

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Departamento de Bioquímica Clínica**



**Desarrollo de alternativas diagnósticas para el  
abordaje molecular de la patología congénita  
hereditaria de la glándula tiroides**

Tesis para optar al título de Magister en Ciencias Químicas

por

Licenciado en Bioquímica Diagnóstica Carlos Eduardo Bernal Barquero

Departamento de Bioquímica Clínica  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Nacional de Córdoba  
Centro de investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología  
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas  
(CIBICI-CONICET)  
Córdoba, septiembre de 2021

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. JUAN PABLO NICOLA.** Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Centro de investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CIBICI-CONICET).

**COMISIÓN ASESORA DE TESIS:**

**DRA. LAURA FOZZATTI.** Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Centro de investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CIBICI-CONICET).

**DRA. ALICIA LAURA DEGANO.** Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CIQUIBIC-CONICET).

**EVALUADOR EXTERNO:**

**DRA. MARÍA INÉS PEREZ MILLAN.** Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología Traslacional, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

**DEFENSA ORAL Y PÚBLICA**

**Lugar y Fecha:** Córdoba, 16 de septiembre de 2021.

**Calificación:**

.....  
Dra. Alicia Laura Degano

.....  
Dra. Laura Fozzatti

.....  
Dra. María Inés Perez Millan

La presente tesis de maestría ha sido realizada en el Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CIBICI-CONICET) en dependencias del Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

La misma se desarrolló durante el desempeño de una Beca de Maestría asociada al proyecto PICT-2015-3839 otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, a través del Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica.

Los subsidios que financiaron la presente fueron otorgados por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, a través del Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica, la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba, el Instituto Nacional del Cáncer dependiente del Ministerio de Salud de la Nación y la Secretaría de Políticas Universitarias dependiente del Ministerio de Educación de la Nación.

## DEDICATORIAS

Quiero dedicarle esta tesis a la persona más importante que tengo en mi vida, a la mujer que sólo ha sabido darme amor, y que en ningún momento escatimó en buscar lo mejor para mí: a mi madre. Porque desde que llegué a su vida, nunca paró de velar por mi bienestar, y con su trabajo y esfuerzo diario supo sacarme adelante, y hacer de mi un hombre de bien. A ti te debo más que la vida mamá, y nunca voy a poder pagarte todo que has dado por mí, solamente me queda por reconocer el excepcional ser humano que eres, con los errores que todos tenemos, pero con muchas virtudes de las que muchos carecen. Gracias por tanto, te amo mucho.

A la familia que Dios me dio, que desde pequeño me han dado muestras de su cariño incondicional y los llevo siempre en mis pensamientos: a mi tía Mara, mi tía Silvia, mi tío Francisco, Pati y Gabi. No sé qué hice para merecerlos. Gracias por tanto, los amo mucho.

También quiero agradecer al Dr. Juan Pablo por darme la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio, y por haberme permitido vivir la experiencia de estar en este hermoso país que es Argentina. Y aprovecho para agradecer a mis compañeros de laboratorio, Marian, Romi, Vicky y todos los miembros del laboratorio 205-207 que me ayudaron a construir esta tesis y contribuyeron significativamente en mi formación.

Por último, y más importante, quiero darle gracias a Dios, porque sin Él NADA sería posible, porque me ha dado múltiples pruebas de su Amor, porque decidió manifestarse en mi vida con el Amor más dulce que es capaz de experimentar un ser humano, y porque ha velado por mí siempre desde antes de mi existencia. Bendito seas mi Señor y Dios.

## RESUMEN

Las hormonas tiroideas juegan un papel crucial en la diferenciación y el desarrollo del sistema nervioso central. Su deficiencia funcional al nacimiento se conoce como hipotiroidismo congénito (HC), la enfermedad congénita de origen endocrino más frecuente, con una frecuencia estimada en 1:2500 neonatos. La enfermedad conduce a un daño mental severo e irreversible, por ello, en Argentina la ley nacional N°26.279 establece la obligatoriedad de la pesquisa neonatal para su detección durante las primeras semanas de vida permitiendo instaurar una terapia hormonal de reemplazo, que protege el desarrollo del sistema nervioso central.

Esta enfermedad puede deberse a defectos intrínsecos de la glándula tiroides (hipotiroidismo primario), del eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo (hipotiroidismo central) o la acción hormonal en tejidos periféricos (hipotiroidismo periférico). Para facilitar la planificación de un manejo interdisciplinario de los pacientes y garantizar un adecuado asesoramiento genético, las guías internacionales de consenso para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la enfermedad recomiendan su diagnóstico molecular. Esto es principalmente porque la caracterización clínica, bioquímica e imagenológica de los pacientes no permite, en la mayoría de los casos, relacionar la etiología con defectos moleculares en genes específicos y, excepto en cuadros con parámetros bioquímicos e imagenológicos concluyentes, la misma permanece incierta.

Las principales estrategias de diagnóstico molecular consisten en la secuenciación de un gen candidato cuando la presentación fenotípica del paciente apunta claramente a defectos en un gen determinado, o la aplicación de tecnología de secuenciación de nueva generación (paneles de genes asociados a la patología o la secuenciación del exoma completo) cuando la presentación fenotípica del paciente no se corresponda con situaciones previamente reportadas. En los últimos 20 años se han realizado importantes progresos en la identificación de diferentes formas monogénicas de la enfermedad, aunque sólo el 5-10% de pacientes con disgenesia tiroidea y 50-90% de los pacientes con dishormonogénesis tiroidea son diagnosticados mediante el estudio de genes candidatos, planteando la existencia de etiologías genéticas alternativas.

En el presente trabajo implementamos la secuenciación del gen candidato *SLC5A5*, la secuenciación de paneles de genes y la secuenciación de exomas completos en una cohorte de 17 pacientes con diversos fenotipos de HC. La combinación de las metodologías permitió establecer el diagnóstico molecular de la patología en 3 pacientes, identificándose un potencial nuevo gen candidato en la etiología de la enfermedad. Además, la caracterización molecular de nuevas variantes en los genes *SLC5A5* y *TG* permitió ahondar en las bases moleculares de la patología.

En Argentina, el estudio molecular del HC no ha sido enfocado con fines asistenciales sino puramente científicos evaluando casos bien definidos y susceptibles a ser producto de la alteración característica de un gen candidato. En este sentido, los hallazgos de este trabajo demuestran la necesidad de sistematizar el diagnóstico molecular de la enfermedad, no sólo para brindar asesoramiento genético, sino también para

comprender los mecanismos moleculares que gatillan su desarrollo, decidir la terapia disponible más adecuada para la condición del paciente y anticipar el desarrollo de anomalías extra-tiroideas facilitando su abordaje interdisciplinario.

**Palabras clave:** Hipotiroidismo congénito, Diagnóstico molecular, Gen candidato, Panel de genes, Exoma.

## ABSTRACT

Thyroid hormones play a crucial role in central nervous system differentiation and development. Functional thyroid hormone deficiency at birth is known as congenital hypothyroidism (CH), the most common congenital endocrine disorder with an estimated frequency of 1: 2500 neonates. The disease leads to severe and irreversible mental damage, therefore a mandatory newborn screening program have been implemented in Argentina to detect the disease, allowing early treatment with levothyroxine, which prevents severe intellectual disability.

The disease can be caused by defects occurring at any of three different levels: the thyroid gland itself (primary hypothyroidism), the hypothalamic-pituitary axis (central hypothyroidism), and thyroid hormone action in peripheral tissues (peripheral hypothyroidism). To facilitate an interdisciplinary follow-up of patients and to guarantee adequate genetic counseling, the international consensus guidelines for the diagnosis, treatment and follow-up of the disease recommend its molecular diagnosis. The clinical, biochemical, and imagenological characterization of patients does not allow, in most cases, to correlate the etiology of the disease to a defective gene and, except in phenotypes with defined biochemical and imaging characteristics, it remains uncertain.

Different technologies were implemented in the molecular diagnosis of the disease, such as the sequencing of a candidate when the phenotype of the patient clearly points to defects in a given gene, and next-generation sequencing technologies (disease-associated gene sequencing panels or whole-exome sequencing) when the phenotypic presentation of the patient does not correspond to previously reported situations. In the last 20 years, an important progress has been made towards the identification of monogenic forms of primary CH; however, only 5-10% of patients with thyroid dysgenesis and 50-90% of patients with thyroid dysmorphogenesis are diagnosed using candidate gene approach, suggesting the existence of unknown genetic etiologies leading to the disease.

Here, we implemented a candidate *SLC5A5* gene sequencing approach, disease-associated gene sequencing panels and whole-exome sequencing in a cohort of 17 patients with different phenotypes of CH. The combination of technologies allows the molecular diagnosis of the disease in 3 patients, identifying a potential new candidate gene in the etiology of the disease. In addition, the molecular characterization of new variants in the *SLC5A5* and *TG* genes uncovered novel insights into the molecular bases of the disease.

In Argentina, the molecular study of CH has been mainly focused on the discovery of novel pathogenic variants evaluating patients with well-defined phenotypes associated with defects in candidate genes. Our findings demonstrate the importance to systematize the molecular diagnosis of the disease in the clinical practice, not only to provide genetic counseling, but also to better understand the molecular basis of the disease, to implement the most appropriate available therapy, and to anticipate the

development of extra-thyroid abnormalities by implement and interdisciplinary approach of patient caring.

**Keywords:** Congenital hypothyroidism, Molecular diagnosis, Candidate gene approach, Gene sequencing panels, Whole-exome sequencing.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Estructura y función de la glándula tiroides.	1
1.2 Biosíntesis de las hormonas tiroideas.	2
1.2.1 Captación de yoduro.	3
1.2.2 Síntesis de iodotirosinas.	5
1.3 Hipotiroidismo congénito.	7
1.3.1 Diagnóstico de Hipotiroidismo congénito.	8
1.3.2 Las mutaciones en los genes <i>SLC5A5</i> y <i>TG</i> como causas de hipotiroidismo congénito dishormonogénico.	9
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>14</b>
3.1 Protocolo de investigación clínica.	14
3.2 Purificación de DNA genómico.	14
3.3 Secuenciación del gen <i>SLC5A5</i> .	14
3.4 Secuenciación por paneles de genes.	15
3.5 Secuenciación del exoma completo.	15
3.5.1 Selección de pacientes.	15
3.5.2 Secuenciación de exoma.	15
3.5.3 Análisis bioinformático.	16
3.5.4 Priorización de variantes.	16
3.6 Análisis <i>in silico</i> .	16
3.7 Plásmidos.	17
3.8 Mutagénesis sitio dirigida.	17
3.9 Construcción de minigenes en pSPL3.	18
3.10 Amplificación y purificación de plásmidos.	19
3.11 Cultivos celulares.	19
3.12 Ensayos de transfección.	20
3.13 Captación de yoduro.	20
3.14 Western blot (WB).	20
3.15 Citometría de flujo.	22
3.16 Inmunofluorescencia.	22
3.17 Edición génica mediante CRISPR/Cas9.	23
3.18 Caracterización funcional de variantes de corte y empalme de RNA.	23
3.19 Gestión de residuos peligrosos.	24
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>25</b>

<b>4.1</b>	<b>Nuevas variantes del gen <i>SLC5A5</i> causantes de hipotiroidismo congénito.</b>	<b>25</b>
4.1.1	Descripción de los pacientes y resultados de la secuenciación del gen <i>SLC5A5</i> .	25
<b>4.2</b>	<b>Nuevas variantes del gen <i>TG</i> causantes de hipotiroidismo congénito.</b>	<b>27</b>
4.2.1	Datos clínicos y resultados de la secuenciación del panel de genes.	27
<b>4.3</b>	<b>Secuenciación completa del exoma en pacientes con hipotiroidismo congénito.</b>	<b>29</b>
4.3.1	Defecto de acumulación de yoduro en la glándula tiroides sin mutaciones en el gen <i>SLC5A5</i> .	30
4.3.2	Hipotiroidismo asociado a hipoacusia.	32
4.3.3	Resistencia a las hormonas tiroideas sin mutaciones en los TR's.	35
<b>4.4</b>	<b>Caracterización funcional de variantes identificadas en heterocigosis compuesta en el gen <i>SLC5A5</i>.</b>	<b>39</b>
4.4.1	Caracterización funcional de las variantes p.D331N y p.S547R NIS.	39
4.4.2	Caracterización funcional de las variantes p.D369V y c.970-3C>A NIS.	42
<b>4.5</b>	<b>Caracterización funcional de variantes del gen <i>TG</i>.</b>	<b>45</b>
4.5.1	Caracterización funcional de la variante de empalme c.177-2A>C TG.	46
4.5.2	Caracterización funcional de las variantes p.G653D y p.Y2563C TG.	48
<b>4.6</b>	<b>Desarrollo de un modelo <i>in vitro</i> de ITD con la tecnología de CRISPR/Cas9.</b>	<b>49</b>
4.6.1	Caracterización funcional de la variante c.1940C>G NIS.	52
4.6.1.1	Impacto en el corte y empalme de la variante c.1940C>G de NIS.	52
4.6.1.2	Impacto en la variante p.Y531* en la función de NIS.	54
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>56</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>69</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>70</b>

# LISTADO DE ABREVIATURAS

HC: Hipotiroidismo congénito  
ITD: Deficiencia en el Transporte de Ioduro  
RHT: Resistencia a las Hormonas Tiroideas  
RHTA: Resistencia Alfa a las Hormonas Tiroideas  
TRH: Hormona Liberadora de Tirotropina  
TSH: Hormona Estimulante de Tiroides o Tirotropina  
T4: 3,5, 3',5'-tetraiodotironina  
T3: 3,5,3'-triiodotironina  
MIT: Monoiodotirosina  
DIT: Diiodotirosina  
CDCA8: Ciclo de división celular asociado 8  
GLIS3: Dedo de zinc de la familia GLIS 3  
GNAS: Proteína de unión a nucleótidos de guanina estimulante alfa  
FOXE1: Caja de horquilla E1  
JAG1: Ligando 1 de la vía Jagged Canonical Notch  
NKX2-1: Factor de transcripción tiroideo 1  
NKX2-5: Factor de transcripción tiroideo 1  
PAX8: Paired Box 8  
TSHR: Receptor de TSH  
NTN1: Netrina 1  
IYD: Desiodasa de iodotirosinas  
DUOX2: Dual Oxidasa 2  
DUOXA2: Dual Oxidasa A2  
SLC5A5: Miembro 5 de la familia 5 de transportadores de soluto  
NIS: Transportador de Sodio Ioduro  
SLC26A4: Miembro A4 de la familia 26 de transportadores de soluto  
SLC26A7: Miembro A7 de la familia 26 de transportadores de soluto  
TG: Tiroglobulina  
TPO: Tiroperoxidasa  
TUBB1: Tubulina 1  
TRPC4AP: Proteína asociada al Receptor transitorio Potencial de canal de cationes Subfamilia C Miembro 4  
MCT8: Transportador de Monocarboxilato 8  
DEHAL: Desiodasa de iodotirosinas  
TR: Receptor Nuclear de Hormonas Tiroideas  
KLC2: Cadena Liviana 2 de la Kinesina-1  
KCNJ12: Miembro de la Subfamilia J del Canal de Rectificación Interna de Potasio 12  
THRB: Receptor  $\beta$  de Hormonas Tiroideas  
THRA: Receptor  $\alpha$  de Hormonas Tiroideas  
BCOR: Corepressor de BCL6  
AP1B: Complejo Adaptador de Clatrina 1B  
NMD: Vía de Degradación del RNA Mensajero Mediada por Mutaciones sin Sentido  
NGS: Tecnologías de Secuenciación Masiva de Nueva Generación  
WES: Secuenciación Completa del Exoma

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Estructura y función de la glándula tiroides.

Las hormonas tiroideas (HT) son fundamentales para el desarrollo humano y tienen un impacto sustancial en el crecimiento fetal, el desarrollo infantil y la capacidad neurocognitiva (1), intervienen de forma decisiva en el desarrollo del sistema nervioso central, la maduración pulmonar, el crecimiento somático y en la regulación de numerosos procesos metabólicos (2).

La principal función metabólica de la glándula tiroides es producir la cantidad necesaria de HT para satisfacer la demanda de los tejidos periféricos. La tiroides humana consta de dos lóbulos situados a ambos lados de la porción superior de la tráquea unidos por una banda delgada de tejido, el istmo, el cual presenta en ocasiones un lóbulo piramidal. La glándula tiroides humana pesa entre 15 y 20 g, y se encuentra profusamente irrigada por medio de dos arterias, la arteria tiroidea superior que proviene de la arteria carótida externa, y la arteria tiroidea inferior que proviene de la arteria subclava (3).

La glándula tiroides humana está formada por la agrupación de unidades esféricas denominadas folículos. El folículo tiroideo es la unidad funcional mínima requerida para la biosíntesis hormonal y aparece constituido por una estructura esférica con una cavidad central rellena de una sustancia homogénea denominada coloide y rodeada de una monocapa de células epiteliales polarizadas cuboideas, individualmente denominada célula folicular tiroidea o, simplemente tirocito. Los folículos son recubiertos por una cápsula de tejido conectivo fibroso y separados entre sí por tejido conectivo interfolicular ricamente vascularizado (Figura 1). La glándula tiroides también contiene células parafoliculares o células C productoras de calcitonina, que se encuentra involucrada en la regulación de la homeostasis del calcio en el organismo, y que aparecen situadas dentro de los folículos, entre la membrana basolateral de la célula folicular y la membrana basal que rodea el folículo (3).

Las células foliculares presentan una cara apical en contacto con el coloide, la cual tiene microvellosidades, y una cara basolateral orientada hacia el exterior del folículo, delimitada por una membrana basal gruesa, en contacto con capilares sanguíneos fenestrados (3). La altura de las células foliculares varía en función del grado de estimulación glandular, tornándose cilíndricas si están activas y cúbicas cuando están inactivas. Entre 20 y 40 folículos rodeados por un tabique de tejido conjuntivo componen un lobulillo, que recibe irrigación sanguínea de una sola arteria (4).

El crecimiento y función de la glándula tiroides se encuentra bajo el control del eje hipotálamo-hipófisis. Los estímulos como el frío o el estrés, son registrados por el cerebro en la zona del hipotálamo. Como reacción a este estímulo, neuronas secretoras del hipotálamo anterior localizadas en el núcleo paraventricular producen la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), un pequeño neuropéptido constituido sólo por tres

aminoácidos. La TRH estimula células tirotropas en el lóbulo frontal de la hipófisis (adenohipófisis) con el objetivo de estimular la síntesis y secreción de la hormona estimulante de la glándula tiroides (TSH), o simplemente tirotropina, que ejerce su efecto en la célula folicular tiroidea mediante su unión al receptor de TSH (TSHR) (2). La interacción TSH-TSHR promueve el crecimiento, diferenciación de la célula folicular tiroidea y biosíntesis de las hormonas tiroideas. Recientemente, nuestro grupo de trabajo reportó que la subunidad p65 del factor de transcripción NF- $\kappa$ B actúa como un mediador de la expresión de marcadores de diferenciación tiroideos en respuesta a la estimulación con TSH (5).

## 1.2 Biosíntesis de las hormonas tiroideas.

La hormona tiroidea tiroxina y sus metabolitos derivan del aminoácido aromático tirosina. La sustancia matriz de la tiroxina se denomina tironina. En la tiroxina, esta sustancia matriz tiene en total cuatro átomos de yodo en los dos anillos aromáticos y por eso se denomina como 3,5, 3',5'-tetraiodotironina (T4). El metabolito más importante de la tiroxina es la 3,5,3'-triiiodotironina (T3) (2).

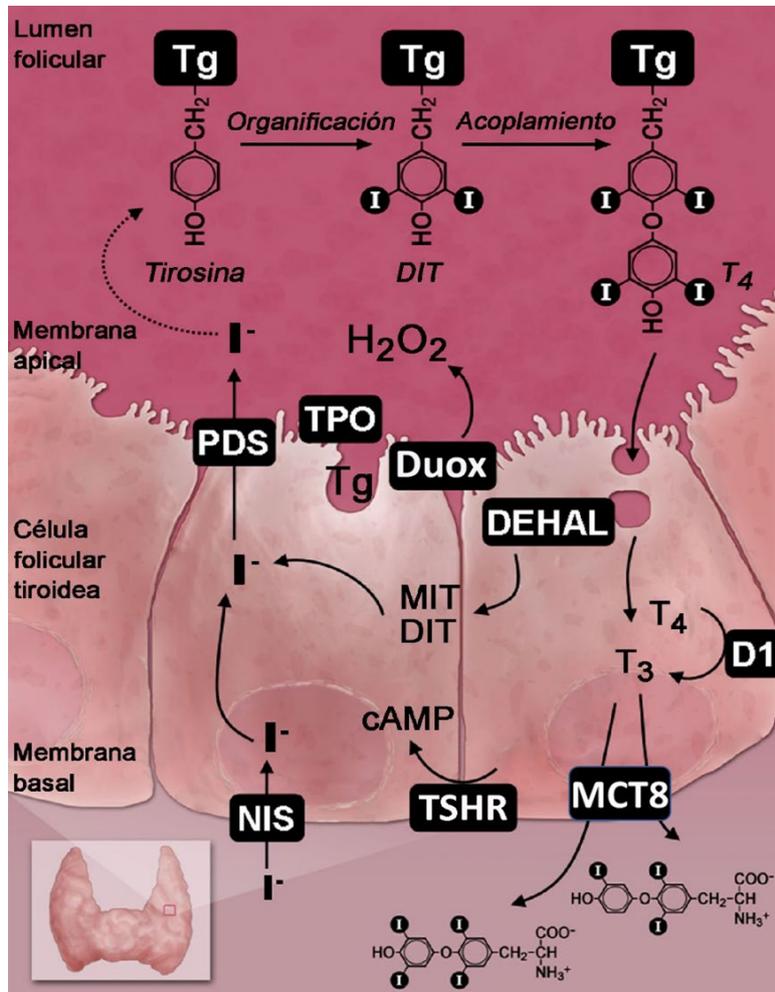
Para la síntesis de las HT se requiere la captación del anión yoduro a través de la membrana basolateral al interior del tirocito, su transporte a través de la célula y su salida a través de la membrana apical hacia el lumen folicular. En la síntesis de HT aparecen implicados varios sistemas enzimáticos especializados, entre los que destaca el transportador de sodio/yoduro (NIS) que se expresa en la membrana basolateral y cotransporta dos cationes sodio junto con un anión yoduro al interior celular utilizando la energía del gradiente electroquímico del catión sodio generado por la sodio/potasio ATPasa (6) (Figura 1). Una vez que atraviesa la membrana basolateral, el yoduro es movilizado hacia lumen folicular por acción, entre otros candidatos propuestos, del transportador de cloruro/yoduro pendrina (PDS) que se expresa en la membrana apical del tirocito (7). Posteriormente, los residuos de tirosina de la tiroglobulina (TG) son iodados por acción de la tiroperoxidasa (TPO) (8) (Figura 1). Esta última cataliza la oxidación de yoduro a yodo o ion yodonio ( $I^+$ ) en presencia de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) dependiente de NADPH que actúa como un aceptor de electrones. El sistema generador de  $H_2O_2$  asociado a la TPO está catalizado por dos enzimas dual oxidadas, DUOX1 y DUOX2 (9) (Figura 1).

Así mismo, la TPO cataliza la iodación de residuos específicos de tirosina de los homodímeros de TG, formando monoiodotirosina (MIT) y diiodotirosina (DIT) que son acopladas para formar iodotironinas (T4 mediante el acoplamiento de dos residuos DIT y T3 mediante el acoplamiento de un residuo MIT y otro DIT) (8) (Figura 1).

Las hormonas T4 y T3, junto con los residuos de MIT y DIT se almacenan en el coloide formando parte de la molécula de TG. En respuesta a las demandas metabólicas, la liberación de las hormonas preformadas se lleva a cabo principalmente mediante micropinocitosis de gotas coloide desde el lumen folicular hacia el citoplasma del tirocito. Las vesículas endocíticas con TG se fusionan con lisosomas, constituyendo fagolisosomas que se desplazan hacia la zona basal del tirocito. Los lisosomas contienen varias enzimas endopeptidasas, las catepsinas, que inducen la proteólisis de la TG. Tras

la ruptura de los enlaces peptídicos que las mantenía unidas a la TG, la T4 y la T3 salen del tirocito y pasan la circulación sanguínea, probablemente mediante la acción del transportador de monocarboxilato 8 (MCT8) (10) (Figura 1).

Durante la proteólisis de la TG no sólo se liberan T4 y T3, sino también residuos MIT y DIT, los cuales son desiodados por la Desiodasa de iodotirosinas (DEHAL1), dicha desiodación se hace forma dependiente del NADPH (Figura 1) (4).



**Figura 1.** Representación esquemática de una célula folicular con los aspectos claves del transporte de yoduro y la síntesis de hormonas tiroideas. La primera etapa de la síntesis de HT comienza con el transporte de yoduro mediado por NIS en la membrana basolateral hacia el interior de la célula folicular tiroidea, donde posteriormente es transportado hacia el coloide por PDS. La segunda etapa es la organificación del yoduro mediada por la TPO, y consiste en la iodación de los residuos de tirosina de la TG formando MIT y DIT. Posteriormente las iodotirosinas se acoplan para formar T4 y T3. La última etapa consiste en la hidrólisis de TG en los fagolisosomas y el transporte de T4 y T3 hacia la circulación sanguínea.

Conforme al trabajo desarrollado en la presente tesis, se enfatizará sobre el proceso de captación de yoduro, así como en la síntesis de iodotirosinas sobre la molécula de TG.

### 1.2.1 Captación de yoduro.

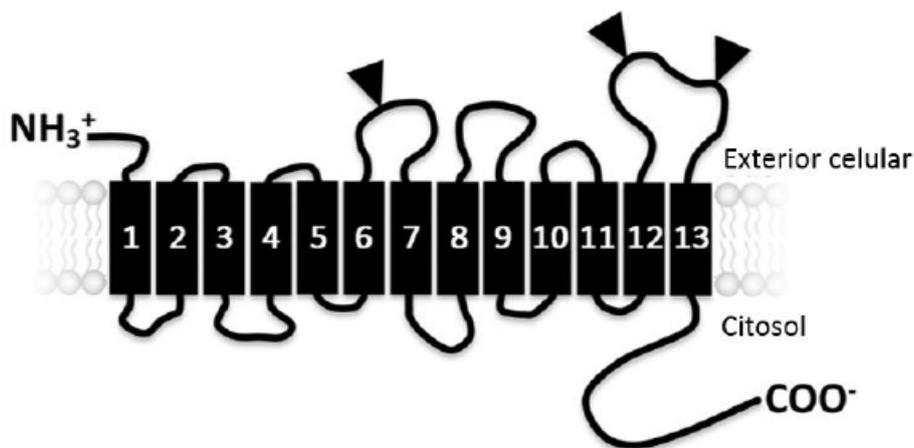
La síntesis de las cantidades necesarias de hormonas tiroideas para satisfacer las demandas metabólicas requiere la disponibilidad de cantidades adecuadas de yoduro

dietario para permitir una captación tiroidea de aproximadamente 60 a 75  $\mu\text{g}$  diarios, teniendo en cuenta las pérdidas fecales de 10 a 20  $\mu\text{g}$  de yoduro y 100 a 150  $\mu\text{g}$  de yoduro urinario en poblaciones con iodo suficiencia (11). Se requieren al menos 100  $\mu\text{g}$  de iodo por día para eliminar todos los signos de deficiencia de iodo (12).

