

**UNIVERSITA' DI PISA**  
**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**



**LAUREA SPECIALISTICA IN**  
**MEDICINA E CHIRURGIA**

**TESI DI LAUREA**

*Ipotiroidismo congenito da difetti della  
organificazione dello iodio*

Relatore

Ch.mo Prof. Massimo Tonacchera

Candidato

Eleonora Loconte

**ANNO ACCADEMICO**  
**2010 – 2011**

## **INDICE**

<b>RIASSUNTO</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>6</b>
<i>Sviluppo embriologico</i> .....	<i>6</i>
<i>Omonogenesi e regolazione ormonale</i> .....	<i>7</i>
<i>Definizione</i> .....	<i>11</i>
<i>Classificazione ed eziologia</i> .....	<i>11</i>
<i>Ipotiroidismo da disgenesia tiroidea</i> .....	<i>12</i>
<i>Ipotiroidismo da disormonogenesi</i> .....	<i>15</i>
<i>Clinica, diagnosi e trattamento</i> .....	<i>22</i>
<b>SCOPO DELLO STUDIO</b> .....	<b>24</b>
<b>PAZIENTI</b> .....	<b>25</b>
<i>Pazienti identificati allo screening neonatale</i> .....	<i>26</i>
<i>Pazienti non identificati allo screening neonatale</i> .....	<i>32</i>
<i>Controlli</i> .....	<i>33</i>
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	<b>34</b>
<i>Test in vivo</i> .....	<i>34</i>
<i>Prove di funzionalità tiroidea</i> .....	<i>35</i>
<i>Sequenziamento genico</i> .....	<i>36</i>
<b>RISULTATI</b> .....	<b>44</b>
<b>DISCUSSIONE</b> .....	<b>50</b>
<b>CONCLUSIONI</b> .....	<b>61</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>62</b>

## ***RIASSUNTO***

L'ipotiroidismo congenito (IC) è una sindrome clinica caratterizzata da un deficit degli ormoni tiroidei presente alla nascita. Si stima che la sua incidenza nei paesi ad adeguato apporto iodico sia di 1:3000-4000 nati vivi.

E' possibile identificare una forma transitoria di IC, che è passibile di completa risoluzione nei primi mesi/anni di vita e che può essere determinata da lievi difetti della ormonogenesi o da fattori ambientali (tra i quali un inadeguato apporto iodico nella dieta materna, il passaggio transplacentare di anticorpi bloccanti il recettore del TSH o di farmaci antitiroidei oppure un'esposizione sia materna sia fetale ad un eccesso di iodio) ed una forma permanente, che come tale richiederà una terapia sostitutiva a vita. L'ipotiroidismo congenito permanente è determinato nell'80-85% dei casi da un quadro di disgenesia tiroidea; nel restante 10-15% dei casi è la conseguenza dell'alterazione di una o più fasi della sintesi ormonale tiroidea, la cosiddetta disormonogenesi. In entrambi i casi sia fattori di ordine genetico sia fattori di ordine ambientale entrano in gioco nell'eziopatogenesi del quadro di IC permanente.

Data la stretta dipendenza, sia nel feto sia nei primi anni di vita, dello sviluppo del sistema nervoso centrale dalla presenza di adeguati livelli di ormoni tiroidei, diventa fondamentale la diagnosi precoce effettuata tramite lo screening alla nascita in quanto un ipotiroidismo congenito misconosciuto può rendersi responsabile di una grave alterazione nello sviluppo neuropsicofisico del bambino.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di identificare eventuali mutazioni a carico dei geni coinvolti nel processo della ormonogenesi tiroidea in bambini affetti da ipotiroidismo congenito con tiroide in sede.

Abbiamo analizzato 6 bambini individuati all'interno di un gruppo di 32 pazienti affetti da ipotiroidismo congenito o da ipotiroidismo giovanile con tiroide in sede. All'interno di questo gruppo i bambini erano stati suddivisi in quelli che presentavano un lieve difetto della organificazione dello iodio, in quelli che avevano un marcato difetto della organificazione dello iodio ed infine in coloro che presentavano una TG sierica indosabile. I bambini oggetto del nostro studio presentavano una tiroide in sede ed erano stati identificati alla nascita mediante dosaggio del TSH su spot di sangue ad eccezione di una paziente (# 6) che veniva identificata in epoca post-natale in quanto nata prima dell'avvento dello screening per l'IC. Dei 6 pazienti, 4 (# 3, 4, 5, 6) risultavano positivi al test al perclorato di potassio con valori di dismissione che oscillavano tra il 91% e il 100%, dato che indicava un difetto totale nel processo della organificazione dello iodio. Le restanti 2 pazienti (# 1, 2), sorelle, presentavano una TG sierica indosabile e una delle due risultava negativa al test al perclorato, con un valore di dismissione pari al 7%. Nell'altra sorella il test non veniva eseguito in quanto presentava un forte stato di agitazione psicomotoria.

Nei 4 pazienti positivi al test al perclorato è stato analizzato il gene della TPO, che codifica per la proteina tireoperossidasi, enzima chiave nel processo della sintesi ormonale tiroidea. Nelle due pazienti con una tireoglobulina sierica indosabile e un test al perclorato negativo è stato sequenziato il gene della TG, che codifica per la proteina principale costituente della colloide. I risultati hanno mostrato la presenza, nelle pazienti # 1 e 2, di una nuova mutazione (R768X) all'interno dell'esone 10 del gene della TG ed espressa in omozigosi, la cui conseguenza è la produzione di una

proteina troncata. Nel paziente # 3 sono state identificate due mutazioni espresse in eterozigosi a carico del gene della TPO. La prima (E746X), mai descritta in letteratura, è stata individuata all'interno dell'esone 13 mentre la seconda (c.2505-2511insC835fs907X, che chiameremo 907X), già nota, è stata identificata all'interno dell'esone 14. Entrambe le anomalie genetiche causano la produzione di una proteina incapace a legarsi alla superficie apicale del tireocita. Il sequenziamento del gene della TPO della paziente # 6 ha rilevato la presenza di una nuova mutazione (T561M) all'interno dell'esone 10 espressa in omozigosi e responsabile della sintesi di una proteina troncata.

Nelle pazienti # 4 e 5 non è stata rilevata alcuna anomalia a carico del gene della TPO. Pertanto si è proceduto ad analizzare il gene DUOX2 e il promotore del gene della TPO. Nel primo caso non è stata trovata alcuna mutazione mentre nel secondo caso sono stati identificati 3 nuovi polimorfismi i quali verosimilmente non sono la causa del fenotipo. Le pazienti # 4 e 5 potrebbero essere portatrici di alterazioni, a livello di una sequenza intronica, che interferiscono con il normale meccanismo di splicing dell'mRNA e che quindi determinano la sintesi di una proteina troncata non funzionante.

In conclusione, abbiamo identificato 4 mutazioni, una (907X) già nota e le altre (E746X, T561M, R768X) mai descritte precedentemente in letteratura, responsabili, le prime tre, del difetto totale della organificazione dello iodio nei pazienti # 3 e 6 e l'ultima, del difetto della sintesi della tireoglobulina nelle pazienti # 1 e 2. Non è stata finora identificata alcuna anomalia genetica che possa spiegare il difetto totale della organificazione dello iodio riscontrato nelle pazienti # 4 e 5 .

## ***INTRODUZIONE***

Gli ormoni tiroidei, ovvero il pro-ormone T4 (3,5,3',5'- tetraiodotironina o tiroxina) e l'ormone attivo T3 (3,5,3'-triiodotironina), sono prodotti dalla ghiandola tiroidea, situata nella regione sottoioidea del collo, ventrocaudalmente alla cartilagine tiroidea. E' ormai noto come tali ormoni sono importanti per il normale sviluppo dei vari tessuti dell'organismo umano, in particolar modo del sistema nervoso centrale, e per la regolazione del loro metabolismo basale (1).

### ***Sviluppo embriologico***

La tiroide è la prima ghiandola a svilupparsi nei mammiferi, da due regioni dell'endoderma faringeo. L'abbozzo mediano, da cui deriveranno le cellule follicolari, origina da un ispessimento del pavimento della porzione anteriore del faringe tra il primo e il secondo arco branchiale e si estroflette sulla linea mediana. Tale abbozzo compare tra il sedicesimo e il diciassettesimo giorno di vita embrionale. Contemporaneamente due abbozzi laterali si sviluppano come proiezioni caudali dal quarto e quinto arco branchiale, da cui prenderanno origine, nell'uomo, le cellule o parafollicolari, calcitonina secernenti.

La ghiandola tiroidea da inizio alla sua attività di sintesi e secrezione degli ormoni tiroidei intorno alla ventesima settimana di gestazione: questo significa che, nelle settimane precedenti lo sviluppo embrionale, e in particolar modo quello del

sistema nervoso centrale, dipende strettamente dal passaggio transplacentare degli ormoni tiroidei materni (1,2).

### ***Ormogenesi e regolazione ormonale***

La sintesi e la secrezione degli ormoni tiroidei si svolge secondo un processo articolato in varie fasi, che ha luogo nei follicoli tiroidei, ossia strutture sferiche costituite da una singola fila di cellule, i tireociti o cellule follicolari, delimitanti un lume centrale, contenente una sostanza detta colloide. Un'adeguata sintesi degli ormoni tiroidei dipende in primo luogo da un corretto apporto di iodio, che rappresenta il principale costituente degli ormoni stessi, oltre che da un normale sviluppo della ghiandola e da un idoneo funzionamento dei sistemi preposti alla sintesi (2).

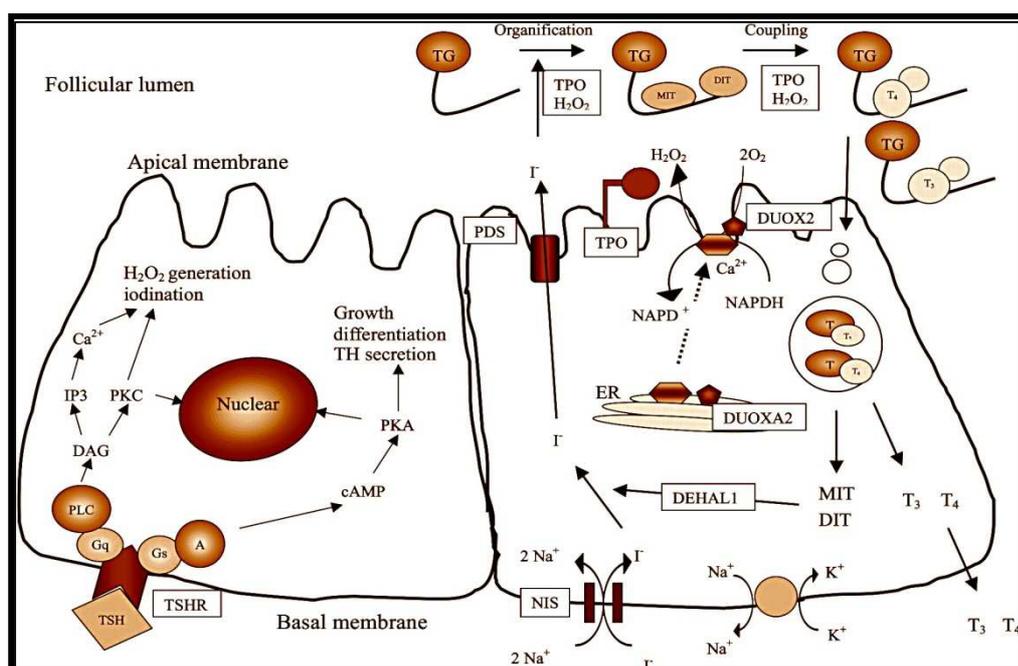
Lo iodio è un elemento raro in natura: esso è introdotto nell'organismo con l'acqua e gli alimenti, assorbito nel piccolo intestino, sotto forma di ioduro, ed in seguito trasportato nel plasma. Il processo di sintesi ha inizio con la captazione dello ioduro dal plasma, attraverso la membrana basolaterale del tireocita, trasporto che avviene controgradiente e che è pertanto facilitato da un trasportatore transmembrana, detto NIS ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  symporter). Il successivo trasferimento dello ioduro nella colloide, attraverso la membrana apicale del tireocita, è mediato da una proteina detta pendrina (PDS). Sul medesimo versante del tireocita è presente un'altra proteina, contenente gruppi eme, detta tireoperossidasi (TPO), che catalizza una reazione di ossidazione dello ioduro, la quale richiede la presenza di perossido d'idrogeno, prodotto dalla flavoproteina DUOX2 (dual oxidase type 2). In seguito, sempre per opera della TPO, lo iodio è ossidato e incorporato nei residui tirosinici della tireoglobulina (TG), una glicoproteina che rappresenta il principale costituente della colloide ed è sintetizzata e secreta dai tireociti nel lume follicolare.

L'ossidazione dello ioduro e il suo legame covalente ai residui tirosinici della tireoglobulina è noto come processo di organificazione (3).

Il risultato che si ottiene è la formazione delle iodotirosine: la monoiodotirosina (MIT) e la diiodotirosina (DIT). Infine è sempre la TPO a catalizzare una reazione di accoppiamento delle iodotirosine a formare gli ormoni tiroidei: la T4 (3,5,3', 5'- tetraiodotironina o tiroxina) e, in misura minore, la T3 (3,5,3'-triiodotironina).

Quando necessario, la TG iodata viene internalizzata nel tireocita, tramite un processo di pinocitosi, e idrolizzata nei lisosomi dalle catepsine: in questo modo sono rilasciate e le iodotironine, che saranno così immesse nel circolo ematico, e le iodotirosine non accoppiate, che saranno sottoposte ad un processo di deiodinazione da parte di una deiodinasi ad attività nitroreductasica, codificata dal gene DEHAL 1 (iodotyrosine dehalogenase 1). Quest'ultima reazione ha lo scopo di recuperare lo iodio, in modo che questo possa essere riutilizzato successivamente. E' chiaro come questo meccanismo sia importante nelle condizioni di carente apporto di iodio.

(Fig. 1)



*Fig. 1: Rappresentazione schematica della sintesi degli ormoni tiroidei e della regolazione dell'attività tiroidea da parte del TSH ipofisario. (4)*

La maggior parte degli effetti biologici indotti dagli ormoni tiroidei, in particolar modo dalla forma attiva T3, sono la conseguenza del legame di questi con propri recettori nucleari (TRs), contenuti all'interno delle cellule bersaglio. Nell'uomo esistono diverse isoforme di tali recettori: l'alfa 1 e 2 codificati dal gene THRA, sito sul cromosoma 17, e il beta 1 e 2 codificati dal THRB, sito sul cromosoma 3. Come altri recettori nucleari, anche i TRs regolano la trascrizione dei geni bersaglio: prima interagiscono con co-attivatori o con co-repressori formando complessi trascrizionali, poi questi ultimi si legano ai T3 response elements (TREs), localizzati nelle regioni promotrici dei geni target.

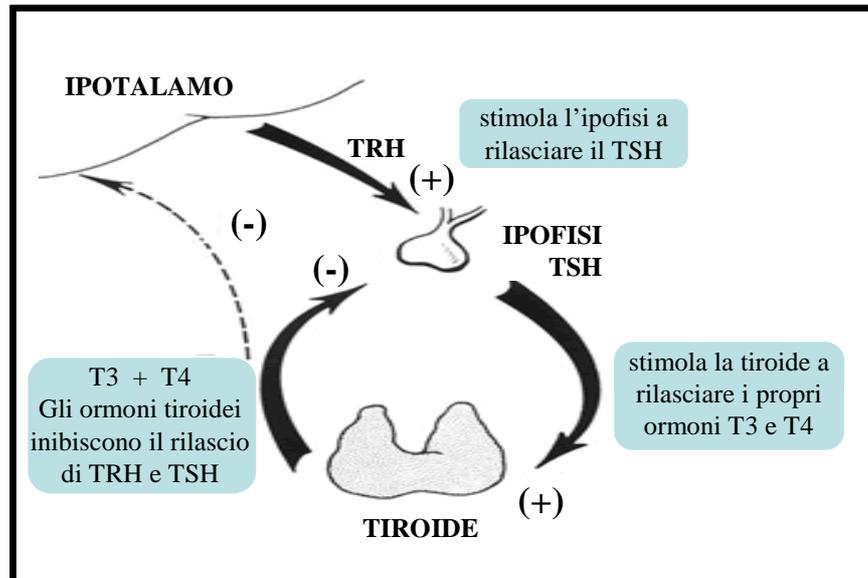
Sebbene la T3 sia l'ormone metabolicamente più attivo, in quanto lega con maggior affinità i TRs, la ghiandola tiroidea produce prevalentemente T4. La maggior parte della T3 circolante deriva invece dalla deiodinazione nei tessuti extratiroidei della T4 per opera delle deiodinasi D1 e D2, che vanno ad agire sull'anello esterno dell'ormone (outer ring deiodination). La D1 è espressa nel fegato, nel rene e nella tiroide; la D2 è espressa nel sistema nervoso centrale, nell'ipofisi e nel tessuto adiposo bruno ove è fondamentale per la produzione locale di T3. Esiste una terza deiodinasi, la D3, che è espressa nel cervello e nella cute dell'adulto e ad alti livelli in diversi tessuti del feto, nella placenta e nell'utero durante la gestazione. La D3 agisce sull'anello interno (inner ring deiodination) della T4, trasformandola nella T3-inversa (rT3), biologicamente inattiva. Con la medesima reazione, la T3 è inattivata a 3,3'-T2. Questo tipo d'attività, dimostrata anche dalla D1, anche se in misura nettamente inferiore, è importante per il controllo negativo sia locale sia

sistemico dei livelli di T3. Gli ormoni tiroidei possono seguire vie metaboliche di minor importanza, come la coniugazione con acido glucuronico o solforico o la deaminazione ossidativa a derivati dell'acido acetico.

