

IDENTIFICACIÓN DE UNA MUTACIÓN EN LA REGIÓN CARBOXILO TERMINAL DEL TRANSPORTADOR DE SODIO/IODURO EN UN PACIENTE CON HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO
NICOLA, Juan Pablo; MARTIN, Mariano; SIGNORINO, Malvina; TESTA, Graciela; SOBRERO, Gabriela; MUÑOZ, Lilliana; MASINI-REPISO, Ana María; MIRAS, Mirta
Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. Programa Provincial de Pesquisa Neonatal, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de Córdoba. Argentina.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS: El defecto en el transporte de yoduro (ITD) es un trastorno autosómico recesivo causado por la incapacidad de la célula folicular tiroidea de acumular yoduro, conduciendo al desarrollo de hipotiroidismo congénito dishormonogénico (1). Los criterios diagnósticos incluyen glándula tiroidea eutópica con grado variable de bocio, captación de yoduro reducida, relación saliva-plasma de yoduro reducida y tiroglobulina plasmática normal o aumentada (1). Sin embargo, el espectro clínico de los fenotipos resultantes varía desde cuadros eutiroideos hasta hipotiroidismos severos.
La acumulación de yoduro constituye el primer paso en la síntesis de hormonas tiroideas, siendo el transportador de sodio/yoduro (NIS) quien cataliza el transporte activo de yoduro (2). Defectos genéticos que conducen a la pérdida de función de NIS han sido identificados en pacientes con ITD (1). La caracterización molecular de diferentes mutantes de NIS ha permitido obtener información sobre los procesos que median la especificidad de sustratos, la estequiometría del transporte y el tráfico de la proteína a la membrana plasmática.
El objetivo del trabajo ha sido el estudio de la presencia de mutaciones en el gen que codifica NIS en un paciente pediátrico con hipotiroidismo congénito sospechado de ITD sobre la base de captación de ^{99m}Tc -pertenectato severamente reducida y presencia de glándula tiroidea eutópica.

DESCRIPCIÓN DEL CASO CLÍNICO: Mediante pesquisa neonatal se observó un nivel anormalmente alto de TSH (64 $\mu\text{IU/ml}$). El análisis bioquímico de la función tiroidea mostró TSH 203 $\mu\text{IU/ml}$, T4 libre 1,6 ng/dl, T4 total 8,7 $\mu\text{g/dl}$, T3 121 ng/dl y tiroglobulina 84 ng/ml. La centellografía tiroidea de ^{99m}Tc -pertenectato mostró una acumulación severamente reducida. La ecografía tiroidea mostró una glándula de tamaño normal. No se evidenció la presencia de anticuerpos anti-tiroideos. Se inició terapia de reemplazo con una dosis diaria de 14 $\mu\text{g/kg}$ levotiroxina a los 10 días de vida.
Materiales y métodos: El ADN genómico fue extraído de células mononucleares de sangre periférica y los 15 exones del gen que codifica NIS fueron examinadas mediante el secuenciamiento de fragmentos amplificados por PCR. El estudio genético fue aprobado por el comité de ética del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de Córdoba y realiza bajo consentimiento informado por escrito en conformidad con normas y protocolos éticos vigentes.
Como modelo de estudio in vitro se utilizaron células no polarizadas Cos-7 que no expresan NIS endógenamente transfectadas de forma transiente con diversos plásmidos que expresan NIS en su versión salvaje o mutado mediante la estrategia de mutagénesis sitio-dirigida. La función de NIS se evaluó mediante de ensayos de captación de ^{125}I -yoduro y su expresión o localización se evaluó mediante citometría de flujo e inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos.