Una vez ingerido, el yoduro se absorbe rápida y eficientemente en el tracto gastrointestinal y una escasa cantidad se pierde en las heces. El yoduro en el líquido extracelular es rápidamente acumulado en la glándula tiroides, aunque una fracción está presente en la saliva, el jugo gástrico y durante la lactancia en la leche materna. La concentración de yoduro en el líquido extracelular es normalmente de 10 a 15  $\mu\text{g} / \text{L}$  ( $\sim 10^{-7} \text{ mol} / \text{L}$ ) y el contenido de la reserva periférica es de aproximadamente 250  $\mu\text{g}$ . La tiroides contiene la mayor cantidad de iodo corporal, en circunstancias normales aproximadamente 8000  $\mu\text{g}$ , la mayoría de los cuales se encuentran en forma de DIT y MIT. Normalmente, esta reserva de iodo se transforma lentamente (alrededor del 1% por día) (3).

Como se ha mencionado anteriormente, NIS media el transporte activo de yoduro en la membrana basolateral de la célula folicular tiroidea. En humanos, el gen *SLC5A5*, que codifica NIS, se encuentra en el cromosoma 19p12-13 con un marco de lectura abierto de 1929 nucleótidos que codifica una proteína transmembrana de 643 aminoácidos con una masa molecular de aproximadamente 50 kDa. La región codificante de NIS comprende 15 exones que abarcan 23,2 kb, y codifican para un mRNA de 3,9 kb (13). El modelo de estructura secundaria de NIS validado experimentalmente predice una proteína con 13 segmentos transmembrana, un segmento amino terminal extracelular y un segmento carboxilo terminal intracelular (14). NIS presenta tres sitios de N-glicosilación en las asparaginas N225, N489 y N502, localizadas en el tercer y el sexto loop extracelular (Figura 2) (15). Debido a estos sitios de N-glicosilación, NIS es una proteína altamente glicosilada, y en su forma madura completamente glicosilada, al menos en la célula folicular tiroidea, NIS presenta un patrón electroforético de 90 a 100 kDa, mientras que en su forma inmadura parcialmente glicosilada tiene un patrón de aproximadamente 60 kDa (16). Al respecto, la forma inmadura de NIS corresponde a la proteína en proceso de síntesis localizada en el retículo endoplásmico (RE) o en algún compartimento anterior al Golgi medio, mientras que la forma madura se encuentra en su ruta de transporte hacia la membrana plasmática, luego del Golgi medio donde adquiere la maduración del árbol glicosídico, o en la membrana plasmática (16,17).

Además de expresarse en la membrana basolateral de la célula folicular tiroidea, NIS también se ha identificado en otros tejidos capaces de concentrar yoduro, tales como las glándulas salivales, glándulas mamarias lactantes, el plexo coroideo, la mucosa gástrica y la placenta (18,19). En la glándula mamaria lactante, NIS juega un papel importante al concentrar el yoduro en la leche materna, proporcionando así este oligoelemento para favorecer la síntesis de hormonas tiroideas en los recién nacidos.



**Figura 2. Representación esquemática de la estructura secundaria de NIS.** Se encuentran numerados los 13 pasos transmembrana, el segmento amino terminal extracelular (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), el segmento carboxilo terminal intracelular (COO<sup>-</sup>) y los 3 sitios de N-glicosilación (señalados con triángulos).

Por otra parte, es importante mencionar que NIS tiene afinidad por otros sustratos tales como el perclorato (ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>), tiocianato y pertecnetato. La relevancia clínica del pertecnetato radioactivo radica en su utilidad como herramienta exploratoria de la captación de yoduro en la célula folicular tiroidea, mientras que el perclorato bloquea por inhibición competitiva la captación de yoduro y es utilizado en la prueba de descarga de perclorato para la evaluación de defectos en la organificación del yoduro (16,20). Cabe mencionar que la afinidad de NIS por el yoduro es mucho mayor que por otros aniones halógenos, como el bromuro y el cloruro, lo que representa la selectividad del mecanismo de transporte de yoduro en la célula folicular tiroidea (21).

### 1.2.2 Síntesis de iodotirosinas.

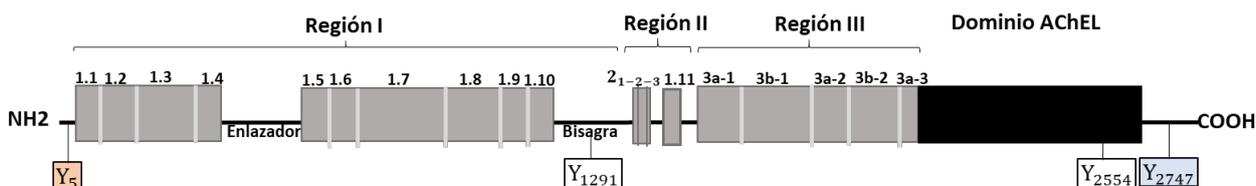
Como se ha mencionado anteriormente, el yoduro intracelular es transportado hacia lumen del folículo tiroideo por proteínas que se encuentran en la membrana apical del tirocito, tales como la pendrina (22), anoctamina (7) y el canal de cloruro CLC5 (23). Posterior a su oxidación, el yoduro en el lumen folicular reacciona con las moléculas de TG, específica y preferencialmente con los residuos de tirosina que están más cerca de la membrana plasmática apical, ya que esta es un área enriquecida en TG recientemente secretada que también es accesible para la internalización endocítica (8,24).

En cuanto al gen que codifica para la TG humana, este tiene ~270 kb y está localizado en el cromosoma 8q24.22, con niveles de expresión muy altos en los tirocitos, característica distintiva de la glándula. El gen *TG* está organizado en 48 exones con tamaños que van desde los 63 a 1101 nucleótidos y contiene intrones de tamaño variado (8). El mRNA de TG tiene una longitud de aproximadamente 8,5 kb (2).

La estructura proteica de la TG tiene una masa molecular monomérica de ~330 kDa y ~2750 residuos aminoácidos (después de la escisión del péptido señal) (25) y consta de distintos módulos: cuatro repetidos de TG tipo 1, un segmento enlazador, seis repetidos adicionales de tipo 1, un segmento bisagra, tres repetidos de TG tipo 2, un repetido final de tipo 1, cinco repetidos de tipo 3 (8), y la región carboxi-terminal de TG,

que muestra homología con la superfamilia de acetilcolinesterasa y se conoce como dominio similar a colinesterasa (AChEL) (8,25) (Figura 3). En cuanto a los tipos de repetidos, los de tipo 1 destacan por una secuencia central de aminoácidos CWCV y se subdividen en 1A (que contiene seis residuos de cisteína) y 1B (que contiene cuatro residuos de cisteína), los de tipo 2 tienen dos residuos de cisteína en un intervalo corto de 14 a 17 residuos, mientras que los de tipo 3 se subdividen en 3A (con ocho residuos de cisteína) y 3B (con seis residuos de cisteína) (8,25).

Recientemente se determinó la estructura tridimensional completa de la TG humana mediante microscopía electrónica criogénica. En este trabajo, además de identificarse los 4 residuos tirosina claves para síntesis de hormonas tiroideas, también se resolvieron 12 sitios de N-glicosilación previamente reportados, y 4 nuevos que no habían sido identificados previamente. A partir de este hallazgo se podrá entender con mayor profundidad como se lleva a cabo la síntesis de HT, y de qué forma afectan las mutantes de TG a su estructura proteica (26). Cabe mencionar que en este artículo se propuso una nueva representación de la estructura secundaria de la TG que difiere un poco de la representación clásica, sin embargo, para este trabajo de tesis se seguirá utilizando la representación clásica (Figura 3).



**Figura 3. Representación esquemática clásica de la estructura secundaria de TG.** La estructura proteica de los monómeros de TG está organizada en 3 regiones compuestas por repetidos ricos en cisteína, la región enlazadora, bisagra, y el dominio AChEL. Tiroglobulina contiene ~ 70 residuos de tirosina; sin embargo, solo unos pocos residuos de tirosina son capaces de sintetizar hormonas tiroideas. T4 se forma principalmente en un sitio conservado cerca del amino terminal (rojo) y minoritariamente en el residuo 1291, mientras que T3 se sintetiza principalmente en el residuo conservado 2747 en el carboxilo terminal (azul) y en menor medida en él 2554.

La iodación de TG se ve favorecida principalmente por la exposición de residuos tirosilo en la superficie de la estructura terciaria y/o cuaternaria de la proteína y, además, podría verse afectada por la secuencia de aminoácidos que flanquean inmediatamente estos residuos (8).

En cuanto al mecanismo del acoplamiento de los residuos de iodotirosina, este siempre involucra dos de estos, uno de los cuales (denominado residuo donante) pierde su anillo iodofenólico para convertirse en deshidroalanina. Tanto DIT como MIT pueden ser un residuo donante, pero para generar hormonas tiroideas, el residuo aceptor debe ser DIT. Después del acoplamiento, el residuo aceptor lleva finalmente una cadena lateral de aminoácidos de dos anillos fenólicos, donde el anillo exterior deriva de un donante DIT (que se convertirá en T4) o MIT (que se convertirá en T3), y este producto de dos anillos todavía está unido covalentemente a la secuencia polipeptídica de TG (8). El producto final de dicho acoplamiento es la formación de iodotironina.

Cuando existe un aporte suficiente de yoduro, cada molécula de TG contiene 7 residuos de MIT, 5 de DIT y 2 de T4, mientras que sólo una de cada tres moléculas de TG contiene 1 residuo de T3 (3,8).

El mantenimiento de la homeostasis y la fisiología tiroidea dependen de una provisión adecuada de yoduro y el correcto funcionamiento de las proteínas involucradas en cada uno de los pasos metabólicos desarrollados anteriormente. La pérdida de función de los genes que codifican para estas proteínas especializadas interrumpe parcial o totalmente la producción de hormonas tiroideas y las consiguientes manifestaciones de enfermedad tiroidea, mejor conocidas en su conjunto como hipotiroidismo congénito.

### 1.3 Hipotiroidismo congénito.

El HC es la enfermedad congénita del sistema endocrino más frecuente en pacientes pediátricos con una incidencia estimada en Argentina de 1: 2500 recién nacidos. El HC se define como la deficiencia funcional de las hormonas tiroideas presente al nacimiento, y si no se detecta y corrige con terapia sustitutiva hormonal en tiempo y forma, puede causar un deterioro grave del desarrollo neurológico, constituyendo la causa endocrina evitable más común de retraso mental irreversible (27,28).

El HC se clasifica en tres tipos principales: en orden de prevalencia, en primer lugar se encuentra el HC primario, que se subclasifica en dishormonogénico donde el paciente tiene una glándula tiroidea eutópica con defectos genéticos que interrumpen la síntesis de hormonas tiroideas, y la disgenesia tiroidea que consiste en el desarrollo aberrante de la glándula tiroidea que puede ser hipoplásica (de menor tamaño), ectópica (anormalmente situada) o ausente (atireosis) (2,29). En segundo lugar se encuentra el hipotiroidismo central o secundario, que es provocado por una estimulación insuficiente de una glándula normal, y es el resultado de una enfermedad hipotalámica o pituitaria o defectos en la molécula de TSH (2). Por último, y frecuentemente excluido de la clasificación de HC, la resistencia a la acción de las hormonas tiroideas (RHT), la cual a su vez se sub clasifica en tres tipos: Alteraciones en las proteínas que permiten el ingreso de las hormonas tiroideas a los órganos diana tales como las mutaciones en el gen *MCT8* que codifica para el transportador de monocarboxilato 8, responsable del síndrome de Allan-Herndon-Dudley (30); defectos en el metabolismo de las hormonas tiroideas como resultado de mutaciones en el gen *SECISBP2* que participa en la síntesis de selenoproteínas tales como las desiodasas de iodotironinas (2,30); y la forma más común de RHT que son los defectos en el receptor nuclear de hormonas tiroideas (TR) asociado con niveles circulantes elevados de hormonas tiroideas (2,30).

En cuanto al hipotiroidismo primario, el ~80% de los casos es atribuido a disgenesia tiroidea y el 20 % restante a dishormonogénesis tiroidea. Mientras que la disgenesia se presenta generalmente sin un patrón de herencia claro y es frecuentemente esporádica, la dishormonogénesis se presenta frecuentemente con un patrón de herencia autosómico recesivo. El HC primario puede ser permanente o transitorio, y comprometer sólo la función tiroidea o asociarse a malformaciones de otros órganos o sistemas, a lo que se le denomina sindrómico (31,32).

Considerando que el HC constituye la causa más frecuente de retraso mental prevenible, como acción de salud pública, la ley nacional N°26.279 establece la obligatoriedad de la pesquisa neonatal para su detección durante las primeras semanas de vida permitiendo instaurar una pronta terapia hormonal de reemplazo con L-tiroxina oral, protegiendo el desarrollo del sistema nervioso central. Actualmente, la determinación de TSH en sangre seca en papel de filtro es considerada el indicador más confiable para la pesquisa (32), aunque su utilidad diagnóstica solamente se limita a HC primario.

### 1.3.1 Diagnóstico de Hipotiroidismo congénito.

Dados los efectos devastadores del HC en el desarrollo neurocognitivo, el diagnóstico bioquímico de la patología debe realizarse como un cribado neonatal dentro de las primeras 48 a 72 horas después del nacimiento, evaluando los niveles de TSH o TSH y T4 libre o T4 total (27). Asimismo, la implementación del gammagrama (utilizando isótopos del yoduro) y la ecografía tiroidea ayuda a mejorar la precisión diagnóstica, así como a identificar las diferentes formas de disgenesia tiroidea, especialmente para prevenir el diagnóstico incorrecto de atireosis en el contexto de una ausencia de captación en el gammagrama cuando una ecografía muestra una glándula normal *in situ* (33). Otras pruebas diagnósticas como la relación yoduro saliva / yoduro sérico, la prueba de descarga de perclorato, dosaje de TG, anticuerpos bloqueantes del receptor de TSH y dosaje de yoduro urinario, pueden usarse para determinar la etiología subyacente de la enfermedad y dar una descripción fenotípica más detallada del paciente (34). Estos parámetros bioquímicos e imagenológicos se modifican con el tratamiento hormonal, por lo que cualquier inferencia diagnóstica con posterioridad al inicio de la terapia pierde validez (35,36). Por ello, en pacientes con confirmaciones diagnósticas incompletas, se recomienda suspender el tratamiento hormonal a los 2 o 3 años de vida para reevaluar la permanencia del cuadro hipotiroideo, su severidad y la etiología probable para lograr un adecuado diagnóstico y así modificar o suspender, si fuera necesario, el tratamiento (32). La caracterización inicial o la revaloración señalarán un camino probable de estudio molecular dirigido a los diferentes genes que regulan la biosíntesis hormonal o los escasos genes conocidos que participan en el desarrollo glandular. En este sentido, las nuevas guías de consenso de la Sociedad Europea de Endocrinología Pediátrica recomiendan realizar un estudio genético molecular de los pacientes con HC, no sólo para brindarle asesoramiento genético a la familia, sino también para encontrar nuevos genes candidatos que estén implicados en el desarrollo de esta patología (37). Al respecto, en los últimos 20 años, se han realizado importantes progresos en la identificación de diferentes formas monogénicas del HC primario que se relacionan a mutaciones en múltiples genes: A) Genes causales de disgenesia tiroidea: *CDCA8*, *GLIS3*, *GNAS*, *FOXE1*, *JAG1*, *NKX2-1*, *NKX2-5*, *PAX8*, *TSHR* (29,38); B) Genes causales de dishormonogénesis: *IYD*, *DUOX2*, *DUOXA2*, *SLC5A5*, *SLC26A4*, *SLC26A7*, *TG*, *TPO*, *TUBB1* y *TRCP4AP* (39).

Una variante particular y poco común de HC es el síndrome autosómico recesivo conocido como deficiencia en el transporte de yoduro, o ITD por sus siglas en inglés, el cual es causado por mutaciones en el gen *SLC5A5* que codifica para NIS, generando una inhabilidad en la célula folicular tiroidea para acumular yoduro (6). Clínicamente, los

pacientes con *ITD* presentan acumulación tiroidea y/o salival reducida o ausente de  $^{123}\text{I}$ -ioduro o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pertecnato, relación baja de ioduro saliva / ioduro plasma, eventual agrandamiento de la tiroides (bocio) y niveles de TG en suero normales o elevados (16,40).

En cuanto a los pacientes con defectos en el gen *TG*, estos normalmente se acompañan de captación de ioduro intacta, prueba de descarga de perclorato negativa, niveles bajos de TG sérica y la mayoría presentan bocio (41).

Dadas las mutaciones causantes de HC que se reportan en este trabajo de tesis, se hará hincapié en analizar las mutaciones que afectan la función de NIS y *TG*, y cuál es el impacto que estas tienen en el desarrollo de HC dishormonogénico.

### 1.3.2 Las mutaciones en los genes *SLC5A5* y *TG* como causas de hipotiroidismo congénito dishormonogénico.

Hasta la fecha, se han reportado 36 variantes distintas en el gen *SLC5A5* (Tabla 1):

**Tabla 1. Variantes reportadas en el gen *SLC5A5* humano.**

cDNA		Proteína	Referencia
Variante	Exón	Variante	
c.-54C>T	5'UTR	-	(40)
c.52G>A	1	p.G18R	(42)
c.152del	1	p.G51*	(43)
c.176T>A	1	p.V59E	(44)
c.279G>C	1	p.G93R	(45)
c.371G>A	2	p.R124H	(46)
c.424_969del	3 a 6	p.M142_Q323del	(47)
c.469delA	3	p.N157Tfs*2	(48)
c.572A>G	5	p.D191G	(49)
c.749G>T	6	p.G250V	(50)
c.794A>G	6	p.G265R	(51)
c.799C>G	6	p.Q267E	(52)
c.809T>A	6	p.V270E	(34)
c.816C>A	6	p.C272*	(53)
c.859_864del	7	p.V287_G288del	(54)
c.958G>A	7	p.A320T	(55)
c.970-3C>A	intrón 7	p.Y324Hfs*148	Esta tesis
c.970_1526del	8 a 12	p.Y324Lfs*12	(56)
c.991G>A	8	p.D331N	Esta tesis (16)
c.1042T>G	8	p.Y348D	(57)
c.1060A>C	9	p.T354P	(58)
c.1106A>T	9	p.D369V	Esta tesis
c.1126C>T	9	p.R376W	(55)
c.1157T>G	9	p.I386S	(49)
c.1162A>T	9	p.K388*	(49)
c.1183G>A	10	p.G395R	(59)
c.1261G>A	11	p.G421R	(43)
c.1315_1329del	11	p.A439_P443del	(60)
c.1546C>T	13	p.R516*	(42)

c.1593C>G	13	p.S509Rfs*6 y p.Y531*	(52)
c.1628G>A	13	p.G543E	(45)
c.1641C>A	13	p.S547R	Esta tesis (16)
c.1679C>T	14	p.P560L	(55)
c.1682G>A	14	p.G561E	(61)
c.1906C>T	15	p.R636*	(48)
c.1915C>T	15	p.Q639*	(62)

La posición de los nucleótidos se designa de acuerdo con la secuencia de mRNA del gen *SLC5A5* de *Homo sapiens* reportada en la secuencia de referencia NM\_000453.3 del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). La A del ATG del codón iniciador de metionina se denota como el nucleótido +1.

Debido a la ausencia de una estructura cristalina para NIS, se ha obtenido valiosa información mecanística y estructural caracterizando las posiciones de los aminoácidos que se han encontrado mutados en pacientes con *ITD*; dicha caracterización ha sido muy útil para revelar regiones de la proteína que son esenciales para su función, ya sea para su correcto plegamiento, localización en membrana plasmática o actividad transportadora. En este sentido, varias de estas mutaciones han permitido determinar los requisitos moleculares que deben cumplirse para el correcto funcionamiento de NIS, tal es el caso de la variante p.G561E descubierta y caracterizada por nuestro grupo de trabajo. Los resultados de la caracterización molecular de esta variante localizada en el extremo carboxilo terminal, revelan que produce una proteína inmadura que es severamente retenida a nivel de RE. La mutación del residuo 561 no elimina la actividad intrínseca de la proteína como quedó demostrado en los experimentos de captación de yoduro en vesículas selladas de endomembranas, pero si provoca un cambio conformacional de un motivo triptófano ácido adyacente a la posición 561, lo que provoca su retención a nivel de RE debido a que reduce la interacción de NIS y la Cadena Liviana 2 de la Kinesina-1 (KLC2) que reconoce este motivo (61).

En este contexto, es importante señalar que existen varios factores tales como el efecto de la mutación sobre la función de NIS y la cigosidad de la variante que condicionan tanto el fenotipo clínico y bioquímico del paciente como la aparición de la enfermedad, que puede ir desde un eutiroidismo compensado hasta un severo hipotiroidismo, e instaurarse en el período fetal o en la infancia (46). Por ejemplo, pacientes con mutaciones en homocigosis para la variante p.R124H desarrollan un cuadro de HC severo (46), mientras que aquellos con la variante p.G561E desarrollan solamente un cuadro leve de HC (61). Otro factor importante son los niveles de la ingesta de yodo en la dieta, debido a que existen reportes de pacientes donde la actividad residual mínima de la mutante de NIS p.T354P en combinación con una ingesta alta de yoduro en la dieta, favorece un mínimo ingreso de yoduro a la glándula tiroidea permitiendo una mínima biosíntesis hormonal (63). Así mismo, se demostró que al alimentar a ratones NIS KO con una dieta alta en yodo, se rescató parcialmente la biosíntesis de hormonas tiroideas, evidenciando que el yoduro, en altas concentraciones, es capaz de entrar en la célula folicular tiroidea por vías distintas a NIS (64).

Otra causa de HC dishormonogénico son las mutaciones en el gen *TG*, estas se heredan de forma autosómica recesiva y se estima que tienen una incidencia global de uno en cada 100 mil recién nacidos (65). Durante las últimas décadas, se han reportado 229 variantes en el gen *TG* humano: 28 variantes en sitios de *corte y empalme de RNA* (19 en sitios donadores y 7 en sitios aceptores), 42 variantes que codifican para un codón de terminación prematuro, 130 variantes con cambio de sentido (*missense*) (18 ubicadas en los residuos de cisteína originales, 7 que originan nuevos residuos de cisteína, 27 en el dominio de homología de AChEL y 78 ubicadas en el resto del monómero de TG), 5 duplicaciones (4 individuales y 1 múltiple), 2 inserciones (1 múltiple y 1 que involucra una gran cantidad de nucleótidos), 21 deleciones (13 simples, 4 múltiples y 4 que involucran una gran cantidad de nucleótidos) y 1 inversión imperfecta del DNA (66).

Las mutaciones de TG p.C1058R y p.C1977S son las más frecuentes en la población japonesa, mientras que la variante p.R277X es la que más se reporta en individuos caucásicos de familias de Brasil, Argentina, España y Francia (8,67). Esta última mutante de TG produce una proteína trunca que carece del dominio central y carboxilo terminal. Los transcritos producidos por estas mutaciones pueden ser un objetivo de la vía de degradación del RNA mensajero mediada por mutaciones sin sentido (NMD, por sus siglas en inglés), que es un mecanismo de supervivencia celular encargado de identificar y degradar rápida y selectivamente aquellos transcritos con codones de paro prematuros (68). En caso de que dichos transcritos escapen al control de la vía NMD, estos producirán proteínas mutantes de TG con un defecto de plegamiento, que serán retenidos en RE y posteriormente degradados (8,69). A pesar de estos controles, se postula que es posible que cantidades limitadas de TG mutante que conserve parte de su extremo N-terminal y algún segmento repetido tipo I, llegue al lumen folicular, permitiendo que se lleve a cabo la iodación de residuos tirosina y la potencial síntesis de hormonas tiroideas (8,68). La base de esta hipótesis es el desarrollo de HC moderado en pacientes homocigotos para la variante p.R296X(41).

Por otra parte, es sabido que la mayoría de las mutantes de TG tienen defectos de plegamiento que les impide fungir como matriz para la síntesis de T3 y T4. Un ejemplo de esto son las mutaciones con cambio de sentido que eliminan o agregan residuos cisteína claves para la formación de enlaces disulfuro, alterando la arquitectura normal de TG, y posiblemente obstaculizando la interacción de los sitios aceptores y donadores hormonogénicos y/o provocando un defecto en el transporte intracelular de la proteína (68,70). Así mismo, se ha confirmado que variantes patogénicas con cambio de sentido presentes en el dominio AChEL pueden provocar su retención en el RE y posterior degradación prematura (70). Por último, se ha documentado una copiosa cantidad de variantes que afectan sitios donadores o aceptores de corte y empalme del pre-mRNA de TG, y que son capaces de inducir HC en humanos debido a que comúnmente los exones involucrados son omitidos del pre-mRNA, provocando un corrimiento del marco de lectura y la aparición de un codón de terminación prematuro que da lugar a la formación de una proteína trunca (71).

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El HC es el trastorno endocrino más frecuente en pacientes pediátricos, y en América Latina tiene una incidencia estimada de 1 por cada 2500 recién nacidos (28), y si no se detecta y trata a tiempo puede causar un deterioro grave del neurodesarrollo, constituyendo la causa endocrina prevenible más común de retraso mental irreversible (3). Dados los efectos devastadores en el desarrollo neurocognitivo, el diagnóstico clínico de HC debe realizarse como un cribado neonatal entre las primeras 48 a 72 horas después del nacimiento (27). Así mismo, las recientes guías de consenso de la Sociedad Europea de Endocrinología Pediátrica recomiendan realizar un estudio genético molecular precedido de una descripción fenotípica cuidadosa de los pacientes con HC con el fin de brindar un asesoramiento genético adecuado a la familia e identificar nuevos genes responsables de esta patología (37). Sin embargo, aunque existen varios genes conocidos causantes de HC y sus alteraciones podrían estar relacionadas con hallazgos clínicos específicos, solo en el 5-10% de los pacientes con disgenesia tiroidea (29) y 50-90 en pacientes con dishormonogénesis es identificable una causa genética (72), es decir, que existe un gran porcentaje de pacientes cuya enfermedad tiene una etiología genética desconocida.

Para superar esta desventaja, las tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) representan una herramienta promisoriosa para profundizar nuestro conocimiento acerca de las enfermedades genéticas complejas, y así mismo incrementar las probabilidades de éxito en el diagnóstico molecular del HC. En este sentido, aunque las regiones codificantes constituyen solamente el ~1% del genoma humano, albergan el ~85% de las mutaciones responsables de enfermedades genéticas (73). Es por esto que las distintas estrategias para secuenciar selectivamente las regiones codificantes del genoma, tienen el potencial de contribuir a la comprensión de enfermedades humanas raras y complejas.

Con base en los antecedentes planteados previamente, el objetivo general de este trabajo consiste en establecer tecnologías que permitan el estudio molecular del HC para brindar soluciones diagnósticas con impacto directo en la salud pública. A tal fin, se desarrollarán los siguientes objetivos específicos:

1. Aplicar tecnologías basadas en secuenciación masiva para el abordaje diagnóstico de enfermedades congénitas hereditarias de la glándula tiroides.

- 1.1 Profundizar en el diagnóstico molecular de pacientes con hipotiroidismo congénito dishormonogénico con fenotipo de defecto en el transporte de yoduro mediante la estrategia de secuenciación del gen candidato *SLC5A5*.

- 1.2 Desarrollar una estrategia de diagnóstico molecular basada en el análisis de paneles de genes asociados al desarrollo de hipotiroidismo congénito mediante secuenciación de nueva generación.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Protocolo de investigación clínica.

