



Figura 1. ELISA de muerte celular medida a los seis meses de edad. ANOVA* $P < 0,05$.

O1/d2-008

EL ESTRÉS PRENATAL INDUCE CAMBIOS EN EL RECAMBIO CELULAR BASAL EN EL EJE HIPOCAMPO-HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIO EN LA RATA ADULTA

E. Baquedano Caballero⁽¹⁾, C. García Cáceres⁽¹⁾, I.M. Calmarza Font⁽²⁾, N. Lagunas García⁽²⁾, L.M. García Segura⁽²⁾, I. Azcoitia Elias⁽³⁾, Y. Diz Chaves⁽²⁾, J.A. Chowen King⁽¹⁾, J. Argente Oliver⁽¹⁾, L.M. Frago Fernández⁽¹⁾

⁽¹⁾ Endocrinología, Dto. Pediatría. Hospital Infantil Universitario Niño Jesús. CIBERobn, Madrid. ⁽²⁾ Instituto Cajal, CSIC, Madrid. ⁽³⁾ Dto. Biología Celular, Facultad de Biología, UCM Madrid.

Introducción

El estrés crónico gestacional induce alteraciones duraderas en el eje hipocampo-hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHPA). Los glucocorticoides tienen un fuerte impacto en la programación prenatal. El efecto del aumento de glucocorticoides maternos podría quedar establecido en el eje hipocampo-hipotálamo-hipofisario.

Objetivo

Investigar si el estrés crónico afecta al recambio celular en el eje hipocampo-hipotálamo-hipófisis y los mecanismos intracelulares implicados.

Metodología

Se utilizaron ratas Wistar macho distribuidas en 4 grupos experimentales: 1) grupo control (C); 2) ratas cuyas madres fueron sometidas a estrés por restricción de movimiento 45 minutos 3 veces/día durante siete días antes del nacimiento (EP); 3) ratas adultas sometidas a estrés por restricción de movimiento 45 minutos 3 veces/día durante 10 días a los tres meses de edad (EA); 4) grupo de estrés pre y adulto (EP/EA). Los animales se sacrificaron a los 6 meses de edad, estudiándose la hipófisis, hipotálamo e hipocampo. Se determinó la expresión de proteínas (*western blotting*), niveles de ARNm por PCR-TR y niveles de muerte celular por ELISA. La proliferación celular se estudió mediante marcaje inmunohistoquímico de BrdU.

Resultados

En los tres tejidos se observó inhibición de muerte celular (Figura 1) y de células proliferando marcadas con BrdU en ratas estresadas prenatalmente, así como un aumento de los niveles del ARNm de IGF-I, de la fosforilación de CREB, y de los niveles de calpastatina. Además, se observó un aumento de los niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y una disminución del factor pro-apoptótico p53. En las ratas estresadas a los 3 meses de edad (EA) no se observaron estos cambios y en las ratas adultas estresadas, también sometidas a estrés prenatalmente (EP/EA), se mantiene el efecto del estrés prenatal.

Conclusión

El estrés prenatal produce una disminución de la tasa de recambio celular en el eje hipocampo-hipotálamo-hipófisis con una disminución de la proliferación y de la muerte celular en el estado adulto que podría estar mediado por un efecto autocrino-paracrino del IGF-I.

Tiroides

O2/d2-009

MUTACIONES EN EL GEN DEL RECEPTOR DE TSH EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON HIPOTIROIDISMO SUBCLÍNICO.

P. Ambrugger⁽¹⁾, E. Kaptein⁽¹⁾, E. van den Akker⁽²⁾, H. Bony-Trifunovic⁽³⁾, I. Riaño⁽⁴⁾, M. Oyarzabal⁽⁵⁾, P. Crock⁽⁶⁾, S. Drop⁽²⁾, M. Polak⁽⁷⁾, T. Visser⁽¹⁾, J. Moreno⁽⁸⁾

