87,4°
P452L	gccccacagaactcttcctcccttttgttcctgg	ccaggaacaaagggaggaagagttctgtggggc	84,6°

Table 3: Primers and melting temperature (TM) used to construct the mutant plamids, they were designed following the specifications of Stratagene™ for use it's Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit™.

	EC50 – DR-4 (M)	EC50 – F2 (M)	EC50 – TRH (M)
WT	$1{,}30 \times 10^{-8}$	$3{,}47 \times 10^{-8}$	$2{,}91 \times 10^{-9}$
A317V	$1{,}06 \times 10^{-6}$	$5{,}04 \times 10^{-6}$	$8{,}24 \times 10^{-8}$
M442T	$1{,}07 \times 10^{-6}$	$1{,}52 \times 10^{-6}$	$9{,}50 \times 10^{-9}$
P452L	$2{,}43 \times 10^{-7}$	$6{,}22 \times 10^{-7}$	$1{,}00 \times 10^{-7}$

Table 4: Comparation of Transcriptional capacity of the three TRβ mutants.
EC50 represent the T3 concentration required for half-maximal receptor activity in the transient transfection assay. The values, as the curve in figure 2, were calculaded using GraphPad Prism Version 3 (GraphPad Software Inc.)

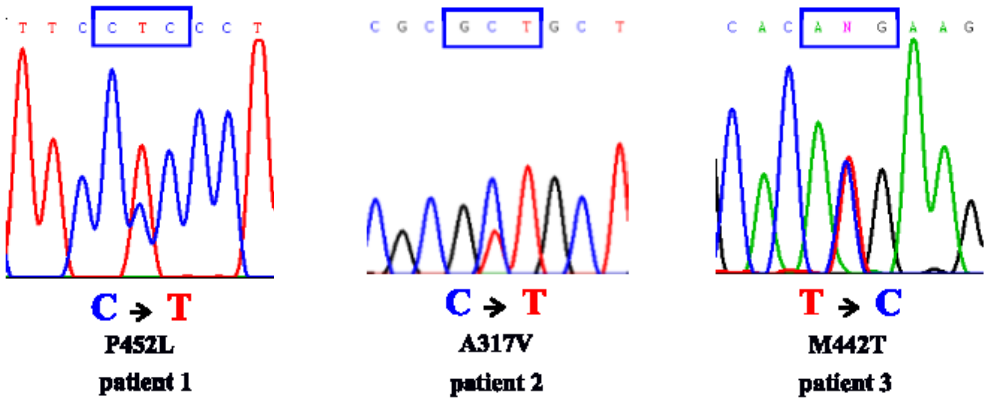


Figure 1: The direct sequencing of PCR products of the three mutations demonstrating a Citosine (C) to Timine (T) change resulting in a alteration of aminoacid Proline to Threonine at codon 452 (P452L) in patient 1, again a change from C to T promotes a transition of the aminoacid Alanine to Valine at codon 317 (A317V) in patient 2 and a T to C transition leads to a cheange of a Metionine to a Threonine at codon 442 (M442T) a in patient 3. All the three mutations were found in heterozigoses.

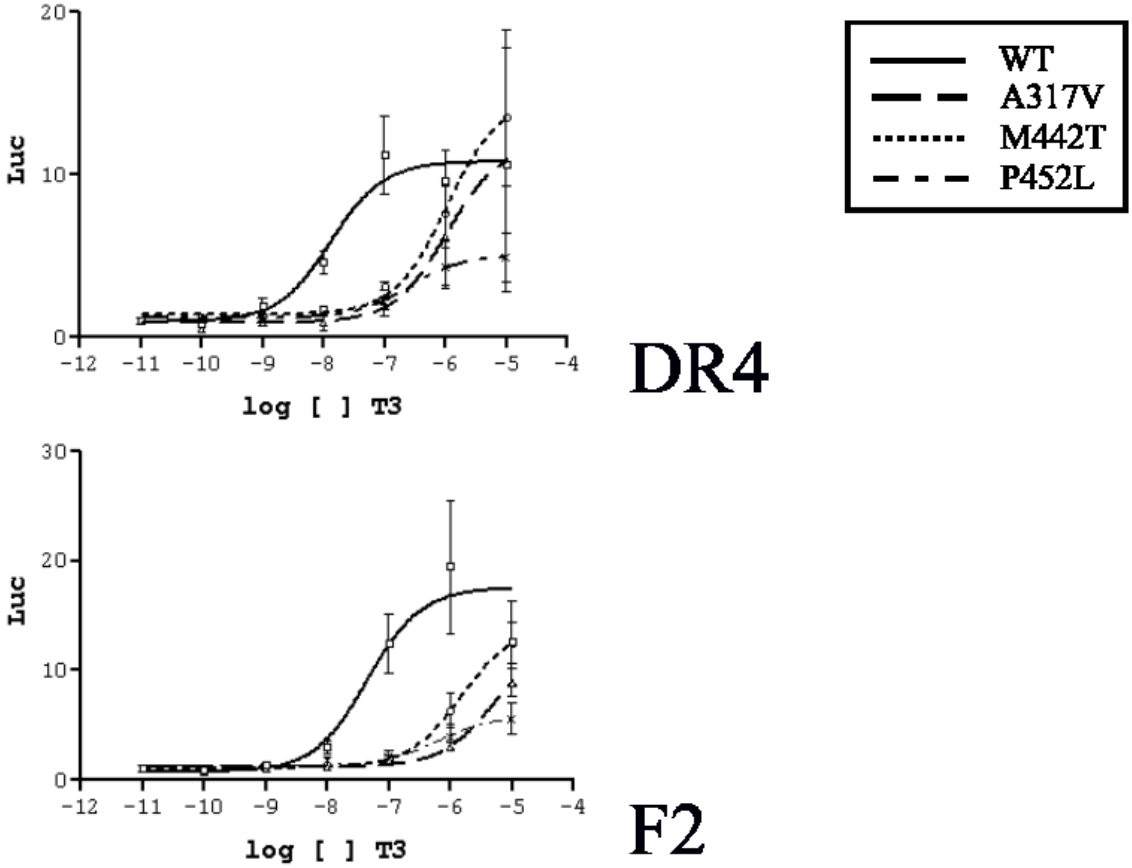


Figure 2: T3 –Dependent Activity of Wild Type and Mutant Receptors on DR-4 and F2 TREs. U937 cells were cotransfected with WT or mutant TRβ expression plasmids and with the reporter luciferase costruct. Hormone-dependent activation in response to increasing amounts of T3 were expressed as fold T3 inductions obtained with each amount of T3. The data shown is the mean of five separate experiments, each done in triplicate.

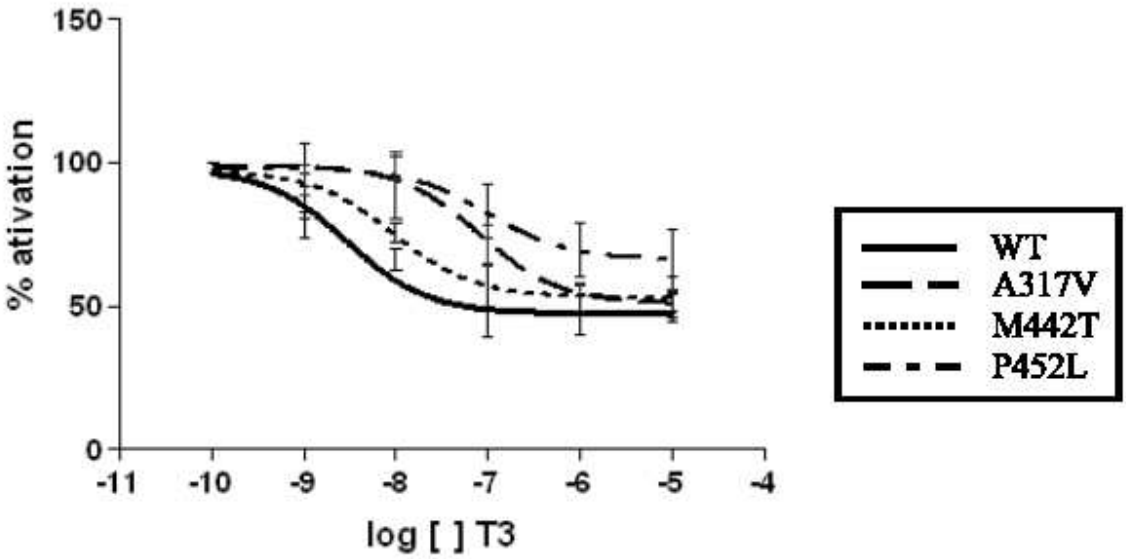


Figure 3: Negative Regulated Gene - U937 cells were cotransfected with WT or mutant TRβ expression plasmids together with the reporter luciferase costruct containing the promoter region of Thyrotropin Release Hormone (TRH). Hormone-dependent repression in response to increasing amounts of T3 were expressed as a percentage of the maximum WT receptor response. The data shown is the mean of three separate experiments, each done in triplicate.

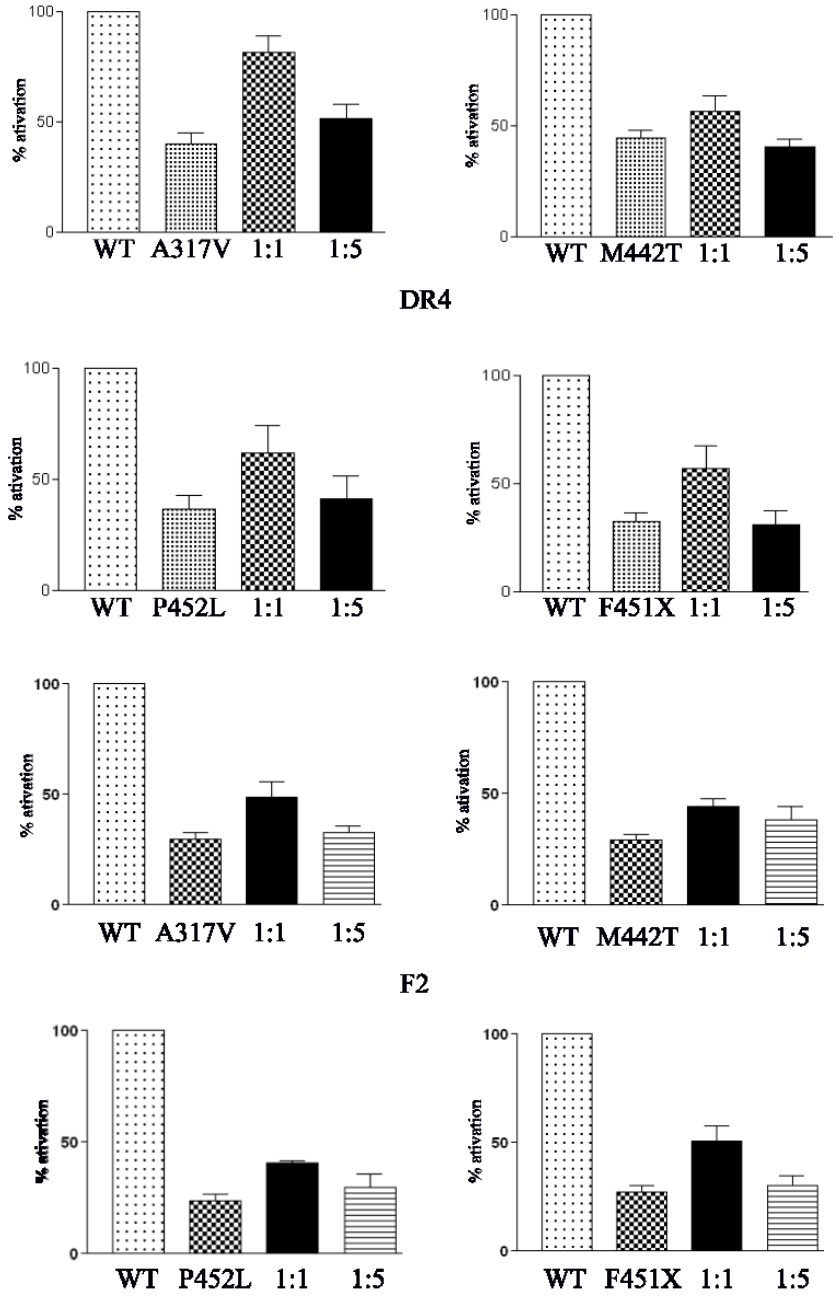


Figure 4: Dominant Negative Effect (DNE) – The U-937 cells were transfected to 1 μg or 5 μg of TR plasmid (wild type or mutant in 1:1 or 1:5 proportion) and 4 μg of reporter plasmid (DR4 and F2), incubated with ethanol or T3 (10-4M). In the graphics it´s possible to see that all the mutants have the DNE in both TRE, and especially in 1:5 wild type and mutant ratio.