El protocolo de investigación clínica ha sido aprobado por los comités de ética del Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez (Buenos Aires) y del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad (Córdoba). El estudio se realizó con el consentimiento informado por escrito de los pacientes y/o padres antes de su inclusión en el estudio. En el presente trabajo de tesis se analizaron los datos clínicos, bioquímicos e imagenológicos de una cohorte de 17 pacientes no relacionados entre sí con diversos tipos de HC permanente.

#### 3.2 Purificación de DNA genómico

El DNA genómico de los pacientes en estudio fue obtenido de leucocitos circulantes en sangre periférica utilizando el kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega).

#### 3.3 Secuenciación del gen *SLC5A5*.

El análisis de la secuencia del gen *SLC5A5* se realizó mediante amplificación por PCR de los distintos exones que componen el gen (Tabla 2), considerando la importancia de las uniones intrón-exón, y posterior secuenciación de los productos de PCR por el método de Sanger en electroforesis capilar (Macrogen) (34,40). La posición de los nucleótidos en el RNA mensajero de NIS humano se designó de acuerdo con la secuencia de referencia NM\_000453.3. Mediante esta estrategia de secuenciación se analizó a los pacientes 1-6 en función de su fenotipo compatible con un defecto en el transporte de yoduro.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar los exones del gen *SLC5A5* y posterior secuenciación.

Primer	Secuencia	Producto
Exon 1.1-F	GCCTGTCTGTCCCAGTCCAG	541 pb
Exon 1.1-R	TAGTCCCAGGCTCCGAAGGT	
Exon 1.2-F	CTTCCCCGCTTGAGCAC	511 pb
Exon 1.2-R	CCTGTACAGCGGCCAAAG	
Exon 2,3 y 4-F	GGGCCACCTAGAGAGCAGA	756 pb
Exon 2, 3 y 4-R	AAGCCCAGAGTCTCCCACA	
Exon 5-F	GGCATCAGTCCTAGGCACCA	471 pb
Exon 5-R	AGCAATCCTCCAGCCTCAGC	
Exon 6 y 7-F	AACCCACTCCAAATGTCCCCTA	617 pb
Exon 6 y 7-R	CTGGCCTCCTCTCAGCTCTTTC	
Exon 8-F	TCTGAGCCCTGTCCGTCTTG	267 pb
Exon 8-R	ATGGCAGGCCAGGATAAGGA	
Exon 9 y 10-F	GGAGGGGAGGGGCAAATATC	452 pb
Exon 9 y 10-R	CCCCACCTCTCAGGAGACCA	
Exon 11 y 12-F	TCCCAGCGGGTAAACTGAGG	580 pb
Exon 11 y 12-R	GCCTTTGCACCTACCGTTCC	
Exon 13-F	CAGTTGGGGGAAGGAAGCAG	288 pb
Exon 13-R	GGTGGAGCCTTGAGGCAGAG	
Exon 14-F	TTGCCAGGGTCCCTTAGTGG	363 pb

Exon 14-R	GCGATGGAGAAAGGTGCTGA	620 pb
Exon 15-F	TCCCGCCAGGTCATCAGTAG	
Exon 15-R	GAGGTTGCAGTGAGCCGAGA	

### 3.4 Secuenciación por paneles de genes.

La secuenciación del panel de genes y análisis bioinformático se realizó en colaboración con la Dra. Frédérique Savagner (Institut Fédératif de Biologie, Toulouse, Francia). A tal fin, se utilizó un total de 10 ng de DNA genómico por paciente para la preparación de la biblioteca, utilizando el protocolo Ion AmpliSeq Library kit 2.0 (Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific) y un panel personalizado de dieciocho genes relacionados con el desarrollo de HC [*TG* (NM\_003235.4), *TPO* (NM\_000547.5), *DUOXA2* (NM\_207581.3), *DUOX2* (NM\_014080.4), *SLC5A5* (NIS, NM\_000453.2), *SLC16A2* (NM\_006517.4), *SLC26A4*, (NM\_000441.1), *TSHR* (NM\_000369.2), *GNAS1* (NM\_000516.4), *THRB* (NM\_000461.4), *THRA* (NM\_003250.5), *PAX8* (NM\_003466.3), *NKX2.1* (TTF1, (NM\_001079668.2), *NKX2.5* (NM\_004387.3), *FOXE1* (NM\_004473.3), *IYD* (NM\_001164694.1), *RXRG* (NM\_006917.4), *SECISBP2* (NM\_024077.4)]. La secuenciación se realizó en la plataforma Ion PGM (Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific). Las variantes incluidas en este trabajo tienen una cobertura mínima de secuenciación de 30x. Los datos provenientes del secuenciador se procesaron utilizando el software Torrent Suite (Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific) y comparado con un análisis independiente mediante NextGENe (Softgenetics) alineando las lecturas al genoma de referencia HG19. Las variantes detectadas por la plataforma Ion PGM se confirmaron mediante secuenciación dirigida de Sanger en un aparato ABI 3500xL utilizando el método BigDye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) (74). Mediante esta estrategia de secuenciación se analizaron los pacientes 7 a 16 y se reanalizó el paciente 3 previamente estudiado mediante secuenciación del gen candidato *SLC5A5*.

### 3.5 Secuenciación del exoma completo.

#### 3.5.1 Selección de pacientes.

Como criterio de selección se eligió aquellos casos que tuvieran un diagnóstico definitivo de alguna variante de HC y se contara con datos clínicos, bioquímicos e imagenológicos que sustentaran el diagnóstico de hipotiroidismo y una clara segregación genética de la enfermedad en su núcleo familiar.

Posteriormente, se analizó la historia clínica y familiar del paciente, los genes responsables de esta patología y se buscaron paneles de secuenciación comerciales que cubrieran las diferentes formas de HC relacionadas con el diagnóstico clínico. En base a esto se confeccionó una lista de genes candidatos cuya cobertura horizontal teórica fue revisada para el kit de captura utilizado. Mediante esta estrategia de secuenciación se analizó a la paciente 17 y los pacientes 4 y 16 previamente estudiados mediante secuenciación del gen candidato *SLC5A5* y panel de genes, respectivamente.

#### 3.5.2 Secuenciación de exoma.

La captura exónica se realizó con el kit de “*Agilent SureSelect Human All Exon V5*” y las muestras fueron secuenciadas mediante la tecnología “*Illumina HiSeq 4000*” (Macrogen) con una longitud de lectura de 100 pares de bases y una profundidad promedio de 100X.

### 3.5.3 Análisis bioinformático.

El preprocesamiento de los resultados que devolvió el secuenciador (lecturas y datos asociados) fue realizado en colaboración con el Dr. Marcelo Martí (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires). Brevemente, el análisis consistió en la utilización de un pipeline basado en las buenas prácticas de *Genome Analysis Toolkit* (GATK) del *Broad Institute* (75), que consta de los siguientes pasos: i) en control de calidad de las lecturas - con descarte de las que no superaran el umbral mínimo de calidad-, ii) mapeo-alineamiento, iii) llamado de variantes, (iv) anotación de las variantes y, finalmente, (v) análisis y priorización de las mismas en el contexto de la clínica de cada caso. Para ello, se utilizaron programas de libre acceso como *Burrows-Wheeler Aligner* (BWA) (76), Picard para alinear y mapear las lecturas con el genoma humano de referencia, GATK “*HaplotypeCaller*” como llamador de variantes (77) y *Genetic variant annotation and functional effect prediction toolbox* (SNPEff) (78) para la anotación de las mismas.

### 3.5.4 Priorización de variantes.

La priorización de variantes se hizo para seleccionar aquellas con mayor probabilidad de ser las causantes de la enfermedad del paciente. Para ello se utilizó la herramienta informática B\_Platform desarrollada por la empresa de base tecnológica Bitgenia (Buenos Aires, Argentina). Todas las variantes reportadas están descritas usando la nomenclatura de la *Human Genome Variation Society* (HGVS) y fueron exploradas usando bases de datos públicas y de licencia, incluyendo *Human Gene Mutation Database* (HGMD), *ClinVar*, *Genome Aggregation Database* (gnomAD), *1000 Genomes Project* (1000G), *Single Nucleotide Polymorphism* (dbSNP) y MalaCards así como búsquedas bibliográficas en PubMed. Las variantes se clasificaron de acuerdo con las pautas del *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (79).

### 3.6 Análisis *in silico*.

Las predicciones de variantes de cambio de sentido se realizaron utilizando las herramientas de software *Sorting Intolerant From Tolerant* (SIFT), *Polymorphism Phenotyping v2* (PolyPhen-2), *Mutation Taster2* e *InterVar*. Para las variantes intrónicas cercanas al sitio de empalme, se utilizaron las herramientas de software *GeneSplicer*, *Splice Site Prediction by Neural Network* (NNSplice), *Human Splicing Finder* (HSF), *MaxEntScan* (MES), *Alternative Splice Site Predictor* (ASSP) y *NetGene2*.

Los alineamientos múltiples de secuencias fueron realizados mediante T-Coffee (<http://tcoffee.crg.cat/>) (80). El modelo de homología de NIS fue realizado utilizando como template la estructura cristalina del transportador de sodio/galactosa de *Vibrio parahaemolyticus* (vSGLT) (PDB ID: 2XQ2) (81).

### 3.7 Plásmidos.

El vector de expresión conteniendo la secuencia codificante de NIS humano con una etiqueta hemaglutinina (HA) en su extremo extracelular amino terminal fue generosamente provisto por la Dra. Nancy Carrasco (Vanderbilt School of Medicine, EE.UU.).

El vector de expresión conteniendo la secuencia codificante de TG de ratón fue generosamente provisto por el Dr. Peter R. Arvan (University of Michigan EE.UU.).

El plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 usado para la edición genómica mediante la técnica de CRISPR/Cas9 fue adquirido en Addgene (Plasmid #48139).

El plásmido pSPL3 usado para la construcción de minigenes utilizados en el estudio de variantes que potencialmente afecten el empalme del RNA mensajero fue generosamente provisto por el Dr. Thomas v. O. Hansen (Copenhagen University Hospital, Denmark).

### 3.8 Mutagénesis sitio dirigida.

El desarrollo de mutaciones sitio-dirigidas de interés se realizó basándose en el método QuikChange (Stratagene). La PCR se hizo mediante el uso de primers que contenían las mutaciones deseadas para generar cada mutante (Tabla 3), y los productos de PCR fueron digeridos con la enzima DpnI (Promega). Posteriormente, los productos fueron transformados en bacterias competentes y se procedió a la amplificación y purificación del plásmido partiendo desde una colonia única. La presencia de las mutaciones generadas fue confirmada mediante secuenciación directa (Macrogen).

**Tabla 3. Primers utilizados para realizar mutagénesis sitio dirigida.** Las bases indicadas en negrita corresponden a aquellas involucradas en la modificación del codón de interés.

Secuencia Primer (5'>3')	Dirección	Mutante a generar
<b>AACATCTTCGAAGATCTGCCTGGAGTC</b>	Fw	p.D331N NIS
CAGCACCAGCAGAGGCATGTAC	Rv	
<b>CGATGCCTGACAGGCCCCACC</b>	Fw	p.S547R NIS
GATGAGGGCTCCGCACAGC	Rv	
<b>GTCCTCATCAAACCTCGGCTGCG</b>	Fw	p.D369V NIS
TTCTACAGTGACTGCAGCCATAGCATTG	Rv	
GCCATCTCCTATCTCTATTACT <b>AG</b> GCCCTGGG	Fw	p.Y531* NIS
TCCACGGCCTCCATGTAAT <b>AG</b> AGATAGGAGATGGC	Rv	
TGTGTCTCCTCCT <b>CCG</b> GACTGTCCAGTGC	Fw	c.177-2A>C TG
GCACTGGACAGT <b>CCG</b> GAGGAGGAGACACA	Rv	
CCCAGGGCACCTAATAG <b>AG</b> ATAGGAGATGGCA	Fw	c.1940C>G NIS
TGCCATCTCCTATCTCTATTAGGGTGCCTGGG	Rv	
GCTCGAGAGTCAGAG <b>AT</b> GGACGCCCAAGATG	Fw	p.G653D TG
CATCTTGGGCGTCC <b>AT</b> CTCTGACTCTCGAGC	Rv	
GCTGCTGCTGTATGGT <b>GTT</b> ACTCCTTGGAGCAC	Fw	p.Y2562C TG
GTGCTCCAAGGAGTA <b>AC</b> CCATACAGCAGCAGC	Rv	

### 3.9 Construcción de minigenes en pSPL3.

Para el estudio de la variante c.177-2A>C identificada en el exón 3 del gen que codifica TG, se amplificó mediante PCR la región codificante de los exones 2 y 3, abarcando ~250 nucleótidos de los intrones 1 y 3, utilizando primers específicos conteniendo sitios de restricción (indicado en subrayado) para las enzimas BamHI (Rv: 5'-cacaGGATCCGTGGCTCATGGGAGGAACTGGGTAG) y XhoI (Fw: 5'-cacaCTCGAGGCTGCCTGAGACTTGGTGCCTCATG) y una secuencia de cuatro nucleótidos (indicada en letras minúsculas) para favorecer el corte de la enzima de restricción. Los productos de PCR fueron resueltos en un gel de agarosa para verificar el tamaño del producto y posteriormente purificados para su clonado en los sitios de restricción BamHI y XhoI (Promega) del vector pSPL3. Una vez verificado que los fragmentos genómicos a estudiar se clonaron correctamente en pSPL3 mediante secuenciación de Sanger, se realizó una mutagénesis sitio dirigida para generar la mutante c.177-2A>C de TG usando los primers de la Tabla 3.

Para el estudio de la variante c.1940C>G identificada en el exón 13 del gen que codifica NIS, se amplificó mediante PCR la región codificante del exón 13 conjuntamente con 382 nucleótidos del intrón 12 y 399 nucleótidos del intrón 13, utilizando primers específicos conteniendo sitios de restricción (indicado en subrayado) para las enzimas XhoI (Fw: 5'-cacaCTCGAGTGGTGGCTTTTGTCTTTGG) y BamHI (Rv: 5'-tgtgGGATCCGAGCCAGGAGTTCGAGACA) y una secuencia de cuatro nucleótidos (indicada en letras minúsculas) para favorecer el corte de la enzima de restricción. Tal como se indicó previamente, los productos de PCR fueron resueltos en gel de agarosa, purificados y clonados en el vector pSPL3. Una vez verificado que los fragmentos genómicos a estudiar se clonaron correctamente en pSPL3 mediante secuenciación de Sanger se realizó una mutagénesis sitio dirigida para generar la variante c.1940C>G NIS usando los primers indicados en la Tabla 3.

En cuanto a la variante c.970-3A>C de NIS, se sintetizó el exón 8 (mayúsculas) y 160 pb de los intrones adyacentes (minúsculas) en su versión **WT** (*wild type*) gaattccaaaacaaaacaaaaccacagacaaaaactaaatgcatattaaatgccgactctgagccctgtccgtcttgggtgctggggacgtgcagcatcaggacagatagatgccccggtcctcgggggtcagctgtctgggaggctgacccccagttctcccagTACATGCCTCTGCTGGTGTGACATCTTCGAAGATCTGCCTGGAGTCCCCGGGCTTTTCC TGGCCTGTGCTTACAGTGGCACCCCTCAGgtgagcaccctgctgttcatggagcattatttcagcccctggggagcctcctatcctggcctgccatccctctggggcatggaatgttctggacctgtccatcagtcctcctgctgtatccctagaagacagctcaggtaggcctggcagagaggatcc) y **mutante** (indicada en negrita) gaattccaaaacaaaacaaaaccacagacaaaaactaaatgcatattaaatgccgactctgagccctgtccgtcttgggtgctggggacgtgcagcatcaggacagatagatgccccggtcctcgggggtcagctgtctgggaggctgacccccagttctcccaagTACATGCCTCTGCTGGTGTGACATCTTCGAAGATCTGCCTGGAGTCCCCGGGCTTTTCC TGGCCTGTGCTTACAGTGGCACCCCTCAGgtgagcaccctgctgttcatggagcattatttcagcccctggggagcctcctatcctggcctgccatccctctggggcatggaatgttctggacctgtccatcagtcctcctgctgtatccctagaagacagctcaggtaggcctggcagagaggatcc) conteniendo sitios de restricción (indicados en subrayado) para las enzimas de restricción EcoRI y BamHI para su clonado en el vector pUC57 (Macrogen). Los productos sintetizados fueron escindidos del vector pUC57 y sub-clonados en el vector pSPL3 utilizando las mencionadas enzimas de restricción.

### 3.10 Amplificación y purificación de plásmidos.

Los diferentes plásmidos fueron transformados en células bacterianas de *Escherichia coli* cepa DH5alfa (*E. coli* DH5alfa) competentes con cloruro de rubidio y sensibles a ampicilina y kanamicina (Stratagene). Las colonias transformadas mediante la estrategia de golpe de calor a 42 °C fueron seleccionadas por su resistencia al mencionado antibiótico.

La etapa de transformación se realizó incubando 100 µl de células competentes DH5alfa con la construcción de interés (10-100 ng) durante 30 min en baño de hielo y posteriormente se realizó un golpe de calor a 42 °C durante 90 s. Las bacterias transformadas fueron crecidas en medio LB no selectivo durante 60 min a 37 °C bajo agitación. Alícuotas de este cultivo (o bien el cultivo completo) fueron sembradas en medio LB sólido selectivo (100 µg/mL de ampicilina o 50 µg/mL de kanamicina) y cultivadas a 37 °C durante 12-16 h a fin de obtener las colonias bacterianas que incorporaron al plásmido. La purificación del DNA plasmídico se realizó utilizando el kit Wizard® Plus SV minipreps DNA purification system (Promega), siguiendo instrucciones del fabricante. El material plasmídico resultante fue cuantificado mediante su absorbancia a 260 nm y se evaluó la calidad de la purificación mediante la relación de absorbancias 260/280 nm y su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

### 3.11 Cultivos celulares.

La línea celular derivada de tiroides de rata Fisher FRTL-5 fue generosamente provista por la Dra. Nancy Carrasco y cultivada de manera similar a la descrita (5,16). Se utilizó como medio de crecimiento una mezcla en proporciones idénticas de Medio Eagle modificado por Dulbecco y la mezcla de nutrientes F12 (DMEM/F-12) (Gibco), suplementado con 5% v/v de suero de ternero inactivado por calor (GIBCO), 1 mUI/mL TSH bovina (generosamente provista por el Dr. Albert F. Parlow, *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Hormone and Peptide Program, National Institutes of Health, EE.UU.*), 10 µg/mL insulina bovina (Sigma-Aldrich), 5 µg/mL transferrina bovina, 2 µmol/mL glutamina y antibióticos (100 U/mL penicilina G, 100 µg/mL estreptomicina) (Sigma-Aldrich).

Las líneas celulares HEK293T y HeLa se obtuvieron del banco de líneas celulares del servicio de cultivo celular institucional y fueron cultivadas en Medio Eagle modificado por Dulbecco con alto contenido de glucosa (DMEM-HG), suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino inactivado por calor (NATOCOR), 2 µmol/mL glutamina y antibióticos (100 U/mL penicilina G, 100 µg/mL estreptomicina).

La línea celular IEC6 fue generosamente provista por la Dra. Nancy Carrasco y cultivada de manera similar a la descrita (82). Se utilizó para su crecimiento Medio Eagle modificado por Dulbecco con alto contenido de glucosa (DMEM-HG), suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino inactivado por calor (NATOCOR), 5 µg/mL insulina bovina (Sigma-Aldrich), 2 µmol/mL glutamina y antibióticos (100 U/mL penicilina G, 100 µg/mL estreptomicina).

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en condiciones de esterilidad en una atmósfera humidificada con 5 % de CO<sub>2</sub> en aire a 37 °C.

### 3.12 Ensayos de transfección.

Las líneas celulares fueron transfectadas de forma transitoria con el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo protocolos y recomendaciones indicadas por el fabricante. Se utilizaron cultivos en placas de 100 mm, 60 mm o placas múltiples de 6 pocillos dependiendo del caudal celular necesario para la actividad experimental. A tal fin, los cultivos celulares fueron transfectados a una densidad del 80 a 90% en medio de cultivo OptiMEM (Invitrogen). Los complejos DNA:Lipofectamina fueron incubados con el cultivo celular durante 6 h. Finalizada la incubación, el medio OptiMEM fue retirado y reemplazado por medio de crecimiento. A las 24 h posteriores a la transfección se procedió con las actividades experimentales diagramadas.

### 3.13 Captación de yoduro.

La captación de yoduro utilizando el trazador radiactivo <sup>125</sup>I-yoduro fue realizada en placas múltiples de 24 pocillos, en el caso de la línea celular HEK293T, la placa fue previamente tratada con poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich). La captación se realizó en medio de cultivo suplementado con 10 μM yoduro de potasio y 25 mCi <sup>125</sup>I/mmol yoduro (PerkinElmer) a 37 °C durante 30 min. Finalizado el período de incubación, las células fueron lavadas con solución salina balanceada de Hank fría a fin de eliminar la radiactividad no incorporada. El <sup>125</sup>I-yoduro incorporado por las células fue extraído mediante la incubación con etanol frío al 95% frío durante 20 min a 4°C. La radiación incorporada por las células fue determinada mediante un contador gamma Triathler Gamma Counter (Hidex) en el Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra. Luego de la extracción etanólica, el contenido celular no extraído se sometió a precipitación con ácido tricloroacético al 5% durante 20 min a 4°C. El material precipitado se incubó con reactivo de difenilamina a temperatura ambiente durante 12-16 h. Posteriormente, el complejo coloreado se evaluó espectrofotométricamente a 595 nm y la concentración de DNA presente fue calculada por comparación con una curva testigo de DNA de espermatozoos de salmón. Los resultados fueron expresados como pmol de yoduro por μg de DNA celular (pmol I<sup>-</sup>/μg DNA). Los datos de captación de yoduro fueron normalizados según la eficiencia de transfección calculada mediante citometría de flujo (ver detalles en sección 3.15).

### 3.14 Western blot (WB).

Las células se despegaron mecánicamente en PBS, se centrifugaron y se resuspendieron en 150 μl de buffer para lisados totales celulares conteniendo 50 mM HEPES (pH 7), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 250mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,1mM EGTA 0.1 mM y 0,1% Nonidet 40 suplementado con inhibidores de proteasas (1mM DTT, 1mM PMSF, 10 μg/mL pepstatina A, 10 μg/mL aprotinina, 10 μg/mL leupeptina) y se incubaron durante 15 min

en hielo. Posteriormente se centrifugaron a 10.000 xg durante 5 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se lo conservó a -70°C.

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y el análisis ulterior por inmuno-marcación fueron realizados como se describió previamente (82), utilizando el sistema Mini-Protean (Bio-Rad). Se utilizaron entre 20 y 50 µg de extractos proteicos totales, dependiendo de la proteína en estudio. Dichos extractos fueron resuspendidos en buffer de lisis para homogenizar el volumen y mezclados con buffer de siembra [62 mM Tris (pH 6.8), 10 % v/v glicerol anhidro, 2 % p/v SDS, 0,1 M DTT, 0,004 % azul de bromofenol]. Las muestras así preparadas fueron colocadas en baño termostático a 37°C durante 30 minutos o a 100°C durante 5 minutos para permitir la desnaturización y reducción de las proteínas, enfriadas en hielo, e inmediatamente sembradas en el gel resolutivo (6, 10 o 12% dependiendo del tamaño de la proteína en estudio). La corrida electroforética se realizó a 100 V constantes durante 2 h aproximadamente en solución de corrida conteniendo 192 mM de glicina, 25 mM Tris (pH 8,8) y 0,1% SDS. Una vez finalizada la corrida electroforética, las proteínas fueron electro-transferidas a membranas de nitrocelulosa de poro de 0.45 µm (Schleicher y Schuell) en buffer de transferencia conteniendo 192 mM glicina, 25mM Tris (pH 8,8) y 20% Metanol, siendo sometidas a una diferencia de potencial constante de 100 V (250-350 mA, 30-40 W) durante 60 min. Las membranas fueron incubadas en TBS-Tween [100 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20] suplementado con 5% seroalbúmina humana durante 60 min a temperatura ambiente bajo agitación permanente. Las membranas bloqueadas fueron incubadas con anticuerpos primarios dirigidos contra las proteínas de interés (Tabla 4) diluidos en solución de bloqueo por 1 a 2 h a temperatura ambiente, o bien durante toda la noche a 4°C, con agitación suave. Las membranas fueron lavadas con TBS-Tween a temperatura ambiente. La inmunodetección del anticuerpo primario se realizó por incubación con un anticuerpo secundario capaz de reconocer el isotipo del anticuerpo primario utilizado conjugado a fluoróforos IRDye (680LT) o VRDye (800CW) diluido en solución de bloqueo (Tabla 4) por 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. El exceso de anticuerpo secundario fue eliminado mediante lavados con TBS-Tween. Las bandas reactivas fueron visualizadas por revelado de la fluorescencia de los fluoróforos asociados a anticuerpos secundarios mediante el equipo Odyssey (LI-COR Biotechnology). La intensidad de las bandas fue determinada por densitometría mediante el software de análisis de imágenes ImageJ (National Institutes of Health).

**Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados.**

Anticuerpo	Isotipo	Catálogo-Fabricante	Dilución empleada
Anti-hNIS ETNL	Conejo	Desarrollado por la Dra. Nancy Carrasco	WB 1:3000 – IF y FACS 1:500
Anti-rNIS	Conejo	Desarrollado por la Dra. Nancy Carrasco	WB 1:3000

Anti-HA tag	Rata	ROAHAHA – Roche – Sigma Aldrich	IF y FACS 1:500
Anti-HA tag	Conejo	C29F4 – Cell Signaling	WB 1:1000 – IF 1:500
Anti-KDEL	Ratón	sc-58774 – Santa Cruz Biotechnology	IF 1:50
Anti- $\alpha$ -Tubulina	Ratón	T6074 – Sigma Aldrich	WB 1:400
Anti-Rat Alexa Fluor 488	Cabra	A11006 – Molecular Probes – ThermoFisher	IF y FACS 1:500
Anti-Mouse Alexa Fluor 594	Cabra	A11005 – Molecular Probes – ThermoFisher	IF y FACS 1:500
Anti-Rabbit Alexa Fluor 488	Cabra	A11008 – Molecular Probes – ThermoFisher	IF y FACS 1:500
Anti-mouse Tg	Conejo	ab156008-Abcam	WB 1:3000

### 3.15 Citometría de flujo.

Células HEK293-T fueron despegadas de la placa de cultivo con 0.05% de tripsina-EDTA y fijadas en PBS conteniendo 2% p/v de paraformaldehído.  $5 \times 10^5$  células/tubo fueron permeabilizadas, de ser necesario, en PBS conteniendo 0,2% saponina y 0,1% BSA, e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con anticuerpos primarios anti-HA o anti-hNIS (Tabla 4). Posteriormente se realizaron lavados previos a la incubación con los correspondientes anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón o conejo conjugados con Alexa 488 (Tabla 4). La fluorescencia de 10.000 a 50.000 células teñidas fue analizada con el citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA). La información obtenida fue analizada mediante el programa Flowjo\_V10 (Tree Star, Ashland, OR). La intensidad de fluorescencia fue graficada en una escala logarítmica y los parámetros singulares se analizaron como dot plots.