L'attività biologica degli ormoni tiroidei dipende essenzialmente dalla concentrazione intracellulare di T3, che a sua volta è influenzata dai livelli circolanti della T3 e dal suo precursore T4, dal livello d'attività delle diverse deiodinasi e infine dall'attività dei trasportatori delle iodotironine. Queste, infatti, benché lipofile, attraversano la membrana plasmatica prevalentemente mediante trasportatori. Negli ultimi anni ne sono stati identificati numerosi che sono in grado di facilitare l'ingresso e/o l'uscita degli ormoni tiroidei dalle cellule target: questi sono, ad esempio, l'NTCP (Na-taurocholate cotransporting polypeptide), l'OATP (Na-independent organic anion transporting polypeptide), il LAT1 e il LAT2 (L-type amino acid transporters), gli MCTs (the family of monocarboxylate transporters) come l'MCT-10 e l'MCT-8, quest'ultimo unico tipo di trasportatore per gli ormoni tiroidei presente a livello del sistema nervoso centrale (5).

L'attività della ghiandola tiroidea è sottoposta ad una fine regolazione per opera dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide. Sul versante basolaterale delle cellule tiroidee sono presenti recettori per l'ormone tireostimolante (TSH), glicoproteina prodotta a livello dell'adenipofisi, che ha il compito di stimolare la sintesi e la secrezione delle iodotironine. A sua volta la secrezione del TSH è stimolata dal fattore di rilascio della tireotropina (TRH), tripeptide ad origine ipotalamica. Gli ormoni tiroidei regolano negativamente la sintesi e il rilascio sia del TRH sia del TSH, con un meccanismo detto a feed-back negativo.

(Fig. 2)



*Fig. 2: Rappresentazione schematica dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide.*

## ***Definizione***

L'ipotiroidismo congenito (CH) è definito come un deficit degli ormoni tiroidei presente alla nascita (6). Si stima che, nelle regioni con adeguato apporto iodico, l'incidenza annua sia di un bambino affetto su 3000-4000 nati vivi. Questo rapporto rende, di fatto, l'ipotiroidismo congenito, l'endocrinopatia dell'infanzia più frequente e una delle cause prevenibili più comuni di ritardo mentale (2,7).

## ***Classificazione ed eziologia***

L'ipotiroidismo congenito è classificato in permanente e transitorio. Il termine permanente si riferisce ad un deficit persistente degli ormoni tiroidei tale da richiedere un trattamento sostitutivo a vita; viceversa il termine transitorio fa riferimento ad un deficit temporaneo, identificato alla nascita, che va incontro a completa risoluzione nei primi mesi/anni di vita, le cui cause più frequenti sono: deficit d'apporto iodico nella dieta materna, passaggio transplacentare di anticorpi materni bloccanti il recettore per il TSH, l'esposizione del feto a farmaci antitiroidei, l'esposizione sia

materna sia fetale ad un eccesso di iodio come nel caso d'assunzione d'amiodarone o dell'uso di disinfettanti iodati, l'emangioma epatico congenito (6).

L'ipotiroidismo permanente è suddiviso ulteriormente in primario e secondario (o centrale), quest'ultimo conseguenza, in genere, di un difetto nella produzione del TSH, isolato o, più frequentemente, associato al deficit di altri ormoni ipofisari nell'ambito di un quadro di panipopituitarismo congenito, oppure, ancor più raramente, di una resistenza all'azione del TRH.

Infine sono note forme di ipotiroidismo congenito permanente ad origine periferica dovute, ad esempio, ad un quadro di resistenza periferica all'azione degli ormoni tiroidei (8) oppure conseguenza di una mutazione a carico del gene codificante per il trasportatore MCT-8 (9).

Nei paesi con adeguato apporto iodico, l'85% delle forme di ipotiroidismo congenito è dovuto ad un quadro di disgenesia tiroidea. Il restante 10-15% è invece la conseguenza o dell'alterazione di una o più fasi della sintesi ormonale, la cosiddetta disormogenesi, o di difetti nel trasporto, nel metabolismo o nell'azione periferica degli ormoni tiroidei (6).

### ***Ipotiroidismo da disgenesia tiroidea***

Negli ultimi anni è stato dimostrato come mutazioni a carico dei fattori di trascrizione come TTF-1, TTF-2 e PAX-8, i quali sono espressi molto precocemente durante lo sviluppo della ghiandola tiroidea e la cui implicazione nel processo d'embriogenesi è innegabilmente dimostrata negli studi sui topi knock-out, possono condurre a quadri di disgenesia tiroidea (7,10).

Con questo termine s'indica un insieme di condizioni eterogenee caratterizzate da un'alterazione nel normale processo di sviluppo della tiroide.

Esse vanno dall'ectopia (80% dei casi), all'agenesia (20% dei casi) fino all'ipoplasia (5% dei casi) tiroidea (10).

Il TTF-2 (o FOXE1) è una fosfoproteina il cui gene è localizzato sul cromosoma 9 in posizione 9q22. Essa partecipa al controllo trascrizionale delle regioni promotrici sia della TG sia della TPO.

Bamforth et al. hanno descritto nel 1989 l'omonima sindrome, studiando il caso di due fratelli, nati da genitori consanguinei, che presentavano agenesia tiroidea, palatoschisi, capelli a spazzola, alterazione delle coane e dell'epiglottide (11). La somiglianza tra questo fenotipo e le anomalie riscontrate nei topi *foex1* knockout portò Clifton-Bligh et al. ad analizzare questi pazienti per il gene FOXE1 e ad identificare la prima mutazione omozigote missenso (A65V) (12).

Il TTF-1 (o NKX2A o T/ebp) è un fattore di trascrizione appartenente alla famiglia delle NKX2, il cui gene è localizzato sul cromosoma 14 in posizione 14q13. Esso regola la trascrizione dei geni della TG, della TPO, del TSHR e dello SBP (surfactant protein B), proteina espressa nell'epitelio polmonare. Delezioni geniche, anche in eterozigosi, sono in grado di determinare quadri di ipotiroidismo congenito associato ad una sindrome da distress respiratorio e ad alterazioni neurologiche: tale associazione dimostra il ruolo che questo fattore ha, non solo nello sviluppo della ghiandola tiroidea, ma anche in quello dell'apparato respiratorio e del sistema nervoso centrale (2,13).

Gli studi sul Pax-8, fattore trascrizionale il cui gene è localizzato sul cromosoma 2 in posizione 2q12-14, hanno dimostrato il suo ruolo chiave nello sviluppo embriologico della ghiandola tiroidea, nonché quello di regolatore della trascrizione delle regioni promotrici del gene del NIS, della TG, in sinergia con il TTF-1, ed infine di quello della TPO. Proprio per questo gene è stata osservata una stretta dipendenza dal Pax-8: un'alterata funzione di quest'ultimo è in grado di

determinare una ridotta espressione della TPO e di conseguenza un difetto nel processo di organificazione. Mentre nel topo knockout solo gli omozigoti sono affetti, nell'uomo è sufficiente una delezione in eterozigosi affinché s'instauri un quadro di disgenesia tiroidea. E' stato inoltre osservato come tale fattore ha un ruolo nello sviluppo del rene, poiché esso attiva il promotore del Wilms' tumor gene (WT1), e come una sua alterazione possa condurre a quadri di disgenesia renale (2,10).

Il TSHr, il cui gene è localizzato nel cromosoma 14 in posizione 14q24-q31, appartiene alla superfamiglia dei recettori associati alla proteina G ed è costituito da 7 domini transmembrana. Il TSHr comincia ad essere espresso intorno alla quattordicesima giornata dell'embriogenesi murina, quando ormai l'abbozzo tiroideo è già migrato ed ha inizio la differenziazione dei follicoli tiroidei. Questa osservazione dimostra come il TSH è importante non tanto per le prime fasi di sviluppo della ghiandola quanto per la successiva crescita e funzione tiroidea (14). Mutazioni inattivanti il gene umano del TSHr, in omozigosi o in eterozigosi, sono responsabili di quadri di resistenza al TSH, rispettivamente completi e parziali (15). Dal punto di vista fenotipico si può osservare un'ampia variabilità: mutazioni inattivanti il TSHr possono tradursi clinicamente in forme di ipotiroidismo subclinico con tiroide di dimensioni normali oppure in quadri severi di ipotiroidismo associato a marcata ipoplasia tiroidea. Il tipo di fenotipo potrebbe riflettere l'attività residua del TSHr, necessaria al normale sviluppo della ghiandola tiroidea (14).

## ***Ipotiroidismo da disormonogenesi***

Disordini congeniti del metabolismo tiroideo possono derivare da un blocco, sia parziale sia completo, in una qualsiasi delle fasi del processo di sintesi e secrezione degli ormoni tiroidei (3). Essi sono in genere trasmessi con modalità autosomica recessiva (6).

L'ipotiroidismo congenito legato alla disormonogenesi, se non trattato, porta ad incremento del TSH, con iperstimolazione tiroidea e gozzo (16), anche se quest'ultimo aspetto è di rara osservazione nei bambini individuati allo screening e trattati precocemente (6).

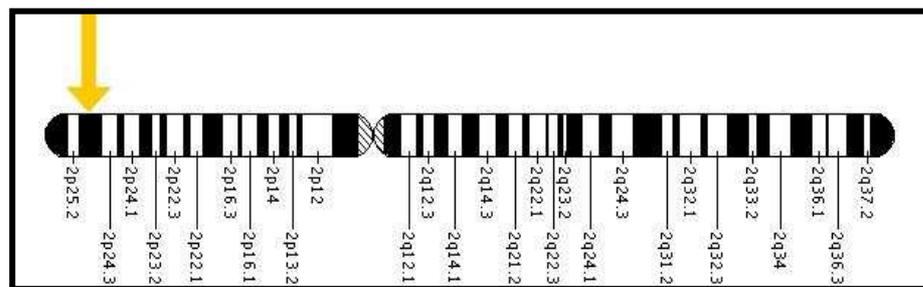
Il test di dismissione al perclorato e il dosaggio della TG sierica rappresentano il primo passo nella diagnosi differenziale dei pazienti affetti da ipotiroidismo congenito da disormonogenesi con una tiroide in sede (17).

Le cause di IC da difetti della disormonogenesi possono essere dovute ad alterazioni ereditarie a carico del gene del NIS, del gene della TPO, del gene DUOX2, del gene della TG, del gene SLC26A4 ed del gene DEHAL1.

Il NIS (trasportatore sodio-iodio) è una glicoproteina espressa sul versante basolaterale del tireocita ed è responsabile del trasporto attivo dello iodio dal plasma all'interno della ghiandola tiroidea. Alterazioni nella struttura e/o nella funzione del NIS, conseguenza di mutazioni a carico del suo gene SLC5A5, si possono rendere responsabile di un quadro raro di ipotiroidismo congenito, di cui sono stati descritti circa 60 casi nel mondo. I criteri, proposti da Stanbury et al., che definiscono la cosiddetta sindrome da "difetto di trasporto dello iodio"(ITD), sono: gozzo con ipotiroidismo lieve o franco, minima o assente captazione dello radioiodio, mancata concentrazione dello iodio nelle ghiandole salivari o nello stomaco, altri organi ove il NIS è espresso, necessità di alte dosi di terapia sostitutiva (18).

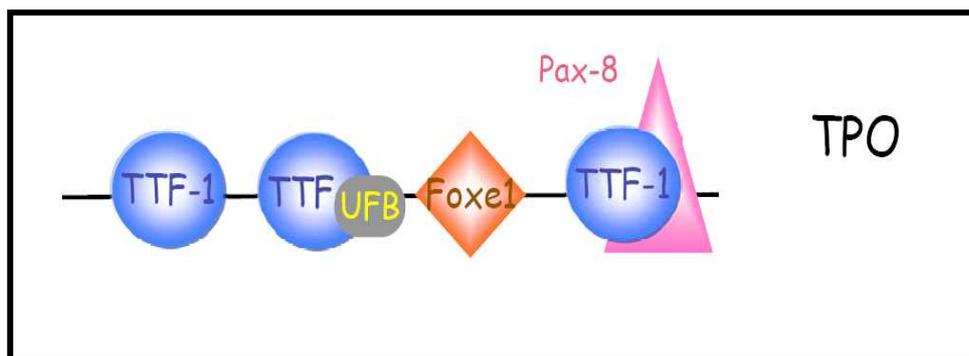
La tireoperossidasi (TPO) è una glicoproteina tiroide-specifica, con un breve dominio transmembrana, espresso sulla superficie apicale del tireocita, e una porzione catalitica affacciata nel lume follicolare (19). Tale enzima svolge un ruolo essenziale nella sintesi degli ormoni tiroidei (16). Le mutazioni, a carico del gene della TPO, rappresentano le più frequenti anomalie genetiche causa di disormonogenesi, con una prevalenza di 1: 40000 nuovi nati (3,20).

Il gene per la TPO è localizzato sul cromosoma 2 (2p25) (Fig. 3) e codifica per una proteina di 933 aminoacidi. Questa proteina ha cinque siti di glicosilazione, due ponti disolfuro e vari gruppi eme, localizzati nei residui istidinici della proteina. Il gene è costituito da 17 esoni e 16 introni e si estende per circa 150 Kb (3).



**Fig. 3: Localizzazione del gene della TPO sul cromosoma 2(2p25)**

La trascrizione del gene della TPO è sotto il controllo dei fattori di trascrizione TTF-1, TTF-2 e Pax-8, i cui siti di legame sono localizzati nella regione promotrice del gene (16). Il sito di legame, che va dal segmento -119 al segmento -105 della regione promotrice, mostra una notevole importanza funzionale, confermata dal fatto che, delezioni o mutazioni in questa sede, possano ridurre drasticamente la trascrizione del gene della TPO (21). (Fig. 4)



*Fig . 4: Rappresentazione schematica del promotore del gene della TPO .*

La TPO catalizza sia la reazione di organificazione sia quella di accoppiamento delle iodotirosine, reazioni che si svolgono all'interno della glicoproteina TG. Il processo di organificazione dipende da quattro fattori: attività della TPO, produzione di perossido d'idrogeno, disponibilità di substrato (TG e iodio) e la corretta localizzazione di tutti questi elementi sulla superficie apicale del tireocita (3). Se per il processo di organificazione la TPO rappresenta un elemento essenziale, lo stesso non può essere affermato per il processo di accoppiamento, in quanto esso può avvenire anche con modalità non enzimatica, anche se in modo meno efficiente (3,16).

I difetti di organificazione possono essere classificati in quantitativi, qualitativi e da deficit del perossido d'idrogeno: i primi sono i più frequenti e si caratterizzano per un'assenza parziale o totale d'attività; i secondi possono essere dovuti ad un difetto dei gruppi eme, possibile conseguenza della perdita dei residui istidinici, dall'esistenza di un inibitore della TPO, da anomalie nella localizzazione intracellulare della TPO, da un'alterata abilità nel legare il substrato; infine il deficit del perossido d'idrogeno, la cui produzione è essenziale per l'attività della TPO (3).