RESULTADOS: El análisis reveló la presencia de una transición homocigota G>A en el nucleótido 1.682 (exón 14) que resulta en la sustitución de la glicina en la posición 561 por un ácido glutámico (G561E) (Panel A). Posteriormente se realizaron estudios in vitro con el fin de comprender las bases moleculares que conducen a la pérdida de la acumulación de yoduro en presencia de la mutación identificada. Células Cos-7 fueron transfectadas de forma transiente con plásmidos que expresan el ADN complementario de NIS humano (WT NIS) o la mutante G561E NIS. Sorprendentemente, células transfectadas con G561E NIS acumularon niveles similares de ^{125}I -yoduro a aquellas transfectadas con WT NIS (Panel B). El análisis mediante citometría de flujo demostró que el porcentaje de células transfectadas y los niveles de expresión de G561E NIS en la membrana plasmática y totales fueron similares a aquellos de WT NIS.
Considerando la presencia de la mutación en la región carboxilo terminal evaluamos la importancia de dicha región en el tráfico del transportador a la membrana plasmática. La delección de la región carboxilo terminal de NIS (residuos 546 a 618) impide la localización de la proteína truncada ($\Delta 546$ NIS) en la membrana plasmática de células Cos-7 y por consiguiente conduce a un defecto en la acumulación de ^{125}I -yoduro (Panel C). Estos resultados indicarían que la región carboxilo terminal, de localización intracelular, actuaría directamente como determinante en el anclaje de proteínas que direccionen el tráfico de NIS hacia la membrana plasmática.

CONCLUSIONES: En el presente trabajo, hemos identificado una nueva mutación (G561E) en el gen que codifica NIS en un paciente pediátrico con hipotiroidismo congénito sospechado de ITD sobre la base de captación de ^{99m}Tc -pertenectato severamente reducida y presencia de glándula tiroidea eutópica. La mutación G561E constituye la primera mutación identificada en la región carboxilo terminal localizada en la región intracelular de la proteína.
El estudio revela la importancia de la región carboxilo terminal de NIS en el tráfico de la proteína a la membrana plasmática. El análisis de dicha secuencia revela la presencia de diversos motivos conservados involucrados en el direccionamiento de proteínas hacia la membrana plasmática. Particularmente, los últimos cuatro aminoácidos de la región carboxilo terminal de NIS componen un dominio putativo PDZ clase I potencialmente involucrado en el direccionamiento hacia la membrana basolateral. En adición, se observa la presencia de un potencial motivo di-leucina (L562L563) que podrían interactuar con el complejo adaptador de clatrina AP-1 involucrado en el tráfico basolateral de proteínas.

La caracterización funcional de las mutantes de NIS identificadas en pacientes con ITD R124H, V270E y G543E demostró que el cambio de un único amino ácido causa la retención intracelular de NIS en células no polarizadas Cos-7 (3). Aunque el mecanismo por el cual la mutación G561E impide la actividad de NIS permanece desconocido, hipotetizamos que la carga negativa del residuo G561 interferiría el reconocimiento del motivo dileucina L562L563 adyacente por proteínas adaptadoras que direccionan el tráfico intracelular de la proteína, afectando su llegada a la membrana plasmática basolateral en células epiteliales polarizadas. Estudios en curso evaluando la localización de G561E NIS en células polarizadas proveerá evidencia sobre los mecanismos que operan en la regulación de la llegada de NIS a la membrana plasmática.

REFERENCIAS:

1. Martín M. et al. (2016) *J Clin Mol Endocrinol.* 1(2):09
2. Nicola J.P. et al. (2014) *Nature Commun.* 5:3948
3. Nicola J.P. et al. (2015) *J Clin Endocrinol Metab.* 100(10):E1353-61

LEYENDA DE FIGURA: A. Cromatograma mostrando la transición homocigota G>A en el nucleótido 1.682 que codifica un ácido aspártico en la posición 561 (G561E) del paciente bajo estudio. B y C. Captación de ¹²⁵I-yoduro evaluando la expresión y función de NIS, G561E NIS y Δ546 NIS en células Cos-7 transfectadas. La captación se indica en pmol I-/μg ADN. La especificidad de la función de NIS es determinada por la inhibición de la acumulación de ¹²⁵I-yoduro en presencia de perclorato.