### 3.16 Inmunofluorescencia.

Las células cultivadas a baja densidad sobre cubreobjetos de 11 mm fueron fijadas en PBS conteniendo 2% p/v de paraformaldehído durante 15 min. De ser necesario, la permeabilización se realizó en solución de permeabilización y bloqueo conteniendo PBS (pH 7,4), 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 % BSA, 0,1 % Triton X-100 durante 10 min. La incubación con anticuerpos primarios (Tabla 4) se realizó en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de lavar las muestras tres veces con solución de bloqueo, se procedió a incubar durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 4). Posteriormente se realizaron 3 lavados con solución de bloqueo y los núcleos fueron teñidos durante 5 min con  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI). Finalmente se procedió a montar los cubreobjetos en portaobjetos utilizando FluorSave (EMD Millipore).

Las muestras fueron examinadas y fotografiadas a 600x de aumento en microscopio invertido confocal de fluorescencia (Confocal Fv1200 – Olympus Life Sciences) en el Centro de Micro y Nanoscopía de Córdoba.

### 3.17 Edición génica mediante CRISPR/Cas9.

El diseño de la secuencia del RNA guía (sgRNA) de Cas9 dirigido contra el exón 13 del gen *Slc5a5* que codifica para NIS de rata, se realizó mediante el uso del software Benchling. Primeramente, se seleccionó el genoma, el gen y el transcrito a editar, posteriormente el software diseña diferentes sgRNA dirigidos contra los exones del gen *Slc5a5* y mediante un algoritmo basado en la eficiencia de corte y el número posibles de cortes inespecíficos (*off-targets*) se asigna un puntaje a cada secuencia guía. En este caso se seleccionó la secuencia de mayor puntaje dirigida contra exón 13 de NIS (5'**CACCG**CTATCTCTATTACGGGGCTC3' /3'**C**GATAGAGATAATGCCCCGAG**CAA**5'). Posteriormente se añadieron sitios de restricción para la enzima BsbI (indicados en negrita) en los extremos 5' del sgRNA. Asimismo, se agregaron un par de bases G-C (subrayado) en la secuencia guía para favorecer su transcripción junto la secuencia promotora del plásmido. Una vez diseñado y sintetizado, el guía se clonó en el plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)v2.0 (Addgene) según el protocolo descrito (83). El correcto clonado fue evaluado mediante secuenciación de Sanger (Macrogen).

El plásmido conteniendo el sgRNA fue transfectado en la línea celular IEC6 conjuntamente con un oligonucleótido donador de DNA monocadena conteniendo la variante c.1940C>G (GGCCGCCCTGCCCTCGCTGATACCTTTTACGCCATCTCCTATCTCTATTAGGGGGCTCTCGGCA CGCTGACCACCATGCTTTGCGGTGCTCTCATCAGCTAC) para favorecer la reparación génica por recombinación homóloga. A las 24 h de transfección se reemplazó el medio de crecimiento por uno de igual composición conteniendo 1.5 mg/mL de Puromicina y se incubó durante 48 h. Posteriormente, se reemplazó el medio de selección por medio de crecimiento carente de Puromicina hasta observar la formación de clones. Se procedió a la selección de clones y crecimiento individual escalado de cada uno de ellos durante 15 días. Posteriormente se extrajo RNA con el kit Direct-zol™ RNA Miniprep (ZYMO RESEARCH) acorde a las instrucciones del fabricante, y se llevó a cabo la síntesis de cDNA mediante la reacción de transcripción reversa (RT) a partir de 1 µg de RNA total, y eventualmente se hizo una PCR convencional usando primers específicos para amplificar el exón 13 de NIS (Fw 5'-TTCCAACGGGATCCCCAGTTC y Rv 5'-GGATGTCTTCCGGTCCCTTC). Los productos de amplificación fueron resueltos en un gel de agarosa para verificar el tamaño del producto y posteriormente purificados para corroborar la edición génica mediante secuenciación directa (Macrogen).

### 3.18 Caracterización funcional de variantes de corte y empalme de RNA.

Los vectores reporteros de corte y empalme de RNA basados en el plásmido pSPL3, también llamados minigenes, se transfectaron transitoriamente en células HeLa o FRTL-5. Pasadas 48 h de la transfección, la extracción del RNA se realizó con el kit Direct-zol™ RNA Miniprep (ZYMO RESEARCH) acorde a las instrucciones del fabricante.

Posteriormente, realizó la síntesis de cDNA mediante la reacción de transcripción reversa (RT) a partir de 1 µg de RNA total, y eventualmente se hizo una PCR convencional usando primers específicos para los exones flanqueantes de pSPL3 (SD6 Fw: 5'-TCTGAGTCACCTGGACAACC y SA2 Rv: 5'-ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC o dUSD2 Fw: 5'-GTGAACTGCACTGTGACAAGCTGC y dUSA4 Rv: 5'-CACCTGAGGAGTGAATTGGTCG). Los productos de PCR fueron resueltos en un gel de agarosa al 2.5% para verificar el tamaño de los productos y posteriormente purificados para corroborar su secuencia mediante secuenciación directa (Macrogen).

### 3.19 Gestión de residuos peligrosos.

Se realizó con base a la normativa institucional, provincial y nacional establecidas en relación a la gestión de residuos peligrosos, Ley Nacional 24051: Residuos Peligrosos y documentos complementarios (Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Presidencia de la Nación), Ley Provincial N° 8973 (Agencia Córdoba Ambiente) y Resolución HCD 336/05: Gestión de Residuos Peligrosos (Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba).

### 3.20 Análisis estadístico.

El análisis de las diferencias múltiples entre grupos fue realizado por Análisis de Varianza (ANOVA). Los resultados se analizaron mediante estadística no paramétrica utilizando el test de Kruskal-Wallis y como post-test se utilizó el test de comparaciones múltiples de Dunn. Las comparaciones entre dos grupos fueron analizadas usando el test *t* de Student o el de Mann-Whitney para muestras no apareadas. Los test estadísticos fueron realizados con la utilización del software Prism 8.0 (GraphPad Software). Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Nuevas variantes del gen *SLC5A5* causantes de hipotiroidismo congénito.

Mediante una evaluación clínica, bioquímica e imagenológica meticulosa, se identificaron pacientes pediátricos con HC con fenotipo sugerente de *ITD*. Tras dicha identificación se procedió a realizar el diagnóstico molecular mediante la secuenciación de las regiones codificantes del gen candidato *SLC5A5* con la finalidad de conocer la etiología genética subyacente a la enfermedad de estos pacientes.

#### 4.1.1 Descripción de los pacientes y resultados de la secuenciación del gen *SLC5A5*.

El diagnóstico de HC de los pacientes 1 a 3 fue llevado a cabo mediante el programa de pesquisa neonatal del Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez (Buenos Aires) dirigido por la Dra. Ana Elena Chiesa, mientras que los pacientes 4 a 6 fueron diagnosticados mediante el programa de pesquisa neonatal del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad (Córdoba) dirigido por la Dra. Mirta Beatriz Miras.

El paciente 1 fue una bebé nacida a término en 1992 de padres sanos no consanguíneos. Al día 20 se detectó un nivel anormalmente alto de TSH en la pesquisa neonatal. Al día 28 se realizó la confirmación diagnóstica de hipotiroidismo congénito primario (Tabla 5). Los análisis de la función tiroidea se realizaron utilizando un sistema DELFIA (PerkinElmer). El estudio radiográfico reveló ausencia de osificación de los núcleos epifisarios de la rodilla. La suplementación con hormona tiroidea se inició el día 28 con una dosis diaria de 12.5 µg / kg de levotiroxina; sin embargo, la adherencia al tratamiento fue subóptima durante los primeros años de vida. A los 2.5 años de edad, después de la suspensión de levotiroxina durante un mes, la evaluación de la función tiroidea indicó HC persistente (TSH > 65 µU / mL, T4 total <1 µg / dL y T3 = 37 ng / mL). La ecografía mostró una glándula tiroidea correctamente ubicada y de tamaño normal. La centellografía reveló niveles de captación indetectables del trazador <sup>131</sup>I tanto a nivel de la glándula tiroidea como de glándulas salivales, lo que sugirió un defecto en la acumulación de yoduro. A los 13 años de edad, la evaluación mediante la prueba WISC-III demostró un coeficiente intelectual total de 82 (coeficiente intelectual verbal 84; coeficiente intelectual de rendimiento 82) con baja velocidad de procesamiento. Los padres eran clínica y bioquímicamente eutiroideos.

La secuenciación del gen *SLC5A5* reveló dos variantes de cambio de sentido en estado de heterocigosis compuesta: una transición heterocigota G>A en la posición +991 (c.991G>A) localizada en el exón 8 y una transversión heterocigota C>A en la posición +1641 (c.1641C>A) localizada en el exón 13, que se traducen en un cambio de ácido aspártico por asparagina en la posición 331 (p.D331N) y un cambio de serina por arginina en la posición 547 (p.S547R), respectivamente (Tabla 5, Figura 8A). La madre resultó

heterocigota para la variante c.1641C>A (p.S547R), y en cuanto al padre no fue posible obtener una muestra de material genético para su análisis.

El paciente 2 era una bebé postérmino (42 semanas), nacida en 1992 como la única hija de padres caucásicos (de ascendencia europea) bioquímicamente eutiroides, no consanguíneos. La medición de tiroglobulina no estaba disponible. La evaluación clínica neonatal reveló protrusión de la lengua, ictericia y llanto ronco. La radiografía reveló una osificación reducida del núcleo epifisario de la rodilla femoral. La suplementación con hormona tiroidea se inició el día 17 con una dosis diaria de 50 µg / día de levotiroxina con excelente adherencia al tratamiento durante los primeros años de vida. La dosis de levotiroxina se ajustó regularmente según las pruebas de función tiroidea. A los 2.5 años de edad, después de la suspensión de levotiroxina durante un mes, la evaluación de la función tiroidea indicó una enfermedad permanente (TSH> 65 µU / mL, T4 total=1 µg / dL y T3=30 ng / mL). La centellografía reveló una acumulación no detectable de <sup>131</sup>I en la glándula tiroides, así como en las glándulas salivales. A los 8 años de edad, la evaluación mediante la prueba WISC-III demostró un coeficiente intelectual total de 84 con un rendimiento lento en las habilidades visuoespaciales. Los padres de la paciente son bioquímica y clínicamente eutiroides.

La secuenciación del gen *SLC5A5* reveló dos variantes en heterocigosis compuesta: una transversión heterocigota C>A en la posición 970-3 localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 7 (c.970-3C>A) (Tabla 5, Figura 9A) y una transversión A>T en la posición +1106 del exón 9 (c.1106A>T) que codifica para un cambio de ácido aspártico por valina en la posición 369 (p.D369V) (Tabla 5, Figura 9A). En consistencia con la naturaleza recesiva de la enfermedad, la madre de la paciente es portadora heterocigota de la variante c.970-3C>A. El padre no estuvo disponible para un estudio genético.

En cuanto a los pacientes 3 a 6 se siguió la misma estrategia de diagnóstico y se secuenciaron las regiones codificantes del gen *SLC5A5*, pero no se encontraron variantes relevantes que expliquen el cuadro clínico de los pacientes. En estos cuatro casos no relacionados entre sí, el genotipo de las regiones analizadas no es consistente con el fenotipo típico de *ITD* de los pacientes, especialmente en el caso del paciente número 3 que presenta niveles no detectables de acumulación del trazador radioactivo <sup>131</sup>I tanto a nivel de la glándula tiroides como de glándulas salivales.

**Tabla 5. Datos clínicos, bioquímicos, imagenológicos y moleculares de los pacientes analizados por gen candidato.**

Paciente	1	2	3	4	5	6
Ultrasonido	E	E	E	E(B)	E	E
Centellografía tiroidea	ND	ND	ND	ND	ND	R
Centellografía salival	ND	ND	ND	-	-	-
Patología asociada	-	-	-	SC	-	-
<b>Diagnóstico neonatal</b>						
Edad (días)	20	11	15	36	7	4
TSH	>200	>200	190	>20	18	67
<b>Diagnóstico confirmatorio</b>						

Edad (días)	28	16	15	49	25	12
TSH	150	>40	193	300	16	62
T <sub>4</sub>	1.1	1	0.4	2	5	14
T <sub>4</sub> L	-	-	0.3	<0.9	1.2	2.2
T <sub>3</sub>	30	30	73	45	156	164
Tiroglobulina	-	-	65	5	59	157
Ac antitiroideos	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Diagnóstico Molecular</b>						
Gen candidato <i>SLC5A5</i>	NIS p.D331N/ p.S547R	NIS c.970-3C>A/ p.D369V	.	.	.	.

**Valores de referencia:** TSH (0.5-4.7 mIU/L), T<sub>4</sub> (4.5-12.5 µg/dl), T<sub>4</sub>L (0.9-2.3 ng/dl), T<sub>3</sub> (105-245 ng/dl), Tiroglobulina (2.0-35.0 ng/ml).

**Abreviaturas:** E: Eutiroidea. B: Bocio. ND: No detectable. R: Reducida. SC: Síndrome convulsivo. (-): no se realizó. Ac: anticuerpos.

## 4.2 Nuevas variantes del gen *TG* causantes de hipotiroidismo congénito.

Con el propósito de conocer las bases moleculares de la enfermedad de un grupo de pacientes pediátricos diagnosticados con HC, en conjunto con una exhaustiva evaluación clínica, bioquímica e imagenológica, se implementó una estrategia de NGS mediante la secuenciación de un panel de genes asociados al desarrollo de esta enfermedad.

### 4.2.1 Datos clínicos y resultados de la secuenciación del panel de genes.

En colaboración con la Dra. Frédérique Savagner (Institut Fédératif de Biologie, Toulouse, Francia) se estudiaron once pacientes con HC detectados a partir del programa de pesquisa neonatal en el Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez (Buenos Aires) y del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad (Córdoba) mediante un panel de dieciocho genes asociados a la enfermedad tiroidea usando la plataforma de secuenciación masiva Ion PGM (Tabla 6).

**Tabla 6. Datos clínicos, bioquímicos, imagenológicos y moleculares de los pacientes estudiados por panel de genes.**

Paciente	3	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Ultrasonido	E	E	E	A	A	E	E	E	E	E	E(B)
Centellografía tiroidea	ND	-									
Centellografía salival	ND	P	P	P	P	P	P	-	-	P	-
Patología asociada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	HA

Diagnóstico neonatal											
Edad (días)	15	-	-	2	2	3	20	20	-	-	-
TSH	190	>200	>100	>100	50	170	>100	>100	>100	>100	-
Diagnóstico confirmatorio											
Edad (días)	15	37	50	13	15	15	22	15	21	43	-
TSH	193	-	-	244	142	170	-	290	-	-	7.3
T <sub>4</sub>	0.4	2.6	0.4	1	2.5	2.8	0.4	1.6	3.5	0.4	12
T <sub>4</sub> L	0.3	-	-	0.2	-	0.2	0.1	0.1	0.4	0.1	1.0
T <sub>3</sub>	73	73	45	72	94	19	57	-	-	73	-
Tiroglobulina	65	-	50	34	14	46	60	14	22	2	-
Diagnóstico Molecular											
Panel de genes	<b>TG</b> p.F1542Vfs*20	<b>TG</b> p.Q29* / c.177-2A>C	<b>TG</b> p.Y2563C	<b>TG</b> p.S523P	<b>FOXE1</b> p.P203R	<b>DUOX2</b> p.E1496Dfs*51	-	-	-	-	-

**Valores de referencia:** TSH (0.5-4.7 mIU/L), T4 (4.5-12.5 µg/dl), T4L (0.9-2.3 ng/dl), T3 (105-245 ng/dl), Tiroglobulina (2.0-35.0 ng/ml).

**Abreviaturas:** E: Eutiroidea. B: Bocio. A: Agenesia. P: Presente. ND: No detectable. R: Reducida. SC: Síndrome convulsivo. HA: hipoacusia. (-): no se realizó.

Con excepción de los pacientes 9 y 10 que presentaban agenesia tiroidea, todos los pacientes fueron diagnosticados como dishormonogénicos en función de estudios imagenológicos de ultrasonido y centellografía con trazadores radiactivos.

En cuanto a los resultados de la centellografía, estos muestran que todos los pacientes estudiados tienen una glándula tiroidea total o parcialmente incapaz de captar yodo, particularmente, en el paciente 3, como se comentó previamente, se detectó un defecto en la acumulación del trazador radiactivo también a nivel de glándulas salivales. Estas características imagenológicas apuntan al diagnóstico presuntivo de *ITD* en estos pacientes, sin embargo, al secuenciar el panel de genes no se encontraron mutaciones en el gen *SLC5A5*, que es hasta ahora el único candidato para esta patología. En cambio, sorprendentemente, se identificaron en repetidas oportunidades mutaciones en el gen *TG* (Tabla 6).

En el paciente 7 se encontraron dos variantes nuevas en estado de heterocigosis compuesta en *TG*: una transición heterocigota C>T en la posición +85 que se encuentra en el exón 2 (c.85C>T) y genera un codón de parada prematuro, produciendo una proteína trunca (p.Q29\*) (Tabla 6, Figura 12), y una transversión heterocigota A>C en la posición 177-2 localizada en el sitio aceptor de empalme del intrón 2 (c.177-2A>C) (Tabla 6, Figura 13). Lamentablemente la imposibilidad de dosar niveles séricos de TG en este paciente no ha permitido establecer una correlación bioquímica y genética.

En el paciente 8 se identificó una transición heterocigota A>G en la posición 7688 (c.7688A>G) localizada en el exón 44 que se traduce en un cambio de tirosina por cisteína en la posición 2563 (p.Y2563C) (Tabla 6).

El paciente 9 presenta una transición en heterocigosis T>C en la posición 1567 (c.1567T>C) localizada en el exón 9 que se traduce en un cambio de serina por prolina en la posición 523 (p.S523P) (Tabla 6).

Así mismo, en el paciente 11 se descubrió en el exón 33 de *DUOX2* una inserción heterocigota de una citosina entre las posiciones 4487 y 4488 del cDNA (c.4487\_4488insC); esta nueva variante genera un cambio de glutamato por aspartato en la posición 1496 y un *frameshift* de 51 aminoácidos (p.E1496Dfs\*51) (Tabla 6). En el paciente 10 se identificó en el exón 1 de *FOXE1* una transversión heterocigota de citosina por guanina en la posición 608 del cDNA (c.608 C>G); esta variante nueva produce el cambio de prolina por arginina en la posición 203 (p.P203R) (Tabla 6). Este paciente se diagnosticó como agenésico y sin manifestaciones típicas del síndrome de Bamforth-Lazarus, que es un síndrome asociado a las mutaciones en *FOXE1* (84).

En los pacientes 5 y 6 y del 12 al 15 no se identificaron mutaciones en alguno de los genes estudiados utilizando diferentes estrategias de secuenciación. Sin embargo, considerando la importancia de profundizar en el estudio de las bases moleculares de la patología, los pacientes 4, 16 y agregando al paciente 17, fueron considerados candidatos interesantes para la secuenciación completa del exoma en función de la presentación clínica, bioquímica e imagenológica de la patología con características sindrómicas y la ausencia de mutaciones en los genes analizados que pudiesen sentar las bases moleculares de la patología.

### 4.3 Secuenciación completa del exoma en pacientes con hipotiroidismo congénito.

Los genes que codifican proteínas constituyen solo aproximadamente el 1% del genoma humano, sin embargo, albergan el 85% de las mutaciones responsables de diversas enfermedades genéticas mendelianas. Entre las aproximadamente 2.600 enfermedades mendelianas que se han identificado, la inmensa mayoría son causadas por mutaciones pocos frecuentes que afectan genes individuales, en otras palabras, son de carácter monogénico. Por lo tanto, estrategias para secuenciar de forma selectiva, eficiente y completa las regiones codificantes del genoma (el exoma) tienen el potencial de contribuir a la comprensión de enfermedades humanas raras y poco frecuentes (73).

Particularmente, la secuenciación completa del exoma (WES, por sus siglas en inglés) ha permitido hacer grandes aportes en el diagnóstico y tratamiento de pacientes pediátricos con sospecha de enfermedades monogénicas. En este contexto, estudios a gran escala de WES en niños con presentaciones clínicas diversas informan tasas de diagnóstico del 25% al 30%, aplicando WES después de múltiples investigaciones genéticas, incluidas pruebas de secuenciación de un solo gen o paneles de genes (85).

En nuestro caso, la secuenciación del exoma de los pacientes seleccionados se hizo con la finalidad de poder determinar la etiología genética de la patología y entender sus bases moleculares. Así mismo, fueron de especial interés aquellos casos que no tuvieran un diagnóstico molecular preciso, o con una variante poco frecuente de hipotiroidismo, y donde WES pudiera arrojar nuevos genes candidatos potenciales para esta patología.

A continuación, se procede a presentar los datos clínicos de cada caso considerando que los pacientes 4 y 16 fueron previamente estudiados mediante estrategias de gen candidato y panel de genes, respectivamente, y que se agrega el paciente 17 que no había sido presentado anteriormente (Tabla 7).

**Tabla 7. Datos clínicos, bioquímicos, imagenológicos y moleculares de los pacientes analizados por WES.**

Paciente	4	16	17
Ultrasonido	E(B)	E(B)	-
Centellografía tiroidea	ND	-	-
Centellografía salival	-	-	-
Patología asociada	SC	HA	-
<b>Diagnóstico neonatal</b>			
Edad (días)	36	-	-
TSH	>20	-	-
<b>Diagnóstico confirmatorio</b>			
Edad (días)	49	-	-
TSH	300	7.3	7.19
T <sub>4</sub>	2	12	10.9
T <sub>4</sub> L	0.1	1.0	1.3
T <sub>3</sub>	45	-	264
Tiroglobulina	520	-	-
<b>Diagnóstico molecular</b>			
WES	<i>TG</i> p.G653D	-	<i>BCOR</i> p.S1431Y

**Valores de referencia:** TSH (0.5-4.7 mIU/L), T<sub>4</sub> (4.5-12.5 µg/dl), T<sub>4</sub>L (0.9-2.3 ng/dl), T<sub>3</sub> (105-245 ng/dl), Tiroglobulina (2.0-35.0 ng/ml).

**Abreviaturas:** E: Eutiroidea. B: Bocio. ND: No detectable. SC: Síndrome convulsivo. HA: hipoacusia. (-): no se realizó o no corresponde.

#### 4.3.1 Defecto de acumulación de yoduro en la glándula tiroides sin mutaciones en el gen *SLC5A5*.

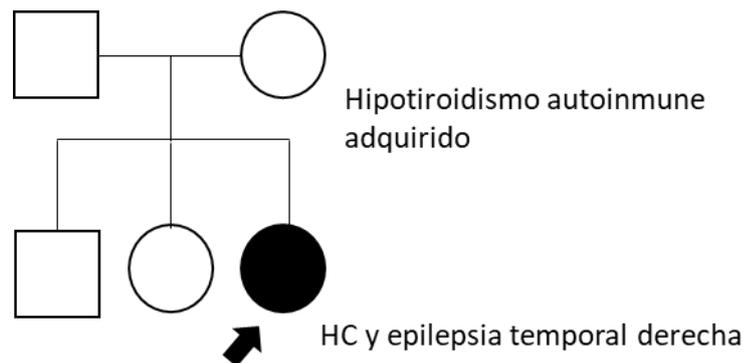
El paciente 4 (Tabla 7) se trata de una paciente femenina nacida en 1998 que fue diagnosticada con HC mediante el programa de pesquisa neonatal del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad (Córdoba).

A los 49 días de edad, la paciente manifestó una deficiencia de crecimiento de -1,6 DS (Percentil 25) al momento del inicio del tratamiento con 8 µg/kg levotiroxina diarios. A

los 36 días de iniciado el tratamiento con levotiroxina se muestra una correcta normalización de la función tiroidea: TSH= 22 mIU/L (0.50-4.70 mIU/L), T4= 10,5 µg/dL (4.5-12.5 µg/dL) y T4L= 1,7 ng/dL (0.9-1.6 ng/dL).

Por otra parte, a la edad de 7 meses la paciente manifiesta un síndrome convulsivo, refractario al tratamiento con depakene y fenobarbital sin aparente relación con el cuadro de HC en tratamiento. En 2005 la paciente es diagnosticada de epilepsia temporal derecha y se agrega al tratamiento lamotrigina, dando una notoria mejoría temporal. En 2012, en virtud de la refractariedad del cuadro epiléptico al tratamiento, la paciente es intervenida quirúrgicamente por el servicio de neurocirugía donde se realiza una lobectomía temporal y amigdalectomía cerebelosa derecha.

En cuanto a la historia familiar de la paciente (Figura 4), esta proviene de padres no consanguíneos. Al momento del diagnóstico no se reportaban antecedentes familiares de HC. No obstante, en el 2016 la evaluación de la función tiroidea de la madre muestra hipotiroidismo adquirido de posible etiología autoinmune: TSH 5,6 mIU/L (0.50 – 4.70 mIU/L), T4 3 µg/dL (4.5-12.5 µg/dl), T4L 1 ng/dL (0.8-1.8 ng/dL), T3 131 ng/dL (80 -200 ng/dL) y anticuerpos anti-tiroideos positivos. La paciente también cuenta con dos hermanos mayores sin afección clínica de la función tiroidea (varón y mujer).



**Figura 4. Familiograma de la paciente 4.** Se grafica la historia familiar de la que se dispone para favorecer la determinación del modelo de enfermedad más probable.

Considerando la ausencia de resultados positivos en los estudios genéticos realizados analizando la secuencia del gen *SLC5A5* (ver sección 4.1.1) cabe la posibilidad de que la enfermedad de la paciente se deba a alteraciones en proteínas aún desconocidas relacionadas a la expresión, función o tráfico de NIS a la membrana plasmática. Por ello, se consideró que la secuenciación del exoma de la paciente en cuestión permitiría avanzar en el entendimiento de los mecanismos que permiten el normal funcionamiento de NIS en la célula folicular tiroidea.

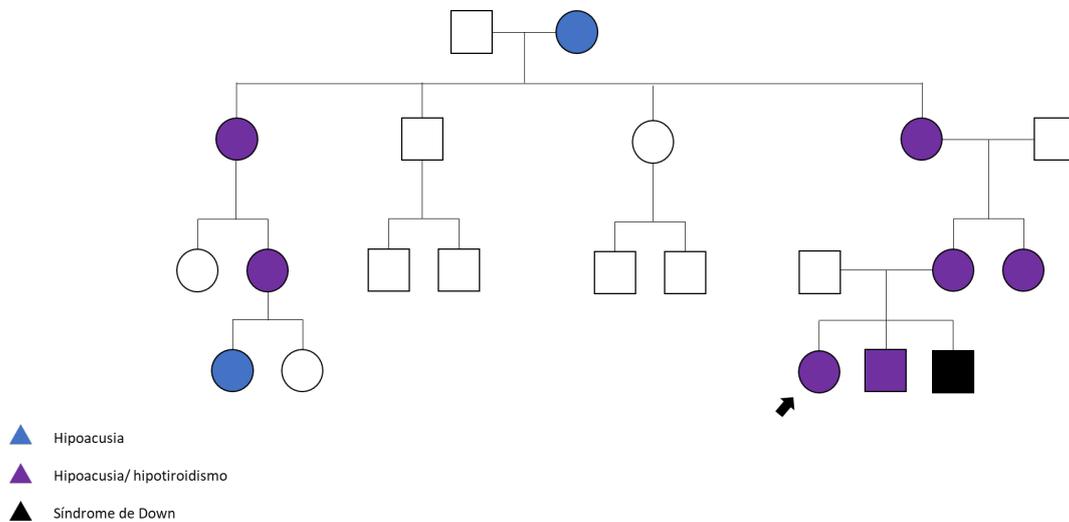
Una vez secuenciado el exoma de la paciente y su madre, y procesados todos los datos que se obtienen del secuenciador, se llevó a cabo la priorización de variantes en la B-platform. El filtrado de variantes se hizo en los genes presentes en los paneles comerciales disponibles para esta patología, buscando variantes con una frecuencia alélica  $\leq 0.01$  en GnomAD y 1000G, considerando los modelos de herencia Autosómico Recesivo (AR), Autosómico Dominante (AD) y *de novo*, pero no se obtuvo ninguna variante que pudiera explicar satisfactoriamente la enfermedad de la paciente. Esta

búsqueda se hizo por segunda vez en todos los genes del exoma, pero tampoco se obtuvieron resultados concluyentes. La única variante destacable de estos resultados fue una transición G > A en la posición 2001 (c.2001G>A) del exón 9 de *TG*, produciendo un cambio en el residuo 653 de glicina por ácido aspártico (p.G653D). Esta variante no ha sido previamente reportada en la bibliografía.