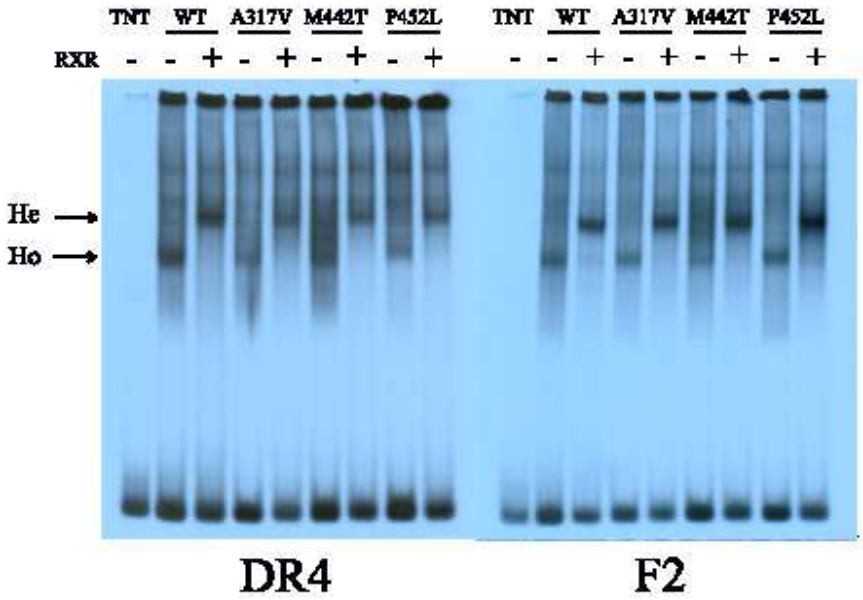
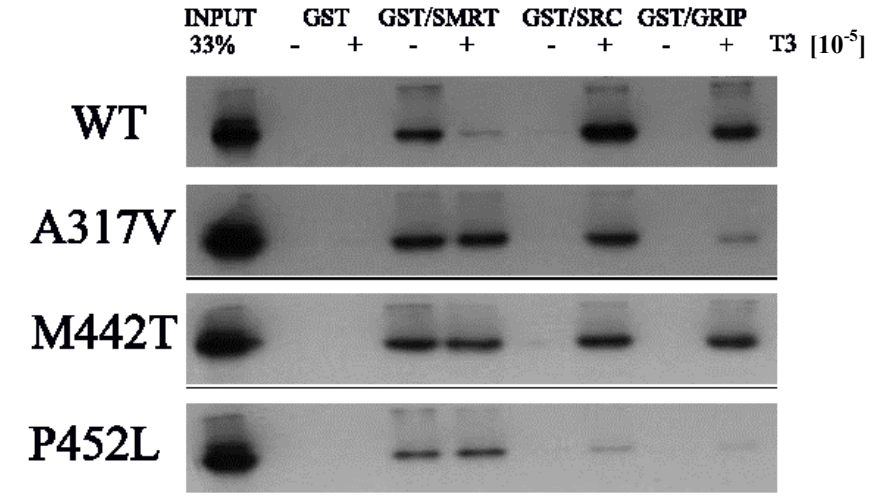
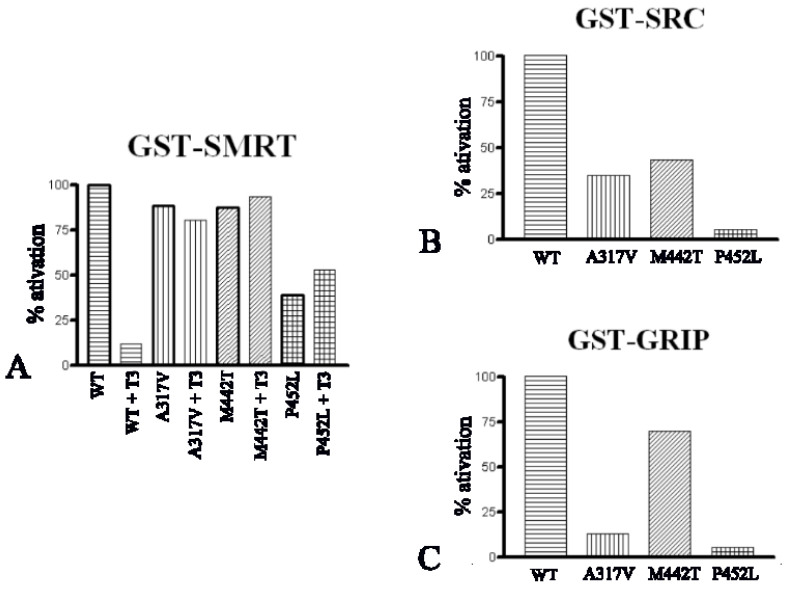


Figure 5: Gel Mobility Shift Assays Showing Homodimer (Ho) and Heterodimer (He) formation on DR-4 and F2 TRE in the presence or absence of RXR receptors. TNT, negative control from the reticulocyte lysate system, TNT T4 Quick ™(Promega, Madison, WI, USA); WT, wild type receptor. All other lanes contain mutants receptor as indicated. The experiments show a discreet reduction in interaction as Ho of A317V and P452L in DR4, but in general all the mutants have na interaction as in Ho as in He with both TRE used in these experiments.

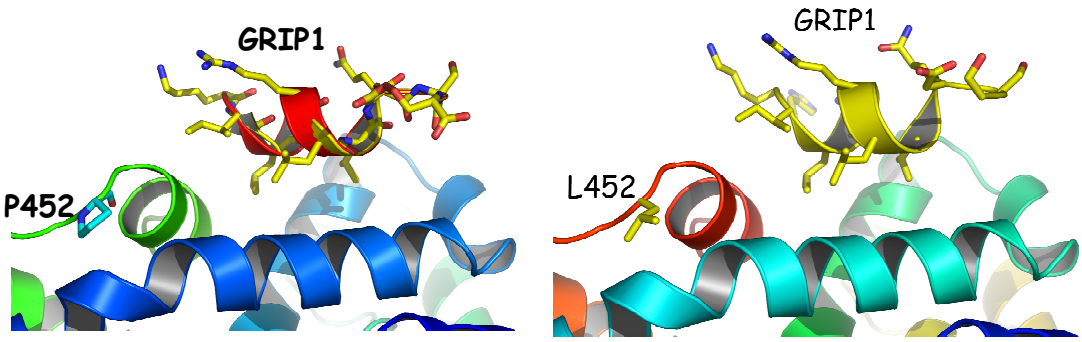


a



b

Figure 6 (a and b): GST Pull-Down Assay for analyse the interaction of the TRs with corepressor SMRT and coactivators SRC and GRIP. The part a shows the binding assay analyzed by autoradiography after separation using 10% SDS-PAGE. The first lane indicated the INPUT (33% of the amount used in the reaction) of each TR. The part b shows a graphic analysis of the quantification of the bands by phosphorimaging using ImageQuant/ Molecular Dynamics. The experiment shows the lack of interaction of P452L with the two coactivators, SRC and GRIP. In addition the three mutants did not dissociate from corepressors SMRT in T3 presence.



a **b**

Figure 7a and b: Computer model
Model for hTRβ wild type (a) and P452L (b) and a peptide from coactivator GRIP1. In the Wild Type TRβ, Helix 12 is colored in green, the proline in light blue and GRIP1 peptide in red. In the P452L model helix 12 is colored in red, the mutant leucine in yellow and the GRIP1 peptide is shown in yellow.

Capítulo do Livro
"Resistência aos hormônios da tiróide"

Resistência aos Hormônios da Tiróide, capítulo do livro Endocrinologia, editado por Mário J. A. Saad, Rui M. B. Maciel e Berenice B. Mendonça, editora Atheneu, 2007

Maria Izabel Chiamolera

Médica da Disciplina de Endocrinologia, Departamento de Medicina, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo

Gisah Amaral de Carvalho

Professora Adjunta, Disciplina de Endocrinologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Paraná

Introdução

O conceito de Resistência Hormonal foi introduzido por Fuller Albright e col. em 1937, com a descrição do pseudohipoparatiroidismo, Albright propôs que as alterações no pseudohipoparatiroidismo ocorreriam devido a uma falha do órgão alvo em responder a ação hormonal e não à deficiência do hormônio, teoria esta usada também para explicar o fenômeno de galos que apresentavam características femininas, com a hipótese de Resistência Androgênica. Todas estas alterações estimularam muitos trabalhos que estudavam as vias de ação hormonais, construindo assim o conhecimento que hoje temos dos hormônios e seus mecanismos de ação. (1)

A primeira descrição da Síndrome de Resistência aos Hormônios Tirodianos (RHT) foi feita em 1967 por Samuel Refetoff e cols., os autores descreveram dois irmãos que apresentavam bócio, surdo-mudez e atraso da idade óssea, o quadro laboratorial revelava elevados níveis de hormônios tiroidianos, contrastando com os sinais clássicos de hipotiroidismo. Posteriormente, foram relatados vários casos, que descreveram uma grande gama de sinais e sintomas, tanto de hipotiroidismo como de

tirotoxicose. Contudo, classicamente, a RHT distingue-se das demais alterações tiroidianas por suas alterações bioquímicas, apresentando níveis elevados de Hormônios Tiroidianos (HT) (T3 e T4), concomitantemente com níveis inapropriadamente normais ou elevados de TSH, na ausência de fatores de interferência (doenças agudas, drogas ou alterações nas proteínas de ligação dos HT), demonstrando com tal quadro laboratorial uma insensibilidade dos tecidos à ação destes hormônios, que, inclusive, não respondem às suas doses suprafisiológicas. A RHT costuma ser classificada em Resistência Generalisada aos Hormônios Tiroidianos (RGHT), na qual os indivíduos são eumetabólicos e aparentemente o defeito é compensado pelo excesso do hormônio tiroidiano; e a Resistência Hipofisária aos Hormônios Tiroidianos (RHHT), na qual os pacientes são hipermetabólicos (hiperativos e taquicárdicos). A Resistência Periférica aos Hormônios Tiroidianos é motivo de controvérsia, sendo que somente um paciente foi descrito na literatura. (2) O mais provável é que tanto a RGHT quanto a RHHT não sejam entidades separadas e sim espectros da mesma síndrome. (1)