Il difetto totale (TIOD) di organificazione dello iodio è la conseguenza di mutazioni bialleliche inattivanti del gene della TPO o, più raramente, dovuto a

mutazioni bialleliche inattivanti del gene DUOX2 (16,20). In letteratura sono state descritti casi in cui il fenotipo è riconducibile ad una TIOD ma che dal punto di vista genetico presentano mutazioni che interessano un singolo allele del gene della TPO (20,22). Negli anni sono state individuate più di 60 mutazioni a carico della TPO, la maggior parte delle quali localizzate negli esoni 7, 8 e 9, codificanti il sito catalitico emimero della proteina (16).

In pazienti sospettati di avere un difetto parziale o totale, l'attività della TPO è valutata in vivo tramite l'uptake del radioiodio e il test di dismissione al perclorato, eseguito a tre anni di vita, dopo quattro settimane di sospensione della terapia con levo-tiroxina (16,20). A causa degli elevati livelli di TSH, i pazienti mostrano un iniziale rapido uptake del radioiodio, che raggiunge il massimo livello entro 30 minuti. La successiva somministrazione di perclorato ( $\text{ClO}_4^-$ ) determina, in caso di difetto totale, una dismissione superiore al 90%, in quanto il radioiodio, precedentemente captato, non è stato incorporato nella TG; in caso di difetto parziale, la dismissione oscilla tra il 10% e il 90% (16).

Il difetto parziale di organificazione dello iodio (PIOD) è più frequentemente riconducibile a mutazioni del DUOX2, del DUOXA2, dello SCL26A4, gene la cui alterazione è responsabile della sindrome di Pendred, e talora alla produzione di una TG qualitativamente alterata (16,20).

La produzione di perossido d'idrogeno, ad opera di un sistema di proteine ad attività ossidasica, rappresenta un passaggio fondamentale nel processo della sintesi degli ormoni tiroidei. Di questo sistema fanno parte la DUOX1 e la DUOX2 (note anche come THOX1 e THOX2) due flavoproteine ad attività NADPH-ossidasica inserite nella membrana apicale del tireocita (23). Mentre il ruolo cruciale della DUOX2, nel processo di sintesi degli ormoni tiroidei, è dimostrato dall'osservazione che, mutazioni inattivanti monoalleliche e bialleliche sono cause, rispettivamente, di

quadri di ipotiroidismo congenito transitorio e permanente, il ruolo della DUOX1 non è stato ancora ben definito.

Recentemente è stato identificato un nuovo gene il cui prodotto, DUOXA2 (dual oxidase maturation factor 2), è necessario per la normale espressione dell'attività della proteina DUOX2 (23,24,25).

La TG, glicoproteina dimerica di 660 kDa contenente circa 125 residui tirosinici (26), è sintetizzata e secreta dai tireociti nel lume dei follicoli tiroidei (3,17,27). Essa svolge un ruolo duplice: partecipare alla sintesi degli ormoni tiroidei e fungere da deposito sia degli ormoni che dello iodio, in modo da soddisfare sia la secrezione ormonale basale che un'eventuale aumentata richiesta ormonale dell'organismo (3). La TG è codificata da un gene di 270 kb, localizzato sul cromosoma 8 in posizione 8q24.2-8q24.3, contenente 48 esoni (3,17,27). L'espressione genica è indotta principalmente dal TSH mediante meccanismo cAMP dipendente, ma anche dai fattori tiroide specifici TTF-1 e TTF-2, i cui siti di legame sono situati nella regione promotrice del gene: in particolar modo le prime 200 bp del promotore sono necessari per il controllo trascrizionale TSH-cAMP dipendente, mentre la regione che va dalla posizione -168 alla posizione -42 sembra essere deputata, almeno nel topo, al legame con i fattori trascrizionali tiroide specifici sopra citati (3,27). La sintesi del monomero di TG si realizza a livello del Reticolo Endoplasmatico Rugoso (RER). Dopo un processo di glicosilazione e di omodimerizzazione, la proteina è secreta nel lume follicolare attraverso la via dell'apparato del Golgi (3,27). L'80% della TG contiene tre tipi di regioni, ricche in cisteina, aminoacido che svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento della struttura terziaria della proteina, a sua volta requisito essenziale per la sintesi degli ormoni tiroidei; il restante 20% è costituito da un dominio carbossi-terminale, omologo dell'acetilcolinesterasi, fondamentale per una corretta maturazione

conformazionale della TG e per il suo trasporto intracellulare nella sede della iodinazione e dell'ormonogenesi (27,28). A livello della superficie apicale del tireocita i residui tirosinici della proteina sono iodinati e in seguito accoppiati, per opera della TPO, a formare T4 e, in misura minore, T3. Nella TG umana sono stati identificati quattro residui tirosinici, cosiddetti accettori ormonali, in posizione 5, 1291, 2554 e 2747 e tre residui tirosinici, cosiddetti donatori ormonali, in posizione 130, 847 e 1448. L'ormonogenesi tiroidea richiede un'iniziale iodinazione di due residui tirosinici, un accettore e un donatore. Dopo il loro accoppiamento, nella sede dell'accettore e in quello del donatore si rilevano rispettivamente, una iodotironina ed una deidroalanina (3,26,27).

Quando necessario, la TG è portata all'interno dei tireociti tramite processo di pinocitosi e trasferita nei lisosomi. Gli ormoni tiroidei sono rilasciati nel circolo ematico in seguito alla scissione proteolitica a cui la proteina è sottoposta (27).

Le mutazioni a carico del gene della TG causano un'alterazione nella struttura della proteina, la cui conseguenza è la perdita della capacità di agire da substrato nella sintesi degli ormoni tiroidei. Si stima che la prevalenza dei difetti della TG sia di 1: 40000 nati vivi (3). Sono state descritte 52 mutazioni a carico del gene della TG, tra cui 23 mutazioni missenso, 11 mutazioni nonsense, 6 delezioni, 1 inserzione e 11 mutazioni nei siti di splicing, trasmesse con modalità autosomica recessiva (27). Ieri et al. hanno identificato la prima mutazione umana, la g.IVS3-3C>G, risultante nella perdita dell'esone 4 dal trascritto della TG e nella produzione di una proteina strutturalmente alterata, con ridotta emivita e basso contenuto in iodotironine (3,27,29).

Le anomalie nella sintesi e/o nella secrezione della TG possono essere classificate in quantitative e in qualitative: le prime sono caratterizzate da livelli di TG, sia sierici sia tiroidei, bassi o assenti, con la presenza nei lumi follicolari e nel

siero, di altre proteine iodate, principalmente l'albumina; le seconde sono caratterizzate da livelli di TG, sia sierici sia tiroidei, normali o addirittura aumentati e sono legate ad alterazioni nella struttura, nella glicosilazione o nel trasporto della proteina nei lumi follicolari.

Il difetto nella sintesi e/o nella secrezione della TG è confermato dalla mancata elevazione dei valori sierici della proteina tra la 24' e la 48' ora dalla somministrazione di TSH ricombinante umano (rhTSH). Tuttavia nei pazienti con difetto qualitativo della TG, la proteina aumenta, così come accade in altri pazienti con difetti dell'organificazione. I livelli di ormoni tiroidei circolanti sono bassi, anche se, in alcuni casi, la T3 può essere normale o addirittura incrementata. L'uptake del radioiodio è aumentato, a causa degli elevati livelli del TSH, mentre il test al perclorato risulta essere negativo. All'ecografia i pazienti presentano, nella maggior parte dei casi, una tiroide ingrandita, talora con aspetti d'iperplasia nodulare. Il quadro clinico di ipotiroidismo può oscillare da moderato a severo; tuttavia in letteratura sono riportati casi di mutazioni inattivanti associate ad un quadro di ipotiroidismo lieve o talora di eutiroidismo (3,17,27).

La sindrome di Pendred (PDS) è un disordine congenito a trasmissione autosomica recessiva, descritto per la prima volta nel 1896, causato da mutazioni nel gene SLC26A4 e caratterizzato da sordità congenita, gozzo e positività al test di dismissione del perclorato. Il gene SLC26A4 è stato mappato sul cromosoma 7 e codifica per la proteina pendrina, che funziona da trasportatore anionico transmembrana sia nell'orecchio interno sia nella tiroide, ove ha il ruolo di trasportare lo iodio attraverso la membrana apicale del tireocita. La perdita di funzione della pendrina si traduce in un difetto parziale del trasporto dello iodio, con il conseguente sviluppo di gozzo; tuttavia la maggior parte dei pazienti affetti da PDS risulta essere eutiroidico e solo progressivamente essi sviluppano un quadro di

ipotiroidismo lieve. Più di 100 mutazioni nel gene SLC26A4 sono state messe in relazione alla sindrome di Pendred (30,31).

Lo iodio è componente essenziale degli ormoni tiroidei e, pertanto, deve essere sempre disponibile in quantità sufficienti per la loro sintesi. E' chiaro come, specie nelle condizioni di carente apporto di tal elemento, diventa fondamentale il recupero e il riutilizzo dello iodio non impiegato per la produzione delle iodotironine. Nella tiroide, ma anche nel fegato e nel rene, esiste quindi un sistema di deiodinazione delle iodotirosine, che non sono state coinvolte nel processo d'accoppiamento, a cui fa capo un enzima dotato d'attività nitroreduztasica, codificato dal gene DEHAL1. In letteratura sono stati descritti quadri di ipotiroidismo congenito legati a mutazioni a carico del gene DEHAL1 e caratterizzati da gozzo ed elevati livelli di iodotirosine nel siero e nelle urine (32).

### ***Clinica, diagnosi e trattamento***

Poiché lo sviluppo del sistema nervoso centrale è strettamente dipendente dagli ormoni tiroidei, sia durante la vita fetale sia nei primi anni di vita, è chiaro come un ipotiroidismo congenito, non tempestivamente diagnosticato e trattato, si renderà responsabile della comparsa di un grave deficit dello sviluppo neuropsicomotorio del bambino (16).

Diversi studi hanno dimostrato come la tempistica con cui è avviata la terapia sostitutiva a base di Levotiroxina (L-T4) è fondamentale per l'outcome neurologico del bambino.

Frequentemente le manifestazioni cliniche dell'ipotiroidismo congenito alla nascita sono sfumate o addirittura assenti, caratteristica che in passato, prima dell'avvento dello screening neonatale, non permetteva di formulare la diagnosi.

I segni e sintomi più comuni comprendono: peso alla nascita maggiore del 90° percentile, ernia ombelicale, macroglossia, cute mixedematosa, ittero neonatale, diastasi delle fontanelle, difficoltà nella suzione, ipotonia muscolare, ritardo nell'acquisizione psicomotoria, sonnolenza, stipsi e turbe nell'accrescimento scheletrico (6).

La diagnosi di ipotiroidismo congenito trova il suo strumento principale nello screening, effettuato su tutti i nuovi nati, tra il terzo e il quinto giorno di vita, mediante dosaggio del TSH su spot di sangue prelevato dal tallone.

In Italia il programma di screening è stato avviato, in via sperimentale, nel 1977 e da allora si è esteso a tutta la nazione, permettendo così l'eradicazione di quei quadri di ritardo mentale, conseguenza di un'ipotiroidismo congenito misconosciuto (33). Valori di TSH su spot di sangue superiori a 15 mU/L indicano una positività allo screening e dovranno essere confermati mediante il dosaggio su siero sia del TSH sia del FT4. Contestualmente verrà eseguito uno studio ecografico della tiroide al fine di escludere un quadro di disgenesia tiroidea. All'età di tre anni si potrà procedere allo sospensione temporanea della terapia sostitutiva al fine di definire l'eventuale carattere di permanenza del quadro di ipotiroidismo congenito e, qualora si sospetti un difetto della organificazione dello iodio, eseguire una scintigrafia tiroidea e un test di dismissione al perclorato (6,33).

## ***SCOPO DELLO STUDIO***

Il presente studio ha come scopo l'analisi genetica di 6 pazienti individuati all'interno di un gruppo di 32 bambini affetti da ipotiroidismo congenito o da ipotiroidismo giovanile con tiroide in sede. In tale gruppo i bambini sono stati divisi in quelli che presentano un lieve difetto della organificazione dello iodio, in quelli che hanno un grave difetto della organificazione dello iodio ed infine in coloro che presentano una TG indosabile nel siero.

Il gruppo dei 6 pazienti con IC e tiroide in sede, oggetto del nostro studio, è composto da 4 bambini con un test al perclorato fortemente positivo, che indica un difetto totale della organificazione dello iodio, e da 2 bambini che hanno una TG sierica indosabile.

Nei 4 pazienti positivi al test al perclorato è stato sequenziato il gene della TPO. In 2 di questi pazienti, privi di anomalie nel gene della TPO, è stato sequenziato anche il promotore del gene della TPO e il gene DUOX2.

Il gene della TG è stato analizzato nei 2 pazienti che presentano una TG sierica indosabile ed un test al perclorato negativo.

## ***PAZIENTI***

Il gruppo di studio comprendeva 6 pazienti affetti da ipotiroidismo congenito con tiroide in sede. Cinque bambini venivano identificati alla nascita mediante dosaggio del TSH su spot di sangue, mentre un paziente veniva identificato in un periodo post-natale in quanto nato in .epoca pre-screening.

Dopo la diagnosi i pazienti iniziavano la terapia ormonale sostitutiva con Levotiroxina.

## ***Pazienti identificati allo screening neonatale***

Sul totale di 6 pazienti, 5 erano identificati mediante screening alla nascita (# 1, 2, 3, 4, 5). (Tabella 1) I pazienti erano tutti nati a termine ( $\geq 37^\circ$  settimana di gestazione), i bambini # 1, 2, 3 con parto cesareo e i bambini # 4, 5 con parto eutocico, da gravidanze con decorso non complicato.

<b><i>Paziente</i></b>	<b><i>TSH sierico alla nascita</i></b> (v.n.: 0,4-3,4 $\mu$ U/ml)	<b><i>Test al perclorato</i></b> (%)	<b><i>Condizioni biochimiche dopo sospensione della terapia</i></b>	<b><i>TSH sierico dopo sospensione della terapia</i></b> (v.n.: 0,4-3,4 $\mu$ U/ml)	<b><i>Tg sierica in occasione del test al perclorato</i></b> (v.n.: 5-25 ng/ml)
<b># 1</b>	50	-	-	-	-
<b># 2</b>	-	7	Ipotiroidismo franco	75	< 0,5
<b># 3</b>	75	100	Ipotiroidismo franco	75	300
<b># 4</b>	520	99	Ipotiroidismo franco	75	525
<b># 5</b>	263	99	Ipotiroidismo franco	75	1025

***Tabella 1: Pazienti positivi allo screening neonatale.***

*Sono indicati: il TSH sierico alla nascita, i valori del test al perclorato, le condizioni biochimiche tiroidee dopo la sospensione della terapia sostitutiva con Levotiroxina, il TSH e la TG sierici al momento dell'esecuzione del test al perclorato.*

*NOTE: il trattino indica un dato non disponibile (vedi testo).*

La paziente # 1 nasceva da prima gravidanza a termine, con parto cesareo, da genitori consanguinei, con peso di 3100 gr e lunghezza di 51 cm. La bambina risultava positiva allo screening per ipotiroidismo congenito, dato confermato dal

riscontro di valori sierici di TSH  $> 50 \mu\text{U/ml}$  (vn.  $0,4-15 \mu\text{U/ml}$ ), che indicavano uno stato di franco ipotiroidismo. La terapia sostitutiva, a base di Levotiroxina, veniva intrapresa in ventesima giornata di vita, grazie alla quale la paziente raggiungeva progressivamente uno stato di eutiroidismo, monitorato nel tempo con controlli prima mensili e poi semestrali presso il centro di screening di riferimento regionale. Durante la crescita si rendeva evidente un quadro di grave ritardo mentale, confermato nell'ambito di una successiva visita specialistica neuropsichiatrica.

La bambina si presentava per la prima volta, all'età di tredici anni, all'attenzione del nostro ambulatorio dedicato all'ipotiroidismo congenito. Veniva fornita documentazione attestante la normalità sia della funzionalità tiroidea (TSH  $1,7 \mu\text{g/ml}$ , fT4  $11,9 \text{ pg/ml}$ ), sotto terapia sostitutiva, sia della funzione uditiva, valutata con precedenti esami audiometrici, dato che ci permetteva di escludere una sindrome di Pendred. Era stato eseguita anche un ecocardiografia che mostrava l'assenza di associazione tra tireopatia e malformazione cardiaca congenita. Altro dato di rilievo era il riscontro di un'amenorrea primaria. Nella valutazione dell'anamnesi familiare si rilevava che anche la sorella minore era affetta da ipotiroidismo congenito, identificata allo screening e precocemente trattata con terapia sostitutiva. Ella tuttavia non presentava un quadro di ritardo mentale. Il padre, unico genitore vivente, riferiva un'anamnesi personale negativa per tireopatia, dato confermato da una successiva valutazione della funzionalità tiroidea.