#### 4.3.2 Hipotiroidismo asociado a hipoacusia.

El paciente 16 se trata de una paciente diagnosticada con hipotiroidismo subclínico con bocio grado I e hipoacusia neurosensorial bilateral leve determinada mediante pruebas audiométricas en el Hospital de Niños de la Santísima Trinidad (Córdoba). La paciente es hija de padres no consanguíneos, donde la madre presenta un cuadro de hipoacusia neurosensorial, y presentó hipotiroidismo a partir de la adolescencia. Actualmente se encuentra medicada con 100 µg/día Levotiroxina. Así mismo, cuenta con dos hermanos menores, uno de 8 años de edad al momento del diagnóstico, que presenta un cuadro clínico de hipoacusia neurosensorial, con hipotiroidismo compensado bajo tratamiento con 50 µg/día de Levotiroxina y bocio grado I. Y el segundo hermano con HC asociado a su Síndrome de Down. El padre de la familia es clínica y bioquímicamente eutiroides.

El famiogramma que se construyó para esta familia (Figura 5), muestra que la segregación de hipotiroidismo e hipoacusia tiene un patrón de herencia aparentemente AD, que se distingue a través del estudio fenotípico realizado en 21 de individuos pertenecientes a 4 generaciones de esta familia.



**Figura 5. Familiogramma de la paciente 17.** Representación gráfica de la historia familiar del paciente D, donde se aprecia la segregación AD de hipoacusia (círculos azules) e hipoacusia con hipotiroidismo (círculos morados).

Como resultado de este análisis se esperaban encontrar mutaciones en el gen *SLC26A4* que codifica para la proteína Pendrina (PDS) en la secuenciación del panel de genes (ver sección 3.4). Esta proteína se localiza en la membrana apical de la célula folicular tiroidea, y cataliza el transporte de yoduro hacia el interior del lumen folicular. Las mutaciones en el gen *SLC26A4* son responsables de un síndrome autosómico recesivo

denominado Síndrome de Pendred, donde los pacientes típicamente presentan un cuadro de hipotiroidismo asociado a hipoacusia neurosensorial (86). Sin embargo, el análisis de los resultados de la secuenciación del panel de genes no evidenció mutaciones relevantes en Pendrina, ni en ningún otro de los genes presentes en el panel asociados a la patología. La obtención de estos resultados negativos representa la posibilidad de que se esté ante un caso único causado por mutaciones en un gen que no ha sido previamente asociado con esta patología. Ante esta posibilidad se optó por secuenciar el exoma completo de la paciente junto con su núcleo familiar cercano (madre, padre y hermano menor sin síndrome Down) para dilucidar la etiología genética de esta patología.

Para tales fines, una vez secuenciado el exoma de la paciente, sus padres y su hermano varón mayor y procesados todos los datos que se obtienen del secuenciador, se llevó a cabo la priorización de variantes utilizando la B-platform buscando genes candidatos en paneles comerciales para el diagnóstico de todas las variantes de HC. Contemplando la historia clínica y el familograma de la paciente se propuso un modelo de herencia AD, para explicar la segregación de la enfermedad en esta familia, con lo cual se esperaban encontrar mutaciones heterocigotas.

En una primera búsqueda tomando como referencia los genes presentes en los paneles comerciales y el modelo de herencia AD, se buscaron variantes con una frecuencia alélica  $\leq 0.01$  en GnomAD y 1000G y con un veredicto ACMG patogénico o posiblemente patogénico, pero no se obtuvo variante alguna, por lo que se procedió a realizar una segunda búsqueda cambiando el veredicto ACMG a incierto, pero tampoco se obtuvieron resultados relevantes. En una tercera búsqueda utilizando los mismos filtros, aunque haciendo el análisis extensivo a todos los genes presentes en el exoma secuenciado, se obtuvieron los siguientes resultados:

**Tabla 8. Resultados de la búsqueda en la B-platform con el modelo de herencia AD para el caso de hipotiroidismo asociado a hipoacusia.**

Gen	Variante	Efecto	Criterios ACMG	gnomAD Exome	Cigosidad
<i>DNAH9</i>	c.2731+17G>A	Variante intrónica	Significado incierto BS1	0.0082	Hija/Het
					Madre/Het
					Hermano/Het
					Padre/-
<i>FANCD2</i>	c.2022-149C>T	Variante intrónica	Significado incierto BS1	0.0086	Hija/Het
					Madre/Het
					Hermano/Het
					Padre/-
<i>GRIK2</i>	c.1868-84delT	Variante no sinónima	Significado incierto PM2	0.0038	Hija/Het
					Madre/Het
					Hermano/Het
					Padre/-
<i>KCNA1</i>	c.*127A>C	Variante 3' UTR	Benigna BS1, BS2, BP6	0.0052	Hija/Het
					Madre/Het
					Hermano/Het
					Padre/-
<i>KCNJ12</i>	c.*69C>T			0.000107	Hija/Het

		Variante 3' UTR	Significado incierto PM2		Madre/Het
					Hermano/Het
					Padre/-
KCNJ12	c.-56-13G>C	Variante intrónica	Benigna BA1, BS1	0.47	Hija/Het
					Madre/Het
					Hermano/Het
					Padre/-
MGAM	c.6508-66C>G	Variante intrónica	Significado incierto	0.002	Hija/Het
					Madre/Het
					Hermano/Het
					Padre/-
PRIM2	c.1021-33464T>C	Variante intrónica	Significado incierto PM2	0.5	Hija/Het
					Madre/Het
					Hermano/Het
					Padre/-

Dado que el presente caso se trata de un caso atípico de HC e hipoacusia, donde todos los genes hasta ahora conocidos asociados a estas patologías no presentan mutaciones relevantes que expliquen la enfermedad de esta familia, se sospecha que la mutación causante de este cuadro clínico tenga una frecuencia alélica extremadamente baja y esté presente en un gen nunca antes reportado para esta condición. Por lo tanto, tomando en cuenta estos antecedentes, y después de haber realizado una búsqueda bibliográfica exhaustiva, se decidió estudiar más detalladamente la variante c.\*69C>T identificada en la región 3'UTR de *KCNJ12* (Miembro de la Subfamilia J del Canal de Rectificación Interna de Potasio 12), dada su evidencia de patogenicidad moderada (PM2) y frecuencia alélica baja, en relación a las demás variantes encontradas.

El gen *KCNJ12* está ubicado en 17p11.2 y según el *Human Protein Atlas* se expresa principalmente a nivel de corteza cerebral, cerebelo, riñones, apéndice y médula ósea. Este canal de potasio es activado por el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato y se cree que participa en el control del potencial de membrana y la excitabilidad de los tejidos neuronales y musculares (87). Este tipo de canales de potasio rectificadores internos se caracterizan por tener una mayor tendencia a permitir que el potasio fluya hacia la célula en lugar de salir de ella. Y sus funciones están reguladas por la concentración de potasio extracelular y el magnesio intracelular que bloquea la corriente de salida (88,89).

Por otra parte, este gen se encuentra presente en la región del Síndrome de Smith-Magenis que es un síndrome provocado por la delección del brazo corto del cromosoma 17, así mismo, está implicado en el desarrollo del Síndrome de Andersen-Tawil cuya presentación clínica consiste en la aparición de episodios de debilidad muscular, cambios en el ritmo cardíaco y anomalías del desarrollo (90). También se han reportado variantes de este gen en cardiomiopatías familiares (91).

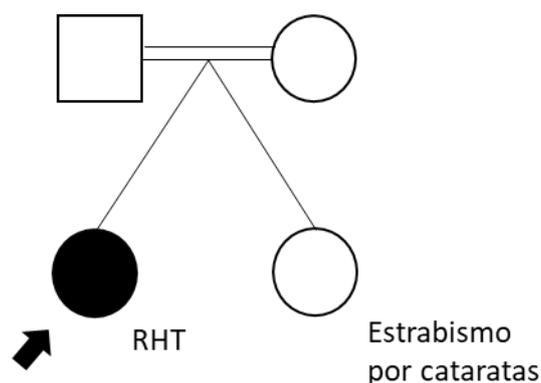
Cabe destacar que, según *Human Protein Atlas* *KCNJ12* no se expresaría a nivel proteico en la glándula tiroidea, sin embargo, los resultados no son concluyentes ya que el anticuerpo utilizado para validar estos datos tiene baja especificidad, así mismo, las publicaciones relacionadas con esta proteína no especifican haber probado su expresión en tejido tiroideo (92).

Por otra parte, es importante mencionar la existencia del gen *KCNJ18* que comparte 98-99% de identidad en su región codificante y 96-99% a nivel de su secuencia proteica con *KCNJ12* (92). Una observación de relevancia es la presencia de una timina en la posición 69 de la región 3'UTR de *KCNJ18*. Dicho esto, es posible considerar que la variante c.\*69C>T identificada sea producto de un mal ensamblado de las lecturas provenientes del secuenciador, ya que es sumamente difícil ensamblar lecturas con alto grado de homología y poder discriminar entre ellas cual proviene de cada gen (93).

#### 4.3.3 Resistencia a las hormonas tiroideas sin mutaciones en los receptores nucleares para las hormonas tiroideas.

La paciente 17 es una paciente femenina que fue diagnosticada con hipotiroidismo a la edad de 3 años en el Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez (Buenos Aires, Argentina). El diagnóstico de la enfermedad se hizo mediante el dosaje en suero de TSH= 7.19 (0.5-4.7 mIU/L), T4L=1.3 (0.9-2.3 ng/dl), T4=10.9 (4.5-12.5 µg/dl), T3=264 (105-245 ng/dl), relación T3/T4= 24.2 (2.5-4.8 ng/dl) y anticuerpos anti tiroideos negativos (Tabla 7). Los signos principales que llevaron a sospechar de una RHT fueron el retraso madurativo, proporciones corporales disminuidas (<3 SD), y el perfil tiroideo con TSH levemente alta, T3 elevada y relación T4/T3 baja (94). Así mismo, la paciente presentó otros signos relevantes tales como desnutrición, bronquiolitis, macrocefalia (<2SD), lenguaje incomprensible y síndrome de Silver-Russel. Al primer mes de vida presentó ictericia y soplo sin etiología aparente, así como diarrea al segundo mes. También se detectó un aumento inusual de creatina- fosfoquinasa= 314 U/L (Valor de referencia en niños <94 U/L).

En cuanto a la historia familiar de la paciente (Figura 6), esta proviene de una unión consanguínea entre primos-hermanos y tiene una hermana gemela con estrabismo por cataratas jóvenes. El perfil tiroideo materno se encontraba normal.



**Figura 6. Familiograma de la paciente 17.** Se grafica la historia familiar de la que se dispone para favorecer la determinación del modelo de enfermedad más probable.

La RHT se define como un síndrome hereditario dominante de baja penetrancia caracterizado por la reducción en la acción intracelular de T3, donde la forma más común de RHT son los defectos en el receptor nuclear de la hormona tiroidea (TR) (95).

La mayoría de los pacientes con RHT tienen una mutación en el gen que codifica el receptor  $\beta$  de hormonas tiroideas (gen *THRB*) que interfiere con la capacidad de ese receptor para responder normalmente a T3, por lo general reduciendo su afinidad de unión a T3. Sin embargo, se ha identificado una pequeña cantidad de individuos con mutaciones en el receptor  $\alpha$  de hormonas tiroideas (*THRA*) (2,95). Al respecto, actualmente sólo se han reportado 20 pacientes con mutaciones en THRA, y su incidencia en la población permanece desconocida (95).

Considerando la sospecha de una resistencia y en función del escaso conocimiento que se tiene sobre la enfermedad, se consideró que la secuenciación del exoma de la paciente y su madre podría proporcionar información útil para comprender los mecanismos moleculares subyacentes a esta patología, y, así mismo, poder completar el diagnóstico del paciente con una etiología genética precisa.

Para tales fines, se llevó a cabo la priorización de variantes en la B-platform buscando genes candidatos en paneles comerciales para el diagnóstico de todas las variantes de HC, y se hizo una búsqueda bibliográfica sobre mutaciones y genes reportados asociados con esta enfermedad. Por otro lado, se contempló la historia clínica y el familiograma de la paciente para proponer modelos de herencia compatibles con la enfermedad. De esta forma se propuso un modelo de herencia AR, debido a la consanguinidad y ausencia de enfermedad en los padres, con lo cual esperaríamos encontrar mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta. En una primera búsqueda tomando como referencia los genes presentes en los paneles comerciales y el modelo de herencia AR, se buscaron variantes con una frecuencia alélica  $\leq 0.01$  en GnomAD y 1000G y con un veredicto ACMG patogénico/ posiblemente patogénico, pero no se obtuvo ninguna variante en los genes del panel ni en el TR $\alpha$  o el TR $\beta$ , por lo que se procedió a realizar una segunda búsqueda cambiando el veredicto ACMG incierto, pero tampoco se obtuvieron resultados relevantes. En una tercera búsqueda, esta vez en todos los genes del exoma, se obtuvieron los siguientes resultados:

**Tabla 9. Resultados de la búsqueda en la B-platform con el modelo de herencia AR para el caso de RHT.**

Gen	Variante	Efecto	Criterios ACMG	gnomAD Exome	Cigosidad
<i>CHDH</i>	p.Thr560Ile c.1679C>T	Variante no sinónima	Significado incierto PM1, PP3, BS1	0.0031	HOM
<i>TPRXL</i>	p.Pro69His c.206C>A	Variante no sinónima	Significado incierto PM2	-	HOM
<i>KCNN3</i>	p.Gln76_Gln80dup c.227_241dupAGCAG CAGCAGCAGC	Inserción sin cambio en el marco de lectura	Significado incierto PM2, PM4	-	HOM

Debido a que las mutaciones en estos genes no explican el cuadro clínico de la paciente, y sus funciones no están aparentemente relacionadas con los TR, se planteó la posibilidad de considerar un segundo modelo de herencia AD, ya que es sabido que la RHT tiene un modelo de herencia AD, al menos para los genes hasta ahora conocidos.

Aplicando los filtros mencionados anteriormente (frecuencia alélica  $\leq 0.01$  en GnomAD y 1000G, veredicto ACMG patogénico/ posiblemente patogénico) y considerando el nuevo modelo de herencia, no se obtuvieron resultados relevantes utilizando los paneles de genes comerciales, por lo que se procedió a buscar con los mismos filtros en todas las variantes del exoma, obteniendo los siguientes resultados:

**Tabla 10. Resultados de la búsqueda en la B-platform con el modelo de herencia AD para el caso de RHT.**

Gen	Variante	Efecto	Criterios ACMG	gnomAD Exome	Cigosidad
<i>SYNJ1</i>	p.Ser1112fs c.3333delG	Desplazamiento del marco de lectura	Posiblemente patogénica PVS1, PM2	-	HET
<i>CEP120</i>	p.Leu367fs c.1100delT	Desplazamiento del marco de lectura	Posiblemente patogénica PVS1, PM2	-	HET
<i>SKIV2L</i>	p.Arg761fs c.2281_2282delAG	Desplazamiento del marco de lectura	Posiblemente patogénica PVS1, PM2	-	HET
<i>NEK4</i>	p.Arg566X c.1696C>T	Codón de parada	Patogénica PVS1, PM2, PP3	8.123e-06	HET
<i>HNRNPA2B1</i>	p.Arg54Thr c.161G>C	Variante no sinónima	Posiblemente patogénica PM1, PM2, PP2, PP3	-	HET
<i>BCOR</i>	p.Ser1431Tyr c.4292C>A	Variante no sinónima	Posiblemente patogénica PM1, PM2, PP3, PP5, BP1	3.99e-05	HET
<i>RNF31</i>	p.Thr125Ala c.373A>G	Variante no sinónima	Posiblemente patogénica PM1, PM2, PP2, PP3	4.063e-06	HET
<i>TTN</i>	p.Arg14439Cys c.43315C>T	Variante no sinónima	Posiblemente patogénica PM1, PM2, PP2, PP3, BP1	3.683e-05	HET
<i>GATA5</i>	p.Asn223Asp c.667A>G	Variante no sinónima	Posiblemente patogénica PM1, PM2, PP2, PP3	-	HET
<i>RYR1</i>	p.Lys1393Arg c.4178A>G	Variante no sinónima	Posiblemente patogénica PM1, PM2, PP3, PP5	0.0028	HET
<i>TEX11</i>	p.Asp336Val c.1007A>T	Variante no sinónima	Posiblemente patogénica PM1, PM2, PP2, PP3	-	HET
<i>BCHE</i>	p.Gly418Val c.1253G>T	Variante no sinónima	Posiblemente patogénica	0.0032	HET

			PM1, PM2, PP3, PP5		
--	--	--	-----------------------	--	--

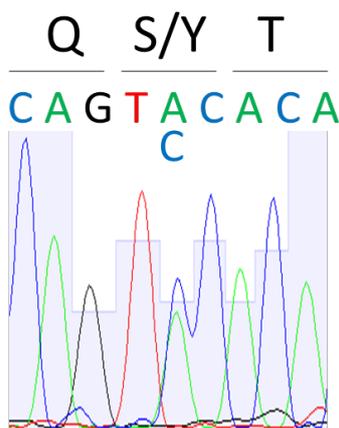
Debido a que no se encontraron mutaciones en los principales genes candidatos de esta patología, se buscó un gen con características similares que permitiera explicar tanto el modelo de herencia, como el fenotipo clínico del paciente. Para esto, se seleccionaron aquellos genes que tuvieran principalmente una localización nuclear, un patrón de expresión en el cuerpo humano similar o que coincidiera con el de las isoformas de los TR, y que cuyas mutaciones estuvieran relacionadas con alguna patología con signos y síntomas compatibles con los del caso en cuestión. De esta forma, después de una búsqueda bibliográfica exhaustiva, se decidió proponer a la variante c.4292C>A localizada en el exón 10 de *BCOR* (*BCL6 Corepressor*) como posible responsable de la patología de la paciente.

El gen *BCOR* está ubicado en Xp11.4 y comprende 16 exones que codifican un represor transcripcional expresado de manera ubicua (96). En asociación con BCL6 es capaz de inhibir específicamente la expresión génica cuando se recluta en regiones promotoras (97), así mismo, mediante su interacción directa con PCGF1 forma parte del *polycomb repressive complex 1* (PRC1) que participa en la represión epigenética mediada por modificación de histonas desacetilasas (98), específicamente HDAC1, HDAC3 y HDAC5 (97).

Por otra parte, además de estar implicado en el desarrollo de algunas neoplasias mesenquimales, las variantes patogénicas en *BCOR* producen dos tipos de síndromes: uno denominado Microftalmia sindrómica 2 que afecta a los hombres, y el otro llamado Síndrome Oculofaciocardiodental (OFCD) que afecta a las mujeres (99). Los pacientes afectados por estos síndromes presentan anomalías oculares tales como cataratas, microftalmia, discapacidad visual, entre otras (100). Así mismo, se presentan características faciales entre las que destacan caras largas, cejas gruesas y curvas, cresta nasal fina con punta bífida, surco naso labial largo, entre otras. En cuanto a las anomalías cardíacas se presentan, entre otras, cardiomegalia leve, hipertrofia ventricular y auricular, estenosis pulmonar periférica benigna, prolapso de la válvula mitral. Por último, en las alteraciones oro-dentales se encuentra la oligodoncia, dientes fusionados o supernumerarios, erupción dentaria retrasada, persistencia de los dientes temporales y paladar hendido, así como úvula bífida en el 50% de los casos (100,101).

Para validar la presencia de esta mutación en la paciente, se diseñaron primers para amplificar la región donde se detectó la variante y se secuenció por Sanger el producto de PCR. Los resultados de la secuenciación confirmaron la presencia de una transición heterocigota C>A en la posición 4292 (c.4292C>A) localizada en el exón 10 de *BCOR* que se traduce en un cambio de serina por tirosina en la posición 1431 (p.S1431Y) (Tabla 7 y Figura 7).

c.4292C>A - p.S1431Y



**Figura 7.** Cromatograma parcial de la secuencia que cubre la región de la variante c.4292C>A/p.S1431Y en el exón 10 del gen *BCOR* en la muestra de la paciente. Se indican las secuencias de nucleótidos y los aminoácidos utilizando el código de una letra. La paciente es heterocigota para el alelo mutante p.S1431Y de *BCOR*.

Un análisis de *in silico* con softwares predictores de patogenicidad evidenció el posible daño provocado por esta variante en la estructura proteica de *BCOR*: CLNSIG= posiblemente patogénico; Intervar= posiblemente patogénico; SIFT= dañino (0.004); Polyphen-2= benigno (0.431) y Mutation Taster2= polimorfismo (p=1.0).

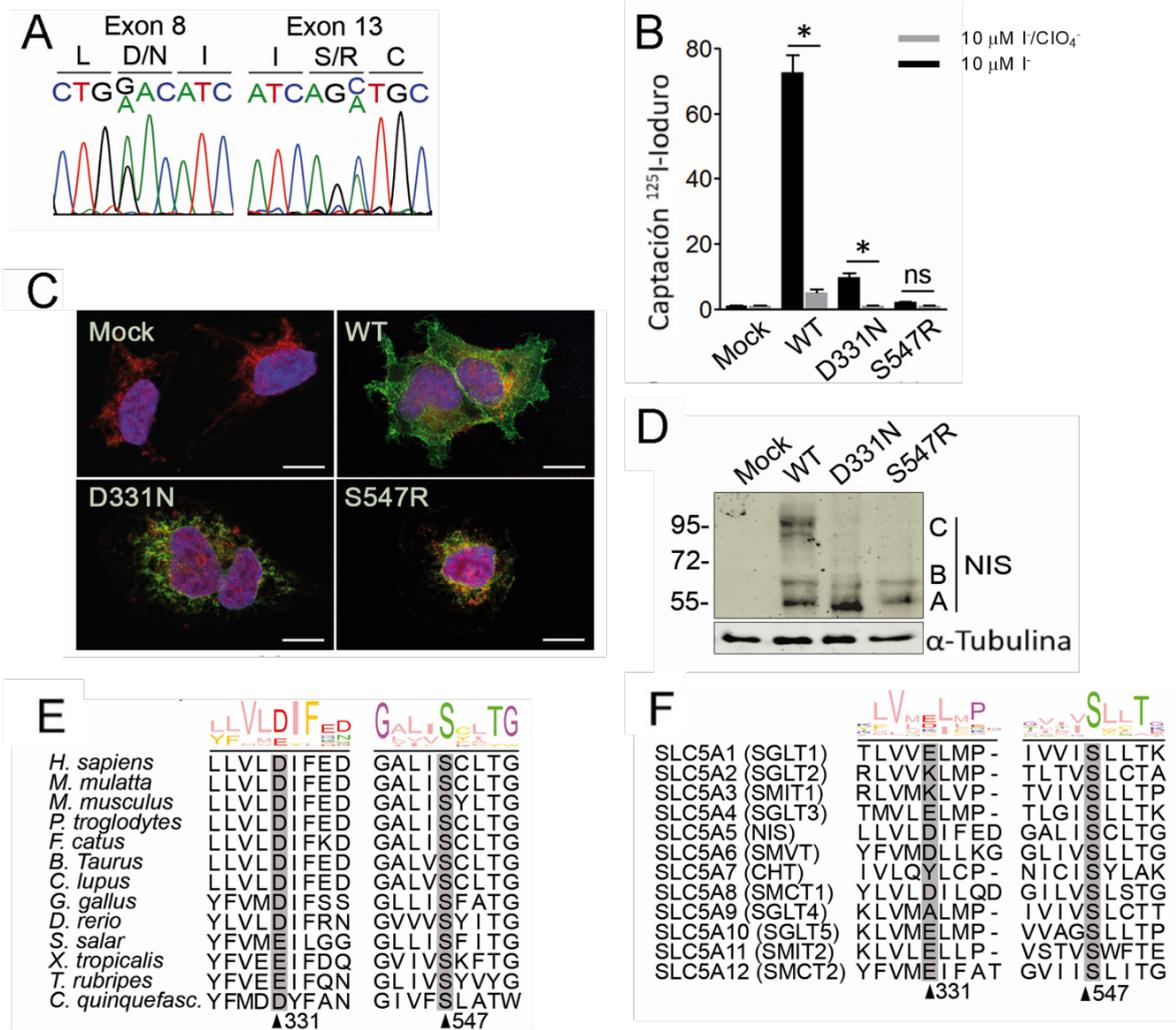
#### 4.4 Caracterización funcional de variantes identificadas en heterocigosis compuesta en el gen *SLC5A5*.

##### 4.4.1 Caracterización funcional de las variantes p.D331N y p.S547R NIS.

Según el modelo de homología actual de la estructura tridimensional de NIS basado en la estructura del transportador de glucosa bacteriano vSGLT (81), la variante p.D331 se encuentra en el cuarto bucle extracelular conectando los segmentos transmembrana 8 y 9, mientras que la p.S547 se localiza en el extremo carboxilo terminal intracelular, que es esencial para el tráfico de NIS a membrana plasmática (102). El análisis *in silico* sugirió que las variantes p.D331N y p.S547R son potencialmente patogénicas: PolyPhen-2=0.6 y 1.0 (0.0: benigno; 1.0: dañino); MutationTaster2, p=1.0 y p=0.98 (valores de p cercanos a 1 indican una alta confiabilidad de la predicción); SIFT 0.01 y 0.00 (0.0: dañino; 1.0: tolerado), respectivamente. Complementariamente, con la finalidad de determinar la patogenicidad de las variantes identificadas, y esclarecer su impacto en la función de NIS, se realizaron estudios funcionales transfectando transitoriamente células HEK293T, que no expresan NIS de forma endógena, con un plásmido de expresión que contiene el cDNA codificante para la versión WT y las versiones mutantes de NIS identificadas en el paciente (p.D331N y p.S547R). El ensayo de captación con yoduro radioactivo se hizo en presencia y ausencia de perclorato que inhibe competitivamente la acumulación de yoduro mediada por NIS (103), y así mismo, se transfectaron células con un vector vacío para evidenciar que la captación de yoduro es mediada únicamente por NIS. Así mismo,

cabe mencionar que sólo las células que expresen NIS en su membrana plasmática son capaces de transportar yoduro. Mediante este experimento se pudo evidenciar que las células que expresan las versiones mutantes de NIS reducen significativamente los niveles de captación en comparación con las células que expresan la versión WT (Figura 8B). Con la finalidad de saber si estos resultados son debidos a un defecto intrínseco en la función o la localización subcelular de la proteína, se analizó por microscopía confocal la localización de las variantes en estudio conjuntamente con la marcación de secuencias SEKDEL presente en proteínas retenidas en el RE bajo condiciones permeabilizantes. Se observó que las mutantes quedan principalmente retenidas a nivel de RE, en comparación a la proteína WT que está presente principalmente en membrana plasmática (Figura 8C). Por otra parte, el patrón electroforético que se pudo apreciar en el extracto proteico de células transfectadas con la versión WT de NIS reveló polipéptidos no glicosilados (~55 kDa, banda A), parcialmente glicosilados (~60 kDa, banda B) y completamente glicosilados (~90-100 kDa, banda C), no así con las versiones mutantes donde no se evidenció la presencia de la banda de NIS completamente glicosilado (Figura 8D). Estos resultados reflejan que las mutantes p.D331N y p.S547R sólo maduran parcialmente producto de su retención en el RE, a diferencia de la proteína WT que madura completamente en su paso por el aparato de Golgi en su tráfico hacia la membrana plasmática (16).