⁽¹⁾ Dto. of Internal Medicine, Erasmus Medical Center, Rotterdam, Holanda. ⁽²⁾ Dept. Pediatric Endocrinology, Sophia Children Hospital, Rotterdam, Holanda. ⁽³⁾ Dept. Pediatric Endocrinology and Diabetes, Hospital Nord, Amiens, Francia. ⁽⁴⁾ Servicio Pediatría, Hospital Carmen y Severo Ochoa, Cangas del Narcea, Asturias. ⁽⁵⁾ Endocrinología Pediátrica, Hospital Virgen del Camino, Pamplona. ⁽⁶⁾ Dept. Pediatric Endocrinology and Diabetes, John Hunter Children Hospital, Newcastle, Australia. ⁽⁷⁾ Dept. Pediatric Endocrinology, Enfants Malades Hospital, Paris,

Francia. ⁽⁸⁾ Laboratorio de Tiroides, Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ y CIBERER, ISCIII, Madrid.

Introducción

El receptor de TSH (TSHR) media el efecto de la TSH en el desarrollo, crecimiento y síntesis hormonal tiroidea. La transducción de la señal está mediada por dos vías diferentes: la cascada Gs-cAMP, involucrada en el crecimiento y diferenciación del tiroides, y la cascada Gq-IP(inositol-fosfato)-Ca⁺⁺, implicada en la generación de H₂O₂. Mutaciones bialélicas con pérdida de función en el gen *TSHR* conducen a hipotiroidismo congénito (gran hipoplasia tiroidea o resistencia a la TSH) y mutaciones monoalélicas causan hipotiroidismo subclínico.

Objetivo

Establecer la prevalencia de mutaciones del gen *TSHR* en una cohorte pediátrica con elevación aislada de TSH e investigar la correlación genotipo-fenotipo.

Pacientes y Métodos

En 72 pacientes con hipertirotrópinemia permanente se estudian los 10 exones codificantes del gen *TSHR*, mediante PCR y secuenciación directa.

Resultados

En 7 pacientes se identificaron 6 mutaciones heterocigotas. Sólo uno fue diagnosticado en el programa de despistaje neonatal, 5 no fueron detectados y a uno no se le realizó. Entre los pacientes no detectados en el período neonatal, la edad al diagnóstico varió entre 4 meses y 13 años. La TSH osciló entre 8,4 a 19 mU/L (vn: ≤5). Se encontró hipoplasia tiroidea mediante gammagrafía y/o ecografía en 2 pacientes, en 4 el tamaño fue normal. Hay que destacar 2 pacientes que presentaron descarga con perclorato positiva, del 30 y 12%, indicando un defecto parcial de yodación (DOYP). Todas las mutaciones identificadas se localizan en el exón 10. Cuatro mutaciones son nuevas (L436P, R519H, N714K, V721F) y dos (R540H y T655X) son ya descritas. Los pacientes con las mutaciones T655X (localizada en la 3^o asa extracelular) y N744K (localizada en el extremo carboxi-terminal) tienen un fenotipo de dishormonogénesis tiroidea (DOYP).

Conclusiones

Un número significativo de hipotiroidismos subclínicos son debidos a mutaciones heterocigotas en el gen *TSHR*. Se necesitan estudios funcionales para determinar el impacto de las mutaciones nuevas sobre la actividad del receptor, tanto en la generación de cAMP como de IP, especialmente en pacientes con DOYP. La localización de la mutación puede ocasionar una alteración preferente de la vía Gq-IP-Ca⁺⁺, conduciendo a una generación deficiente de H₂O₂ por parte de DUOX2.

O2/d2-010

ALTO PORCENTAJE DE MUTACIONES EN EL GEN *THRB* EN UNA COHORTE PEDIÁTRICA ESPAÑOLA CON RESISTENCIA A HORMONA TIROIDEA.