Si sottoponeva la paziente ad una serie di accertamenti diagnostico-strumentali tra cui un prelievo ematico, i cui risultati confermavano il precedente stato di eutiroidismo sotto terapia e che rivelavano l'indossabilità della TG nonché l'assenza degli anticorpi anti-TPO e anti-TG. L'ecografia del collo mostrava una tiroide in sede, di dimensioni normali, ipoecogena e disomogenea, priva di noduli. Dato il forte stato di agitazione psicomotoria della bambina, non era stato possibile

effettuare una valutazione morfo-funzionale della tiroide mediante una scintigrafia con I-123 associata al test al perclorato.

La paziente # 2 nasceva da terza gravidanza a termine, con parto cesareo, sorella della paziente # 1. La bambina veniva identificata allo screening per ipotiroidismo congenito, dato confermato successivamente mediante valutazione di TSH e fT4 su siero. La terapia sostitutiva a base di Levotiroxina veniva somministrata fin dai primi giorni di vita. Il successivo sviluppo neuropsicofisico risultava nella norma.

In concomitanza della prima valutazione ambulatoriale della sorella la paziente veniva sottoposta a un prelievo ematico, i cui risultati rivelavano un quadro di eutiroidismo sotto terapia, l'assenza degli anticorpi anti-TPO e anti-TG e l'indosabilità della TG (< 0,5 ng/ml, v.n. 5-25 ng/ml). L'ecografia del collo mostrava una tiroide in sede, con dimensioni nella norma.

All'età di sette anni veniva programmata l'esecuzione di una scintigrafia con I-123 e del test al perclorato. Pertanto si procedeva alla sospensione della terapia sostitutiva con Levotiroxina circa un mese prima del test. In questo periodo la bambina sviluppava un quadro di ipotiroidismo franco caratterizzato da lieve sonnolenza, pelle secca, gozzo e valori sierici di TSH > 75  $\mu$ U/ml (v.n. 0,4-4,5  $\mu$ U/ml), fT4 < 1,1pg/ml (v.n. 1,15-12,95 pg/ml), fT3 1,29 pg/ml (v.n. 2,75-6,91 pg/ml), TG indosabile (< 0,5 ng/ml) e anticorpi anti-TG e anti-TPO negativi. La scintigrafia mostrava una tiroide in sede, di dimensioni aumentate, con disomogenea captazione del tracciante. I valori di captazione alla 3° ora erano del 13,3%, quelli alla 24° ora del 12,4%. Dopo un'ora dalla somministrazione del perclorato di potassio si aveva una dismissione del 7%. Questo dato escludeva un difetto della

organificazione dello iodio. La terapia sostitutiva con Levotiroxina veniva reintrapresa al dosaggio di 100 µg/die.

Il paziente # 3 nasceva a termine con parto cesareo, con indice di APGAR nella norma e con peso corporeo di 2870 gr. La gravidanza era decorsa regolarmente, senza assunzione di farmaci con eventuale azione antitiroidea e senza l'uso di tintura di iodio al momento della nascita. Risultava positivo allo screening per l'ipotiroidismo congenito con valori su siero, a una settimana dalla nascita, di TSH > 75 µU/ml (v.n. 0,4-15 µU/ml), fT4 < 0,3 pg/ml (v.n. 1,15-12,95 pg/ml), fT3 1,7 pg/ml (v.n. 2,75-6,91 pg/ml), anticorpi anti-TG e anti-TPO negativi e TG > 300 ng/ml (v.n. 5-25 ng/ml). Anche il quadro clinico confermava l'ipotiroidismo franco: il bambino si presentava itterico con sonnolenza, disappetenza e scarso incremento ponderale. Veniva intrapresa la terapia sostitutiva con Levotiroxina, grazie alla quale si raggiungeva la condizione di eutiroidismo. Una successiva valutazione ecografica mostrava una tiroide in sede, volumetricamente aumentata e di aspetto disomogeneo.

All'età di tre anni si programmava l'esecuzione di una scintigrafia tiroidea con I-123 e del test al perclorato. Pertanto si procedeva alla sospensione della terapia sostitutiva un mese prima dell'esame, periodo nel quale il paziente diveniva francamente ipotiroideo con valori di TSH > 75 µU/ml, fT4 < 1 pg/ml, fT3 1,2 pg/ml TG > 300 ng/ml ed anticorpi anti-TG e anti-TPO negativi. La scintigrafia mostrava una tiroide in sede, con captazione alla 3° e alla 24° ora rispettivamente del 39% e dello 0,1% e dismissione dopo la somministrazione di perclorato di potassio del 100%. Il test indicava chiaramente un difetto totale del processo di organificazione dello iodio. La terapia sostitutiva con Levotiroxina veniva reintrapresa al dosaggio di 50 µg/die. Sia i genitori, non consanguinei, sia un fratello, nato successivamente, risultavano non affetti da alcuna tireopatia.

La paziente # 4 nasceva alla quarantunesima settimana di gestazione con parto naturale, con un peso corporeo di 3570 gr, con una lunghezza di 51 cm e una circonferenza cranica di 36 cm. Risultata positiva allo screening per l'ipotiroidismo congenito, veniva richiamata a due settimane di vita, presso il centro di screening di riferimento regionale, per valutare i valori su siero di TSH e di fT4, che risultavano essere rispettivamente di 520  $\mu$ U/ml (v.n. 0,4-15  $\mu$ U/ml) e di 0,29 pg/ml (v.n. 1,15-12,95 pg/ml). L'ecografia del collo mostrava una ghiandola tiroidea in sede e aumentata di volume. Pertanto si procedeva alla somministrazione della terapia sostitutiva con Levotiroxina, grazie alla quale la bambina diveniva progressivamente eutiroidea.

Il carattere di permanenza del quadro di ipotiroidismo congenito veniva confermato, mediante sospensione temporanea della terapia sostitutiva, all'età di tre anni.

All'età di dieci anni, presso il nostro dipartimento di Endocrinologia, veniva programmata l'esecuzione di una scintigrafia tiroidea con I-123 e del test al perclorato di potassio. Dopo l'interruzione della terapia sostitutiva, la paziente veniva sottoposta a prelievo ematico, che indicava valori di TSH  $> 75 \mu$ U/ml, fT4  $< 1$ pg/ml, fT3 1,6 pg/ml, TG  $> 525$  ng/ml e anticorpi anti-TPO e anti-TG negativi, e a un'ecografia del collo che indicava una ghiandola aumentata in dimensioni, finemente disomogenea e normoecogena, priva di noduli. La scintigrafia tiroidea mostrava una disomogenea distribuzione del tracciante nella ghiandola. Ad un'ora dalla somministrazione del perclorato di potassio, la dismissione risultava essere del 99%. Il test evidenziava così un difetto totale del processo di organificazione dello iodio.

Sia la madre sia il padre venivano indagati mediante la valutazione del profilo ormonale tiroideo e con un'ecografia del collo. Mentre la madre risultava essere eutiroidea, il padre presentava la positività degli anticorpi anti-TG (137 U/ml, v.n.< 1-30) e una tiroide ecograficamente ipoecogena ma di dimensioni normali.

La paziente # 5 nasceva da gravidanza regolarmente condotta a termine con parto eutocico. Identificata allo screening per l'ipotiroidismo congenito, presentava valori su siero di TSH > 263  $\mu$ U/ml (v.n. 0,4-15  $\mu$ U/ml) e di fT4 0,4 pg/ml (v.n. 1,15-12,95 pg/ml). Anche la clinica confermava un quadro di franco ipotiroidismo in quanto la bambina si presentava itterica, con cute secca, pianto rauco, stipsi, macroglossia, fontanella posteriore pervia (1cmx1cm) e ernia ombelicale. Veniva pertanto intrapresa la terapia sostitutiva con Levotiroxina. Successivamente eseguiva, presso il centro di medicina nucleare di riferimento, una scintigrafia con I-123 che mostrava una ghiandola in sede.

La paziente si ricoverava all'età di diciotto anni presso il nostro dipartimento di Endocrinologia per una più accurata valutazione del quadro di ipotiroidismo congenito. All'osservazione si presentava astenica, con eloquio rallentato e sensazione di freddo mentre all'esame obiettivo la tiroide risultava non palpabile. La terapia a base di Levotiroxina 100  $\mu$ g/die era stata sospesa da circa un mese. Il profilo ormonale tiroideo indicava un TSH >75  $\mu$ U/ml, fT4 <1 pg/ml, fT3 1,19 pg/ml, TG 1025 ng/ml (v.n. 5-25 ng/ml) e gli anticorpi anti-TG e anti-TPO negativi. L'ecografia del collo rivelava una ghiandola tiroidea di dimensioni normali, ad ecostruttura finemente disomogenea e ipoecogena. Veniva eseguita una scintigrafia tiroidea con I-123 e test al perclorato che mostrava una captazione alla 3° ora del 5% e una dismissione ad un'ora dalla somministrazione di perclorato di potassio del 99%. Il

risultato del test indicava un difetto totale nel processo di organificazione dello iodio. La terapia veniva pertanto reintrapresa al dosaggio di 100 µg/die.

Successivamente la paziente veniva seguita presso il nostro ambulatorio dedicato all'ipotiroidismo congenito con controlli a cadenza annuale.

### ***Pazienti non identificati allo screening neonatale***

La paziente # 6 si ricoverava presso il nostro dipartimento di Endocrinologia all'età di 45 anni per un ipotiroidismo congenito trattato tardivamente associato a gozzo multinodulare non tossico e cretinismo.

All'anamnesi familiare risultava una positività per tireopatia (la madre era affetta da gozzo nodulare) mentre all'anamnesi patologica remota si rendeva evidente una lunga storia di cretinismo, inizialmente ritenuto una forma aspecifica di ritardo mentale ed attribuito ad un quadro di ipotiroidismo congenito all'età di tre anni. Solo allora veniva intrapresa la terapia sostitutiva con Levotiroxina. All'esame obiettivo effettuato all'ingresso si confermava la grave alterazione dello sviluppo psicosomatico della paziente. Il peso corporeo era pari a 45 kg, l'altezza pari a 145 cm e il BMI pari a 21,4 kg/m<sup>2</sup>. L'abito corporeo richiamava il quadro del nanismo disarmonico. All'ispezione e alla palpazione del regione del collo si evidenziava una tiroide di dimensioni superiori alla norma con a destra un nodulo duro di circa 5 cm, che si affondava nel giugulo. Allo scopo di stabilire la natura eziopatogenetica del quadro di ipotiroidismo congenito si procedeva alla valutazione del profilo ormonale tiroideo che presentava, sotto terapia con Levotiroxina, valori di TSH 0,032 µU/ml (v.n. 0,4-4,5 µU/ml), di fT<sub>4</sub> 15,6 pg/ml (v.n. 1,15-12,95 pg/ml), di fT<sub>3</sub> 4,78 pg/ml (v.n. 2,75-6,91 pg/ml), di TG 42,1 ng/ml (v.n. 5-25 ng/ml), anticorpi anti-TG, anti-TPO e TRAb negativi. Veniva eseguita un'ecografia del collo che confermava il quadro emerso all'esame obiettivo ed evidenziava una natura calcifica del nodulo a

sede nel lobo destro tiroideo. Un'Rx del torace e una Tac collo-torace evidenziavano l'immersione retrosternale del gozzo con deviazione tracheale a sinistra. A completamento dell' iter diagnostico si programmava un test con rhTSH (TSH ricombinante umano), somministrato i.m. per tre giorni consecutivi alla dose di 4µg/kg/die e seguito dal dosaggio di TSH, fT4, fT3 e TG. I livelli della TG aumentavano progressivamente fino a raggiungere il valore di 97,2 ng/ml.

Successivamente si effettuava una scintigrafia tiroidea con I-123 e test al perclorato di potassio, che rivelava una tiroide in sede, di dimensioni aumentate, con disomogenea distribuzione del tracciante. La formazione nodulare palpabile appariva fredda. Ad un'ora dalla somministrazione del perclorato di potassio, si aveva una dismissione del 91%. Il test era pertanto positivo ed indicava un difetto totale nel processo di organificazione dello iodio.

Date le dimensioni del gozzo e la presenza del nodulo calcifico nel lobo destro tiroideo, si procedeva all'intervento di tiroidectomia totale. L'esame istologico deponesse per un gozzo nodulare. Si consigliava di proseguire con la terapia sostitutiva al dosaggio di 100 µg/die.

### ***Controlli***

Come controlli sono stati usati 60 soggetti non affetti da malattie tiroidee con età media di 39 anni e range 11 – 66 anni.

## ***MATERIALI E METODI***

### ***TEST IN VIVO***

#### ***Ecografia tiroidea***

L'esame ecografico della ghiandola è stato sempre eseguito da un stesso esaminatore utilizzando un apparecchio ecografico a tempo reale (Technos Esaote Biomedical) collegato ad un trasduttore lineare (7.5 MHz).

#### ***Test al perclorato***

Il test è stato eseguito secondo una metodica descritta da Beckers. Tre ore dopo la somministrazione di  $^{123}\text{I}$ , 2.96 MBq, veniva acquisita per 5 minuti un'immagine anteriore della tiroide utilizzando una gamma-camera munita di un collimatore ad alta risoluzione e bassa energia. La captazione del  $^{123}\text{I}$  era determinata usando una tecnica a regione d'interesse (ROI), che confronta i colpi sulla tiroide con quelli di uno standard. Successivamente, erano somministrati per via orale 400 mg di perclorato di potassio ( $\text{KClO}_4$ ). Un'ora più tardi era ripetuta l'acquisizione utilizzando lo stesso metodo. La dismissione dello iodio era calcolata come rapporto tra attività sulla tiroide prima e dopo somministrazione del perclorato di potassio, secondo la formula:

$$100 - \frac{\text{attività sulla tiroide dopo } \text{KClO}_4 \text{ (cpm)}}{\text{attività sulla tiroide pre } \text{KClO}_4 \text{ (cpm)}} \times 100$$

Il nostro controllo positivo era una ragazza affetta da IC, con difetto di organificazione dello iodio (dismissione dopo un'ora da somministrazione di perclorato di potassio: 99%). Il controllo negativo era rappresentato da venti soggetti adulti non affetti da patologia tiroidea (dismissione: 0.5 – 2.5 %).

### ***PROVE DI FUNZIONALITA' TIROIDEA***

I valori delle frazioni libere degli ormoni tiroidei sono stati dosati presso il Nostro Dipartimento tramite metodo radioimmunometrico (FT4 RIA, FT3 RIA, Lysophase, Technogenetics SpA, Milano, Italia). Il TSH è stato dosato con metodo sensibile (sensitive-TSH IRMA, Delfia, Wallac, Finlandia). Gli anticorpi anti-tireoperossidasi e anti-tireoglobulina sono stati misurati mediante dosaggio immunofluorimetrico (AIA-PACK Tg Ab/TPOAb, Tosoh Corp., Tokyo, Giappone). L'escrezione urinaria dello iodio è stata misurata mediante metodo colorimetrico usando un autoanalyzer (Technicon, Tarrytown NY) ed i risultati sono stati espressi in microgrammi di iodio per litro di urina. Gli anticorpi diretti contro il recettore del TSH sono stati misurati usando dosaggio radiorecettoriale commerciale (TRAK human, B.R.A.H.M.S., Berlino, Germania).

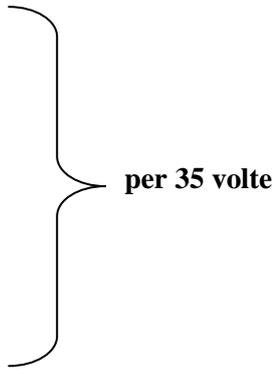
## ***SEQUENZIAMENTO GENICO***

### ***Estrazione DNA da sangue***

Il DNA genomico è stato estratto da linfociti, a partire da 200 µl di sangue periferico utilizzando QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, MI). Il DNA così recuperato è stato risospeso in 200 µL di H<sub>2</sub>O e conservato a 4°C.