La importancia de los residuos mutados demostrada a través de estos experimentos, queda respaldada cuando se alinean las secuencias aminoacídicas de diferentes ortólogos de NIS humano (Figura 8E), así como las distintas proteínas miembros de la familia SLC5A humana (Figura 8F), al observar un alto grado de conservación de los aminoácidos presentes en estas posiciones, poniendo de relieve el valor de estos residuos en la biología de NIS (16).



**Figura 8. Identificación y caracterización funcional de las variantes p.D331N y p.S547R.** (A) Cromatogramas de parciales de las secuencias que cubren la región de las variantes en los exones 8 (c.991G> A, p.D331N) y 13 (c.1.641C> A, p.S547R) del gen *SLC5A5*. Se indican las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos correspondientes, utilizando el código de una letra. El paciente 1 es heterocigoto compuesto para los alelos mutantes p.D331N y p.S547R de NIS. (B) Captación de ioduro en células HEK293T que expresan transitoriamente un vector vacío (Mock), WT, D331N o S547R de NIS. Las células se incubaron con 10 μM de I<sup>-</sup> en ausencia (barras negras) o presencia (barras grises) de perclorato. Los datos se expresan en pmol de I<sup>-</sup> / μg de ADN (n = 3) y se estandarizan mediante la eficiencia de transfección evaluando la expresión total de NIS mediante citometría de flujo. \* p <0.05 respecto a la captación de NIS WT (ANOVA, prueba de Newman-Keuls). (C) Inmunofluorescencia por microscopía confocal de células HEK293T permeabilizadas teñidas con anticuerpos anti-NIS (verde) y anti-SEKDEL (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barras de escala: 10 μm. (D) Ensayo de Western blot de lisados de células HEK293T revelando con anticuerpos anti-NIS humano y α-tubulina. Las etiquetas en el lado derecho de la transferencia indican las movilidades electroforéticas relativas de los polipéptidos NIS correspondientes dependiendo de su estado de glicosilación. (E) Alineamiento del software PSI/TM-Coffee de múltiples secuencias de aminoácidos de ortólogos NIS de diferentes especies de metazoos y (F) miembros de la familia SLC5A humana alrededor de los aminoácidos mutados D331 y S547 de NIS humano. Las puntas de flecha denotan la posición de los aminoácidos mutados.

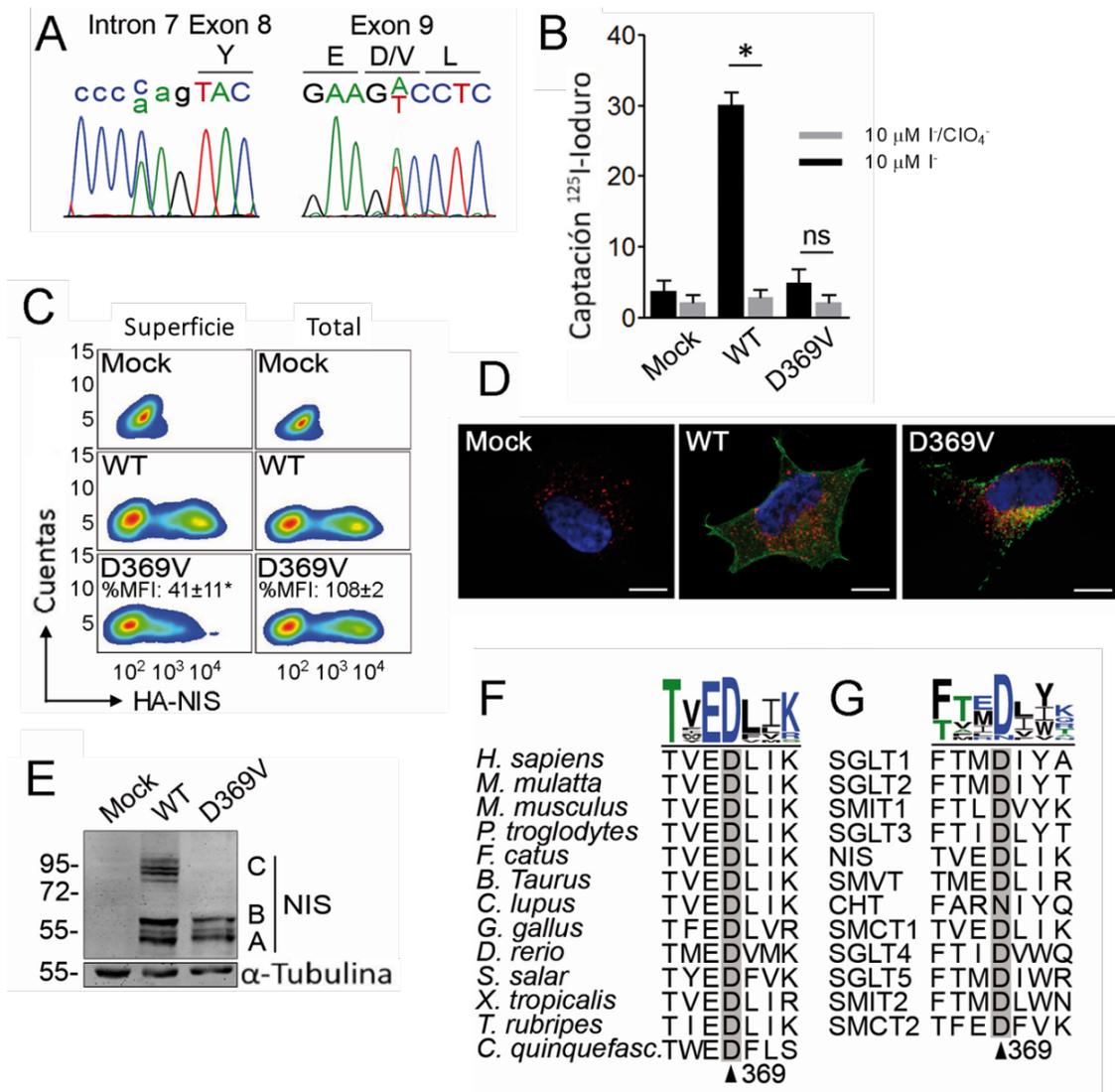
## 4.4.2 Caracterización funcional de las variantes p.D369V y c.970-3C>A NIS.

### 4.4.2.1 p.D369V

Acorde al modelo actual de la estructura terciaria de NIS (81), el ácido aspártico de la posición 369 se localiza en el segmento transmembrana 9. Para estimar la malignidad de la variante p.D369V, se realizó un análisis *in silico* usando softwares predictores de patogenicidad, cuyos resultados arrojaron que la variante p.D369V es posiblemente patogénica PolyPhen-2= 1.0 (dañino); MutationTaster2, p=1.0 (causa de enfermedad); SIFT= 0.01 (0.0: deletéreo).

Complementario a este análisis, se realizaron estudios funcionales para estudiar en profundidad los efectos de la variante p.D369V. El ensayo de captación con yoduro radioactivo evidenció que las células expresando transitoriamente la mutante p.D369V NIS pierden completamente la capacidad de acumular yoduro (Figura 9B), en comparación con aquellas células expresando NIS WT. De tal forma que, para poder explicar estos resultados, se realizó una citometría de flujo marcando HA-NIS en condiciones permeabilizantes y no permeabilizantes, y se pudo apreciar que la mutante p.D369V llega en escasa cantidad a membrana plasmática en comparación a la versión WT de NIS, cuando ambas se expresan en cantidad similares (Figura 9C). Y al evaluar la localización subcelular de esta mutante mediante inmunofluorescencia con microscopía confocal en células permeabilizadas, se evidenció que la variante p.D369V queda principalmente retenida a nivel de RE ya que co-localiza con el marcador de RE SEKDEL, a diferencia de NIS WT que se expresa principalmente en la membrana plasmática (Figura 9D). Complementariamente, el patrón electroforético de esta variante reveló que carece de la banda madura o completamente glicosilada de NIS (Figura 9E).

Los resultados demuestran que la variante p.D369V presenta un defecto en su maduración, y esto repercute en su transporte intracelular de RE hacia el aparato de Golgi, poniendo de relieve que el ácido aspártico de la posición 369 es un residuo clave para el transporte de NIS a membrana plasmática, y presenta un alto grado de conservación entre ortólogos de NIS (Figura 9F) y miembros de la familia SLC5A humana (Figura 9G).



**Figura 9. Caracterización funcional de la variante p.D369V.** (A) Cromatograma parcial de las mutaciones identificadas en el Paciente 2. Se muestra la región cercana a la mutación en el exón 9 (c.1106A>T) y en el intrón 7 (c.970-3C>A) del gen *SLC5A5*. (B) Captación de <sup>125</sup>I-ioduro en células HEK293T expresando de forma transitoria un vector vacío (Mock), WT o D369V. Los resultados se expresan en pmol ioduro/μg ADN. \*p<0.05 respecto a captación de NIS WT, ns: sin significancia estadística (ANOVA, Dunns post-test). (C) Citometría de flujo analizando la expresión de NIS WT o D369V en células HEK293T no permeabilizadas (superficie) y permeabilizadas (total). (D) Microscopía confocal analizando la localización subcelular de NIS WT o D369V en células HEK293T permeabilizadas marcadas con anticuerpos anti-NIS (verde) y anti-SEKDEL (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 10 μm. (E) Western blot de NIS WT o D369V. (C: Péptido completamente glicosilado, B: péptido parcialmente glicosilado, A: péptido sin glicosilaciones) α-Tubulina como control de carga. (F) Alineamiento del software PSI/TM-Coffee de múltiples secuencias de aminoácidos de ortólogos de NIS de diferentes especies de metazoos y (G) miembros de la familia *SLC5A* humana alrededor del aminoácido mutado D369V de NIS humano. Las puntas de flecha denotan la posición del aminoácido mutado.

#### 4.4.2.2 c.970-3C>A

La variante intrónica c.970-3C>A que porta el paciente 2 se localiza en el sitio aceptor de empalme del intrón 7 del gen *SLC5A5* (Tabla 5). Con el propósito de estudiar el impacto de esta variante en el empalme del gen de NIS, se hicieron análisis *in silico* utilizando distintos algoritmos informáticos predictores de sitios de empalme y se pudo

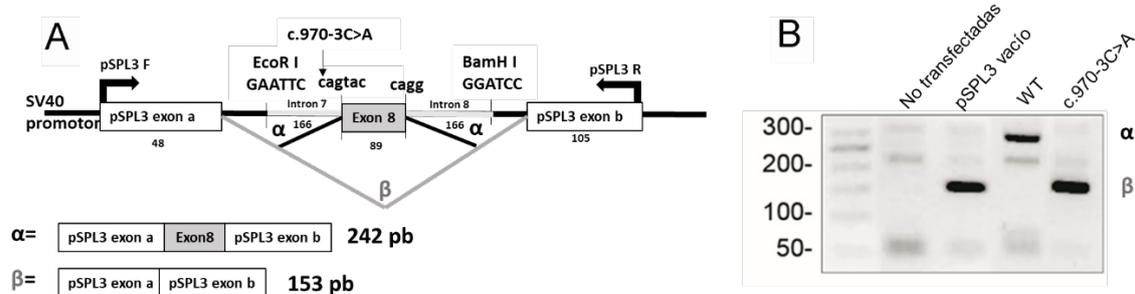
evidenciar que la variante c.970-3C>A interrumpiría el sitio aceptor canónico de empalme ubicado en el límite del intrón 7 y el exón 8, afectando el empalme normal del pre-mRNA de NIS (Tabla 11).

**Tabla 11. Análisis *in silico* de la variante c.970-3C>A.**

Variante	Secuencia	GeneSplicer (0-15)	NNSplice (0-1)	HSF (0-100)	MES (0-16)	ASSP $\geq 4.5$	NetGene2
WT	ccc <u>c</u> agTAC	3.53	0.56	86.6	1.59	6.465	0.34
c.970-3C>A	ccc <u>a</u> agTAC	0 (deletérea)	0 (deletérea)	77.2	0 (deletérea)	2.816 (deletérea)	0.19 (deletérea)

Se subraya la posición 970-3 del sitio aceptor de empalme del intrón 7 (minúsculas). La secuencia del exón 8 se muestra en letras mayúsculas. Se adjuntan las puntuaciones obtenidas para la secuencia WT y mutante utilizando los softwares indicados. Para cada software, el rango de escala se indica entre paréntesis. El efecto deletéreo de la variante se predice si el cambio en la variación fue superior al 15% con respecto al WT (% de variación = [(puntuación de la variante - puntuación de WT) / puntuación de WT] \* 100).

Para evaluar funcionalmente el impacto de la variante sobre el empalme del exón 8, se hicieron ensayos de minigen basados en el plásmido pSPL3. Este vector diseñado específicamente para evaluar eventos de corte y empalme de RNA, funciona como un pequeño gen artificial compuesto por una secuencia promotora SV40, una secuencia exón-intrón-exón con sitios de corte y empalme funcionales donadores y aceptores y una señal de poliadenilación tardía (104). Dentro del intrón único de pSPL3 se localiza un sitio de clonado múltiple, en el cual se insertó el exón 8 de NIS y 166 pb de los intrones adyacentes. A esta construcción de expresión se le denomina minigen, y según el efecto de la variante a estudiar se producirán distintos productos de corte y empalme (Figura 10A).



**Figura 10. La variante c.970-3C>A causa un empalme incorrecto del exón 8. (A)** Esquema de la construcción de minigenes en pSPL3 utilizada para los ensayos funcionales. Las flechas muestran los primers específicos (dUSD2 y dUSA4) usados en experimentos de RT-PCR para amplificar los exones del vector pSPL3. Se sintetizaron fragmentos genómicos sin la mutación y con la mutación c.970-3C>A del gen *SLC5A5* y se subclonaron entre los exones a y b del vector pSPL3 usando sitios de restricción para EcoRI y BamHI presentes en la secuencia intrónica. La localización de la variante c.970-3C>A se indica con una flecha. Se representan esquemáticamente las secuencias de los productos de corte y empalme  $\alpha$  y  $\beta$ . **(B)** Electroforesis en gel de agarosa de productos de RT-PCR de células FRTL-5 transfectadas transitoriamente con el minigen WT, c.970-3C>A, vacío o no transfectadas.

Para este experimento se transfectaron transitoriamente células de tiroides de rata FRTL-5 con las versiones WT y mutante de los minigenes en estudio, así como un vector

vacío. Los resultados revelaron que la variante c.970-3C>A genera un transcripto principal de ~150 pb (Figura 10B) compatible en tamaño con la omisión del exón 8 (producto  $\beta$ ) (Figura 10A), y equivalente al producto que se genera cuando las células se transfectaron con el vector vacío (Figura 10B). Por el contrario, el minigen WT genera una transcripción principal de ~250 pb (Figura 10B) compatible con la transcripción canónica completa que incluye el exón 8 (producto  $\alpha$ ) (Figura 10A). Así mismo, cabe mencionar que la omisión del exón 8 causada por la variante c.970-3C>A cambia el marco de lectura abierto de la transcripción y genera un codón de terminación prematuro río abajo, lo que conduce a la formación de una proteína trunca que corresponde a la variante de NIS p.Y324Hfs\*148.

#### 4.5 Caracterización funcional de variantes del gen *TG*.

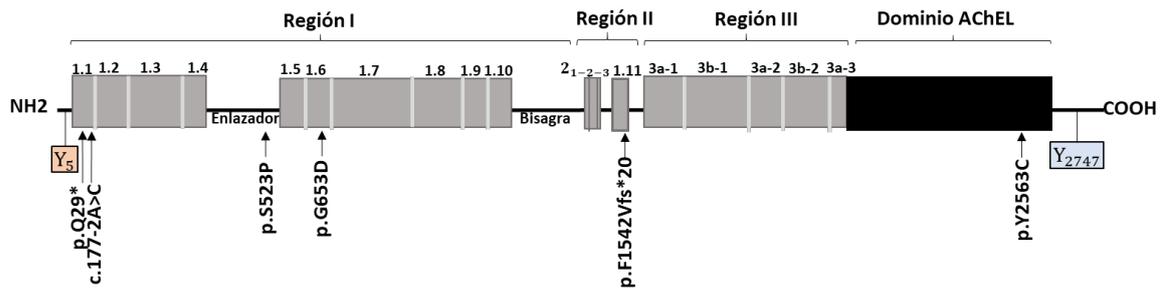
Con la finalidad de comprobar la naturaleza patogénica de las variantes encontradas por diferentes estrategias de secuenciación masiva, y dilucidar la etiología genética subyacente a la enfermedad de los pacientes, nos dispusimos a realizar estudios *in silico* e *in vitro* que nos permitieran alcanzar los objetivos planteados en el presente trabajo de investigación. A continuación, a manera de resumen se enlistan las mutaciones encontradas en el gen *TG*:

**Tabla 12.** Resumen de las mutaciones de *TG*.

Paciente	Variante de TG	SNP	Frecuencia alélica	DNA	Proteína	Región de Tg
3	c.4623_4624insG	-	-	Exón 22	p.F1542Vfs*20	Subunidad repetitiva 1.11
4	c.2001G>A	rs2069548	0.01395	Exón 9	p.G653D	Subunidad repetitiva 1.6
7	c.85C>T	rs1554648860	-	Exón 2	p.Q29*	Subunidad repetitiva 1.1
7	c.177-2A>C	-	-	Intrón 2	p.T59Sfs*17	Subunidad repetitiva 1.1
8	c.7688A>G	rs368587657	0.00003182	Exón 44	p.Y2563C	Dominio AChEL
9	c.1567T>C	rs116062097	0.001536	Exón 9	p.S523P	Enlazador

Debido a la amplia distribución de estas mutaciones en la estructura proteica de TG, y para visualizar mejor su impacto en la estructura de esta proteína, se las representó esquemáticamente en la estructura secundaria del monómero de la TG humana (Figura

11).



**Figura 11. Resumen esquemático de las mutaciones de TG reportadas.** Se ubican en la estructura secundaria del monómero de TG las diferentes mutaciones reportadas repartidas en las distintas regiones de la proteína. Se señalan los principales sitios hormonogénicos, para T4 en la tirosina 5 cerca del amino terminal (rojo) y para T3 se en la tirosina 2747 en el extremo carboxilo terminal (azul).

Complementariamente, se realizó un análisis *in silico* con distintos softwares predictores de malignidad para estimar la patogenicidad de las variantes encontradas:

**Tabla 13. Análisis *in silico* de las mutaciones de TG.**

Variante de TG	Proteína	Polyphen (0-1)	PROVEAN (valor de corte= -2.5)	Mutation taster (0-215)
c.4623_4624insG	p.F1542Vfs*20	-	-	Causa de enfermedad
c.7688A>G	p.Y2563C	1.0 (Probablemente dañino)	-5.101 (Deletéreo)	194 (Polimorfismo)
c.1567T>C	p.S523P	0.049 (Benigno)	-1.762 (Neutral)	74 (Polimorfismo)
c.2001G>A	p.G653D	1.0 (Probablemente dañino)	-3.430 (Deletéreo)	94 (Causa de enfermedad)

#### 4.5.1 Caracterización funcional de la variante de empalme c.177-2A>C TG.

Con el propósito de estudiar el impacto de esta variante en el empalme del gen *TG*, se hicieron análisis *in silico* utilizando distintos algoritmos informáticos predictores de sitios de empalme y se pudo evidenciar que la variante c.177-2A>C interrumpiría el sitio aceptor canónico de empalme ubicado en el límite del intrón 2 y el exón 3, afectando el empalme normal del pre-mRNA de *TG* (Tabla 14).

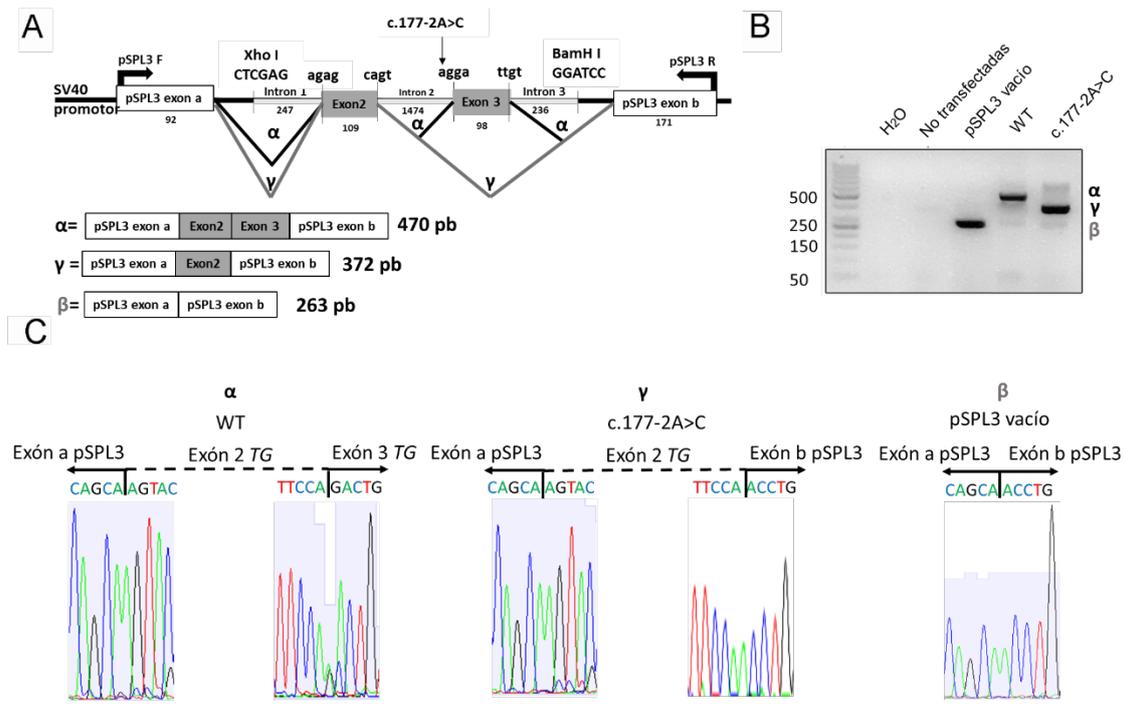
**Tabla 14. Análisis *in silico* de la variante c.177-2A>C.**

Variante	Secuencia	NNSplice (0-1)	HSF (0-100)	MES (0-16)	ASSP ≥ 4.5	NetGene2
WT	cctcagGAC	0.93	94.22	9.4	9.878	0.97
c.177-2A>C	cctccgGAC	0 (deletérea)	65.28 (deletérea)	1.36 (deletérea)	0 (deletérea)	0 (deletérea)

Se subraya la posición 177-2 del sitio aceptor de empalme del intrón 2 (minúsculas). La secuencia del exón 3 se muestra en letras mayúsculas. Se adjuntan las puntuaciones obtenidas para la secuencia WT y mutante utilizando los softwares indicados. Para cada software, el rango de escala se indica entre paréntesis. El efecto deletéreo de la variante se predice si el cambio en la variación fue superior al 15% con respecto al WT (% de variación = [(puntuación de la variante - puntuación de WT) / puntuación de WT] \* 100).

La evaluación funcional de la variante de *TG* c.177-2A>C se realizó mediante la construcción de minigenes basados en el plásmido pSPL3 (Figura 12A), los cuales fueron transfectados transitoriamente en células HeLa con las versiones WT y mutante de los minigenes en estudio, así como el vector vacío. Acorde a este esquema de clonado, la transcripción canónica completa de este minigen incluye el exón 2 y 3 de *TG* (producto  $\alpha$ ) (Figura 12A), la omisión del exón 3 generaría un producto de menor tamaño (producto  $\gamma$ ) (Figura 12A), mientras que el vector vacío generaría un transcrito que corresponde a los exones de pSPL3 (producto  $\beta$ ) (Figura 12A). Los resultados revelaron que el minigen con la versión WT genera un transcrito principal de ~450 pb (Figura 12B) compatible con el producto  $\alpha$ , la variante c.177-2A>C genera un único producto transcripcional de ~350 pb equiparable en tamaño con el producto  $\gamma$  (Figura 12B), mientras que el vector vacío genera un producto de ~250 pb (Figura 12A) similar producto  $\beta$  (Figura 12B). La secuenciación de Sanger de los productos de PCR confirmó la inclusión y exclusión del exón 3 de *TG* en el mRNA de los minigenes WT y c.177-2A>C, respectivamente (Figura 12C).

Por otra parte, la omisión del exón 3 de *TG* causada por la variante c.177-2A>C cambia el marco de lectura abierto de la transcripción y genera un codón de terminación prematuro río abajo, lo que conduce a la formación de una proteína trunca que corresponde a la variante de *TG* p.T59Sfs\*17.

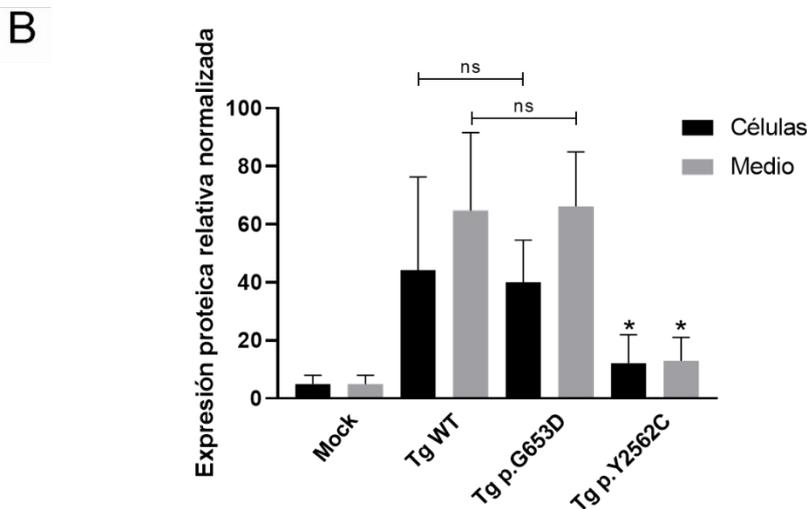
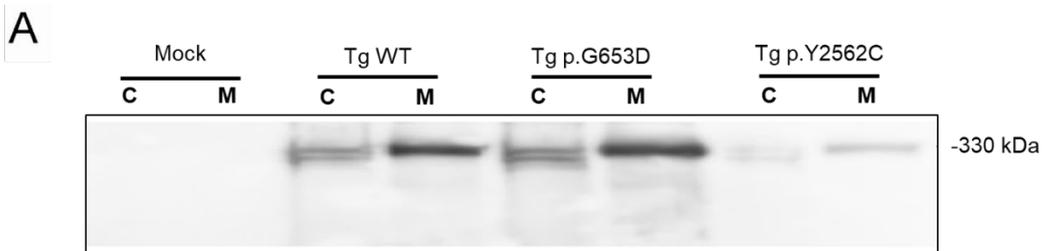


**Figura 12. La variante c.177-2A>C causa un empalme incorrecto del exón 3 de *TG*.** (A) Esquema de la construcción de minigenes en pSPL3 utilizada para los ensayos funcionales. Las flechas muestran los

primers específicos (SD6 y SA2) usados en experimentos de RT-PCR para amplificar los exones del vector pSPL3. Se amplificó el fragmento genómico a estudiar, y se subclonó entre los exones a y b del vector pSPL3 usando sitios de restricción para XhoI y BamHI. Posteriormente mediante mutagénesis sitio dirigida se generó la variante c.177-2A>C del gen *TG*. La localización de esta variante se indica con una flecha. Se representan esquemáticamente las secuencias de los productos de corte y empalme  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\beta$  (B) Electroforesis en gel de agarosa de productos de RT-PCR de células HeLa transfectadas transitoriamente con el minigen c.177-2A>C, WT, vacío, no transfectadas y un control interno negativo con agua (C) Cromatograma parcial de los productos de RT-PCR  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\beta$ . Se señalan las uniones entre los respectivos exones.