P. Ambrugger ⁽¹⁾, P.S. Ventura ^(1,2), M.J. López ⁽³⁾, A. Lechuga ⁽⁴⁾, M.V. Borrás ⁽⁵⁾, J.A. López-Medina ⁽⁶⁾, J.L. Lechuga ⁽⁴⁾, E. Mayayo ⁽⁷⁾, J.C. Moreno ⁽⁸⁾

⁽¹⁾ Dto. Medicina Interna. Erasmus Medical Center, Rotterdam, Holanda. ⁽²⁾ Endocrinología Pediátrica, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona. ⁽³⁾ Servicio de Pediatría, Hospital Clínico Universitario, Valencia. ⁽⁴⁾ Servicio de Pediatría, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz. ⁽⁵⁾ Servicio de Pediatría, Hospital General de Granollers, Barcelona. ⁽⁶⁾ Servicio de Endocrinología, Complejo Hospitalario de Jaén. ⁽⁷⁾ Servicio de Endocrinología, Hospital Infantil Miguel Servet, Zaragoza. ⁽⁸⁾ Laboratorio de Tiroides, INGEMM-Instituto de Genética Médica y Molecular, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ y CIBERER, ISCIII, Madrid.

Los efectos de la hormona tiroidea (T3) son mediados por sus receptores nucleares α y β , codificados por los genes *THRA* y *THRB*. La resistencia clásica a T3 (R-T3) se debe a defectos del receptor intranuclear β (*THRB*). Su expresión clínica es variable, con formas hipofisarias y generalizadas. Aunque las mutaciones en *THRB* constituyen el hallazgo molecular típico, existen casos sin defectos en este gen, cuya base genética es desconocida.

Objetivo

Investigar la etiología molecular de una cohorte española de 10 pacientes con diagnóstico clínico de R-T3.

Pacientes y Métodos

Se analizaron los datos clínicos y bioquímicos de pacientes y familiares de 1^a grado. Se amplificó y secuenció el cDNA específico de la isoforma activa de *THRB* (exones 7, 8, 9 y 10) y su variante hipofisaria (β_2).

Resultados

La edad media al diagnóstico fue de 5,5 años (0,1-14). Solo un caso fue detectado en el cribaje neonatal. Motivos de consulta: síndrome de hiperactividad con déficit de atención (5/10), retraso pondero-estatural con clínica digestiva (4/10), sospecha de patología tiroidea (2/10) y retraso mental (1/10). Presentaban bocio 3/10, prematuridad uno, CIR uno y trisomía 21 otro. Dos pacientes tienen resistencia hipofisaria (hipertiroidismo sintomático) y 8 generalizada. La TSH fue normal en un paciente y en el resto elevada (5-25 mU/L), LT4 elevada en todos (2-4,1 ng/dl), y la LT3 normal en dos y elevada en los demás (2,4-14 ng/dl).

Se identificaron 4 mutaciones missense en *TRHB* en 6 pacientes: tres noveles (R338W, R438H, P453R) y una patogénica ya descrita (R243W) que está presente en 2 pacientes. La prolina P453 se ha

descrito mutada previamente hacia a otro aminoácido, sugiriendo que P453R es una mutación funcional. Todos nuestros casos de R-T3 con mutación en *THRB* muestran herencia dominante. Existe gran variabilidad fenotípica intrafamiliar y la expresión clínica y bioquímica parece disminuir con la edad.

Conclusiones

Se identificaron mutaciones en *THRB* en un alto porcentaje de pacientes. Una misma mutación puede expresarse como resistencia hipofisaria o generalizada. La variabilidad fenotípica intrafamiliar y la existencia de pacientes sin alteraciones en *THRB* sugieren heterogeneidad genética, probablemente relacionada con defectos en coactivadores o correpresores nucleares de los receptores de T3.

O2/d2-011

MUTACIONES EN GENES DE LA ORGANIFICACIÓN TIROIDEA DEL YODO SUGIEREN COOPERACIÓN FUNCIONAL ENTRE TPO, DUOX2 Y DUOXA2.

P.S. Ventura⁽¹⁾, P. Ambrugger⁽¹⁾, M. Clemente⁽²⁾, M. Albisu⁽²⁾, P. Cavarere⁽³⁾, A. Mestre⁽⁴⁾, I. Roca⁽⁴⁾, L. Audí⁽²⁾, A. Carrascosa⁽²⁾, M. Polak⁽³⁾, T. Visser⁽¹⁾, J.C. Moreno^(1,5)

⁽¹⁾ Dto. de Medicina Interna, Erasmus Medical Center, Rotterdam, Holanda. ⁽²⁾ Servicio de Endocrinología Pediátrica, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona. ⁽³⁾ Dept. Pediatric Endocrinology, Enfants Malades Hospital, Paris, France. ⁽⁴⁾ Servicio de Diagnóstico por Imágenes, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona. ⁽⁵⁾ Laboratorio de Tiroides, Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), Hospital Universitario la Paz, IdiPAZ y CIBERER, ISCIII, Madrid.