### ***Amplificazione genica***

Gli esoni del gene della TG, del gene della TPO, del promotore del gene della TPO e del gene DUOX2 sono stati amplificati tramite PCR, utilizzando il *kit HotStartTaq<sup>®</sup> PCR* (QIAGEN, MI), secondo il seguente ciclo di reazione:

- Denaturazione iniziale, 15' a 95°C
  - denaturazione, 1' a 94°C,
  - annealing, 1' a 60°C,
  - extension, 1' a 72°C,
  - mantenimento a 4°C per tempo indefinito.
- 
- per 35 volte**

Le sequenze dei primers utilizzati per l'amplificazione del gene TG sono riportati in tabella insieme alla lunghezza in paia di basi dei diversi frammenti amplificati.

(Tabella 2)

<b>Esone</b>	<b>Primer sequence (5'→3')</b>		<b>Fragment length (bp)</b>
<b>1</b>	Fw Rev	cgttctgttccccacagtt gctccatggcctcagaactt	338
<b>2</b>	Fw Rev	ccacactcttctttgatgaa agttgcagggcagagctcaggaa	242
<b>3</b>	Fw Rev	ccactccactctctccctaa gctcagtcacccacccaaa	327
<b>4</b>	Fw Rev	gggaaggagcatgagttt ggatcgcagtgaggaaa	355
<b>5</b>	Fw Rev	gggacacgagtgcataatg agtgtgggctgcgtcaggtgat	299
<b>6</b>	Fw Rev	gcttgtgatgacttgctt cagtcactctagctgtgctt	260
<b>7</b>	Fw Rev	ctgaatgagaccatctctgaa cacgcacattgttggcagtt	216
<b>8</b>	Fw Rev	gcatgctgtgaagacaccaa aaagaggaagccccagaggaaa	277
<b>9a</b>	Fw Rev	gttctggcttcttactacct CTTCTTGTCTCCCTCCAT	570
<b>9b</b>	Fw Rev	CCCAAAGAGACTCCAGCAAA GTCGTGCATGATGGGACAAA	477
<b>9c</b>	Fw Rev	TGTGCCAGAAGATGTGGCAA agggcctaaagagagactca	473
<b>10a</b>	Fw Rev	gacggagtttggacagtt TTCCGGAAGCTGCTTCT	363
<b>10b</b>	Fw Rev	TGCCAAGCTGCTAGTGAA ccctcccactagacatcctt	460
<b>11</b>	Fw Rev	cgtgagggcacacatgctt aggatgactgaggagagac	404
<b>12</b>	Fw Rev	agctacagagcccacacaga tgtccacttggccacctgaa	237
<b>13</b>	Fw Rev	gtccctagtgcaattcctgaa tagaccagtgatgccaccaa	182
<b>14</b>	Fw Rev	ccacgaccagtcctttacaa atctctgaccagcggggacaa	208
<b>15</b>	Fw Rev	catctgccagcagcaggtt gacacgaagccagctcttt	259
<b>16</b>	Fw Rev	actgattccccagcccattct cccagcttctctagtact	323

<b>Esone</b>	<b>Primer sequence (5'→3')</b>		<b>Fragment lenght (bp)</b>
<b>17</b>	Fw Rev	gagaaggagacaccccacaa gcaggatagatgctctgat	326
<b>18</b>	Fw Rev	gcagaggaaatcccaa ccctgagttgagtccaa	278
<b>19</b>	Fw Rev	gtagggttggtggaggatt ctcagagaggctgcatagctt	327
<b>20</b>	Fw Rev	ccctagcagagtacagt cacatggctccacaggagat	313
<b>21</b>	Fw Rev	gtgtgttctgggattgt cattgcagggcttttct	264
<b>22</b>	Fw Rev	gattccagaggcccatt agcccttgagactact	280
<b>23</b>	Fw Rev	cttctctgcagatgcccta ccacaccttcttctgagt	220
<b>24</b>	Fw Rev	gggaaagccaggtgagtga acagcggatgaggagcagaa	199
<b>25</b>	Fw Rev	ggttagggttggatgaatg agcgtgctgtgctgagtct	361
<b>26</b>	Fw Rev	gctctgtccaactctgccat gtgtgtcctggcttctgcat	326
<b>27</b>	Fw Rev	tcaggggacagagaagagt ggagggctcataagaaagt	325
<b>28</b>	Fw Rev	gagatggggctattgcagta catgtaatcagcgtcctgcta	193
<b>29</b>	Fw Rev	gaccagtggagtactacccat gcaccatttagtctctgcat	202
<b>30</b>	Fw Rev	gaactattcctgtctgacc ccacagtgatccatgagttatgacac	474
<b>31</b>	Fw Rev	cccagagaatcctgtagaga accacagagccagcagaaca	313
<b>32</b>	Fw Rev	catgactacagcaaactctc gtgctgggtatgcttctggt	262
<b>33</b>	Fw Rev	ccccaaagcaagaatgacta ggataggagatgctgaggat	274
<b>34</b>	Fw Rev	gtctgctgaacaatgtact gagctccatatagctgtcat	283
<b>35</b>	Fw Rev	cccaccctgaccgataca gcgagtgatatgcaagcta	321
<b>36</b>	Fw Rev	cacggctgtctttgttact cccttacttccaagcatccta	323

<b>Esone</b>	<b>Primer sequence (5'→3')</b>		<b>Fragment length (bp)</b>
<b>37</b>	Fw Rev	ggatggatgactggaaga caggatggctgcaaaggcata	278
<b>38</b>	Fw Rev	cagaatgccagtggagagagc ctgctactgagtcccatttga	378
<b>39</b>	Fw Rev	gctttggaatggggtagtgg ggcaaatcacctaacctcagct	318
<b>40</b>	Fw Rev	tgtgtcaaccaagaatcaggc aaatttccactgtgtgcctag	368
<b>41</b>	Fw Rev	tgaggacaagagcccagagc ccaagcaattgaagccaactag	423
<b>42</b>	Fw Rev	gatgcagaaccctgatgtgg cagttggtcatcagcctcatg	381
<b>43</b>	Fw Rev	accagtattggcattcagtatgg ccagagcccttaggaaatgc	319
<b>44</b>	Fw Rev	ttgtgtttaatgccatgccc cctgaacaccaactgagtctgc	375
<b>45</b>	Fw Rev	gggaatgggaagaagggtgttc tagaggggttaagtgggtgttcc	344
<b>46</b>	Fw Rev	gaagggaaagtcttggttttgg gagtctatcgatgcaaattggg	340
<b>47</b>	Fw Rev	tgtccctcagataccgagtgc ccccagaccatgaacaactca	443
<b>48</b>	Fw Rev	gaccagagaagagaagtccta acagcagcctgggattcaaa	380

**Tabella 2: Lista dei primers senso e antisenso utilizzati per amplificare il gene della TG. (34)**

*NOTE: I primers intronici sono riportati in minuscolo, i primers esonici sono riportati in maiuscolo.*

Le sequenze dei primers intronici utilizzati per l'amplificazione del gene della TPO sono riportati in tabella insieme alla lunghezza in paia di basi dei diversi frammenti amplificati. (Tabella 3)

<b>Esone</b>	<b>Primer sequence (5'→3')</b>		<b>Fragment length (bp)</b>
<b>1</b>	Fw Rev	ggagtcagtgaggaggagcc tctattgtgtcatcccaag	424
<b>2</b>	Fw Rev	tggctgcctgcctgtccc tgcttgacatgacactg	364
<b>3</b>	Fw Rev	ccgcagtgctgtcacat tgccctgagcaagcagcc	386
<b>4</b>	Fw Rev	tcatggtttcctatTTTTcaca catgttcagatccaactttcac	208
<b>5</b>	Fw Rev	tgggtgtcttatatctgga agccttggctcctaaggg	391
<b>6</b>	Fw Rev	ccaggaagtgcgatgcc agtgagatgcaccagata	420
<b>7</b>	Fw Rev	gccggcctcgaacttcca tgcccgagccaccagg	698
<b>8</b>	Fw Rev	tatcctgggcctcactga gcacatgtaccctatgaa	488
<b>9</b>	Fw Rev	tgagtcgccactgcact cgcagcagctgcatgagg	361
<b>10</b>	Fw Rev	cctgtgcgcttccagtct cgcagaccacctgcctct	395
<b>11</b>	Fw Rev	tcctcagcgcctgcacct gagatgcacgtgctgtaa	413
<b>12</b>	Fw Rev	acagggagcttgggtgtgtg tttcagaagcaccttttggc	346
<b>13</b>	Fw Rev	catctgtctgctcctcat tgggtgattgacagttgcc	404
<b>14</b>	Fw Rev	tggccaggacagggtatg acctgtgttagcttcgggaa	301
<b>15</b>	Fw Rev	cgacttgactgaagtgtg attctggctcactgtcat	369
<b>16</b>	Fw Rev	gaattcagacgttattaa gattgcaagagtgggtgtt	390

*Tabella 3: Lista dei primers senso e antisense utilizzati per amplificare il gene della TPO. (22)*

Le sequenze dei primers intronici utilizzati per l'amplificazione del promotore della TPO sono riportati in tabella insieme alla lunghezza in paia di basi dei diversi frammenti amplificati. (Tabella 4)

ProTPO		Primer sequence (5'→3')	Fragment length (bp)
1	Fw	gcccctttttcacagggtat	375
	Rev	aactgcactgctgagta	
2	Fw	tgaggatgaggggagaatg	342
	Rev	ctctggccgaatgagttagg	
3	Fw	gaagcctttgcatcggttt	451
	Rev	cccaagcccctagttttctt	
4	Fw	aggatggctgaatcctcaga	482
	Rev	gacttggagcctcttcatgc	
5	Fw	cctagacgctgggtgctctg	425
	Rev	ccagactcggtaggctcatta	
6	Fw	gagacttttggcagcaagg	466
	Rev	agctgttgggtgaagtccag	
7	Fw	ggctacaaaacgacctggag	406
	Rev	ccatgagcctccagaaactg	

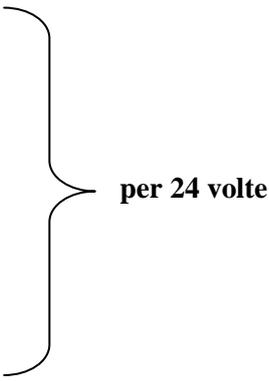
**Tabella 4: Lista dei primers senso e antisense utilizzati per amplificare il promotore della TPO. (20)**

I prodotti di PCR, colorati con *SYBR<sup>®</sup> Safe DNA gel stain* (Invitrogen Eugene, Oregon, USA), sono stati separati per elettroforesi su un gel d'agarosio all'1%, insieme ad un marker, per verificarne l'avvenuta amplificazione. I prodotti di PCR così ottenuti sono stati purificati dai residui di sali, oligonucleotidi, deossinucleotidi non incorporati e dall'eccesso di enzima polimerasi, con un *kit* commerciale *PureLink<sup>TM</sup> PCR Purification kit* (Invitrogen Eugene, Oregon, USA), che sfrutta la

proprietà degli acidi nucleici di legarsi in maniera reversibile a una membrana di silice, in presenza di sali.

### ***Sequenziamento diretto***

A questo punto è stata eseguita la reazione di sequenza, utilizzando un *kit* commerciale (ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit) che prevede l'incorporazione dei quattro dideossiterminatori, ciascuno legato a un diverso fluorocromo, da parte dell'enzima *AmpliTaq DNA polimerasi*. Gli oligonucleotidi utilizzati come primer per la reazione di sequenza sono quelli usati per la PCR. La reazione di polimerizzazione a catena è stata eseguita su un termocicizzatore che esegue i seguenti cicli:

- denaturazione iniziale, 1' a 96°C,
  - denaturazione, 10'' a 96°C,
  - annealing, 5'' a 50°C,
  - extension, 4' a 60°C,
  - mantenimento a 4°C per tempo indefinito.
- 
- per 24 volte**

Al termine della reazione, il prodotto è stato purificato per eliminare i dideossinucleotidi fluorescinati in eccesso e i deossinucleotidi non incorporati, utilizzando un *kit* commerciale *Centri-sep Spin Column* (Applied Biosystem, Princeton Separation, INC) e poi corsi tramite elettroforesi capillare su sequenziatore automatico *ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer* (Perkin Elmer). Durante la corsa elettroforetica lungo il capillare, un sensore ottico rivela il passaggio di ogni

frammento, identificando la base terminatrice, a seconda della diversa fluorescenza emessa dai fluorocromi legati ai nucleotidi marcati. I segnali vengono convertiti in picchi, grazie ad un *software* indicato per analizzare le sequenze, formando un tracciato detto elettroferogramma che consente la lettura della sequenza.

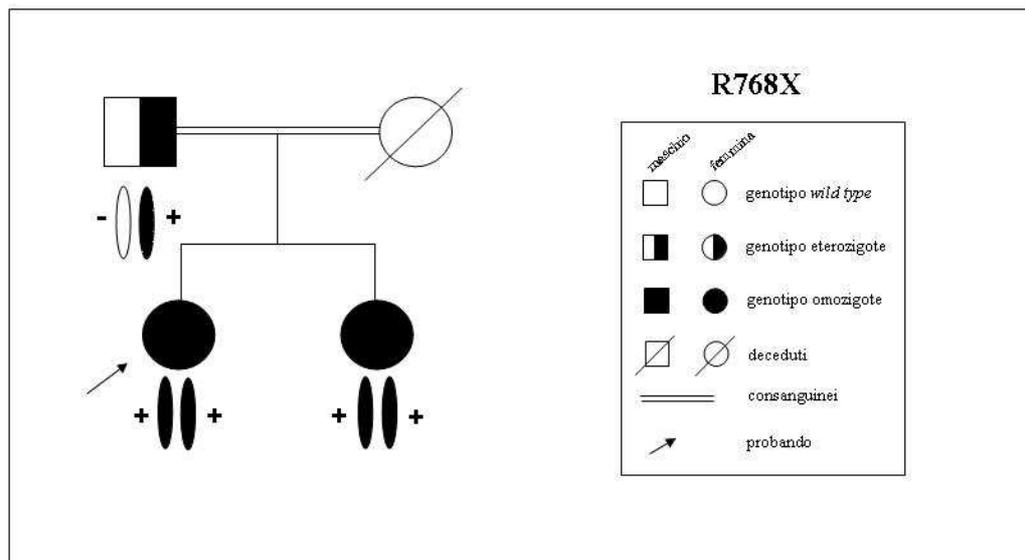
## ***RISULTATI***

Tutti i pazienti analizzati avevano una tiroide in sede ed erano risultati positivi allo screening per l'ipotiroidismo congenito, tranne la paziente # 6, nata in epoca pre-screening.

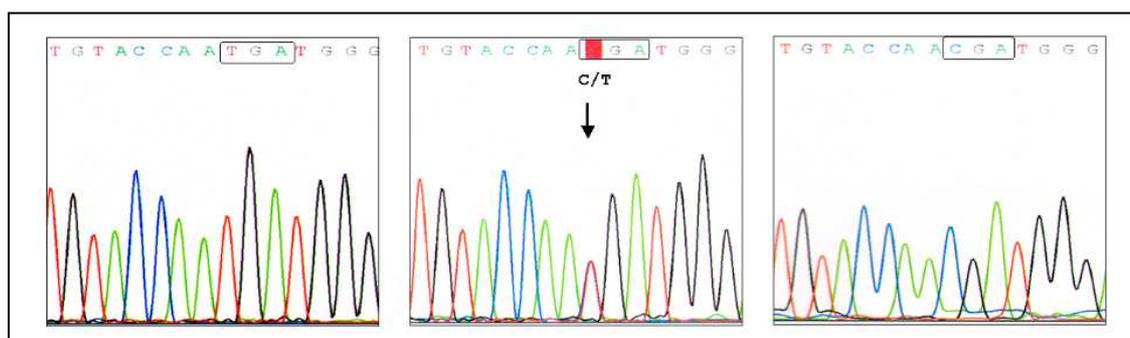
Dei 6 pazienti, 4 risultavano positivi al test al perclorato (# 3, 4, 5, 6), dato che indicava un difetto totale della organificazione dello iodio. In particolar modo il paziente # 3 presentava un valore di dismissione del 100%, la paziente # 4 e 5 del 99% ed infine la paziente # 6 del 91%. Nella paziente # 1, dato il forte stato di agitazione psicomotoria, non era stato possibile effettuare il test al perclorato, mentre la paziente # 2 risultava negativa, presentando un valore di dismissione pari al 7%. I pazienti # 2, 3, 4 e 5 mostravano, ad un mese dalla sospensione della terapia sostitutiva con Levotiroxina, un quadro di franco ipotiroidismo.