A RHT é uma síndrome clínica rara, sua incidência precisa é desconhecida, podemos estimar sua prevalência em 1 para 40.000 recém-nascidos (3). Mais de 1000 indivíduos com a síndrome já foram descritos, provenientes de cerca de 250 famílias, o padrão de herança é autossômico dominante (com exceção da primeira família descrita que apresentava um padrão de herança recessivo), e uma parte dos casos são "de novo", ou esporádicos (cerca de 22%), nos quais a família do indivíduo não apresentava nenhuma alteração. (1, 4)

A fisiopatogênese da síndrome foi motivo de muita controvérsia, mesmo porque o completo entendimento dos mecanismos de ação do HT é um fato relativamente recente. Na década de 60, Tata e colaboradores sugeriram que a ação do HT estaria ligada à regulação da transcrição gênica, posteriormente os grupos de Oppheinheimer e Samuels demonstraram, através do uso de hormônio marcado, a ligação nuclear específica do hormônio tiroidiano nos tecidos dependentes deste,

sendo esta a primeira evidência da existência dos receptores nucleares. Mas foi somente após a clonagem dos receptores dos glucocorticóides e do estrógeno (1985/1986), detectando uma família de receptores nucleares, que a real existência destes receptores foi corroborada, culminando, em 1986, com a clonagem do Receptor dos Hormônios Tiroidianos (TR) pelos laboratórios de Evans e Vennstrom, iniciando a era molecular dos estudos sobre a ação do hormônio tiroidiano. (5)

Em 1988, Usala e colaboradores descreveram através de técnicas de estudo genético a ligação entre a RHT e o gene que codifica o receptor beta dos HT (TRβ), após esta descrição e até os dias atuais 122 mutações no TRβ foram descritas, com 46 ocorrendo em mais de uma família, como a mutação no aminoácido 338 (R338W) que foi descrita em 23 famílias não relacionadas. (1) Até o momento não foram descritas associações da síndrome com mutações em qualquer dos outros elementos conhecidos envolvidos na ação do HT, embora 15 a 20% dos indivíduos com diagnóstico de RHT não apresentem mutações no TRβ. (6)

Contudo, uma nova síndrome com transmissão ligada ao X e correlacionada a mutações no MCT8 (transportador do hormônio tiroidiano) foi descrita, apresentando condições laboratoriais semelhantes (TSH inapropriado para um T3 elevado, com T4 baixo) e quadro neurológico grave. (7, 8)

Mecanismo de Ação do Hormônio Tiroidiano e Mecanismo Molecular da RHT

- **Mecanismo De Ação Do Hormônio Tiroidiano**

Até recentemente acreditava-se que o hormônio tiroidiano entrava na célula através de um processo de difusão passiva concentração dependente após desligar-se de suas proteínas transportadoras, contudo, várias classes de transportadores de iodotironinas transmembranicos foram identificadas recentemente, e a teoria do transporte passivo vem sendo cada vez mais questionada. Sugere-se que o polipeptídeo transportador de anions orgânicos Oatp14 (Slc21a14) seja importante para a passagem do T4 da circulação sanguínea para o cérebro, uma vez que é altamente expresso nas células endoteliais capilares. O transportador do monocarboxilato (MCT8, Slc16a2) foi identificado como um transportador do hormônio tiroidiano muito ativo e específico, altamente expresso no cérebro e em outros tecidos responsivos ao hormônio tiroidiano (9). A análise genética de crianças (meninos, uma vez que a herança é ligada ao X) com mutações no MCT8 mostrou quantidades anormais de hormônios tirodianos séricos (T4 livre e total baixos, T3 livre e total elevados e TSH normal ou elevado) associado a quadro neurológico grave, semelhante aquele observado em condições de extrema deficiência de iodo (7, 8).

Uma vez dentro da célula a ação do HT é essencialmente exercida através da interação com seus receptores nucleares (TRs), (fig. 1) como já foi mencionado. Entretanto, ações não genômicas do HT já foram descritas, contudo a significância biológica destas ações não é bem entendida em muitos casos. (10)

Desde meados dos anos 80 foram clonados e identificados dois diferentes TRs, alfa e beta, codificados por dois diferentes genes respectivamente no cromossomo 17 e 3. Cada um desses genes codifica várias isoformas das proteínas através de splincing alternativo. O TR pertence à superfamília dos receptores nucleares, a mesma dos receptores dos esteróide, da vitamina D, do ácido retinóico, das prostaglandinas e de outros receptores órfãos (para os quais não há ligantes conhecidos). Por pertencer a

esta família o TR guarda grande similaridade estrutural com seus membros, contando três principais domínios: o amino-terminal, o de ligação ao DNA (DBD) e o de ligação ao ligante (LBD) (fig.2). (5)

O domínio amino-terminal possui uma função de ativação transcricional independente do ligante, denominada função de ativação 1 (AF-1), contudo a importância desta função para o TR ainda não é totalmente conhecida. (5)

O DBD tem como principal função a ligação ao DNA, situa-se na porção central do receptor e é organizado por dois segmentos estruturais conhecidos como dedos de zinco, cada um composto por quatro cisteínas coordenadas com íons zinco, existem neste domínio pontos de ligação aos DNA (as regiões P-box e A-box), e pontos de heterodimerização (T-box e D-box), principalmente com o receptor do retinóide X (RXR). (11)

O LBD localiza-se na região carboxi-terminal, possui funções variadas como a homo e a heterodimerização do receptor, a localização nuclear, a dissociação das "heat shock proteins", a interação com proteínas corepressoras e co-ativadoras e a repressão basal do TR sem o ligante. Mas, provavelmente, a função primordial é exercida quando ocorre a interação com o hormônio e por conseqüência ocorre a ativação da transcrição dos genes positivamente regulados pelo T3, pois o LBD possui uma superfície que faz contato com o hormônio, e que é fundamental para a ativação transcricional, essa região é denominada função de ativação 2 (AF-2). Após a ligação do hormônio essa região passa a interagir com os co-ativadores e recrutar a maquinaria de transcrição. Estruturalmente o LBD se organiza como uma bolsa hidrofóbica na qual o ligante se insere profundamente, esta bolsa é formada por 12 alfa hélices formando uma superfície hidrofóbica, com a ligação do hormônio ocorre uma modificação na conformação da cavidade, a hélice 12, a mais carboxi-terminal, se movimenta, fechando a cavidade, liberando os corepressores e expondo sítios de interação com proteínas co-ativadoras. (5, 11)

O TR, como já foi visto, age como um fator de transcrição dependente do T3 e atua ligando-se a seqüências específicas no DNA denominadas elementos responsivos aos hormônios tiroidianos (TRE), que estão localizados na região promotora dos genes alvos, tais seqüências possuem duas cópias imperfeitas de um hexanucleotídeo (AGGTCA), que podem estar arranjadas em diferentes orientações e com espaçamentos diversos (fig. 3). O TR liga-se ao TRE de diversas formas, podendo atuar como monômeros (somente um TR), homodímeros (TR-TR) ou heterodímeros com o receptor do retinóide X (RXR) (TR-RXR). A formação dos heterodímeros de TR-RXR aumenta a ligação do receptor ao DNA e estimula a transcrição gênica. (12)

Quando dissociado do T3 o TR está localizado principalmente no núcleo, em solução ou ligado aos TREs no DNA, e ao receptor associam-se proteínas conhecidas como corepressoras, que atuam reprimindo a transcrição gênica em genes positivamente regulados pelo T3, ou ativam a transcrição em genes negativamente regulados (como é o caso do gene do TSH) (fig. 4). Quando ocorre a ligação do hormônio ao receptor essa associação se desfaz, com a presença do hormônio tiroidiano a hélice 12 encontra-se aberta, com a ligação do T3 a hélice se dobra sobre o TR e expõem sítios de ligação aos co-ativadores e promove o desligamento dos corepressores, proteínas coativadoras são recrutadas para estimular a transcrição do gene alvo (fig. 5). (5, 11)

Os corepressores são capazes de interagir com o TR na ausência de T3, tanto em solução como quando o TR está ligado aos seus TREs, os principais corepressores para o TR são o NcoR (do inglês Nuclear Receptor Correpressor) e o SMRT (do inglês silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor). Esses corepressores são capazes de interagir com outros repressores formando um complexo de corepressores, onde cada componente parece ter a sua própria importância. (11)

Por outro lado, os co-ativadores não são específicos, podendo associar-se com vários outros membros da superfamília dos receptores nucleares. O TR interage com os co-ativadores da família p160 (proteínas com 160kD), que tem como principais

componentes as seguintes proteínas: co-ativadores de receptores esteróides 1 (SRC-1 ou NCoA1), fator transcricional intermediário 2 (TIF2, GRIP1, SRC-2 ou NCoA2), e o ativador dos receptores de hormônio tiroidiano e do ácido retinóico (ACTR, pCIP, AIB1, RAC3, TRAM-1, SRC-3 ou NCoA3). (5, 11)

- **Mecanismo Molecular da RHT**

Na Síndrome de Resistência aos Hormônios Tiroidianos 80 a 85% dos indivíduos possuem mutações no TRβ, enquanto nenhuma mutação foi descrita no TRα. A maioria ocorreu em três regiões hot spot (ou Clusters) no domínio de ligação ao ligante (LBD) entre os exons 8 e 10, o maior número são de mutações missense (substituição de um único nucleotídeo), mas também foram descritas mutações nonsense (substituição de um único nucleotídeo gerando um ponto de parada prematuro), deleções e inserções. (13)

As mutações levam principalmente a uma diminuição ou a uma abolição da afinidade do T3 ao TR, conseqüentemente o corepressor não é totalmente liberado e a transcrição do gene alvo não é ativada. Em alguns casos, a afinidade com o T3 não é tão afetada a ponto de explicar a alteração na liberação dos corepressores e no recrutamento dos co-ativadores, nesses casos, provavelmente, existam outros defeitos estruturais nos sítios de ligação destas proteínas que justifiquem tais alterações, como, por exemplo, falha na interação com co-ativadores. (5, 11, 13)

O padrão de herança é autossômico dominante sendo que em uma família o padrão foi recessivo, nessa família foi descrita uma deleção de toda a sequência codante do TRβ, esses indivíduos apresentavam as características bioquímicas típicas de RHT além de surdo-mudez e visão monocromática, o quadro se explica pela complexa perda do gene que é necessário para a maturação coclear e o desenvovimento do cone fotoreceptor que media a visão para a cor (1). Indivíduos heterozigotos que expressam somente um alelo do gene do TRβ não têm anormalidades clínicas ou laboratoriais (fig. 6). (1, 5)

Levando-se em conta que a herança da síndrome é preferencialmente autossômica dominante, qual o papel do alelo normal nesta síndrome? O que parece é que os receptores mutados interferem na ação dos receptores normais, no chamado Efeito Negativo Dominante, e provavelmente múltiplos mecanismos moleculares explicariam tal efeito. As proteínas mutantes podem inibir a ação da proteína nativa por competirem pela ligação ao TRE, fato demonstrado por Nagaya e cols. (14) Observando mutações no DBD que impediam a ligação ao DNA e por sua vez atenuavam a atividade dominante negativa. Outros estudos demonstraram que o dímero TR nativo / TR mutado é inativo, e em mutantes em que se impede a dimerização o efeito também é atenuado (11). Além disso, a interação aos correpressores é mais intensa nos TRs que tem esse efeito, que mesmo com a ligação do hormônio tal interação não se desfaz e a não liberação do co-repressor impede a ativação da maquinaria de transcrição basal nos genes positivamente regulados pelo T3. (5, 11)

Um ponto que não foi totalmente esclarecido em nenhum dos estudos até o momento, é a grande diferença entre o grau de resistência nos diversos tecidos e entre indivíduos com a mesma mutação, tal fato deve acontecer devido à combinação de múltiplos fatores tais como: a diferente distribuição das diversas isoformas entre os vários tecidos, a ação dos co-ativadores e o ambiente da região promotora dos genes regulados pelo T3, e até mesmo o Efeito Negativo Dominante tecido-específico.