#### 4.5.2 Caracterización funcional de las variantes p.G653D y p.Y2563C *TG*.

Con la finalidad de determinar la patogenicidad de las variantes identificadas que generan un cambio de sentido y resultaran predichas como patogénicas por los predictores utilizados, en colaboración con la Dra. Cintia Citterio (Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires), se procedió a realizar estudios funcionales transfectando transitoriamente células HEK-293T, que no expresan *TG* de forma endógena, con un vector de expresión que contiene el cDNA codificante de *TG* de ratón para la versión WT y las versiones mutantes p.G653D y p.Y2562C (equivalente en ratón a la tirosina de la posición 2563 en humano) *TG* identificadas en los pacientes. Al evaluar la expresión proteica de *TG* en el lisado celular (C) y el sobrenadante del cultivo (M) mediante WB no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión entre *TG* WT y la variante p.G653D (Figura 13A y B). Sin embargo, se pudo observar que la expresión de la variante p.Y2562C está sumamente disminuida tanto en el lisado celular como en el sobrenadante en comparación a la versión WT (Figura 13A y B).



**Figura 13. Ensayo de WB de las mutantes de TG.** (A) Ensayo de Western blot de medio de cultivo celular sin suero (M) o lisado celular (C) de células HEK293T expresando de forma transitoria las versiones WT de TG, p.G653D, p.Y2562C o un vector vacío (Mock), revelando con un anticuerpo específico anti-Tg de ratón. (B) Cuantificación de los niveles de TG en el lisado celular (negro) y en el medio de cultivo (gris) en cuatro ensayos independientes usando el software Fiji. Los resultados se expresan en unidades relativas calculadas en base a la media de intensidad de las bandas menos el fondo. ns: diferencia no estadísticamente significativa. \* $p < 0.05$  con respecto de TG WT (ANOVA, prueba de Newman-Keuls).

#### 4.6 Desarrollo de un modelo *in vitro* de ITD con la tecnología de CRISPR/Cas9.

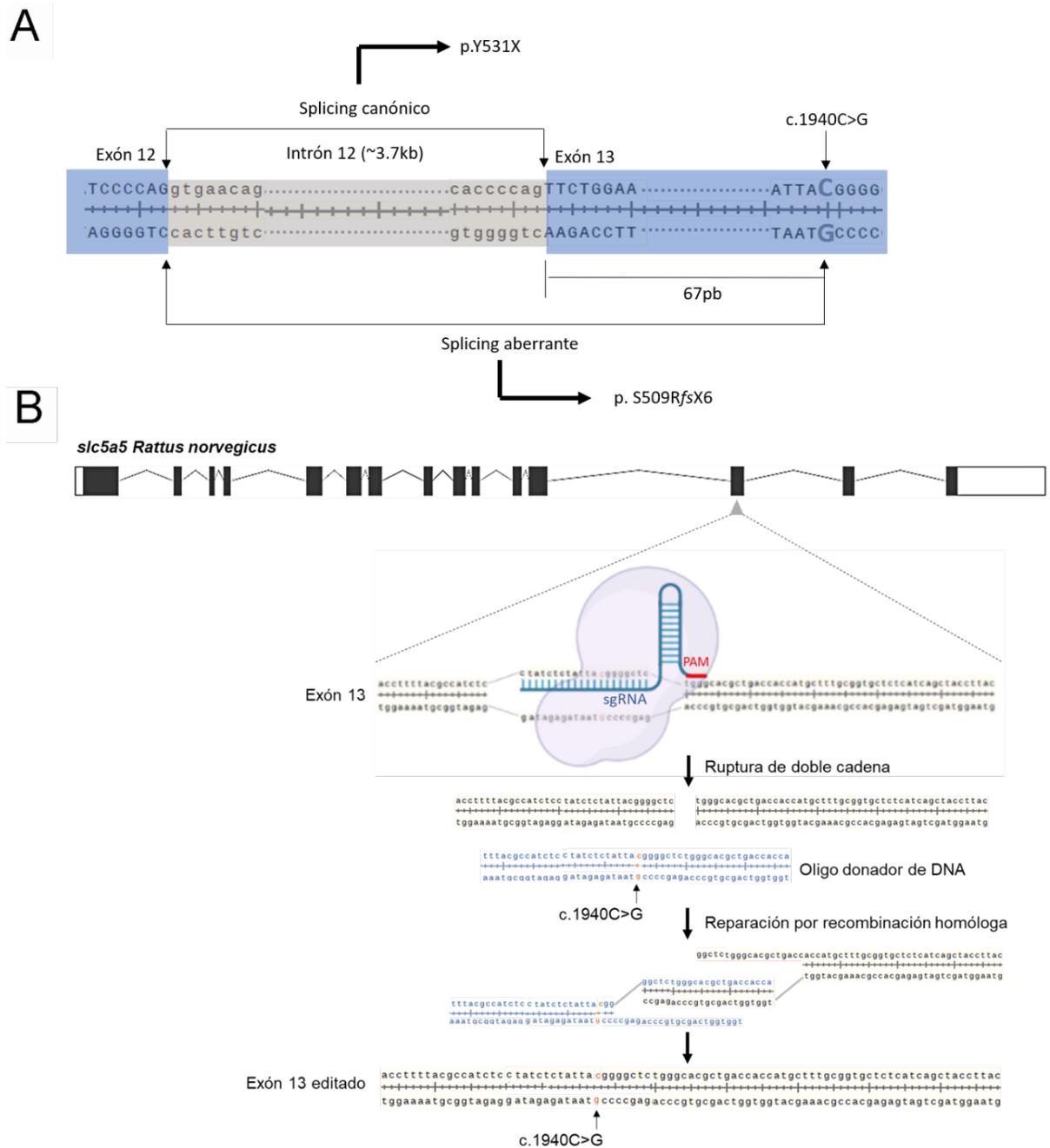
La variante c.1940C>G fue reportada por Pohlenz y colaboradores en 1998 (52) en una paciente pediátrica con ITD que heredó de su madre dicha mutación, y que portaba en heterocigosis compuesta la mutación p.Q267E heredada por línea paterna. La mutación c.1593C>G (reportada como c.1940C>G al contabilizar como posición +1 el inicio de la transcripción) se encuentra presente en el exón 13 de NIS, y produce un codón de parada prematuro (TAG) en la posición 531 (p.Y531\*), al mismo tiempo que genera un nuevo sitio 3' aceptor de corte y empalme (AC a AG), lo que conduce a una delección de 67 pb del exón 13 de NIS (Figura 14A).

En la caracterización funcional de esta variante, los autores no pudieron amplificar el alelo materno conteniendo la variante c.1940C>G en el cDNA sintetizada a partir de tejido tiroideo de la paciente, por lo que decidieron clonar el cDNA de la paciente en el vector pGEM-T para favorecer su amplificación; al analizar la secuencia de estos clones, se percataron que sólo 1 de los 8 clones obtenidos no tenía la delección de 67 pb predicha por la aparición del nuevo sitio aceptor 3', por lo que se concluyó que el sitio WT al inicio del exón 13 de NIS sigue teniendo actividad funcional, y el nuevo sitio mutado no es exclusivamente usado por la célula (52). Debido a esto, al usarse el sitio WT y por la presencia del codón de parada prematuro se produciría la proteína trunca p.Y531\*, pero si se usa el nuevo sitio aceptor se generaría la proteína p.S509Rfs\*6 como producto del empalme alternativo (Figura 14A).

Años más tarde, Pohlenz y colaboradores caracterizaron el impacto funcional de la variante p.S509Rfs\*6 en la secuencia proteica de NIS utilizando la variante p.S515\* como aproximación experimental, evidenciando que esta no es capaz de alcanzar la membrana plasmática (105).

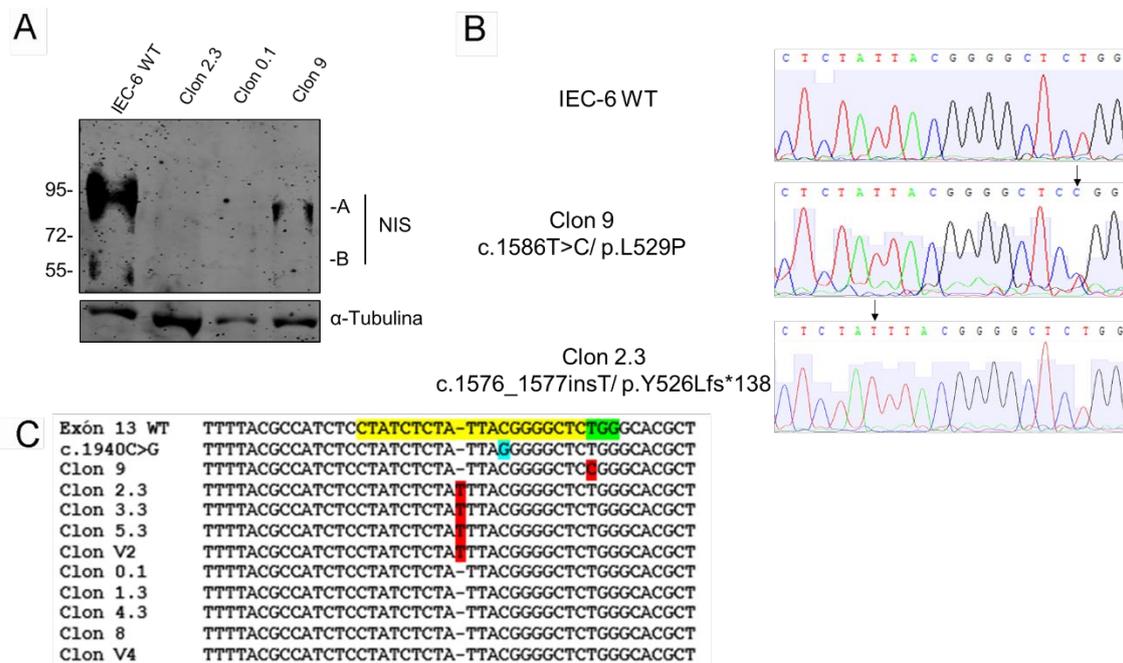
Debido a la experiencia del grupo caracterizando variantes que afectan el corte y empalme del mRNA, y con la finalidad de profundizar en el estudio de los efectos moleculares de la variante c.1940C>G, se propuso utilizar como modelo células IEC6 de intestino de rata que expresan NIS de forma endógena (82), y de esta manera mediante la implementación de la tecnología de edición génica CRISPR/Cas9 generar células IEC6 que contengan la variante c.1940C>G NIS (IEC6 c.1940C>G NIS). Para tal fin, se diseñó un gRNA dirigido contra el exón 13 del gen *Slc5a5* de rata, y un oligonucleótido donador de DNA conteniendo la variante c.1940C>G para favorecer la reparación del DNA por recombinación homóloga y de esa manera lograr la edición génica precisa del gen *Slc5a5*

en la línea celular IEC6, y así recrear la variante identificada en el paciente en un modelo de estudio para proceder a su caracterización funcional. (Figura 14B).



**Figura 14.** Efectos de la variante c.1940C>G y estrategia de edición génica con CRISPR/Cas9. (A) Se representa esquemáticamente en el gen *Slc5a5* de rata la comparación del corte y empalme canónico y aberrante del intrón 12 producto de la mutación c.1940C>G. Esta mutación genera un codón de parada prematuro y un nuevo sitio 3' aceptor de empalme de mRNA que resulta en una delección de 67pb del cDNA del exón de 13 de NIS. (B) Representación esquemática del gen *Slc5a5* de rata. Los recuadros negros simbolizan los 15 exones. En la parte inferior se muestra la secuencia parcial del exón 13 donde se dirigió el RNA guía para la edición mediante CRISPR/Cas9. En azul se indica la secuencia del RNA guía utilizado y en rojo la secuencia PAM de reconocimiento para la actividad endonucleasa de Cas9. El mecanismo de corte direccionado de Cas9 mediante el uso un sgRNA, va a producir una ruptura de doble cadena en el DNA, que será reparada por recombinación homóloga tomando como molde un oligo donador de DNA, produciéndose la edición génica precisa del gen *Slc5a5* de la línea celular IEC6.

Después de la selección clonal con puromicina, se aisló un total de 26 clones de los cuales se extrajo un lisado proteico y se realizó un Western blot utilizando el anticuerpo anti-NIS de rata (anti-rNIS) que está dirigido contra un péptido correspondiente al extremo carboxilo terminal de la proteína (amino ácidos 603–618) (14). De estos 26 clones obtenidos, sólo 10 presentaron ausencia de expresión de NIS (Figura 15A). La ausencia de la expresión de NIS es indicativo de que ambos alelos del gen fueron editados, ya que como se mencionó anteriormente, la mutación c.1940C>G puede producir dos proteínas truncas que carecen del extremo carboxilo terminal, por lo que el anticuerpo utilizado para este ensayo no permitiría que se lleve a cabo su detección. Sin embargo, a pesar de comprobar la ausencia de NIS en estos clones, fue necesario corroborar que estén editados correctamente portando la variante c.1940C>G, y no otra mutación producto de un mecanismo de reparación inespecífico como la unión de extremos no homólogos. Es por esto que se amplificó mediante PCR el mRNA del exón 13 de NIS, y se secuenciaron los productos obtenidos. Desafortunadamente, la secuenciación de los productos de PCR evidenció que ninguno de los clones obtenidos portaba la variante c.1940C>G (Figura 15 C y B).



**Figura 15.** Edición del gen *Slc5a5* de rata con CRISPR/Cas9. **(A)** Ensayo de Western blot de lisados de células IEC6 revelando con anticuerpos anti-NIS de rata y  $\alpha$ -tubulina. Se usaron muestras representativas de los clones obtenidos. Las etiquetas en el lado derecho de la transferencia indican las movilidades electroforéticas relativas de los polipéptidos de NIS correspondientes dependiendo de su estado de glicosilación. (A: Péptido completamente glicosilado, B: péptido sin glicosilaciones)  $\alpha$ -Tubulina como control de carga. **(B)** Cromatogramas parciales de la secuencia del exón 13 del gen *Slc5a5* de rata. Se muestran cromatogramas representativos de los clones obtenidos. Se señala con una flecha la inserción de una base en el clon 2.3 y el cambio de base en el clon 9. Se escribe el nombre de la variante correspondiente. **(C)** Se alinea la secuencia parcial de la hebra positiva del exón 13 WT del gen *Slc5a5* de rata, contra la versión mutante (c.1940C>G) y la secuencia del producto de PCR de clones representativos. En amarillo se marca la secuencia del guía, en verde el PAM reconocido por Cas9, en rojo las mutaciones encontradas y en azul la base mutada de la variante.

La secuenciación del exón 13 del gen *Slc5A5* de los clones 2.3, 3.3, 5.3 y V2 reveló una inserción homocigótica de una timina entre la posición 1576 y 1577 del cDNA (c.1576\_1577inst). Esta inserción produce un cambio de tirosina por lisina en la posición 526, y un corrimiento en el marco de lectura que provoca la aparición de un codón stop 229 aminoácidos después del residuo 526 (p.Y526Lfs\*229). Por otra parte, en el clon 9 se detectó una transición homocigota de citosina por timina en la posición 1586 del cDNA (c.1586C>T), que a nivel proteico se traduce en el cambio de lisina por asparagina en el residuo 529 (p.L529P). Sorprendentemente, la otra mitad de los clones secuenciados (0.1, 1.3, 4.3, 8, y V4) evidenció no tener mutación alguna en el exón 13 de NIS, a pesar de que a nivel proteico se observó la ausencia de NIS en el WB.

A pesar de haber logrado la obtención de algunos clones editados en la región reconocida por el RNA guía, no se logró editar de forma precisa el gen *Slc5a5* con la variante c.1940C>G, por lo tanto, recurrimos a la implementación de estrategias alternativas para estudiar los efectos moleculares de esta variante tanto a nivel del mRNA como a nivel proteico.

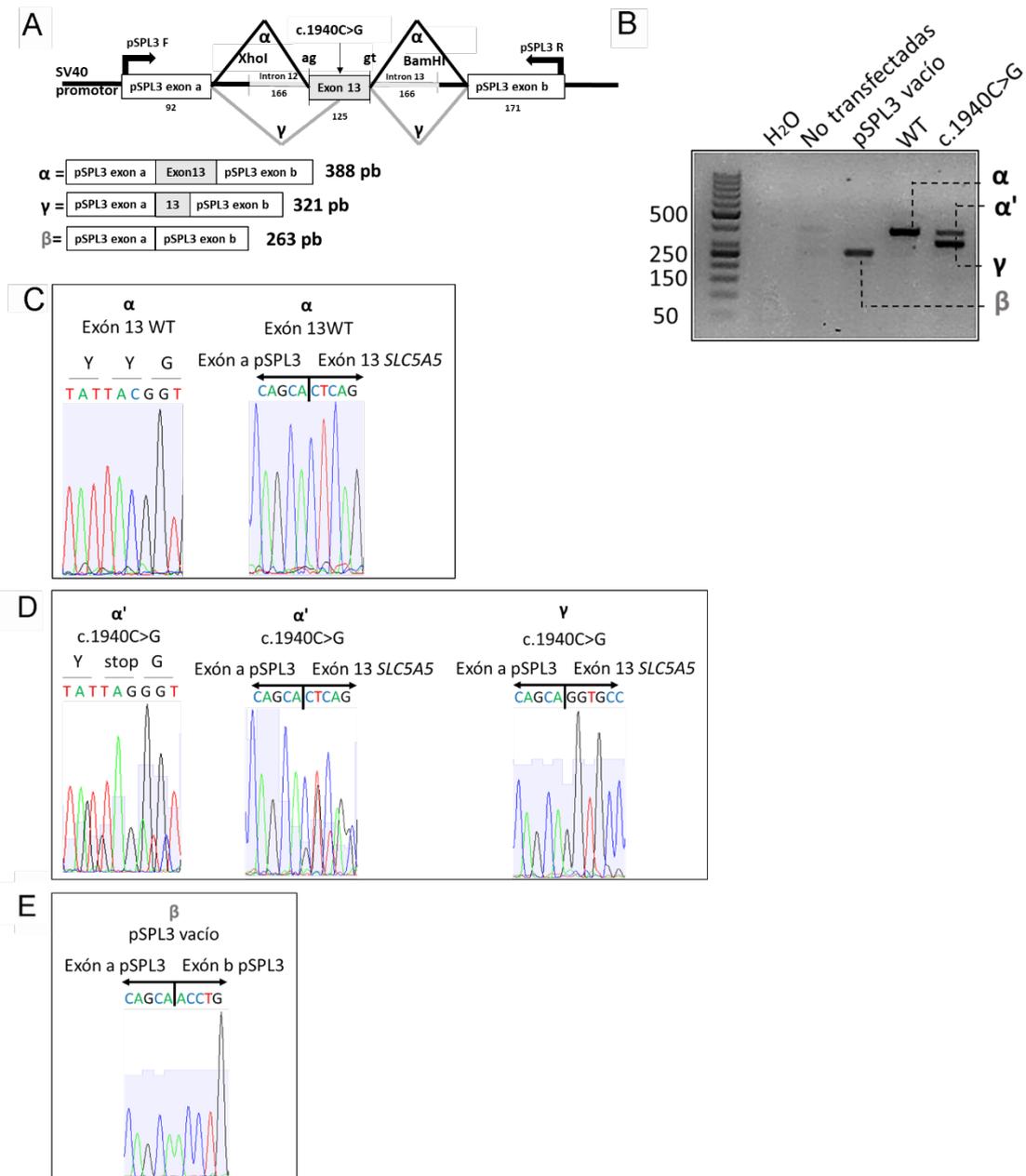
#### 4.6.1 Caracterización funcional de la variante c.1940C>G NIS.

Con el propósito de analizar más profundamente los efectos de la mutación c.1940C>G, se diseñó una estrategia de caracterización funcional que constó de dos partes: la primera enfocada en estudiar el impacto de esta variante sobre el proceso de corte y empalme del mRNA de NIS mediante ensayos de minigenes basados en el vector pSPL3, y la segunda que evalúa el efecto de esta variante en la función y estructura proteica de NIS caracterizando la variante p.Y531\* producto del codón de parada prematuro que produce esta variante.

##### 4.6.1.1 Impacto en el corte y empalme de la variante c.1940C>G de NIS.

Para estudiar los efectos que produce esta variante en el corte y empalme del mRNA de NIS, se transfectaron transitoriamente células de tiroides de rata FRTL-5 con las versiones WT y c.1940C>G de los minigenes en estudio (Figura 16A), y los resultados revelaron que la versión WT del exón 13 de NIS genera la transcripción de un producto de ~400 pb (Figura 16B) compatible con la transcripción canónica que incluye el exón 13 (producto  $\alpha$ ) (Figura 16A). Mientras que la variante c.1940C>G genera dos transcritos: uno de ~300 pb (Figura 16B) que corresponde a la delección de 67 pb del exón 13 de NIS (producto  $\gamma$ ) (Figura 16A), y otro transcripto de ~400 pb (producto  $\alpha'$ ) del mismo peso molecular que aquél producido por el exón 13 WT. El análisis densitométrico de los productos amplificados reveló que la cantidad relativa del producto  $\gamma$  (64.8) es mayor a aquella del producto  $\alpha'$  (34.1) (Figura 16B). La secuenciación de Sanger de las bandas obtenidas en el gel de electroforesis, confirmó que el producto  $\alpha$  corresponde a la secuencia WT del exón 13 (Figura 16C), mientras que la secuencia del producto  $\gamma$  exhibe la exclusión de 67 pb del exón 13 de NIS (Figura 16D). Por otra parte, el producto  $\alpha'$  conserva de forma completa el exón 13, pero contiene la mutación c.1940C>G (Figura

16D). El vector vacío genera un producto de ~250 pb (Figura 16B) que corresponde a los exones solos del vector pSPL3 (producto  $\beta$ ) (Figura 16E).

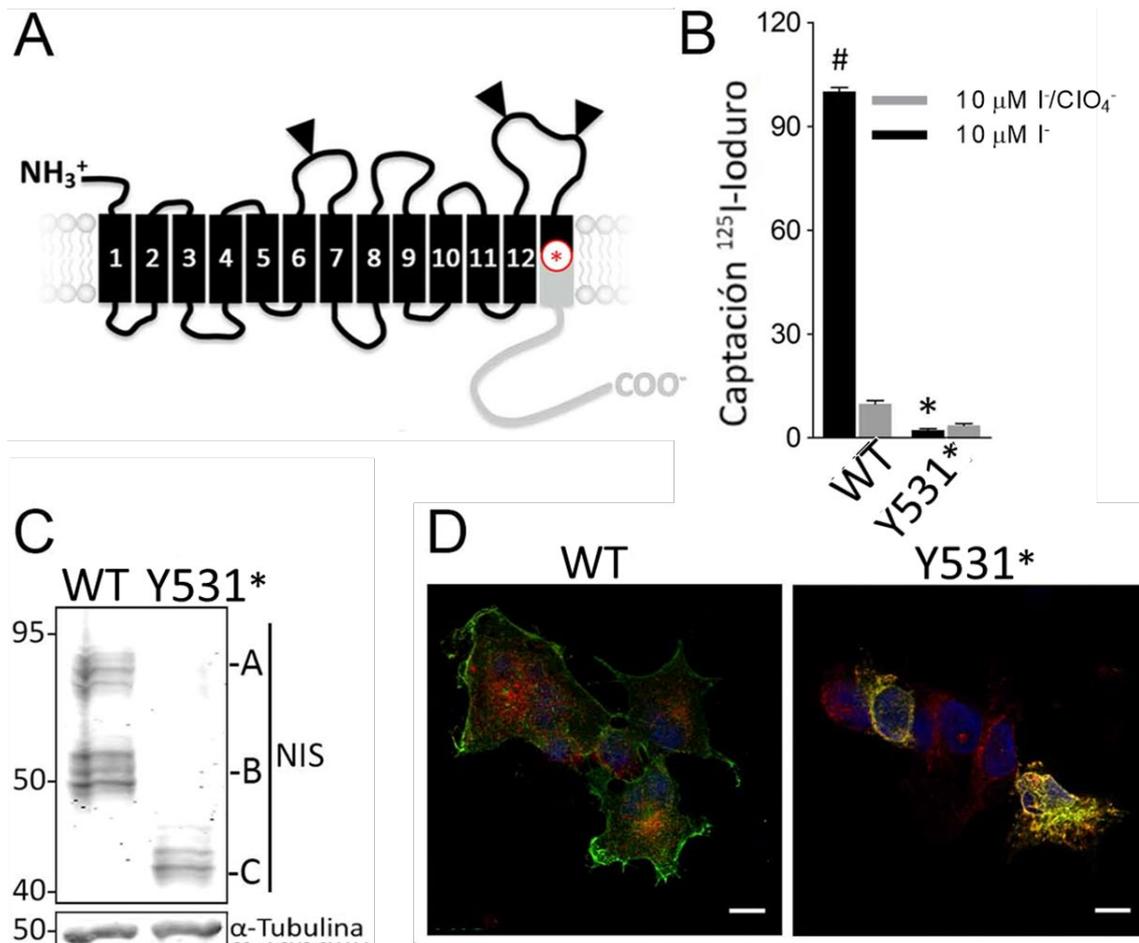


**Figura 16. La variante c.1940C>G causa un empalme incorrecto del exón 13 de NIS. (A)** Esquema de la construcción de minigenes en pSPL3 utilizada para los ensayos funcionales. Las flechas muestran los primers específicos (SD6 y SA2) usados en experimentos de RT-PCR para amplificar los exones del vector pSPL3. Se amplificó el fragmento genómico a estudiar, y se subclonó entre los exones a y b del vector pSPL3 usando sitios de restricción para XhoI y BamHI. Posteriormente mediante mutagénesis sitio dirigida se generó la variante c.1940C>G. La localización de esta variante se indica con una flecha. Se representan esquemáticamente las secuencias de los productos de corte y empalme  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (B) Electroforesis en gel de agarosa de productos de RT-PCR de células FRTL-5 transfectadas transitoriamente con el minigen c.1940C>G, WT, vacío, no transfectadas y un control interno negativo con agua (C) Cromatograma parcial de los productos de RT-PCR  $\alpha$ , (D)  $\alpha'$ ,  $\gamma$  (E) y  $\beta$ . Se señalan las uniones entre los respectivos exones.