### ***Sequenziamento dei geni analizzati***

Il sequenziamento diretto dei 48 esoni del gene della TG nelle pazienti # 1 e 2 ha rilevato la presenza di una nuova mutazione puntiforme (R768X) a livello dell'esone 10. Ne risulta che il codone CGA, codificante per un'arginina in posizione 768, è sostituito dal codone TGA, codificante invece per un segnale di stop. Tale mutazione è presente in omozigosi in entrambe le pazienti # 1 e 2 (che ricordiamo essere sorelle), nonché nel padre, unico genitore vivente, in eterozigosi. (Fig. 5, 6)



**Fig. 5:** Albero genealogico della famiglia delle pazienti # 1 e # 2.

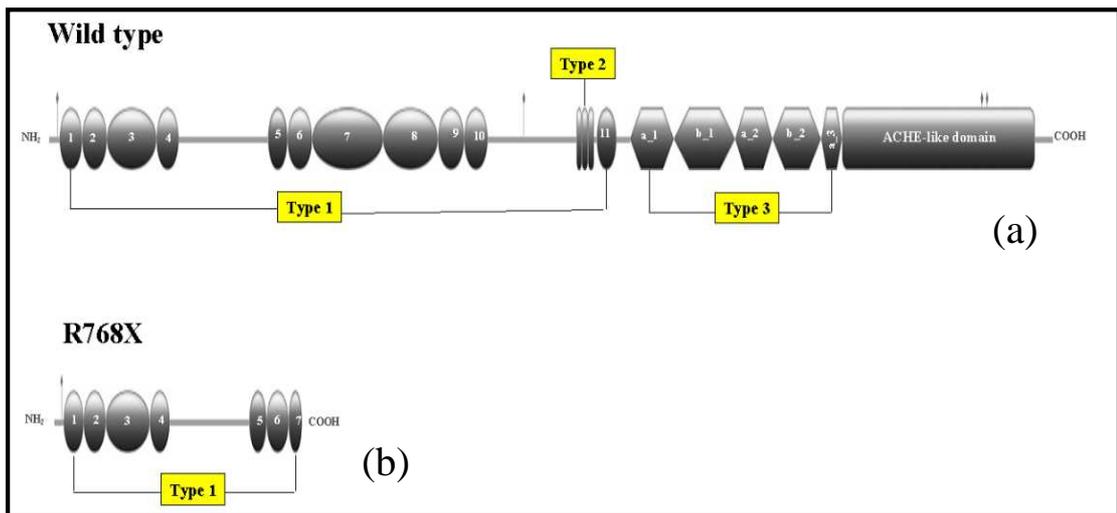


**Fig. 6:** Mutazione R768X della TG.

L'elettroferogramma mostra rispettivamente la mutazione in omozigosi (a sinistra), in eterozigosi (al centro) e la sequenza wild type (a destra).

La mutazione individuata è responsabile della sintesi di una proteina troncata, la cui struttura contiene ancora i due residui tirosinici 5 e 130, rispettivamente accettore e donatore ormonale, necessari per l'ormonogenesi tiroidea.

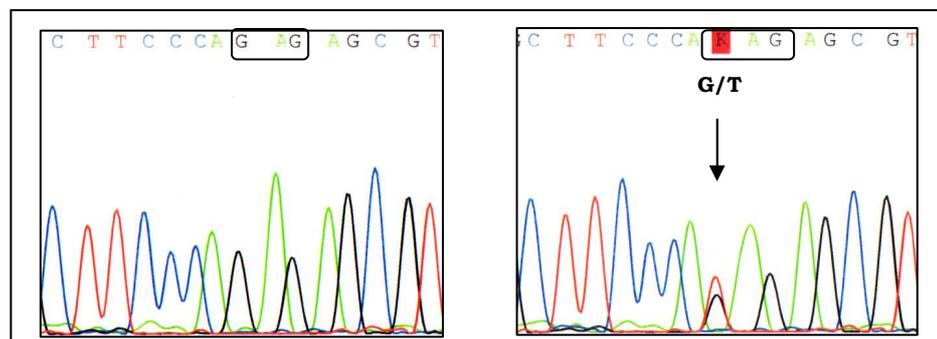
Il prematuro codone di stop, tuttavia, elimina il dominio carbossiterminale, omologo dell'acetilcolinesterasi, fondamentale per una corretta maturazione conformazionale della TG e per il suo trasporto intracellulare nella sede dell'ormonogenesi. (Fig. 7)



**Fig. 7: Struttura della Tireoglobulina wild type (a) e mutata (b).**

Il sequenziamento diretto dei 17 esoni del gene della TPO è stato eseguito nei pazienti # 3, 4, 5, 6. Nel paziente # 3 è stata identificata una mutazione all'interno dell'esone 13 (E746X) mai descritta in letteratura. L'anomalia, presente in eterozigosi, determina la sostituzione di una G con una T, per cui al posto della tripletta GAG, codificante per una glutammina in posizione 746, è presente la tripletta TAG, codificante per un segnale di stop. (Fig. 8)

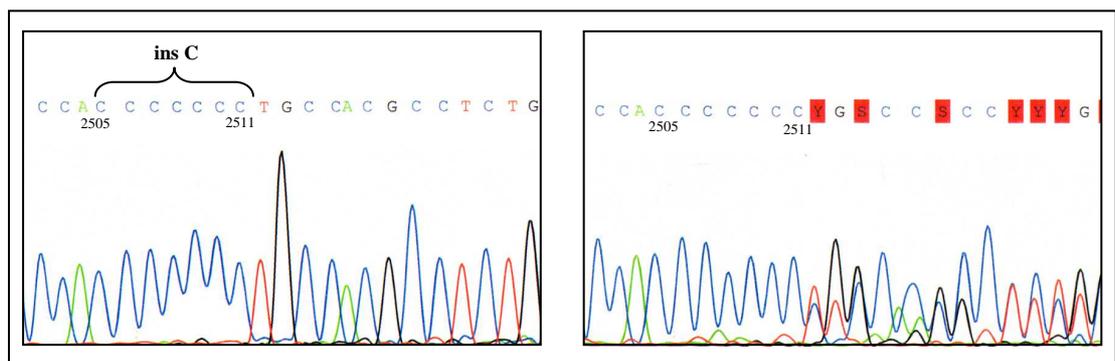
La conseguenza è la sintesi di una proteina troncata, priva del dominio che la lega alla membrana cellulare del tireocita.



**Fig. 8: Mutazione E746X della TPO.**

L'elettroferogramma mostra rispettivamente la sequenza wild type (a sinistra) e la mutazione in eterozigosi (a destra).

Lo stesso paziente presenta, sempre in eterozigosi, una seconda mutazione già nota, situata a livello dell'esone 14. L'analisi della sequenza rivela la duplicazione di una delle 7 citosine presenti dalla posizione 2505 alla posizione 2511 (c.2505-2511insC835fs907X, che chiameremo 907X). La duplicazione, che determina l'inserzione di una C, causa un cambiamento nel quadro di lettura con la comparsa di un codone di stop nell'esone 16 in posizione 907 della proteina. La proteina risulta quindi essere troncata e priva del sito di ancoraggio al versante apicale del tireocita. (Fig. 9)



**Fig. 9: Mutazione 907X della TPO.**

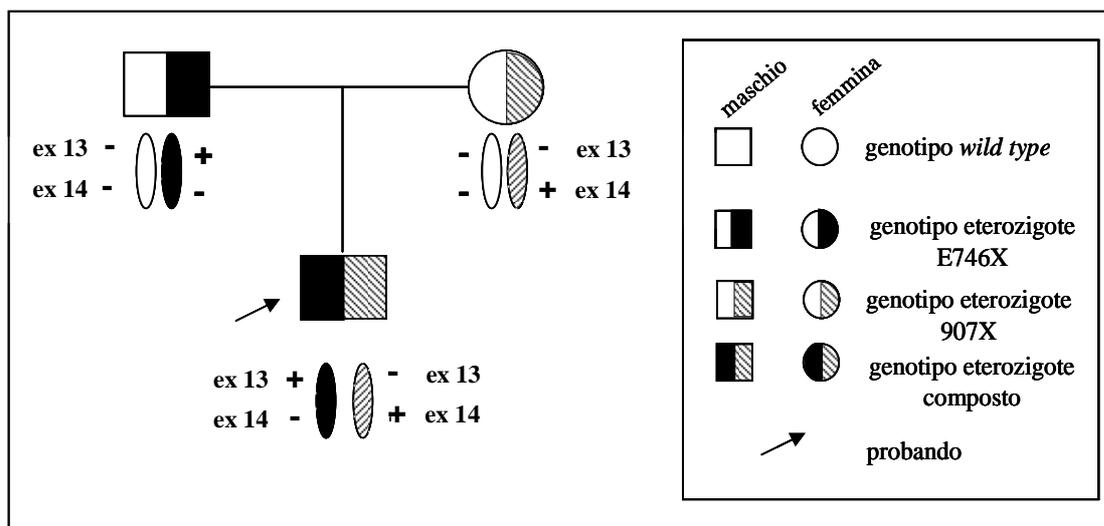
L'elettroferogramma mostra rispettivamente la sequenza wild type (a sinistra) e la mutazione in eterozigosi (a destra)

Nel paziente # 3 è stato sequenziato anche il promotore del gene della TPO e sono stati individuati 3 nuovi polimorfismi, espressi in omozigosi. (Tabella 5)

<i>Regione</i>	<i>Posizione nel DNA</i>	<i>Sostituzione nucleotidica</i>
<i>Promotore</i>	- 708	a>g
<i>Promotore</i>	- 801	a>g
<i>Promotore</i>	-1119	g>a

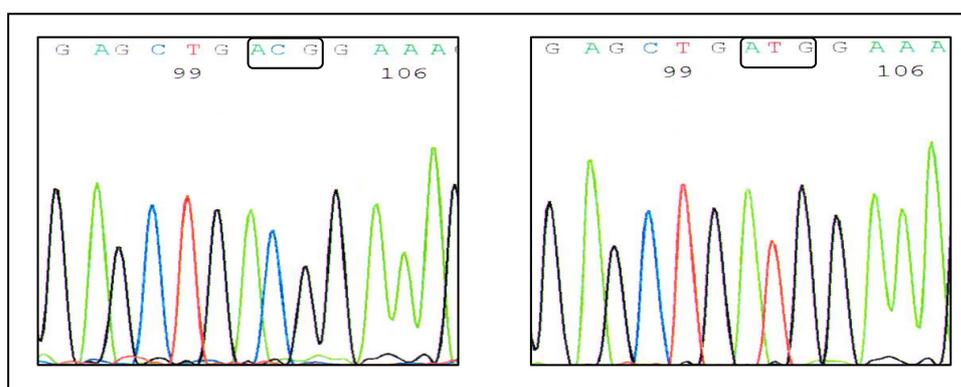
**Tabella 5: Polimorfismi individuati nel promotore del gene della TPO del paziente # 3.**

L'analisi genetica dei genitori ha evidenziato che il padre presenta, in eterozigosi, la mutazione E746X mentre la madre presenta, sempre in eterozigosi, la duplicazione del singolo nucleotide. (Fig. 10)



*Fig. 10: Albero genealogico della famiglia del paziente # 3.*

Nella paziente # 6 l'analisi molecolare del gene della TPO ha individuato una nuova mutazione in omozigosi (T561M) all'interno dell'esone 10. Il codone ACG, che codifica per l'aminoacido treonina in posizione 561, subisce un cambiamento della seconda base C->T, divenendo ATG e codificando per l'aminoacido metionina. (Fig. 11)



548	KLQVQDQLMNEEL	T	ERLFVLSNSSTLDLAS	577	[HUMAN]
	KLPVQEQLMNEEL	T	ERLFVLGSSGSLDLGS		[Canis lupus familiaris]
	KLQVQGQLMNEEL	T	ERLFVLSNVGTLDLAS		[Mus musculus]
	KLQVQEQLMNEEL	T	ERLFVLSNVGTLDLAS		[Rattus norvegicus]
	KLQVQGQLMNEEL	T	DKLFVLSNNGSLDLAS		[Gallus gallus]
	-----EHLMTEEL	T	ERLLVLNVPQNLDLAA		[Danio rerio]

**Fig. 11: Mutazione T561M della TPO.**

L'elettroferogramma mostra rispettivamente la sequenza wild type (in alto, a sinistra) e la mutazione in omozigosi (in alto, a destra). In basso è riportata l'omologia della sequenza tra Homo Sapiens ed altre specie.

In futuro verrà effettuata l'analisi molecolare del gene TPO anche nei familiari.

L'analisi genetica dei pazienti # 4 e 5 non ha evidenziato alcuna mutazione a carico del gene della TPO. Per tale ragione, in questi pazienti, è stato eseguito anche il sequenziamento sia del promotore del gene della TPO sia del gene DUOX2.

A carico del promotore sono stati individuati 3 nuovi polimorfismi espressi in omozigosi (Tabella 6) mentre nel gene DUOX2 non è stata rilevata alcuna anomalia.

<i>Regione</i>	<i>Posizione nel DNA</i>	<i>Sostituzione nucleotidica</i>
<i>Promotore</i>	-708	a>g
<i>Promotore</i>	-801	a>g
<i>Promotore</i>	-1199	g>a

**Tabella 6: Polimorfismi individuati nel promotore del gene della TPO delle pazienti # 4 e 5.**

## ***DISCUSSIONE***

L'ipotiroidismo congenito (IC) rappresenta l'endocrinopatia più frequente dell'infanzia, data la sua incidenza annua di 1:3000-4000 nati vivi nelle aree ad adeguato apporto iodico. Gli ormoni tiroidei sono essenziali, sia durante la vita fetale sia nei primi anni di vita, per il corretto sviluppo dell'organismo umano e, in particolar modo, del sistema nervoso centrale. Per tale ragione un ipotiroidismo congenito misconosciuto potrebbe causare una grave alterazione nello sviluppo neuropsicofisico del bambino. Lo screening neonatale, effettuato su tutti i nuovi nati tra il terzo e il quinto giorno di vita mediante il dosaggio del TSH su spot di sangue, consente di individuare un'eventuale condizione di insufficiente apporto di ormoni tiroidei e di attuare tempestivamente un'adeguata terapia sostitutiva a base di Levotiroxina.

E' quindi possibile garantire a tutti i bambini affetti da ipotiroidismo congenito una qualità della vita del tutto sovrapponibile a quella dei bambini sani. Essi potranno raggiungere un normale livello di sviluppo non solo psicofisico ma anche sessuale, aspetto quest'ultimo da non sottovalutare in quanto questi bambini diventeranno degli adulti clinicamente sani, capaci pertanto di procreare e trasmettere alla propria progenie l'eventuale difetto genetico alla base della loro tireopatia.

E' prevedibile quindi che nel prossimo futuro potrà esserci un aumento dei casi di ipotiroidismo congenito e questo rende fondamentale lo studio dei meccanismi genetici e molecolari alla base di questa condizione per poter fornire alle future coppie una consulenza genetica adeguata.

Nei paesi con adeguato apporto iodico la disgenesia tiroidea è causa di ipotiroidismo congenito nell'80-85% dei casi. Tale condizione, che raggruppa sotto di sé i quadri di agenesia, ipoplasia e ectopia tiroidea, è conseguenza principalmente di alterazioni genetiche a carico dei fattori di trascrizione TTF-2, TTF-1 e PAX-8, coinvolti nell'embriogenesi tiroidea. Nel restante 15-20% dei casi la tiroide si sviluppa correttamente ed il difetto è riconducibile all'alterazione di una o più fasi della sintesi e della secrezione degli ormoni tiroidei.

Ancora una volta la genetica è chiamata in causa in quanto la disormonogenesi può essere la conseguenza di mutazioni, trasmesse prevalentemente con modalità autosomica recessiva, a carico principalmente dei geni TPO e TG, ma anche dei geni NIS, DUOX2 e DUOXA2.

Difetti totali nel processo di organificazione dello iodio (TIOD) sono in genere determinati da mutazioni bialleliche inattivanti (esprese in omozigosi o in eterozigosi composta) il gene della TPO o, più raramente, il gene DUOX2, il quale invece è più frequentemente coinvolto nei difetti parziali di organificazione dello iodio (PIOD). Questi ultimi possono essere causati inoltre da alterazioni a carico dei geni DUOXA2 e SLC26A4, la cui mutazione determina la sindrome di Pendred che associa alla PIOD la sordità neurosensoriale (16,20,23).