Portanto, não é surpreendente que a literatura não consiga estabelecer uma correlação clínico-molecular nesta síndrome, ou seja, não consiga explicar os diversos sinais e sintomas apenas pelo tipo de mutação e pela região do TR na qual ela se encontra. Mostrando que outros elementos além do TR também são importantes para a correta ação do T3, outro fato que corrobora essa hipótese é que 10 a 15% das famílias com todas as características da síndrome não apresentam mutações no TR, mostrando que outro cofator de transcrição provavelmente esta envolvido na gênese da RHT nessas familias. (1, 6)

Fisiopatologia da Síndrome de RHT

A falha de função do receptor do HT leva a uma diminuição no feedback do T3 sobre o TSH resultando na persistente secreção do TSH e conseqüentemente estimulando a produção e secreção de hormônio tiroidiano (fig. 7).

A resposta do eixo hipotálamo-hipofisário não sofre alteração na RHT, a hipófise produz um TSH imunologicamente idêntico ao TSH sérico de indivíduos normais, e não contém um excesso da subunidade alfa, contudo o TSH da RHT parece ter uma maior atividade biológica *in vitro*, o que poderia explicar que com níveis normais de TSH tais indivíduos apresentem bócio e níveis elevados de HT. (15)

Várias das características clínicas da síndrome podem ser sinais de privação de HT durante o desenvolvimento, e a gravidade dos sintomas tem relação com a expressão do alelo mutado (e possivelmente de outros co-fatores) nos diversos tecidos, como por exemplo: no tecido cardíaco que predominantemente expressa TR alfa, que não apresenta mutações conhecidas até o momento, o que explica a grande incidência de taquicardia nos pacientes com RHT.

O estudo de tecido tiroidiano obtido através de biopsia ou cirurgia demonstrou variados graus de hiperplasia do epitélio folicular, a espécime podendo ser descrita como tecido tiroidiano normal, bócio adenomatoso ou bócio colóide. (1) Pouco pode ser dito sobre achados patológicos nos tecidos pelo pequeno número de dados de autopsias disponíveis dos indivíduos com RHT. Metacromasia em fibroblastos pode ser encontrada em pacientes com RHT assim como naqueles com Mixedema por hipotiroidismo, contudo nos pacientes com RHT a metacromasia não desaparece nem mesmo com o tratamento. (16)

Quadro Clínico

Não existem sintomas que sejam patognomônicos da síndrome e o seu diagnóstico geralmente ocorre após a detecção de níveis elevados de HT na presença de TSH não suprimido em paciente que procuram ajuda médica por bócio, transtornos de hiperatividade e atenção, atraso no desenvolvimento ou taquicardia sinusal. Atualmente, crianças têm sido diagnosticadas através das rotinas de triagem neonatal de hipotiroidismo congênito que utilizam TSH e T4 (3) e através da análise de DNA daquelas que possuem um dos genitores sabidamente afetados. Muitos adultos assintomáticos são diagnosticados por alterações em exames tiroidianos pedidos como rotina em "check ups". (17) (fig. 8)

Devido à variabilidade da resistência nos diversos tecidos em um mesmo indivíduo podem coexistir sintomas de hiper e hipotiroidismo, contudo na maioria dos casos descritos até o momento os pacientes não tratados mantinham seu estado metabólico normal apesar dos altos níveis de hormônios tirodianos. Em pacientes tratados erroneamente por hipertiroidismo os sintomas de hipotiroidismo ficam mais evidentes, e em crianças tal erro diagnóstico pode causar piora no retardo de crescimento e desenvolvimento. (1,17) (tabela 1)

Quanto aos sinais clínicos deve-se destacar a alta freqüência de aparecimento do bócio, algumas vezes detectado somente ao exame ultra-sonográfico. O bócio é em geral difuso, entretanto alterações de ecotextura ou nódulos podem ser visto com mais freqüência naqueles bócios que já foram submetidos à cirurgia. Além disso, um caso foi descrito com uma progressão pouco usual, em a paciente que iniciou o quadro com um bócio difuso e RHT predominantemente hipofisária tal bócio evoluiu para um bócio multinodular com hormônios tiroidianos normais e TSH suprimido, possivelmente resultado da estimulação crônica pelo TSH. (25)

Outro sintoma freqüente é a taquicardia sinusal, mesmo ao repouso, muitas vezes é o sintoma que leva o paciente a procurar auxilio médico e é também o sintoma

que leva ao diagnóstico equivocado de tireotoxicose. Estudando o envolvimento cardíaco observou-se que os indivíduos com RHT e sinais cardíacos tinham média de idade, freqüência cardíaca e níveis hormonais mais elevados, e o relaxamento diastólico menor, sendo que os demais parâmetros cardíacos não mostraram grandes alterações. (26) Em animais transgênicos além da hipertrofia miocárdica pouco efeito na estrutura ou função cardíaca foi relatado. (27)

A análise do Reflexo Aquileu mostra um tempo de relaxamento normal ou levemente prolongado.

Algum grau de transtorno de aprendizagem ou déficit de atenção pode ser encontrado em praticamente metade dos pacientes estudados, mas retardo mental mais grave é mais raro como podemos ver na tabela 1. O atraso no crescimento parece ter relação com a função mental comprometida, aparecendo raramente como evento isolado (4%). Transtorno de hiperatividade e déficit de atenção têm uma alta prevelência entre os indivíduos com RHT, contudo o inverso não se comprova, pois entre as crianças hiperativas estudadas, a ocorrência da RHT é rara. (1)

As crianças com RHT têm um peso ao nascer menor que as crianças sem a doença, a maturação óssea é retardada, como é esperado no hipotiroidismo, desde o período pré-natal até a vida adulta, sendo que os adultos também têm altura menor que os indivíduos controles. (28)

Hipertiroidismo congênito, um estado hipermetabólico na infância, foi relatado em uma família em associação com infertilidade secundária materna, sendo que o tratamento com propiltiouracil surtiu efeito inicialmente no neonato que evoluiu clinicamente eutiroideo. (29)

Em uma paciente com RHT estudada durante a gestação viu-se que os níveis de hormônio tiroidiano elevaram-se em paralelo com o aumento do hCG atingindo seu pico com 12 semanas, quando os níveis de TSH ficaram suprimidos (transitoriamente), posteriormente os níveis de hormônios tiroidianos reduziram progressivamente com redução dos sintomas (náusea e vômitos). (30) Em um outro caso descrito de gestante

com RHT, a paciente foi submetida durante a gestação a tratamento com TRIAC, portanto não há uma avaliação de seus níveis hormonais durante a gestação. (31)

Vários sintomas descritos em alguns pacientes não podem ser explicados pelas alterações hormonais, tais como escapula alada, anormalidades vertebrais, peito de pombo, fácies de passarinho, craniosinostose, quarto metacarpo curto, prurido de Besnier, ictiose congênita, atrofia macular. Em uma família com deleção do TRb todos os três membros afetados tinham surdo-mudez, mostrando o envolvimento do TR na audição. (1)

O curso da doença assim como a sua apresentação pode ser variável, alguns dos indivíduos têm seu desenvolvimento normal, enquanto outros apresentam atraso mental e no desenvovimento, Através do estudo de ratos transgênicos demonstrou-se que a gravidade da doença diminue com o passar dos anos. (17)

Diagnóstico

A condição essencial para o diagnóstico da RHT é a presença de elevação dos hormônios T3 e T4 na presença de TSH não suprimido (inadequamente normal ou elevado), deve-se, contudo excluir condições que propiciem o aparecimento de elevação de hormônios tiroidianos sem a conseqüente supressão do TSH que são: alterações nas proteínas transportadoras dos hormônios tiroidianos (na RHT os níveis de TBG e das outras proteínas carregadoras é normal), drogas e presença de anticorpos que podem interferir nos ensaios hormonais.(1, 13)

Os níveis séricos de T3 e T4 variam, inclusive no mesmo indivíduo com o passar do tempo, podendo se elevar desde discretamente até muitas vezes acima do limite superior de normalidade, contudo a elevação dos dois hormônios é semelhante, resultando em uma relação T3 para T4 normal pois a conversão extratireoidiana de T4 para T3 é normal. O T3 reverso também é elevado nestes pacientes, e os níveis da tiroglobulina sérica tendem, também, a serem elevados refletindo a hiperatividade da tiróide induzida pelo TSH. (1, 17) (tabela 2)

O TSH está inapropriadamente normal ou elevado, mas não com valores muito acima do limite da normalidade (tabela 2) e, também, habitualmente preserva a sua resposta ao TRH, algumas vezes inclusive com resposta exagerada. Valores acima de 10 mU/L e resposta exagerada ao TRH podem aparecer em indivíduos que receberam qualquer terapia na tentativa de reduzir o hormônio tiroidiano. A atividade biológica do TSH está normal ou aumentada e a concentração da sua sub-unidade alfa não é desproporcionalmente elevada, contrastando com a relação sub-unidade alfa/TSH que está elevada nos tumores produtores de TSH, um dos principais diagnósticos diferenciais desta síndrome. (18) (tabela 3)

Já foram descritos casos de co-existência de tiroidite auto-imune e RHT, nestes casos observa-se a presença de anticorpos. (19, 20)

A captação de iodo pela glândula encontra-se aumentada, o iodo aparentemente é organificado normalmente, sendo que o teste do perclorato é normal. (1, 17)

Na tentativa de mensurar o status metabólico destes pacientes é possível utilizar a dosagem de uma série elementos que tem relação com as respostas biológicas à ação dos hormônios, como: a Taxa Metabólica Basal, colesterol sérico, caroteno, triglicérides, creatinoquinase, fosfatase alcalina, enzima conversora da angiotensina (ECA), globulina ligadora de hormônio sexual (SHBG), ferritina e osteocalcina, todos os quais devem estar dentro dos parâmetros normais. Excreção urinária de magnésio, hidroxiprolina, creatina, creatinina, carnitina e AMP cíclico todos deveriam estar elevados na tirotoxicose, contudo, estão normais ou levemente diminuídos na RHT, mostrando um defeito da ação do hormônio tiroidiano. (1)

O HT em doses elevadas pode suprimir a secreção do TSH e, eventualmente, abolir a resposta do TSH ao TRH. A quantidade de HT necessária para tal efeito varia de indivíduo para indivíduo, variando também a efetividade do T3 e do T4. A diminuição da secreção do TSH é acompanhada, como seria esperado, pela diminuição da captação intratiroidiana de iodo, outros parâmetros analisados frente a doses suprafisiológicas de HT mostraram pouca ou nenhuma alteração, tais como: gasto metabólico basal, freqüência cardíaca, reflexos, colesterol, enzimas, osteocalcina e SHBG, excreção urinária de hidroxiprolina, creatina e carnitina. È importante ressaltar que aparentemente longe de causar um efeito catabólico nos indivíduos as doses altas de HT (doses muita vezes maiores que 1000 mcg/dia de T4 e 400 mcg/dia de T3) levaram a um efeito anabólico, aumentando a velocidade de crescimento e acelerando a maturação óssea. (21)