Los defectos de organificación del yodo (DOY) son hipotiroidismos hereditarios debidos a la alteración de los genes responsables de la yodación de la tiroglobulina. Los DOY totales (DOYT), con descarga de yodo >90% tras perclorato, se deben a mutaciones bialélicas en el gen de la tiroperoxidasa (*TPO*), o de la Oxidasa Dual 2 (*DUOX2*). Sin embargo, existen pacientes con hipotiroidismo intenso y DOYT en los que sólo se logran identificar mutaciones en uno sólo de los alelos de estos 2 genes candidatos. Recientemente se postula la existencia del "tiroxisoma", un complejo de todas las proteínas participantes en la yodación tiroidea que actuaría como una unidad funcional.

Objetivo

Investigar la base molecular de 6 pacientes con hipotiroidismo congénito con DOYT y una paciente con bocio con DOY parcial (DOYP).

Pacientes y Métodos

Amplificación por PCR y secuenciación directa

del cDNA completo de los genes *TPO*, *DUOX2* y *DUOXA2* (factor de maduración de *DUOX2*), con estudio funcional *in vitro* de las mutaciones en los 2 últimos genes.

Resultados

En *TPO* se identificaron un total de 7 mutaciones en 7 pacientes afectados, 6 en heterocigosis y 1 en homocigosis. Cuatro son inéditas: dos mutaciones con cambio de sentido (R665W, C696S), una duplicación de 4 pares de bases (1184-1187dupGCCG) y un error de *splicing* (IVS16-1). Tres ya descritas: una delección de nucleótido (808fsX831), una inserción de un nucleótido en homocigosis (756fsX757), y una mutación sin sentido (N425S, en la paciente con bocio). Cuatro pacientes tienen defectos bialélicos de *TPO* que explican el fenotipo. El resto portan únicamente mutaciones monoalélicas de *TPO* junto a defectos monoalélicos patogénicos en *DUOX2* (K530X, con stop codón prematuro) y *DUOXA2* (G294E, que disminuye la capacidad de generación de H₂O₂ al 50%).

Discusión

La mayoría de pacientes con DOYT presentan defectos bialélicos de *TPO*. En otros, el fenotipo requiere la búsqueda de defectos adicionales, ya sea en regiones promotoras o reguladoras de *TPO* o en otros genes implicados en yodación. La identificación de defectos patogénicos adicionales en *DUOX2-DUOXA2* sugiere la posibilidad de que algunos hipotiroidismos por DOYT sigan una herencia digénica no-mendeliana y contribuyan a la expresión clínica del hipotiroidismo.

Diabetes

O2/d2-012

ACTIVACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LEPTINA E INSULINA EN LOS RATONES *KNOC-KOUT* DE *IRS2* NO DIABÉTICOS

Barrios Sabador, V. Barrios Sabador^(1,2), E. Burgos Ramos^(1,2), A. González Rodríguez⁽³⁾, S. Canelles Ortiz^(1,2), A. Martínez Valverde⁽³⁾, J. Argente Oliver^(1,2)

⁽¹⁾ Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Servicio de Endocrinología, Madrid. ⁽²⁾ CIBER de Fisiopatología de Obesidad y Nutrición (CIBERObn). ⁽³⁾ Instituto de Biomedicina Alberto Sols (CSIC/UAM), Madrid.

Introducción

La obesidad y la resistencia insulínica en la infancia, así como la diabetes tipo 2 en el adulto parecen estar relacionadas con la resistencia a la acción de la leptina e insulina. El uso de modelos experimentales y especialmente de animales *knockout* de *IRS2* permite explorar las dianas de señalización para ambas hormonas y su relación con alteraciones de la homeostasis glucídica y la aparición de diabetes.