Le mutazioni a carico del gene della TG possono causare anomalie di sintesi sia di tipo quantitativo, caratterizzate da livelli sierici di tireoglobulina bassi o assenti, sia di tipo qualitativo con la sintesi di una proteina strutturalmente alterata ma i cui livelli sierici sono normali o addirittura aumentati (3).

Mutazioni a carico del gene SLC5A5 determinano alterazioni nella struttura e/o nella funzione del NIS, rendendosi così responsabile di un quadro di ipotiroidismo con mancata captazione del radioiodio alla scintigrafia tiroidea (18).

Lo scopo del nostro studio è stato quello di identificare le possibili alterazioni genetiche alla base del quadro di ipotiroidismo congenito diagnosticato in 6 pazienti (# 1, 2, 3, 4, 5, 6) con tiroide in sede e un grave difetto della organificazione dello iodio o un difetto della sintesi della TG, afferiti al nostro Dipartimento di Endocrinologia.

Le pazienti # 1 e 2 erano sorelle nate da genitori consanguinei e affette entrambe da ipotiroidismo congenito, identificato alla nascita mediante screening, con tiroide in sede e tireoglobulina indosabile. La paziente # 1 era affetta da ritardo mentale grave e amenorrea primaria dato che risultava verosimilmente incompatibile con l'ipotiroidismo congenito trattato precocemente e poneva il dubbio di un ulteriore deficit a livello centrale.

I bambini # 3, 4 e 5 erano pazienti affetti da ipotiroidismo congenito diagnosticato mediante screening neonatale. La paziente # 6 arrivava alla nostra attenzione all'età di 45 anni con un quadro di cretinismo e nanismo disarmonico attribuito a un ipotiroidismo congenito diagnosticato nel periodo post-natale in quanto la paziente era nata in epoca pre-screening.

I pazienti # 2, 3, 4, 5 e 6 venivano sottoposti a scintigrafia tiroidea con I-123 e al test al perclorato, indagini non eseguite nella paziente # 1 dato il suo forte stato di agitazione psico-motoria. Nei pazienti # 2, 3, 4 e 5 si procedeva pertanto alla sospensione della terapia sostitutiva con Levotiroxina circa un mese prima dell'esecuzione del test. Alla sospensione seguiva, in tutti pazienti, lo sviluppo di un quadro di franco ipotiroidismo. Nella paziente # 6 la scintigrafia tiroidea e il test al

perclorato erano eseguiti sotto terapia sostitutiva con Levotiroxina, a seguito della somministrazione di rhTSH.

Il dosaggio della TG sierica e il test al perclorato rappresentano i due strumenti principali per la diagnosi differenziale nei pazienti affetti da ipotiroidismo congenito da deficit della ormonogenesi con tiroide in sede.

A seguito della sospensione della terapia i valori di tireoglobulina sierica risultavano indosabili nella paziente # 2 mentre erano nettamente aumentati nei pazienti # 3, 4, 5 e 6. In particolar modo nella paziente # 6, a seguito della somministrazione di rhTSH, la TG sierica aumentava fino a raggiungere il valore di 97,2 ng/ml (vn: 5-25 ng/ml). Nella paziente # 1 si procedeva all'esecuzione di un prelievo ematico i cui risultati evidenziavano uno stato di eutiroidismo sotto terapia sostitutiva e l'indosabilità della TG.

Il test al perclorato si basa sull'esecuzione di una captazione e di una scintigrafia tiroidea con il radioiodio ( $^{123}\text{I}$ ) e sulla successiva dismissione dello stesso che si ha dopo un'ora dalla somministrazione del perclorato di potassio, che è un inibitore della captazione. Il radioiodio dismesso è quello che non è stato incorporato all'interno della tireoglobulina e che quindi non è stato organificato. Di conseguenza tanto maggiore è la dismissione tanto più importante è il difetto della organificazione dello iodio. Valori di dismissione  $\geq 90\%$  indicano un difetto totale nel processo di organificazione dello iodio (TIOD) mentre valori tra il 10% e il 90% indicano un difetto parziale (PIOD) (16).

Tutti i pazienti sottoposti alla scintigrafia tiroidea con I-123 mostravano una tiroide in sede con disomogenea distribuzione del tracciante. A seguito della somministrazione del perclorato di potassio i pazienti # 3, 4, 5 e 6 presentavano un difetto totale della organificazione dello iodio con valori di dismissione  $\geq 90\%$ . La paziente # 2 risultava negativa al test in quanto aveva un valore di dismissione  $<10\%$ .

Per tali caratteristiche l'attenzione del nostro studio, dal punto di vista genetico, si è concentrata sui geni della TG e della TPO, sospettando un IC da disormonogenesi, e su come eventuali mutazioni a carico di tali geni potessero correlare con il fenotipo dei nostri pazienti. Nelle pazienti # 4 e 5, prive di anomalie nel gene della TPO, sono stati analizzati anche il gene DUOX2 e il promotore del gene della TPO. Il sequenziamento del promotore è stato eseguito anche nel paziente # 3.

Nelle pazienti # 1 e 2, partendo dai dati di indosabilità della TG sierica e da un test al perclorato negativo, si è proceduto a sequenziare il gene della TG, rilevando una mutazione puntiforme (R768X) a livello dell'esone 10, mai descritta precedentemente in letteratura. Tale alterazione determina la sostituzione del codone CGA con il codone TGA che codifica per un segnale di stop al posto di un'arginina. La mutazione è presente in omozigosi nelle due pazienti e nel padre, unico genitore vivente, in eterozigosi. La conseguenza dell'alterazione genica è la sintesi di una proteina troncata, priva del dominio carbossiterminale necessario per la maturazione conformazionale e il trasporto intracellulare della TG, causa quindi del quadro di ipotiroidismo franco identificato in entrambe le pazienti allo screening neonatale. Tuttavia la TG mutata possiede ancora i due residui tirosinici in posizione 5 e 130, necessari per l'ormonogenesi, e questo potrebbe spiegare il risultato del test al perclorato che non ha rilevato difetti della organificazione dello iodio. (Tabella 7)

<i>Paziente</i>	<i>Genotipo della TG</i>	<i>Tipo di mutazione</i>	<i>Test al perclorato</i>	<i>Stato tiroideo dopo un mese di sospensione della terapia</i>
# 1	R768X	Inattivante	-	-
# 2	R768X	Inattivante	7%	Ipotiroidismo franco

*Tabella 7: Correlazione fra le mutazioni trovate nel gene della TG delle nostre pazienti, il risultato ottenuto al test al perclorato di potassio e lo stato tiroideo dopo un mese di sospensione della terapia sostitutiva.*

*NOTE: il trattino indica un dato non disponibile (vedi testo).*

In letteratura sono state descritte 52 mutazioni a carico del gene della TG, classificate in missenso, nonsense, delezioni, inserzioni e mutazioni nei siti di splicing. La maggior parte delle mutazioni causa il blocco dei processi di modificazione post-traduzionali che hanno luogo principalmente nel RER (reticolo endoplasmatico rugoso) con la conseguente degradazione proteosomica dei monomeri di TG e la riduzione della secrezione della proteina (17).

Tuttavia la più frequente mutazione individuata a carico del gene della TG è la p.R277X che causa la perdita del dominio carbossiterminale della proteina ma non ne compromette, in modo marcato, la secrezione, consentendo così di conservare una parziale capacità nella sintesi ormonale (27).

Difetti nella sintesi e/o nella secrezione della TG causano in genere quadri di ipotiroidismo congeniti di entità moderati-severi. Hishinuma et al. (35) hanno però descritto 26 tipi di mutazioni inattivanti, a carico del gene della TG, che clinicamente determinano un quadro di eutiroidismo o di ipotiroidismo lieve.

Nei pazienti # 3, 4, 5 e 6, dato il risultato del test al perclorato, che risultava fortemente positivo con valori  $\geq 90\%$ , e i livelli sierici della TG elevati dopo sospensione della terapia sostitutiva o, nel caso della paziente # 6, dopo la somministrazione di rhTSH, si è proceduto al sequenziamento del gene della TPO, il cui prodotto è elemento chiave nel processo di organificazione dello iodio.

Nel paziente # 3 sono state identificate due mutazioni a carico del gene della TPO che spiegano il quadro di ipotiroidismo franco evidenziato alla nascita mediante lo screening, con valori di TSH  $>75 \mu\text{U/ml}$ , e il risultato del test al

perclorato, con valori di dismissione del 100%. La prima mutazione (E746X), mai descritta in letteratura, è stata rilevata all'interno dell'esone 13 ed è espressa in eterozigosi. L'anomalia causa la sostituzione di una tripletta GAG, codificante per una glutammina, con una tripletta TAG, codificante per un segnale di stop. Il risultato è la sintesi di una proteina troncata priva del dominio che la ancora alla superficie apicale del tireocita. La seconda mutazione, presente sempre in eterozigosi, è localizzata all'interno dell'esone 14 e causa la duplicazione di una delle 7 citosine presenti dalla posizione 2505 alla posizione 2511. Si realizza così uno slittamento nel modulo di lettura con la comparsa di un segnale di stop dopo 72 aminoacidi in posizione 907 della proteina (907X). Come nel caso della precedente mutazione la conseguenza è la sintesi di una proteina troncata, incapace a legarsi alla membrana cellulare del tireocita, e che determina la produzione di una TG scarsamente o per nulla iodinata. Tale mutazione è già stata descritta da Bikker et al. (36) i quali, partendo dall'osservazione che tale anomalia si associa a un quadro di TIOD e che essa è localizzata in una regione altamente conservata del gene della TPO, affermano che tale alterazione genica è la causa dell'inattivazione dell'enzima TPO.

L'analisi genetica dei genitori del paziente # 3 ha evidenziato che il padre è portatore della mutazione E746X in eterozigosi mentre la madre è portatrice, sempre in eterozigosi, della duplicazione. Entrambe le anomalie sono state ereditate dal figlio che quindi è portatore di mutazioni bialleliche inattivanti il gene della TPO, espresse in eterozigosi composta.

Nelle pazienti # 4 e 5 il sequenziamento del gene della TPO non ha evidenziato alcun tipo di anomalia che potesse spiegare il quadro di franco ipotiroidismo sia alla nascita che dopo sospensione della terapia sostitutiva nonché il risultato del test al perclorato che mostrava valori di dismissione  $\geq 90\%$ .

Si è proceduto pertanto al sequenziamento del gene DUOX2, che codifica per una flavoproteina ad attività ossidasica che fa parte del sistema di generazione del perossido d'idrogeno. E' noto come il processo di organificazione dipende non solo dall'attività della TPO ma anche dalla produzione di perossido d'idrogeno.

Anche se mutazioni monoalleliche e bialleliche inattivanti il gene DUOX2 sono più frequentemente causa di quadri di difetti parziali della organificazione dello iodio, è stato descritto un caso di TIOD determinato da mutazioni bialleliche inattivanti il gene DUOX2, che causa il blocco totale nella produzione del perossido d'idrogeno (23). Tuttavia in queste pazienti l'analisi del gene DUOX2 non ha dato alcun tipo di risultato.

La nostra attenzione si è rivolta quindi sul promotore del gene della TPO, sito di legame per fattori di trascrizione come il TTF-2, il TTF-1 e il PAX-8 che regolano la trascrizione del gene. Abramowicz et al. (21) hanno dimostrato come delezioni o mutazioni in questa sede possano ridurre drasticamente la trascrizione del gene della TPO. Nelle pazienti # 4 e 5 l'analisi dei 2957 nucleotidi del promotore ha evidenziato solamente la presenza di 3 polimorfismi, verosimilmente non responsabili del fenotipo osservato. Queste pazienti potrebbero essere portatrici di alterazioni a livello di una sequenza intronica che interferisce con il normale meccanismo di splicing dell'mRNA, con la conseguente sintesi di una proteina troncata e non funzionante.

Nella paziente # 6, affetta da un cretinismo e un nanismo disarmonico legati a un quadro di ipotiroidismo congenito rimasto misconosciuto fino all'età di tre anni, si è proceduto, dato il risultato sia del test al perclorato, con un valore di dismissione  $\geq 90\%$ , sia del test con rhTSH, che mostrava l'assenza di difetti nella sintesi della TG, al sequenziamento del gene della TPO.

E' stata così identificata una nuova mutazione (T561M) all'interno dell'esone 10, espressa in omozigosi, che causa la sostituzione della tripletta ACG, codificante

per l'aminoacido treonina in posizione 561, con la tripletta ATG, codificante per l'aminoacido metionina.

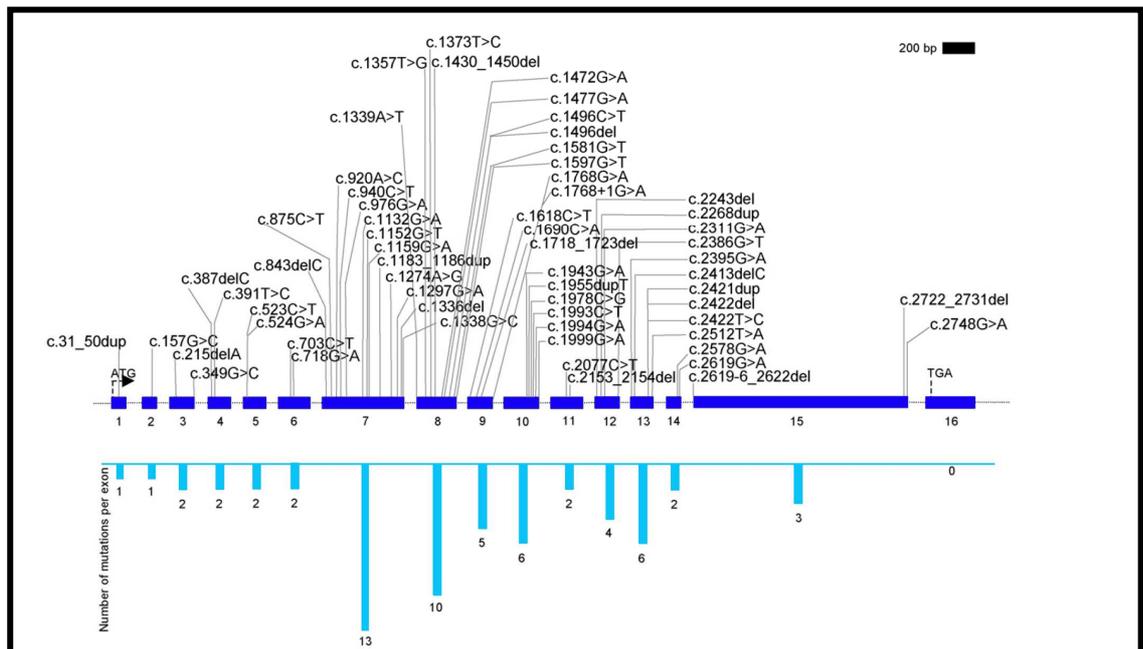
Partendo dall'osservazione che tale mutazione si associa a un quadro di TIOD e che essa si localizza in una regione altamente conservata del gene della TPO, dato questo confermato dall'elevato grado di omologia della sequenza tra Homo sapiens e altre specie animali, è possibile affermare che la mutazione T561M è causa dell'inattivazione della TPO nella paziente # 6. (Tabella 8)

<i>Paziente</i>	<i>Genotipo della TPO</i>	<i>Tipo di mutazione</i>	<i>Test al perclorato</i>	<i>Stato tiroideo dopo un mese di sospensione della terapia</i>
# 3	E746X 907X	Inattivante	100%	Ipotiroidismo franco
# 4	-	-	99%	Ipotiroidismo franco
# 5	-	-	99%	Ipotiroidismo franco
# 6	T561M	Inattivante	91%	-

**Tabella 8: Correlazione fra le mutazioni trovate nel gene della TPO dei nostri pazienti, il risultato ottenuto al test al perclorato di potassio e lo stato tiroideo dopo un mese di sospensione della terapia.**

*NOTE: il trattino indica un dato non disponibile.*

La prima mutazione a carico del gene della TPO è stata descritta da Abramowicz et al. (37) nel 1992. Ad oggi sono state individuate più di 60 mutazioni, la maggior parte delle quali localizzate negli esoni 7, 8 e 9, che codificano per il dominio catalitico della proteina (Fig. 12). La maggior parte delle mutazioni sono di tipo missenso, seguono poi le mutazioni nonsense, i frameshift e le mutazioni di splicing (16).