O protocolo clássico de supressão com HT utiliza doses crescentes de L-T3 numa seqüência de três doses, uma primeira de reposição de 50 mcg/dia e duas suprafisiológicas de 100 e 200 mcg/dia. O hormônio é admnistrado em duas doses diárias, e o incremento de dose é feito a cada três dias. Em crianças e adultos fora do peso padrão a dose é ajustada para manter o mesmo nível sérico de T3. A preferência pelo T3 se deve a seu efeito direto nos tecidos sobrepondo potenciais defeitos no transporte ou no metabolismo do T4, além do seu início mais rápido, e a curta duração de sua ação o que encurta tanto o período de avaliação quanto a duração de possíveis efeitos colaterais. (22, 23)

Outras substâncias além do T3 e do T4 podem alterar o padrão de resposta hormonal nos indivíduos com RHT, o TRIAC (ácido triiodo-tiroacético) produz resposta atenuada nos pacientes, os glicocorticóides produzem reduzida resposta do TSH ao TRH e diminuição nos níveis séricos de T4, drogas agonistas (L-dopa e bromocriptina) e antagonistas (domperidona) dopaminérgicas não tem resposta alterada na RHT, indicando que o efeito inibitório da dopamina sobre o TSH está intacto. Drogas antitiroidianas controlam os níveis de HT, mas provocam importante aumento no TSH. Beta-bloqueadores causam uma significativa redução na freqüência cardíaca. (1)

Metade dos pacientes diagnosticados na infância ou adolescência apresenta atraso da idade óssea, contudo a maioria consegue adquirir sua estatura alvo normal. A ressonância magnética de sela não deve mostrar tumores, contudo já foi relatado aumento da hipófise nos casos de terapia inadequada, revertido após o tratamento com doses suprafisiólogicas de levotiroxina. (24), assim como, casos de incidentaloma hipofisário, que podem ocorrer em 10% dos indivíduos da população normal.

Além do tumor hipofisário produtor de TSH (TSHoma) (figura), outros diagnósticos diferenciais da RHT incluem todas as possíveis causas de

hipertiroxinemia, tais como: elevação nos níveis de globulina ligadora de tiroxina (TBG), doenças não tiroidianas, drogas, alterações das deiodases, anticorpos contra os hormônios (HT ou TSH). (4)

Quando suspeita-se do diagnóstico de RHT, uma forma mais fácil de proceder a investigação é realizar teste de função tiroidiana em parentes de primeiro grau do indivíduo afetado (pais e irmãos), encontrar o mesmo padrão clínico e laboratorial nos familiares é forte indicação de RHT, uma vez que o TSHoma não apresenta história de herança genética. (1, 17)

Uma vez estabelecido o diagnóstico de RHT, o teste genético pode ser realizado no caso índice, e sendo identificada uma mutação, o rastreamento desta pode ser mais sensível que o rastreamento do fenótipo, devido à natureza variável do mesmo na RHT. Este rastreamento pode ser útil por eliminar a necessidade de tratamentos errôneos, ou por permitir o tratamento adequado (inclusive de fetos) e um adequado aconselhamento genético da família, além de ser mais econômico por afastar a necessidade de realização de testes hormonais extensos ou exames por imagem caros. (17)

Levando em conta tudo que foi relatado até o momento temos que para o adequado diagnóstico da RHT deve-se proceder da seguinte forma:

1. Frente a níveis séricos elevados de T3 e T4 com TSH inapropriadamente não suprimido deve-se confirmar os resultado e excluir defeitos de transporte dos HT ou interferência por anticorpos nos ensaios;
2. Buscar pelas mesmas alterações laboratoriais nos familiares;
3. Em casos esporádicos, excluir a presença do TSHoma, através da medida da subunidade alfa sérica;
4. Realizar teste de supressão com T3 em doses suprafisológicas;

5. Análise genética. (1, 17)

A falha diagnóstica em diferenciar uma simples tirotoxicose de uma RHT tem levado ao tratamento errado de cerca de um terço dos pacientes , portanto deve-se prestar muita atenção a casos com elevação de HT sem a adequada supressão do TSH.(1)

Tratamento

Até o momento, não existe tratamento específico para a correção do defeito primário da RHT. Felizmente a maioria dos pacientes permanece eumetabólico, apesar do excesso de HT na circulação, tal fato deve ocorrer por haver uma compensação adequada ao aumento do HT endógeno, portanto tais pacientes não necessitam de tratamento. (1, 17)

A grande vantagem da realização do teste genético é orientar as famílias e identificar precocemente aqueles indivíduos da família portadores da RHT, e naquelas famílias com histórico de retardo mental e no desenvolvimento instituir a terapêutica adequada prontamente.

Alguns indivíduos mostram tecidos periféricos mais resistentes, com sinais e sintomas de hipotiroidismo estes indivíduos devem ser tratados com doses suprafisiológicas de HT, notadamente aqueles indivíduos que por diagnóstico errôneo desenvolveram hipotiroidismo pós-cirúrgico ou pós-radioiodo. O TSH pode ser um bom parâmetro para o tratamento, assim como o estado catabólico, em crianças o controle deverá ser rigoroso em relação ao crescimento, maturação óssea e desenvolvimento mental, sendo que a velocidade de crescimento e a idade óssea podem ser bons parâmetros de seguimento, as doses podem chegar a 1000 mcg/dia de T4. (32)

Podemos resumir da seguinte maneira as indicações de tratamento com T4, especialmente em crianças:

1. TSH acima do limite superior da normalidade;
2. Sinais ou sintomas de hipotiroidismo;
3. Atraso de idade óssea;
4. Redução na velocidade de crescimento e ganho de peso;

5. História de convulsão;
6. História familiar prévia de atraso de desenvolvimento e retardo mental. (1, 32)

Naqueles pacientes em que a resistência é predominantemente hipofisária e os sintomas que prevalecem são os de tirotoxicose também podem necessitar de terapia. Drogas para tratamento dos sintomas como os agentes bloqueadores beta-adrenérgicos, preferencialmente Atenolol, normalmente são suficientes. O tratamento com drogas antitiroidianas ou a ablação tiroidiana levam ao aumento do TSH e podem resultar na hiperplasia dos tirotrofos. O desenvolvimento de tumores hipofisários, mesmo após longos períodos de hiperexcitação do tirotrofo, é extremamente raro. (1, 32, 33)

O tratamento com L-T3 pode melhorar os sintomas de hiperatividade e déficit de atenção em crianças com RHT (34). O ácido triiodotiroacético (TRIAC) tem com sucesso na redução dos níveis séricos de TSH e de HT para reduzir o tamanho do bócio e melhorar alguns sintomas secundários ao excesso de HT nos tecidos periféricos. O ácido triiodotiroacético suprime o TSH sem aumentar o efeito tiromimético nos tecidos periféricos, isto se deve à sua maior afinidade pelo TR beta e não pelo TR alfa quando comparado com T3, e a degradação mais rápida. A D-T4 possui efeito semelhante ao TRIAC, porém o seu mecanismo de ação ainda não é compreendido (32, 35, 36).

Recentemente foi demonstrado que doses suprafisiológicas de L-T3, em dose única e dias alternados foi um tratamento bem sucedido na redução do tamanho do bócio, com grandes benefícios estéticos e sem causar grandes efeitos colaterais. As doses de L-3 devem ser ajustadas até que TSH e Tiroglobulina estejam suprimidas e a redução do bócio seja observada. (37)

A ocorrência de doenças tiroidanas comuns como hipotiroidismo e hipertiroidismo em pacientes com RHT alteram de maneira significativa a abordagem diagnóstica e terapêutica, a abordagem nestes casos especialmente nos casos de Doença de Graves é a normalização do TSH sérico. (32, 17)

A grande incidência de aborto e baixo peso ao nascimento de crianças normais nascidas de mães com RHT foi recentemente relatada. (38) Contudo, a literatura não é unânime em afirmar o quanto a intervenção durante a gestação é apropriada. Recentemente foi descrito um caso em que o TRIAC foi utilizado para reduzir o tamanho do bócio de um feto que foi constatada uma mutação no TR beta. O tratamento foi bem sucedido na redução do tamanho do bócio, contudo pode-se contestar a necessidade de realização de tantas cordocenteses e a segurança por não haver disponível conhecimento sobre o transporte transplacentário e o metabolismo fetal do TRIAC. (39) Numa gestante com RHT os níveis elevados de HT podem ser necessários para um feto com RHT, mas podem ser deletérios para um feto sem a mutação, e uma mãe normal pode não fornecer quantidade de hormônio suficiente para um feto com RHT. De qualquer maneira, os poucos dados na literatura mostram que nenhum destes fetos, sejam afetados ou não pela RHT, apresentam morbidades. Mais estudos devem ser feitos para melhor definir a conduta em tal situação mas já pode-se definir que as gestantes devem ser observada cuidadosamente durante a gestação e deve-se evitar que os valores de TSH se reduzam. (40, 41)

As drogas dopaminérgicas e análogos da somatostatina não têm indicação formal para o tratamento da RHT, estudos mostraram que administração crônica dos análogos da somatostatina não apresentaram resultados benéficos em pacientes com RHT. (32, 42) Contudo um estudo da literatura mostrou que o uso da Quinagolida em associação com metimazol ajudou a normalizar as dosagens séricas de T3 e TSH. (43) Contudo com somente um estudo não há base para estabelecer tal conduta.

O estudo da estrutura do receptor normal e dos receptores mutantes trará possivelmente tratamentos específicos para a síndrome, com compostos que interagirão especificamente com os receptores mutados, eliminando o efeito dominante negativo, não interagindo com o TR alfa, e portanto não estimulando nem sendo deletérias para o coração. Sendo que algumas drogas já foram descritas com com boas ações *in vitro* específicas para o TR beta ou alguns de seus mutantes: GC-1, KB-141 e um novo ligante baseado na tiazolidinediona AH-9. (17, 44, 45)

Referências

1. Refetoff S. Chapter 16D. Resistance to Thyroid Hormone. September 28, 2004. www.thyroidmanager.org. e em Werner and Ingbar's The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text. Braverman, L.E., and Utiger, R.E, (eds.), LIppincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA., 2005.
2. Kaplan MM, Swartz SL, Larsen PR. Partial peripheral resistance to thyroid hormone. Am J Med. 1981; 70:1115-1121.
3. Lafranchi SH, Snyder DB, Sesser DE, Skeels MR, Singh N, Brent GA, Nelson JC. Follow-up of newborns with elevated screening T4 concentrations. J Pediatr. 2003; 143(3):296-301.
4. Refetoff S, Weiss RE, Usala S. The syndromes of resistance to thyroid hormone. Endocr Rev 1993;14:348-9
5. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. Physiol Rev 2001;81:1097-142.
6. Reutrakul S, Sadow PM, Pannain S, Pohlenz J, Carvalho GA, Macchia PE, Weiss RE, Refetoff S. Search for abnormalities of nuclear corepressors, coactivators, and a coregulator in families with resistance to thyroid hormone without mutations in thyroid hormone receptor beta or alpha genes. J Clin Endocrinol Metab. 2000; 85(10):3609-17.
7. Dumitrescu AM, Liao XH, Best TB, Brockmann K, Refetoff S. A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. Am J Hum Genet. 2004; 74(1):168-75.
8. Friesema EC, Grueters A, Biebermann H, Krude H, von Moers A, Reeser M, Barrett TG, Mancilla EE, Svensson J, Kester MH, Kuiper GG, Balkassmi S, Uitterlinden AG, Koehrle J, Rodien P, Halestrap AP, Visser TJ. Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. Lancet. 2004; 16;364(9443):1435-7.

9. Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. J Biol Chem. 2003; 10;278(41):40128-35.
10. Davis PJ, Davis FB. Nongenomic actions of thyroid hormone. Thyroid 1996; 6:497-504.
11. Barra GB, Velasco LF, Pessanha RP, Campos AM, Moura FN, Dias SM, Polikarpov I, Ribeiro RC, Simeoni LA, Neves FA. Molecular mechanism of thyroid hormone action. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2004; 48(1):25-39.
12. Ribeiro RCJ, Apriletti JW, Wagner RL, West BL, Feng W, Huber R, et al. Mechanisms of Thyroid Hormone Action: Insights from X-ray Crystallographic and Functional Studies. Recent Prog Horm Res 1998; 53:351-94.
13. Carvalho AC, Ramos HE. Síndrome de Resistência ao Hormônio Tiroidiano. Arq Bras Endocrinol Metab vol 48 nº 1, 2004.
14. Nagaya T, Madison LD, Jameson JL. Thyroid hormone receptor mutants that cause resistance to thyroid hormone. Evidence for receptor competition for DNA sequences in target genes. J Biol Chem. 1992; 267(18):13014-9.
15. Persani L, Borgato S, Romoli R, Asteria C, Pizzocardo A, Beck-Peccoz P. Changes in the degree of sialylation of carbohydrate chain modify the biological properties of circulating thyrotropin isoforms in various physiological and pathological states. J Clin Endocrinol Metab. 83:2486-2492, 1998.
16. Refetoff S, DeGroot LJ, Benard B, DeWind LT. Studies of a sibship with apparent hereditary resistance to the intracellular action of thyroid hormone. Metabolism. 21:723-756, 1972.
17. Weiss RE, Carvalho GA. Resistance to thyroid hormone. In: Martini L, editor. Encyclopedia of endocrine diseases. 1st ed. Amsterdan:Elsevier/Academic Press, 2004 (in press).

18. Persani L, Asteria C, Tonacchera M, Vitti P, Chatterjee KV. Evidence for secretion of thyrotropin with enhanced bioactivity in syndromes of thyroid hormone resistance. J Clin Endocrinol Metab 1994;78:1034-9.
19. Fukata S, Brent GA, Sugawara M. Resistance to thyroid hormone in Hashimoto's thyroiditis. N Engl J Med. 2005; 352(5):517-8.

20. Aksoy DY, Gurlek A, Ringkananont U, Weiss RE, Refetoff S. Resistance to thyroid hormone associated with autoimmune thyroid disease in a Turkish family. J Endocrinol Invest. 2005; 28(4):379-83.
21. Refetoff S, Salazar A, Smith TJ, Scherberg NH. The consequences of inappropriate treatment because of failure to recognize the syndrome of pituitary and peripheral tissue resistance to thyroid hormone. Metabolism. 32:822-834, 1983.
22. Hu I, Lazar MA. Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. Trends Endocrinol Metab 2000; 11:6-10.
23. Vandalem JL, Pirens G, Hennen G. Familial inappropriate TSH secretion: evidence suggesting a dissociated pituitary resistance to T3 and T4. J Clin Endocrinol Invest 1981; 4:413-7.
24. Gurnell M, Rajanayagam O, Barbar I, Jones MK, Chatterjee VK. Reversible pituitary enlargement in the syndrome of resistance to thyroid hormone. Thyroid. 1998 8(8):679-82.
25. Catargi B, Monsaingeon M, Bex-Bachellerie V, Ronci-Chaix N, Trouette H, Margotat A, Tabarin A, Beck-Peccoz P. A novel thyroid hormone receptor-beta mutation, not anticipated to occur in resistance to thyroid hormone, cause variable phenotypes. Horm Res. 2002 57(3-4): 137-42.
26. Kahaly GJ, Matthews CH, Mohr-Kahaly S, Richards CA, Chatterjee VKK. J Clin Cardiac Involvement in Thyroid Hormone Resistance. Endocrinol Metab. 2002 87(1): 204-212.

27. Ortiga-Carvalho TM, Hashimoto K, Pazos-Moura CC, Greene D, Cohen R, Lang RM, Wondisford FE. Thyroid Hormone Resistance in the Heart: Role of the Thyroid Hormone Receptor Beta Isoform. Endocrinology. 2004 145(4): 1625-1633.
28. Kvistad PH, Lovas K, 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(4): 425-30.
29. Blair JC, Mohan U, Larcher VF, Rajanayagam O, Burrin JM, Perry LA, Grossman AM, Chatterjee VK, Savage MO. Neonatal thyrotoxicosis and maternal infertility in thyroid hormone resistance due to a mutation in the TRb gene (M313T). Clin Endocrinol (Oxf). 2002 57(3): 405-9.
30. Anselmo J, Kay T, Dennis K, Szmulewitz R, Refetoff S, Weiss RE. J Clin Resistance to thyroid hormone does not abrogate the transient thyrotoxicosis associated with gestation: report of a case. Endocrinol Metab. 2001 86(9) 4273-4275.
31. Asteria C, Rajanayagam O, Collingwood TN, et al.. Prenatal diagnosis of thyroid hormone resistance. J Clin Endocrinol Metab. 1999 84: 405-410
32. Weiss RE. Management of resistance to thyroid hormone. Thyroid Today 1999;22:1-11.
33. Safer JD, Colan SD, Fraser LM, Wondisford FE. A pituitary tumor in a patient with thyroid hormone resistance: a diagnostic dilemma. Thyroid. 11:281-91, 2001.
34. Weiss RE, Stein MA, Refetoff S. Behavioral effects of liothyronine (L-T3) in children with attention deficit hyperactivity disorder in the presence and absence of resistance to thyroid hormone. Thyroid 1997;7:389-93.
35. Radetti G, Persani L, Molinaro G, Mannavola D, Cortelazzi D, Chatterjee VK, et al. Clinical and hormonal outcome after two years of triiodothyroacetic acid treatment in a child with thyroid hormone resistance. Thyroid 1997;7:775-8.
36. Takeda T, Suzuki S, Liu RT, DeGroot LJ. Triiodothyroacetic acid has a unique potential for therapy of resistance to thyroid hormone. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80: 2033 - 40.

37. Anselmo J, Refetoff S. Regression of a large goiter in a patient with resistance to thyroid hormone by every other day treatment with triiodothyronine. Thyroid. 2004, 14:71-4.
38. Anselmo J, Cao D, Karrison T, Weiss RE, Refetoff S. Fetal loss associated with excess thyroid hormone exposure. JAMA. 2004, 292:691-695.
39. Asteria C, Rajanayagam O, Collingwood TN, Persani L, Romoli R, Mannavola D, et al. Prenatal diagnosis of thyroid hormone resistance. J Clin Endocrinol Metab 1999,84:405-10.
40. Weiss RE, Refetoff S. Treatment of resistance to thyroid hormone--primum non nocere. J Clin Endocrinol Metab. 1999, 84:401-4.
41. Kane S, Fox R, Close C. Thyroid hormone resistance and pregnancy. BJOG 2003;110:633-4.
42. Mannavola D, Persani L, Vannucchi G, Zanardelli M, Fugazzola L, Verga U, Facchetti M, Beck-Peccoz P. Different responses to chronic somatostatin analogues in patients with central hyperthyroidism. Clin Endocrinol (Oxf). 2005; 62(2):176-81.
43. De Luis DA, Lahera M, Botella JI, Valero MA, Varela C. Efficacy of quinagolide in the treatment of a patient with hypophyseal resistance to thyroid hormones. An Med Interna. 2001;18(5):259-61.
44. Grover GJ, Mellstrom K, Ye L, Malm J, Li YL, Bladh LG, et al. Selective thyroid hormone receptor-beta activation: a strategy for reduction of weight, cholesterol, and lipoprotein(a) with reduced cardiovascular liability. Proc Natl Acad Sci USA 2003 ;100:10067-72.
45. Hashimoto A, Shi Y, Drake K, Koh JT. Design and synthesis of complementing ligands for mutant thyroid hormone receptor TRbeta(R320H): a tailor-made approach toward the treatment of resistance to thyroid hormone. Bioorg Med Chem. 2005;13(11):3627-39.

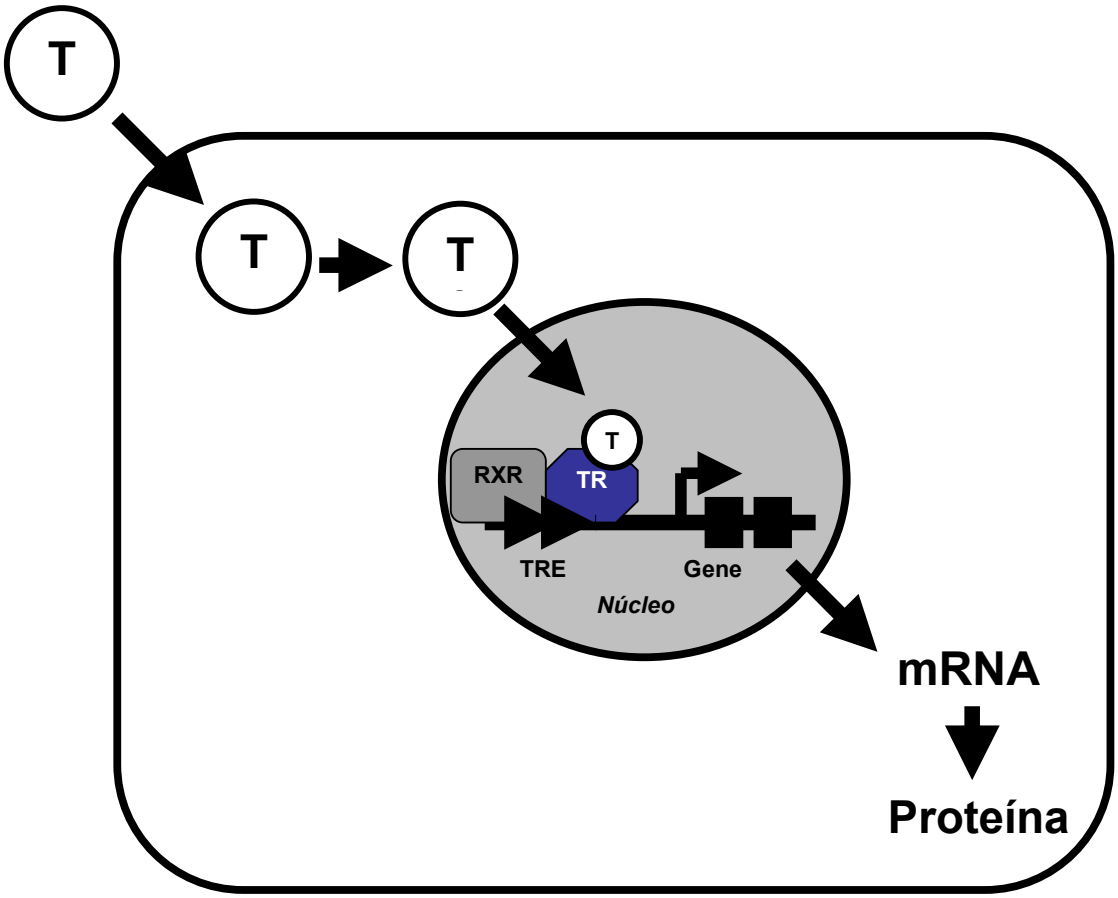


Figura 1 – Representação esquemática da ação intranuclear do hormônio tiroidiano, o T3 liga-se ao receptor do hormônio tiroidiano (TR), que atua em heterodímero com o RXR (receptor do retinóide X), tanto o RXR quanto o TR estão ligados ao DNA em seqüência específicas denominadas TREs (elementos responsivos ao hormônio tiroidiano), no caso dos genes positivamente regulados, a ligação do T3 ao TR ativa a transcrição do RNA mensageiro do gene alvo (mRNA).