**Fig. 12:** Rappresentazione schematica di tutte le mutazioni descritte a carico del gene della TPO.

E' ormai noto che la principale causa di un difetto totale nel processo di organificazione dello iodio è una mutazione biallelica inattivante il gene della TPO. Tuttavia alcuni studi hanno mostrato che soggetti con un difetto totale della organificazione dello iodio possono avere difetti monoallelici a carico del gene della TPO. Ad esempio Fugazzola et al. (22) hanno evidenziato come il 17% dei soggetti, che dal punto di vista fenotipico presentano una TIOD, in realtà sono portatori di una mutazione monoallelica inattivante il gene della TPO. Essi descrivono il caso di una famiglia in cui tre fratelli, affetti da ipotiroidismo congenito dovuto a un difetto totale della organificazione dello iodio sono portatori a livello germinale di una mutazione monoallelica (R693W), ereditata dal padre, a sua volta clinicamente sano. Il fenotipo TIOD è probabilmente determinato dall'espressione dell'allele paterno mutato associato alla perdita del trascritto dell'allele materno sano nel tessuto tiroideo.

Infine sono stati descritti anche casi di IC da difetto parziale della organificazione dello iodio conseguenza di mutazioni bialleliche inattivanti il gene della TPO. Ad esempio Kotani et al. (38) hanno descritto il caso di tre fratelli con un difetto parziale della organificazione dello iodio ma portatori di due mutazioni (G1687T, 1808-13del), espresse in eterozigosi composta, ereditate rispettivamente dal padre e dalla madre. E' stato osservato come la TPO codificata dall'allele sede della mutazione G1687T è incapace a sintetizzare gli ormoni tiroidei a causa del suo mancato ancoraggio alla superficie apicale del tireocita mentre la TPO codificata dall'allele sede della mutazione 1808-13del è in grado di sintetizzare gli ormoni tiroidei in modo parziale.

## ***CONCLUSIONI***

In questo lavoro sono stati analizzati dal punto di vista clinico, biochimico, strumentale e genetico 6 pazienti affetti presso il nostro Dipartimento di Endocrinologia ed affetti da ipotiroidismo congenito con una tiroide in sede ed un difetto totale della organificazione dello iodio o un difetto nella sintesi della TG.

Il nostro scopo è stato quello di individuare le possibili cause alla base di tali deficit, ponendo particolare attenzione all'analisi delle proteine TPO e TG.

Il sequenziamento dei geni di tali proteine ha evidenziato: una mutazione inattivante (R768X) a carico del gene della TG, mai descritta precedentemente, e tre mutazioni a carico del gene della TPO, di cui due (E746X, T561M) nuove ed una (907X) già nota in letteratura.

Tali mutazioni sono quindi la causa del difetto della sintesi della TG, osservabile nelle pazienti #1 e 2, e del difetto totale della organificazione dello iodio, osservabile nei pazienti # 3 e 6. Nelle pazienti # 4 e 5, che presentavano un difetto totale della organificazione dello iodio, non è stata individuata alcuna anomalia a carico del gene della TPO, del promotore del gene della TPO e del gene DUOX2. E' verosimile che entrambe possano essere portatrici di alterazioni a carico di una sequenza intronica con conseguente alterazione del normale meccanismo di splicing e con la conseguente sintesi di una proteina alterata.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. *Visser WE, Friesema ECH, Jansen J and Visser TJ.* Thyroid hormone transport in and out of the cells. *Trends Endocrinol Metab* 2008, 19(2):50-6.
2. *Park SM, Chatterjee VK.* Genetics of congenital hypothyroidism. *J Med Genet* 2005, 42:379-89.
3. *Medeiros-Neto GA, Billerbeck AE, Wajchenberg BL and Targovnik HM.* Defective organification of iodide causing hereditary goitrous hypothyroidism. *Thyroid* 1993, 3(2):143-159.
4. *Ohye H, Fukata S, Hishinuma A, Kudo T, Nishihara E, Ito M, Kubota S, Amino N, Ieiri T, Kuma K, Miyauchi A.* A novel homozygous missense mutation of the dual oxidase 2 (DUOX2) gene in an adult patient with large goiter. *Thyroid* 2008, 18(5): 561-6.
5. *Visser WE, Friesema ECH and Visser TJ.* Minireview: Thyroid Hormone Transporters: The Knowns and the Unknowns. *Mol Endocrinol* published online 2010; doi: 10.1210/me.2010-0095.
6. *Rastogi MV, LaFranchi SH.* Congenital hypothyroidism. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2010, 5:17.
7. *Kopp P.* Perspective: Genetic Defects in the Etiology of Congenital Hypothyroidism. *Endocrinology* 2002, 143(6):2019–2024.
8. *Pohlenz J, Weiss RE, Macchia PE, Pannain S, Lau IT, Ho H and Refetoff S.* Five New Families with Resistance to Thyroid Hormone not Caused by Mutations in the Thyroid Hormone Receptor  $\beta$  Gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84(11):3919-28.
9. *Filho HC, Marui S, Manna TD, Brust ES, Radonsky V, Kuperman H, Dichtchekenian V, Setian N, Damiani D.* Novel mutation in MCT8 gene in a Brazilian boy with thyroid hormone resistance and severe neurologic abnormalities. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2011, 55(1):60-6.
10. *Meeus L, Gilbert B, Rydlewski C, Parma J, Roussie AL Abramowicz M, Vilain C, Christophe D, Costagliola S, Vassart G.* Characterization of a Novel Loss of Function Mutation of PAX8 in a Familial Case of

Congenital Hypothyroidism with In-Place, Normal-Sized Thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89(9):4285–4291.

11. *Bamforth JS, Hughes IA, Lazaraus JH, Weaver CM AND Harper PS.* Congenital hypothyroidism, spiky hair, and cleft palate. *Journal of Medical Genetics* 1989, 26(1):49-60.
12. *Castanet M Polak M.* Spectrum of human Foex1/TTF2 mutations. *Horm Res Paediatr* 2010, 73:423–429.
13. *Hishinuma A, Kuribayashi T, Kanno Y, Onigata K, Nagashima K and Ieiri T.* Sequence Analysis of Thyroid Transcription Factor-1 Gene Reveals Absence of Mutations in Patients with Thyroid Dysgenesis but Presence of Polymorphisms in the 5' Flanking Region and Intron. *Endocrine Journal* 1998, 45(4), 563-567
14. *Biebermann H, Schoneberg T, Krude H, Schultz G, Gudermann T and Gruters A.* Mutations of the Human Thyrotropin Receptor Gene Causing Thyroid Hypoplasia and Persistent Congenital Hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82(10):3471-3480.
15. *Nicoletti A, Bal M, De Marco G, Baldazzi L, Agretti P, Menabo`S, Ballerini E, Cicognani A, Tonacchera M and Cassio A.* Thyrotropin-Stimulating Hormone Receptor Gene Analysis in Pediatric Patients with Non-Autoimmune Subclinical Hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2009, 94(11):4187–4194.
16. *Ris-Stalpers C and Bikker H.* Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to TPO mutations. *Mol Cell Endocrinol* 2010, 322:38-43.
17. *Targovnik HM, Esperante SA, Rivolta CM.* Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to thyroglobulin mutations. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010, doi:10.1016/j.mce.2010.01.009.
18. *Spitzweg C and Morris J.* Genetics and Phenomics of Hypothyroidism and Goiter Due to NIS Mutations. *Mol Cell Endocrinol* 2010, 322(1-2): 56–63.
19. *Avbelj M, Tahirovic H, Debeljak M, Kusekova M, Toromanovic A, Krzislak C and Battelino T.* High prevalence of thyroid peroxidase gene mutations in patients with thyroid dysmorphogenesis. *European Journal of Endocrinology* 2007, 156: 511-519.

20. *Neves SC, Mezalira PR, Dias VM, Chagas AJ, Viana M, Targovnik H, Knobel M, Meideros-Neto G, Rubio IG.* Monoallelic thyroid peroxidase gene mutation in a patient with congenital hypothyroidism with total iodide organification defect. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2010, 54(8):732-737.
21. *Abramowicz MJ, Vassart G and Christophe D.* Functional study of the human thyroid peroxidase gene promoter. *Eur J Biochem* 1992, 203: 467-473.
22. *Fugazzola L, Cerutti N, Mannavola D, Vanucchi G, Fallini C, Persani L and Beck-Peccoz P.* Monoallelic Expression of Mutant Thyroid Peroxidase Allele Causing Total Iodide Organification Defect. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88(7):3264-3271.
23. *Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, Vulsma T and Ris-stalpers C.* Inactivating Mutations In The Gene For Thyroid Oxidase 2 (THOX2 ) And Congenital Hypothyroidism. *N Engl J Med* 2002, 347(2):95-102.
24. *Song Y, Ruf J, Lothaire P, Dequanter D, Andry G, Willemse E, Dumont JE, e Van Sande J and De Deken X.* Association of Duoxes with Thyroid Peroxidase and Its Regulation in Thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2010, 95(1):375–382.
25. *Tonacchera M, De Marco G, Agretti P, Montanelli L, Di Cosmo C, Freitas Ferreira AC, Dimida A, Ferrarini E, Estrela Ramos H, Ceccarelli C, Brozzi F, Pinchera A and Vitti P.* Identification and Functional Studies of Two New Dual-Oxidase 2 (DUOX2) Mutations in a Child with Congenital Hypothyroidism and a Eutopic Normal-Size Thyroid Gland. *J Clin Endocrinol Metab* 2009, 94(11):4309–4314.
26. *Lamas L, Anderson PC, Foxy JW and Dunn JT.* Consensus Sequences for Early Iodination and Hormonogenesis Human Thyroglobulin. *The Journal of Biological Chemistry* 1989, 264 (23): 13541-13545.
27. *Targovnik HM, Citterio EC and Rivolta CM.* Thyroglobulin Gene Mutations in Congenital Hypothyroidism. *Horm Res Paediatr* 2011, 75:311–321.
28. *Pardo V, Vono-Toniolo J, Rubio IGS, Knobel M, Possato RF, Targovnik HM, Kopp P and Meideros-Neto G.* The p.A2215D Thyroglobulin Gene Mutation Leads to Deficient Synthesis and Secretion of the Mutated

Protein and Congenital Hypothyroidism with Wide Phenotype Variation. *J Clin Endocrinol* 2009, 94(8):2938-2944.

29. *Ieiri T, Cochaux P, Targovnik HM, Suzuki M, Shimoda S-I, Perret J and Vassart G.* A 3' Splice Site Mutation in the Thyroglobulin Gene Responsible for Congenital Goiter with Hypothyroidism. *J Clin Invest* 1991, 88:1901-1905.
30. *Senou M, Khalifa C, Thimmesch M, Jouret F, Devuyst O, Col V, Audinot JN, Lipnik P, Moreno JC, Van Sande J, Dumont JE, Many MC, Colin IM and Gerard AC.* A Coherent Organization of Differentiation Proteins Is Required to Maintain an Appropriate Thyroid Function in the Pendred Thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 2010, 95(8):4021–4030.
31. *Cengiz K, Mehtap K, Ahmet U and Murat A.* Congenital Goitrous Hypothyroidism, Deafness and Iodide Organification Defect in Four Siblings: Pendred or Pseudo-Pendred Syndrome? *J Clin Res Ped Endo* 2010, 2(2):81-84.
32. *Moreno JC, Klootwijk W, van Toor H, Pinto G, D'Alessandro M, Lèger A, Goudie D, Polak M, Grüters A and Visser TJ.* Mutations in the Iodotyrosine Deiodinase Gene and Hypothyroidism. *N Engl J Med* 2008, 358:17.
33. *Olivieri A and The Study Group for Congenital Hypothyroidism.* The Italian National Register of infants with congenital hypothyroidism: twenty years of surveillance and study of congenital hypothyroidism. *Italian Journal of Pediatrics* 2009, 35:2.
34. *Gutnisky VJ, Moya CM, Rivolta CM, Domenè S, Varela V, Toniolo JV, Mederos-Neto G and Targovnik HM.* Two Distinct Compound Heterozygous Constellations(R277X/IVS34–1G>C and R277X/R1511X) in the Thyroglobulin (TG) Gene in Affected Individuals of a Brazilian Kindred with Congenital Goiter and Defective TG Synthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89(2):646–657.
35. *Hishinuma A, Fukata S, Nishiyama S, Nishi Y, Oh-Ishi M, Murata Y, Ohyama Y, Matsuura N, Kasai K, Harada S, Kitanaka S, Takamatsu J, Kiwaki K, Ohye H, Uruno T, Tomoda C, Tajima T, Kuma K, Miyauchi A and Ieiri T.* Haplotype analysis reveals founder effects of thyroglobulin gene mutations C1058R and C1977S in Japan. *J Clin Endocrinol Metab* 2006, 91(8):3100-4.

36. *Bikker H, Vulsma T, Baas F and de Vijlder JJM*. Identification of five novel inactivating mutations in the human thyroid peroxidase gene by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Mutat* 1995, 6(1):9-16.
37. *Abramowicz MJ, Targovnik HM, Varela V, Cochaux P, Krawiec L, Pisarev MA, Propato FV, Juvenal G, Chester HA, Vassart G*. Identification of a mutation in the coding sequence of the human thyroid peroxidase gene causing congenital goiter. *J Clin Invest* 1992, 90(4):1200-4.
38. *Kotani T, Umeki K, Kawano J, Suganuma T, Hishinuma A, Ieiri T and Harada S*. Partial iodide organification defect caused by a novel mutation of the thyroid peroxidase gene in three siblings. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003, 59(2):198-206.

## **RINGRAZIAMENTI**

*Ringrazio innanzitutto il Prof. Aldo Pinchera ed il Prof. Paolo Vitti per avermi dato la straordinaria possibilità di poter frequentare questo Dipartimento.*

*Grazie di cuore al Prof. Massimo Tonacchera che mi ha accolta nel suo gruppo di lavoro, facendomi sentire fin da subito all'interno di una grande famiglia, e che mi ha guidato con estrema disponibilità e pazienza nella stesura di questo lavoro. Tutte le volte che mi sono affacciata alla porta del suo studio, affranta dai mille pensieri che attraversano, credo, la testa di ogni laureando, mi ha accolto sempre con uno squillante "Loconte!!", rischiando così la mia giornata.*

*Un ringraziamento particolare alla Dott.ssa Giuseppina de Marco che ha avuto il merito di introdurremi nel mondo della Biologia Molecolare, per me completamente astratto, riuscendo perfino a farmi cimentare (con risultati spesso improbabili) nell'allestimento di una PCR o nella preparazione di un gel di controllo. E' stata costantemente al mio fianco, sostenendomi sempre nei momenti di difficoltà (specie con l'uso del Power Point!!!) e tranquillizzandomi ogni volta che il panico si faceva strada al pensiero di tutto quello che c'era ancora da fare.*

*Allo stesso modo ringrazio: la Dott.ssa Patrizia Agretti, la quale mi ha aiutato a dare un senso alle frasi contorte che il più delle volte affollavano il lavoro di stesura (spesso dovuto ad un uso "esagerato" delle virgole!!); la Dott.ssa Eleonora Ferrarini e il Dott. Antonio Dimida che hanno "sopportato" di buon grado l'invasione dei propri spazi lavorativi da parte del mio pc!*

*Grazie alla Dott.ssa Lucia Montanelli e alla Dott.ssa Caterina di Cosmo che, nei nostri incontri fortuiti nei corridoi del Dipartimento, non hanno mai mancato di assicurarsi che tutto procedesse per il meglio.*

*Ringrazio inoltre la Dott.ssa Laura Russo, la Dott.ssa Brunella Bagattini, il Dott. Angelo Molinaro e il Dott. Filippo Niccolai che si sono dimostrati sempre pronti a sostenermi, anche solo con un sorriso.*

*E' con infinito affetto che ringrazio i miei genitori, la mia amata nonna e mia sorella per tutto il sostegno che mi hanno dato in questo percorso così lungo e tortuoso.*

*Grazie a tutti gli amici ed in particolar modo a Silvia e Nuela che mi sono sempre state vicine, specie nei momenti di crisi pre-esame!*

*Ed infine, anche se nella mia vita riveste un ruolo da protagonista, ringrazio infinitamente Dario che in questi tre anni insieme, non con poca pazienza, mi è stato a fianco ed ha condiviso con me sia le gioie sia i momenti di sconforto, spronandomi sempre a dare il massimo.*