Figura 2 – Organização dos domínios do Receptor do Hormônio Tiroidiano (TR), os domínios Amino-terminal, Domínio de Ligação ao DNA (do inglês DNA Binding Domain – DBD), a região de dobradiça (do inglês Hinge region) e o Domínio de Ligação ao Ligante (do inglês Ligand Binding Domain – LBD) estão presentes nos outros receptores nucleares.

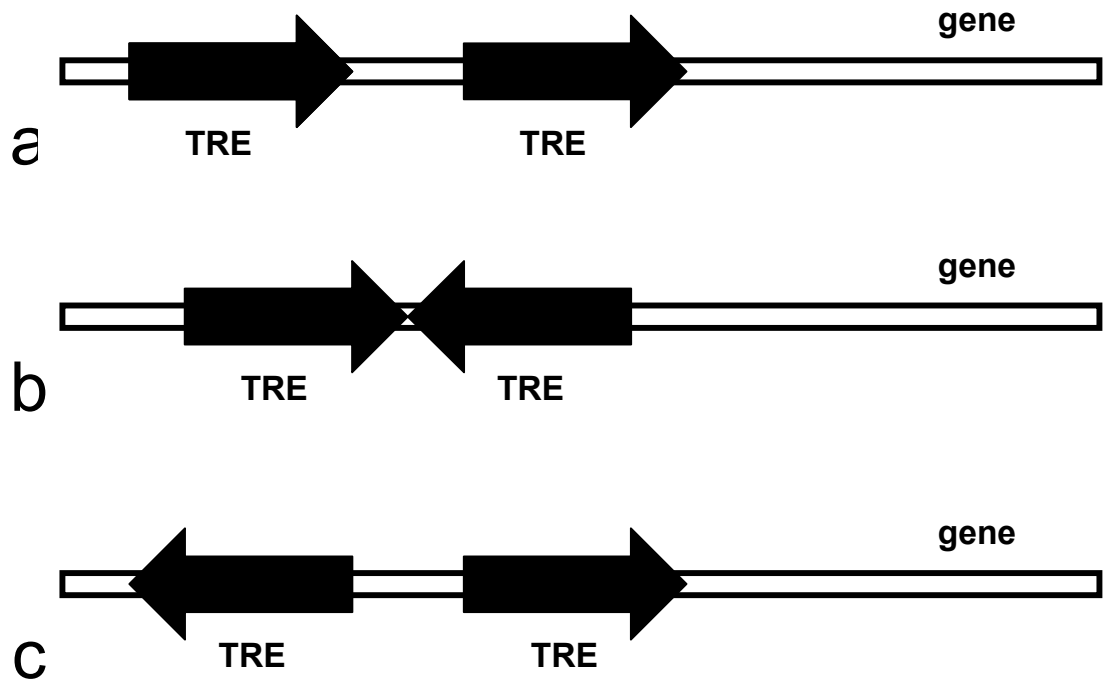


Figura 3 – Os elementos responsivos aos hormônio tiroidianos (TRE) são compostos por seqüências consenso dos nucleotídeos a(g)ggtc(g)a que se repetem e podem apresentar a orientação de repetição direta (a) com separação de 4 nucleotídeos, palíndromos (b), e palíndromos invertidos (c).

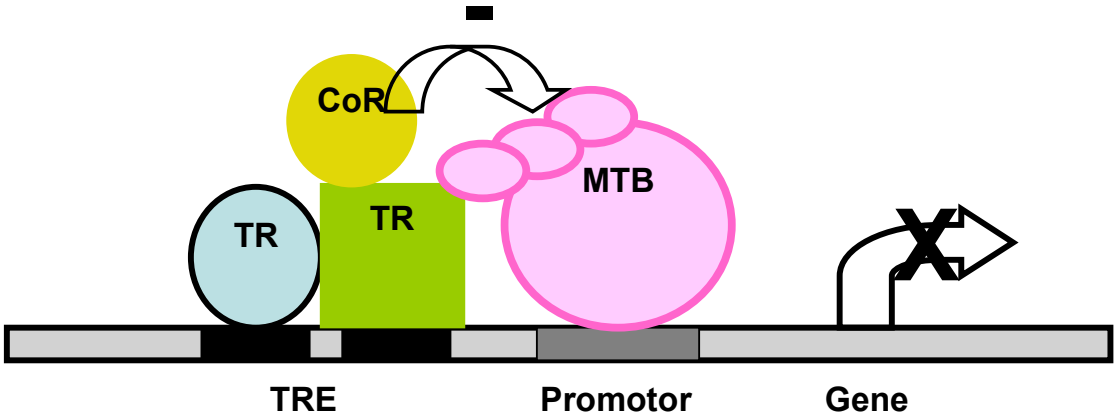


Figura 4 – Efeito supressivo do TR não ligado, responsivos ao T3 (a). Os homodímeros TR/TR não ligados se associam aos co-repressores (CoR) e exercem um efeito supressivo nos genes positivamente regulados pelo TER, reprimindo a maquinaria de transcrição basal (MTB).

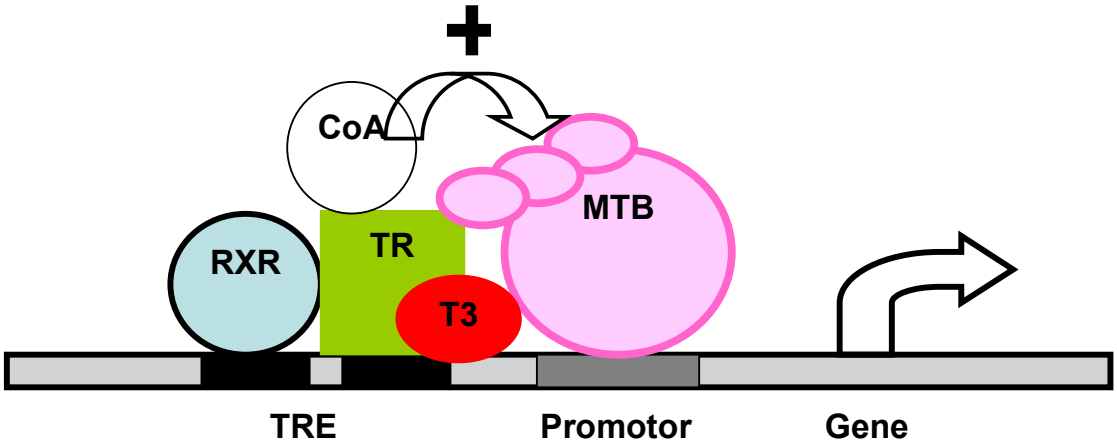


Figura 5 – Efeito positivo do complexo TR/RXR ativado pelo T3. Formação do complexo TR/T3, resultando na dissociação do CoR, ocupação do TRE pelos heterodímeros TR/RXR e recrutamento do co-ativador (CoA) para amplificar a transcrição dos genes positivamente regulados pelo TRE.

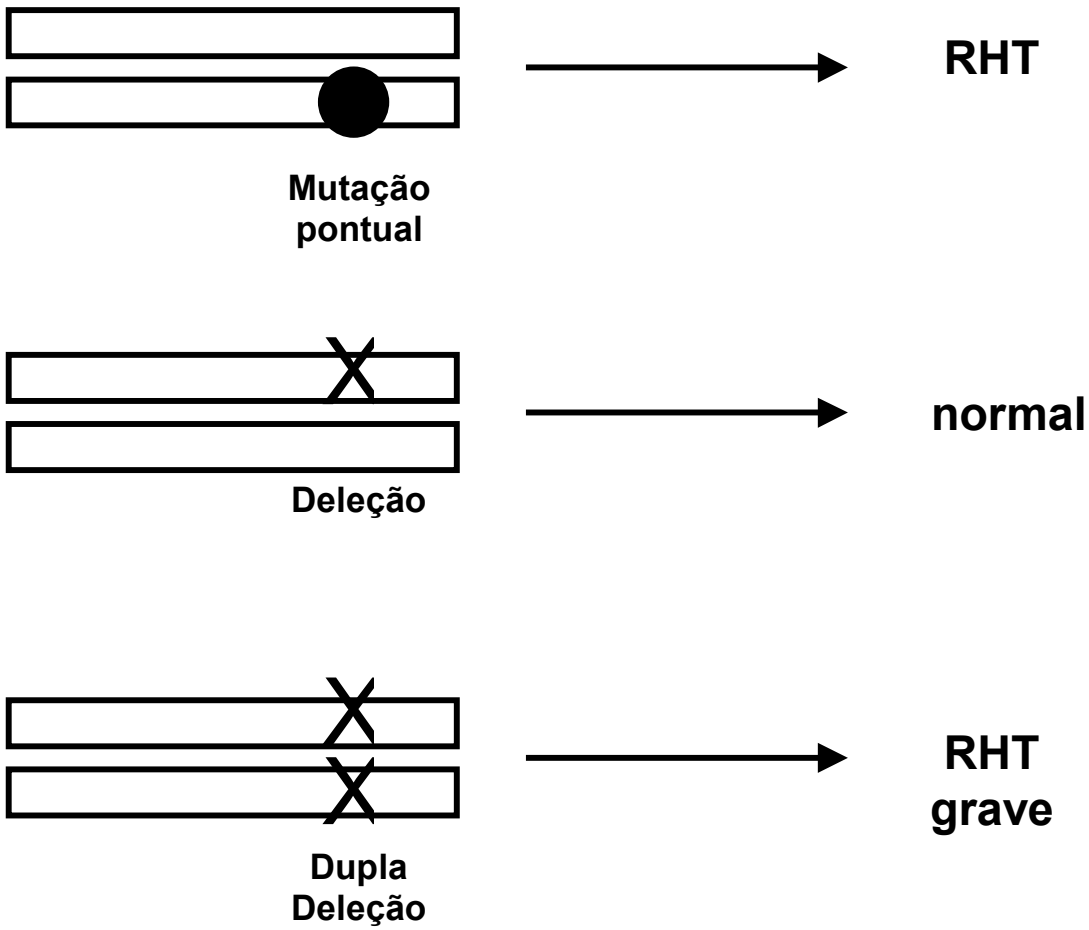


Figura 6 – Mutações pontuais no gene do TR beta provocam fenótipo de RHT, enquanto a deleção de um dos alelos do gene não provoca alteração fenotípica nenhuma. A deleção dos dois alelos do gene já foi descrita em uma família com caso muito grave de RHT.

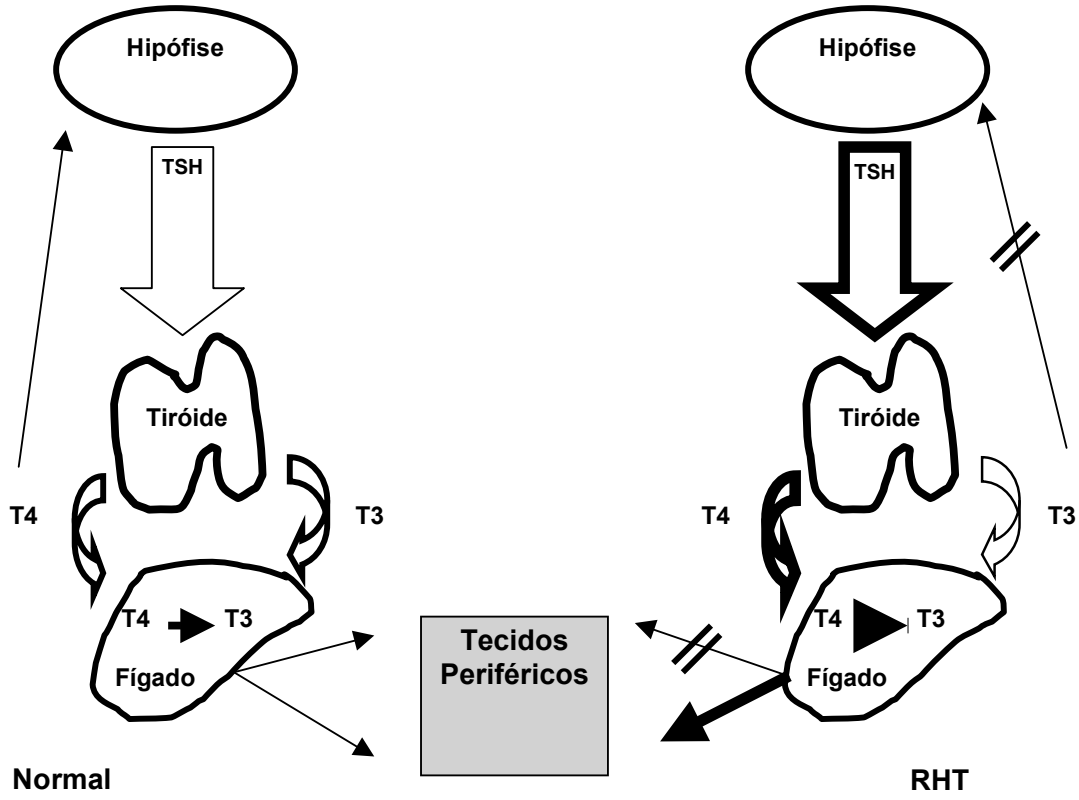


Figura 7 - Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. Em condições normais, o hipotálamo secreta TRH, que estimula a hipófise a produzir TSH que, por sua vez, estimula a tireóide a produzir principalmente T4. T4 é metabolizado nos tecidos periféricos em T3, o HT faz um feedback negativo no hipotálamo e na hipófise. A ação do HT na hipófise e nos tecidos periféricos ocorre quando o T3 se liga ao seu receptor. Na RHT o feedback está inibido devido à sensibilidade reduzida da hipófise ao HT, resultando em um TSH elevado com uma secreção elevada de T4. Os tecidos periféricos também apresentam sensibilidade reduzida ao HT na RHT.

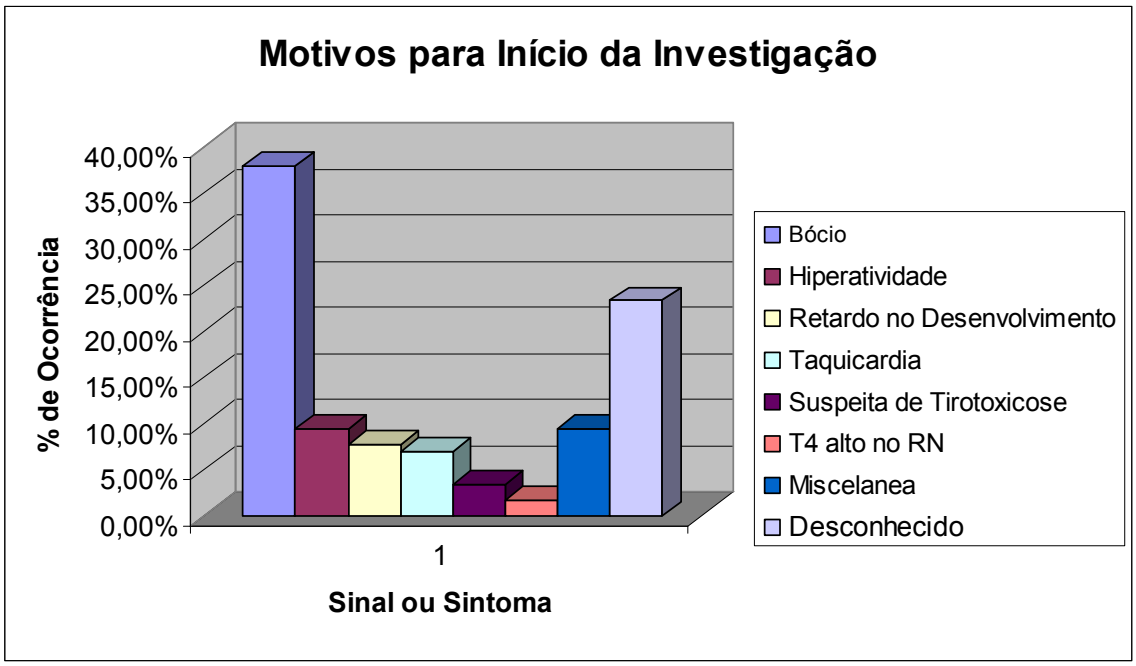


Figura 8 - Razões que levaram à investigação inicial de RHT no caso indíce de diversas famílias estudadas. Figura adaptada de Refetoff S, www.thyroidmanager.org, 2004.

Achados Clínicos	Frequência
Bócio	**66-95%**
Taquicardia	**33-75%**
Alterações Emocionais	**60%**
Comportamento Hipercinético	**33-68%**
Transtorno de hiperatividade e déficit de atenção	**40-60%**
Transtornos de aprendizagem	**30%**
Retardo Mental (QI<70)	**4-16%**
Surdez neurosensorial	**10-22%**
Baixa Estatura (<5%)	**18-25%**
Atraso de Idade Òssea > 2 DP	**29-47%**
IMC baixo (infância)	**33%**
Infecções recorrentes de ouvido e garganta	**55%**

Tabela 1 – Características Clínicas. Porcentagem de aparecimento das diversas características clínicas verificadas em vários estudos, adaptado de Refetoff S, www.thyroidmanager.org, 2004.

Valores Médios de Hormônios Tiroidianos e TSH em Indivíduos com RHT

Achados Laboratoriais	Normal	RHT
T4 (pmol/L)	**12,8 – 24,4**	**41+/- 2,1**
T3 (pmol/L)	**3,8 -8,4**	**11,4 +/- 1,5**
TSH (mU/L)	**0,5 – 4,5**	**3,15 +/- 0,3**

Tabela 2 – Hormônios da RHT. A coluna **Normal** corresponde aos valores normais da população geral; e a coluna **RHT** corresponde à média dos valores nos pacientes com RHT estudados.

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL RHT X TSHoma

	RHT	TSHoma
Subα/TSH	**Normal (100%)**	**Aumentado (88%)**
HT na família	**Podem ser elevados**	**Normal**
Teste do TRH	**Positivo (94-100%)**	**Negativo (61%)**
Supressão com T3	**Supressão (88-90%)**	**Não Supressão (75%)**
RM hipófise	**negativa**	**positiva**

Tabela 3 – Tabela de Diagnóstico Diferencial entre RHT e TSHoma. Comparação entre os resultados obtidos na relação subunidade alfa e TSH (Subα/TSH), a dosagem dos hormônios tiroidianos nos parentes de primeiro grau dos pacientes afetados, o teste de TRH, o teste de supressão com o T3 e a ressonância magnética de hipófise (RM). Adaptado de: Refetoff S, Endocrine Reviews, 1993.

CONSIDERAÇÕES E CONCLUSÕES

Através do trabalho de nosso grupo no Laboratório de Endocrinologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo identificamos oito mutações no TRβ em pacientes portadores da Síndrome de Resistência aos Hormônios Tiroidianos, provenientes de São Paulo, Paraná e Rio de Janeiro. Destas 5 são inéditas na literatura, as mutações A317V, P452L, G251V, T277I e R320G e três já tinham sido descritas, M442T, P453A e R338W {Weiss, 1993 #11; Bayer, 2004 #12; Adams, 1994 #10}. Conjuntamente com grupos da Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, organizamos uma publicação com 17 pacientes com Resistência aos Hormônios Tiroidianos. Somando os pacientes dos 4 grupos obtivemos 14 mutações diferentes, sendo 6 mutações novas. Anteriormente, somente uma mutação havia sido descrita na literatura em pacientes brasileiros (4).

Através do estudo funcional de três destas mutações (A317V, M442T e P452L) concluímos que:

- Todos os três mutantes apresentaram diminuição da ligação ao T3, verificada por meio do ensaio de Ligação ao T3
- Utilizando o ensaio da luciferase para identificar o poder de ativação dos vários receptores observamos que: as três mutações interferem tanto na ativação dos genes positivamente regulados,

quanto na repressão dos genes negativamente regulados; contudo, as mutações A317V e M442T recuperam tanto a capacidade de ativação quanto a de repressão com doses elevadas de T3, enquanto que o mesmo não ocorre com a mutação P452L

- Os ensaios de "GST-Pull Down" mostraram a virtual ausência de ligação aos co-ativadores no receptor mutante P452L e uma deficiência no desligamento do co-repressor; nos outros dois mutantes, apesar da ligação aos co-repressores e co-ativadores estarem alteradas, estas evidenciam um padrão que é explicado pela deficiente ligação ao T3
- Nenhum dos mutantes apresentou alteração na ligação ao DNA, nem tampouco marcante alteração na hetero ou homodimerização

Provavelmente, tais alterações explicam-se pela localização da mutação P452L numa área próxima à Hélice 12; tal fato interferiria com a mobilidade desta hélice, dificultando a correta exposição dos sítios de ligação aos co-ativadores. Portanto, a alteração na ativação e na repressão gênica não se relaciona somente com a ligação deficiente do T3, como nos outros dois mutantes, mas com a alteração na ligação com os coativadores e co-repressores.

Com estes resultados, além de realizar o diagnóstico molecular destes pacientes e, conseqüentemente, melhor orientar os pacientes e seus familiares quanto

aos riscos genéticos, contribuímos para elucidar alguns aspectos estruturais que podem ser importantes para o completo entendimento sobre o funcionamento do TRβ.

Referências

1. **Weiss RE, Weinberg M, Refetoff S** 1993 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 91:2408-2415
2. **Bayer Y, Fasshauer M, Paschke R** 2004 The novel missense mutation methionine 442 threonine in the thyroid hormone receptor beta causes thyroid hormone resistance: a case report. Exp Clin Endocrinol Diabetes 112:95-97
3. **Adams M, Matthews C, Collingwood TN, Tone Y, Beck-Peccoz P, Chatterjee KK** 1994 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 94:506-515
4. **Furlanetto TW, Kopp P, Peccin S, Gu WX, Jameson JL** 2000 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 71:520-526