#### 4.6.1.2 Impacto en la variante p.Y531\* en la función de NIS.

En la estructura secundaria de NIS, se puede apreciar que la variante p.Y531\* genera la pérdida de una parte del segmento transmembrana 13 y todo el extremo carboxilo terminal de NIS (Figura 17A). Es por esto que para evidenciar el efecto deletéreo de la variante c.1940C>G a nivel proteico, se procedió a transfectar de forma transitoria el plásmido de expresión conteniendo el cDNA codificante para la proteína WT y la mutante p.Y531\* NIS en la línea celular HEK293T. Los resultados de estos experimentos muestran que la variante p.Y531\* NIS no es capaz de transportar yoduro (Figura 17B). Por otra parte, en los ensayos de Western blot se observa que esta variante produce un patrón electroforético con una sola de banda ~40 kDa consistente con la pérdida de 112 aminoácidos y la maduración incompleta del árbol glicosídico (Figura 17C). Por último, al evaluarse la localización de la proteína por inmunofluorescencia marcando con un anticuerpo dirigido contra el epítopo HA localizado en el extremo amino terminal de la proteína, se observó que la mutante p.Y531\* presenta una localización intracelular, mostrando una fuerte co-localización con la señal de retención en el retículo endoplásmico SEKDEL, mientras que la versión WT se expresa principalmente en membrana plasmática (Figura 17D).

Recientemente, en nuestro laboratorio se identificó un motivo monoleucina (577-EEVAIL-583) necesario para el transporte basolateral de NIS desde el trans-Golgi hacia la membrana plasmática basolateral, y que estaría siendo reconocido por el complejo adaptador de clatrina 1B (AP1B) (102). Así mismo, se identificó el motivo triptófano ácido (563-LWWD-566) que es reconocido por KLC2 que media la salida de NIS desde el RE hacia el complejo de Golgi (61), y el motivo PDZ tipo 1 (641-TNL-643) que es reconocido por la proteína polar SCRIB que estabiliza la expresión de NIS en la membrana plasmática basolateral, retardando su internalización y posterior degradación por la vía lisosomal (106). Estos resultados en conjunto con la caracterización de la variante c.1940C>G, ponen de relieve la importancia del extremo carboxilo terminal de NIS para la funcionalidad de este transportador. Los efectos de esta mutación culminan en la producción de una proteína trunca sin propiedad funcional alguna, y al mismo tiempo, eliminan regiones funcionales importantes para el tráfico intracelular de NIS a la membrana plasmática.



**Figura 17. Caracterización funcional de la variante p.Y531\*.** (A) Estructura secundaria de NIS humano. El asterisco rojo representa la posición de la mutación p.Y531\*, y la parte gris representa la región de la proteína que se elimina a causa de la mutación. (B) Captación de  $^{125}\text{I}$ -ioduro en células HEK293T expresando de forma transitoria un vector codificante para la versión WT o p.Y531\* de NIS. Los resultados se expresan en pmol ioduro/ $\mu\text{g}$  ADN. \* $p < 0.05$  respecto a captación de NIS WT, # $p < 0.05$  respecto a la inhibición con perclorato (ANOVA, Dunns post-test). (C). Western blot de NIS WT o p.Y531\*. (A: Péptido completamente glicosilado, B: péptido parcialmente glicosilado, A: péptido trunco sin glicosilaciones)  $\alpha$ -Tubulina como control de carga. (D) Microscopía confocal analizando la localización subcelular de NIS WT o p.Y531\* en células HEK293T permeabilizadas marcadas con anticuerpos anti-NIS (verde) y anti-SEKDEL (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 10  $\mu\text{m}$ .

## 5. DISCUSIÓN

Uno de los principales objetivos de la genética humana es identificar los factores genéticos determinantes para el desarrollo de enfermedades. La comprensión de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a las enfermedades hereditarias puede traer consigo enormes beneficios para la humanidad, no sólo para mejorar y agilizar el diagnóstico de la patología del paciente, sino también para prescribir tratamientos más efectivos basados en la composición genética de una persona, para diseñar estrategias de prevención que ayuden a reducir los riesgos de la enfermedad, y para brindar un asesoramiento genético a las familias que padecen de estas patologías.

Con el advenimiento de técnicas de NGS se facilitó la secuenciación de grandes cantidades de datos genómicos, con aplicaciones variables que van desde la secuenciación de un solo gen, pasando por la secuenciación de paneles de genes, WES, hasta la secuenciación del genoma completo. En la actualidad, el uso de NGS como prueba diagnóstica en enfermedades genéticas se encuentra ampliamente aceptado (107,108).

En cuanto al diagnóstico molecular de HC, este tradicionalmente se hizo mediante la estrategia del gen candidato, que consiste en hacer una meticulosa evaluación clínica, bioquímica e imagenológica del paciente para demostrar que existe una clara asociación entre la presentación fenotípica de la enfermedad y posibles alteraciones en un gen específico. La sensibilidad clínica de esta prueba es alta en la mayoría de los casos porque el fenotipo y otros hallazgos apuntan claramente a un trastorno que está asociado con un único gen (109). En este contexto, la secuenciación del gen *SLC5A5* en pacientes con HC dishormonogénico con fenotipo típico de ITD es la prueba diagnóstica confirmatoria de esta variante poco común de HC, sin embargo, la caracterización molecular de las mutaciones encontradas en NIS representa la evidencia última y definitiva de la patogenicidad de dichas variantes, y así mismo, permite determinar cuáles son los requisitos moleculares que deben cumplirse para el correcto funcionamiento de este transportador.

La caracterización molecular de las variantes patogénicas de NIS identificadas en este trabajo de tesis reveló el papel fundamental de residuos aminoacídicos que no habían sido estudiados previamente. Tal es el caso de la variante p.S547R que se localiza en el carboxilo terminal de NIS y genera una proteína inmadura que no supera el control de calidad del RE y queda retenida en este organelo. La adición de una carga positiva cuando se produce el cambio de serina por arginina en esta posición, tiene efectos perjudiciales para la maduración de NIS que ponen de relieve la necesidad de un aminoácido neutro en el residuo 547. Un efecto similar se vio cuando se caracterizó la mutante p.G543E, donde en esta posición solamente las sustituciones con aminoácidos neutros como alanina y serina son capaces de producir una proteína activa, mientras que las cargas positivas o negativas no son toleradas (110). Al igual que la mutante p.G543E que permanece retenida en el RE, es posible que la mutante p.S547R cause un defecto de plegamiento tridimensional del transportador que interfiera con la maquinaria de control de calidad presente en el RE impidiendo que la mutante continúe

su ruta biosintética hacia la membrana plasmática. En este sentido, sería interesante saber si el efecto sobre el plegamiento causado por la mutación p.S547R genera una pérdida completa de la función intrínseca NIS, o si conserva algún remanente de actividad intrínseca como quedó demostrado en los experimentos de captación con vesículas selladas de membrana que presenta la variante p.G561E también presente en el carboxilo terminal de NIS (61).

En cuanto a la variante p.D331N, la caracterización funcional evidenció que esta mutación no es tan disruptiva como la p.S547R, ya que las células transfectadas con esta variante mostraron una mínima acumulación de yoduro (43), contra la ausencia de captación de yoduro observada en las células transfectadas con la variante p.S547R. Una posible explicación a esto es que el aspartato y la asparagina son aminoácidos con características similares, ya que su única diferencia radica en el grupo hidroxilo que tiene el aspartato en su cadena lateral y el grupo amino que tiene la asparagina; aunque el aspartato es considerado un aminoácido de carácter ácido y la asparagina como un aminoácido neutro, tienen un grado de polaridad semejante. Otro aspecto interesante a destacar es que la variante p.D331N que se localiza en el cuarto bucle extracelular, conectando los segmentos transmembrana 8 y 9, representa uno de los pocos reportes de variantes sin sentido patogénicas que se localizan en bucles extracelulares de NIS. Al respecto, la variante p.A320T que se localiza en este mismo bucle extracelular, recientemente fue reportada en heterocigosis en un paciente con HC dishormonogénico (55).

Actualmente se conoce muy poco sobre el rol que juegan estos dominios extracelulares en la fisiología molecular de NIS, sin embargo, se han reportado variantes en proteínas miembros de la familia SLC5A tales como los transportadores de sodio/glucosa SLGT1 y 2, que afectan dichas regiones extracelulares y presentan un alto grado de patogenicidad asociado a la aparición de defectos congénitos en el transporte de glucosa-galactosa (111).

Otra de las mutantes caracterizadas en este trabajo de tesis fue la variante p.D369V, la cual se encuentra cerca del extremo intracelular del segmento transmembrana 9. Los ensayos *in vitro* con esta mutante revelaron que causa la retención de NIS en el RE, alterando su transporte a membrana plasmática y, en consecuencia, anula la acumulación de yoduro mediada por NIS necesaria para la hormonogénesis tiroidea normal. Curiosamente, otras mutaciones que afectan al segmento transmembrana 9 también provocan una captación defectuosa de yoduro, como se reportó anteriormente en pacientes que albergan las variantes patogénicas p.Y348D y p.T354P (57,58,112). Otro aspecto interesante de este segmento transmembrana es que contiene el mayor número de aminoácidos que contienen grupos  $\beta$ -OH, debido a que participa directamente en la unión y translocación de sodio (113,114). Aunque el grado de conservación de este residuo sea el más alto entre las proteínas ortólogas y homologas de NIS, y tenga un rol crucial en el cotransporte de sodio, se observó que al sustituir aspartato por alanina en la posición 369, NIS seguía conservando el 50% de su actividad transportadora (113), en oposición a la ausencia de transporte de yoduro que se observa

al transfectar la mutante p.D369V. Este fenómeno puede ser explicado porque cuando se sustituye por alanina el residuo adyacente negativamente cargado (Glu-368) compensa la falta de la carga negativa en la posición 369, y mientras que la sustitución por valina además de generar una pérdida de la carga negativa, posiblemente también provoque un cambio conformacional por la presencia del grupo propilo en su cadena lateral, eliminando por completo la funcionalidad de NIS. De manera similar, las variantes patogénicas p.A388V y p.F405S encontradas en estado de heterocigosis compuesta que afectan el segmento transmembrana 9 del transportador SGLT1 provocan un defecto congénito en la absorción de glucosa-galactosa (115).

En resumen, la caracterización molecular de las variantes de NIS encontradas en los pacientes con *ITD* analizados en esta tesis remarca la importancia de estos residuos para las funciones de NIS. De igual forma, el alto grado de patogenicidad de estas variantes se ve reflejado en la aparición de la enfermedad detectada desde el periodo neonatal y la inhabilidad de la glándula de tiroides de estos pacientes para acumular el trazador radioactivo, una medida directa de la actividad de NIS *in vivo*. Al respecto, estudios históricos en este tema apuntan a que los valores normales de captación tiroidea de yoduro radioactivo son más altos para los recién nacidos que en etapas posteriores de la vida (116,117). En este sentido, es posible que tanto la edad de aparición del hipotiroidismo, como la severidad de la patología en pacientes con *ITD*, dependa del efecto de la mutación sobre la función de NIS, ya que se ha observado que en regiones de iodo-suficiencia, donde se mantienen los niveles normales de ingesta de yoduro, los pacientes portadores de variantes patogénicas homocigotas o heterocigotas compuestas en el gen *SLC5A5* tienen una marcada heterogeneidad clínica (46).

Referente a la disparidad clínica de pacientes con *ITD*, los reportes en la literatura sobre la caracterización molecular de la variante p.T354P revelan que esta variante es capaz alcanzar la membrana plasmática, pero produce una proteína intrínsecamente inactiva (118); dos pacientes homocigotos para esta mutación desarrollaron bocio a la edad de 8 (112) y 18 años (58) y no presentaron valores positivos de captación de yoduro. Por otro lado, la variante p.R124H que es retenida intracelularmente e intrínsecamente inactiva (119) produjo un cuadro de HC dishormonogénico en el periodo neonatal en un paciente homocigoto para esta variante que no acumulaba yoduro (46). Así mismo, la variante p.V270E que llega pobremente a la membrana plasmática, pero es intrínsecamente activa (34), se descubrió en heterocigosis compuesta con la variante p.R124H en un paciente que desarrolló hipotiroidismo en la infancia, con bocio nodular y niveles de captación reducidos, a diferencia del paciente con *ITD* que portaba la mutación homocigota p.R124H, que desarrolló la enfermedad desde neonato con una presentación clínica más severa.

Como se puede apreciar, a pesar de que el gen *SLC5A5* sea hasta ahora el único gen candidato para el desarrollo de *ITD*, no todos los pacientes con este síndrome presentan las mismas características clínicas, y en muchos casos no existe una correlación genotipo-fenotipo clara, ejemplo de esto son los pacientes analizados en esta tesis que

presentan fenotipo de *ITD*, pero sin mutaciones en *NIS*. Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se reportan pacientes con estas características.

La aparición de pacientes sin mutaciones aparentes que puedan identificarse como causantes de la enfermedad, puede ser debida a las limitaciones propias de las técnicas clásicas de diagnóstico molecular. A pesar de que la secuenciación bidireccional de Sanger se ha considerado el "estándar de oro" en las pruebas genéticas clínicas, y tenga una alta sensibilidad clínica capaz de identificar un genotipo que explique la patología de la mayoría de los pacientes con HC dishormonogénico, al menos para las mutaciones en los genes *TG* (68) y *SLC5A5* (6), es incapaz de detectar la mayoría de los cambios estructurales genómicos tales como, inversiones o traslocaciones balanceadas, cambios en el número de copias o deleciones y duplicaciones en zonas repetitivas (108,120), por lo que a menudo se necesita un segundo método para identificar estas alteraciones cuando la secuenciación del gen candidato falla.

Otro importante aspecto a considerar es que el HC constituye una patología con heterogeneidad alélica y con diferentes *locus* implicados en su desarrollo, por lo que en muchos casos resulta de gran utilidad evaluar distintos genes a la vez. Dicho esto, la evolución de las técnicas de NGS no sólo ha permitido secuenciar múltiples genes simultáneamente, sino que también aumentó la sensibilidad analítica de las pruebas de diagnóstico genético, y simplificó el proceso de toma de decisiones médicas (109). Esta estrategia de secuenciación consiste en el análisis de las regiones codificantes de genes de interés para una enfermedad específica, permitiendo no solo la secuenciación de varios cientos de genes blanco, sino también el procesamiento de un gran número de muestras de pacientes en un tiempo relativamente corto (121).

En el presente trabajo de tesis, gran parte de las mutaciones detectadas en la secuenciación de paneles de genes fueron en el gen *TG*. Si bien es un hallazgo sin precedentes en pacientes con fenotipo de *ITD*, *TG* es de los genes en los que más se reportan mutaciones en estudios de pacientes con HC por paneles de genes (72,121,122). No obstante, un alto porcentaje (~50%) de las variantes reportadas en estos estudios son de significado incierto o posiblemente benigno/patogénico (48,55,62). Esto se explica debido a que a medida de que aumenta la cantidad de datos genómicos secuenciados, también aumentan las probabilidades de encontrar variantes de significado incierto (109). Una forma de resolver este inconveniente y determinar la patogenicidad de una variante es evidenciar la segregación de dicha variante en el núcleo familiar del paciente analizado, corroborar que cumple con el modelo de herencia propuesto para la enfermedad en cuestión, y que produce un fenotipo asociado con la patología (109,120). En lo que respecta a este trabajo, en ninguno de los pacientes analizados por paneles de genes se extendió el análisis genético a los miembros de su familia, y esto representa una desventaja en términos de la utilidad clínica de los paneles de genes, ya que en estos casos no es posible brindar ningún tipo de asesoramiento genético, ni determinar con certeza si las variantes encontradas son un hallazgo incidental o son verdaderamente la causa de la patología. Sin embargo,

como alternativa para superar esta desventaja nos dispusimos a realizar la caracterización funcional de las variantes encontradas en el gen *TG*.

La mutación p.G653D de *TG* detectada al secuenciar el exoma del paciente 4, es predicha como patogénica por todos los predictores utilizados, debido a que la naturaleza del cambio de un aminoácido alifático apolar como glicina, por un aminoácido ácido polar como el aspartato, es de tipo radical. No obstante, esta mutación tiene una frecuencia alélica relativamente alta (0.0036) y ha sido previamente reportada (123). Esta variante se localiza en la subunidad repetitiva 1.6 de la región I de *TG*, y el paciente portador de esta variante expresa niveles en suero bajos-normales de *TG*. Una variante similar a la p.G653D que es la p.G634R, localizada en la misma región de la estructura secundaria de *TG*, que ha sido previamente reportada en estado de heterocigosis en un paciente con aplasia tiroidea (48), y en pacientes con dishormonogénesis (123,124). La caracterización funcional de p.G653D reveló que se expresa y secreta exactamente en las mismas proporciones que la versión WT de *TG*, por lo que es posible considerar que esta variante sea de carácter benigno, a pesar de que los softwares predictores utilizados la hayan predicho como patogénica. Otra variante que muy posiblemente sea de carácter benigno fue la p.S523P, debido a que el paciente 9 portador de esta variante presentaba niveles normales de *TG* sérica, además, esta variante tiene una frecuencia alélica (0.002) relativamente alta y fue predicha como benigna en todos los softwares utilizados. Por lo tanto, acorde a las guías del ACMG para la interpretación de variantes genéticas (79) esta variante debe ser clasificada como posiblemente benigna. Debido a esto, y a que la serina en esta posición no se encuentra conservada entre diferentes especies, y en *TG* de ratón aparece una prolina en esta posición, esta variante no fue caracterizada a nivel funcional.

En cuanto a la variante p.Y2563C hallada en el paciente 8, que fue predicha como deletérea por dos de los tres predictores utilizados, y tiene una frecuencia alélica de  $3.18 \times 10^{-5}$  reportada en gnomAD, involucra dos aminoácidos que tienen un rol fundamental tanto para la estructura como la función de *TG*: tirosina y cisteína.

El principal papel que desempeñan los residuos tirosina en la molécula de *TG*, es que mediante su iodación efectuada por la acción de la TPO se producen eventualmente hormonas tiroideas. No obstante, la fosforilación de *TG* que es una modificación postraduccional que ocurre en el aparato de Golgi, es otro proceso importante en el que se ven implicados los residuos tirosina y se cree que mejora la eficiencia de la formación de T3 (8,125). Una proteína implicada en este proceso es la serina quinasa FAM20C que reconoce el motivo S-X-E (donde X es cualquier aminoácido) y cataliza la fosforilación de proteínas secretadas. En este contexto, el silenciamiento de FAM20C en la línea celular de tiroides de rata PCCL3 disminuyó significativamente la capacidad de *TG* de formar T3 (125). Si bien no existe evidencia de que la tirosina en la posición 2563 esté implicada en la formación de hormonas tiroideas, debido a que se conoce cuáles son los sitios hormonogénicos de *TG* (26), cabe la posibilidad de que el cambio de tirosina por cisteína en esta posición provoque un cambio conformacional que afecte un motivo adyacente de reconocimiento para la proteína FAM20C (2565-SLE-2567). Aunque solamente la

serina de la posición 2721 ha sido reconocida como un sitio de fosforilación potencial de FAM20C (126), la serina de la posición 2565 puede ser considerada como otro posible sitio de fosforilación dado su alto grado de conservación.

Por otro lado, los residuos cisteína juegan un papel importante en la estructura de TG, debido a que se encuentran abundantemente presentes en todos los módulos de TG y organizan su estructura tridimensional mediante la formación de puentes disulfuro (25). Variantes de cambio de sentido que eliminan residuos de cisteína WT o crean nuevos residuos de cisteína, pueden provocar la eliminación o creación de nuevos enlaces disulfuro, respectivamente, alterando la arquitectura normal de TG, disminuyendo la interacción entre los sitios aceptores y donantes homonogénicos, y/o provocando un defecto en el transporte intracelular de la proteína (8,68). Por lo tanto, la presencia de la variante p.Y2563C podría alterar el patrón de puentes disulfuro provocando un cambio estructural en la estructura terciaria de TG que resulte deletéreo. El efecto deletéreo de esta variante quedó comprobado cuando se caracterizó molecularmente, debido a que se observaron niveles disminuidos de expresión y secreción de esta variante.

Existen varios reportes de mutaciones de cambio de sentido que crean nuevas cisteínas en TG, como la mutación p.R1270C reportada en un paciente con dishormonogénesis, la variante c.Y759C reportada en un paciente con atireosis (127), y la variante p.G304C que se encontró en heterocigosis compuesta con la variante p.R432X (128). Este último caso resulta de particular interés para este trabajo, debido a que el paciente portador de estas mutaciones fue diagnosticado con HC neonatal y a la edad de 21 años desarrolló un nódulo tiroideo en el lóbulo izquierdo. Los resultados de la centellografía revelaron que este nódulo era un nódulo frío, es decir, no era capaz acumular el trazador radioactivo <sup>123</sup>I-ioduro. Histológicamente no se observaron signos de malignidad, se observó una fuerte inmunotinción citoplasmática de TG, pero la inmunotinción de NIS era apenas detectable en el nódulo hiperplásico, y la mutación p.V600E del oncogén *BRAF* no fue detectada. Al respecto, es sabido que los niveles de expresión de NIS en los carcinomas tiroideos decaen significativamente (129), sin embargo, el nódulo tiroideo en este caso no era un carcinoma sino un nódulo hiperplásico, lo que plantea la siguiente interrogante: ¿por qué en este paciente y en los pacientes con mutaciones en TG analizados en este trabajo se encuentra comprometida la función de NIS? La respuesta puede venir desde múltiples perspectivas: las mutaciones en TG provocan un problema de plegamiento que genera su retención a nivel de RE (8), la acumulación en el RE de proteínas mal plegadas puede desatar mecanismos de respuesta que generen estrés de retículo. Si la cantidad de proteína acumulada en RE excede la capacidad de los mecanismos de respuesta, puede producirse daño y muerte celular (130). En el contexto de la glándula tiroidea, se ha demostrado que el estrés de retículo es capaz de disminuir los niveles proteicos y de mRNA de proteínas involucradas en la síntesis de hormonas tiroideas, tales como NIS, TPO y TG (131).

Otra posible explicación deriva del hecho de que TG es una de las proteínas más grandes del proteoma humano, y al ser tan grande, es plausible pensar en la posibilidad de que

no sirva únicamente como andamiaje para la síntesis de hormonas tiroideas, sino que tenga algunas otras funciones que no se han estudiado hasta el momento. Ejemplo de esto, son los trabajos de Suzuki en células FRTL-5 donde se observó que el aumento de los niveles de TG suprimió de forma dosis dependiente los niveles de mRNA, proteicos y la actividad del promotor del gen *Slc5a5* en presencia o ausencia de TSH (132,133). Así mismo, la supresión mediada por TG de los niveles de expresión proteica de NIS, se asoció estrechamente con una disminución de los niveles de captación de yoduro radioactivo inducida por TSH (132).

Tomando en conjunto las evidencias presentadas, es posible que las mutaciones de TG presentes en estos pacientes evitaran que fuera secretada al medio extracelular, aumentando su concentración en los tirocitos, y debido a problemas de plegamiento generaran estrés de retículo que indirectamente afectó la funcionalidad de NIS. Sin embargo, los pacientes con mutaciones en TG usualmente presentan inalterados sus niveles de captación de yoduro (65,67). Al respecto, es posible especular que la retención intracelular de diferentes mutantes del gen de TG tengan efectos dispares sobre el estrés de retículo, conllevando sólo en situaciones particulares a efectos colaterales sobre la captación de yoduro en estos pacientes.

Un aspecto importante a destacar es que existen varios reportes de variantes monoalélicas en TG (72,122,134,135), TPO, DUOX2, y el TSHR (48,62,124,127) en pacientes con HC. En estos casos, la aparente ausencia de una segunda mutación podría explicarse por las limitaciones técnicas de la secuenciación de paneles de genes, debido a que solamente se analizan las regiones codificantes de los genes incluidos en el panel, y no son detectables las microdeleciones o rearrreglos que involucran regiones reguladoras o intrónicas distantes de los genes analizados (8,120). No obstante, una hipótesis que podría explicar los casos de HC con una segregación diferente a la clásica autosómica recesiva, es el modelo de *two-hit*, donde en combinación con una mutación de línea germinal en un gen relevante para las funciones de la glándula tiroidea, ocurra una segunda mutación en un gen cuya función en la síntesis de hormonas tiroideas, la estimulación o el desarrollo de la glándula tiroidea, sea desconocido hasta el momento (136). En este sentido, existe copiosa información en la literatura de pacientes que presentan mutaciones en dos o más genes relevantes para las funciones de la glándula tiroidea, y cuyo efecto aditivo genera un solapamiento fenotípico propio de las alteraciones de cada gen (55,62,72,123).

Por otra parte, el segundo *hit* también podría ser un cambio epigenético que dé lugar a la haploinsuficiencia del gen en cuestión, silenciando el alelo WT, y permitiendo solamente la expresión del alelo mutado. Evidencia de esto es el caso reportado por Fugazzola *et. al.* (137) donde analizó una familia con un defecto total en la organificación de yoduro en la que los tres hijos afectados de esta familia tenían una sola mutación en TPO (p.R693W) heredada de su padre sano, y mediante secuenciación de mRNA extraído de tejido tiroideo, observaron que solo el alelo paterno mutante estaba siendo expresado en la tiroidea de sus hijos, y el alelo materno WT había sido silenciado.

A manera de conclusión, es posible que en los pacientes con mutaciones heterocigotas en un gen asociado al desarrollo de dishormonogénesis tiroidea, por algún mecanismo epigenético de carácter estocástico se haya silenciado el alelo WT y de esta manera sólo se esté expresando el alelo mutado, sin embargo, esta hipótesis no explica como las mutaciones en *TG*, contribuyen a disminuir la captación tiroidea de yoduro, por lo que es posible que exista una segunda mutación en un gen que no haya sido incluido en el panel de genes secuenciados, y que tenga funciones relevantes tanto para la captación de yoduro mediada por NIS, como para la síntesis de hormonas tiroideas, dando lugar al desarrollo de HC. En este marco de ideas, el progreso de las técnicas de NGS está permitiendo descubrir día con día un número cada vez mayor de genes asociados a trastornos hereditarios humanos, y también, contribuye al esclarecimiento de las bases moleculares de enfermedades complejas (138).

Entre las diferentes estrategias de NGS disponibles actualmente, sin duda alguna la más usada para el descubrimiento de genes nuevos implicados en enfermedades mendelianas es WES (109). En el contexto de las patologías congénitas que aquejan a la glándula tiroidea, la secuenciación del exoma ha contribuido al diagnóstico molecular de pacientes con HC con mutaciones en genes nunca antes relacionados con esta patología (139-144). En cuanto a los hallazgos realizados en esta tesis, el estudio del exoma en uno de los casos analizados por esta estrategia de NGS, reveló mutaciones en *BCOR*, un gen que no ha sido previamente relacionado a esta patología.

La proteína BCOR en asociación con BCL6 (97) o PCGF1 (98) actúa como un represor transcripcional regulando la expresión de diversos genes. La variante p.S1431Y se localiza en una región desordenada en medio de dos dominios funcionales de BCOR. Uno de estos dominios corresponde a tres secuencias de ankirina repetidas en tándem (residuos 1467 a 1558), cuyas funciones son principalmente mediar interacciones proteína-proteína, sin embargo, estos repetidos no son necesarios para la interacción de BCOR con BCL6 o las HDAC, lo que plantea la posibilidad de que estos estén siendo utilizados por otras proteínas para interactuar con BCOR (97). Así mismo, aunque actualmente no se ha dilucidado en su totalidad la estructura tridimensional de BCOR, el cambio de serina por tirosina en la posición 1431 podría generar un cambio conformacional que afecte las funciones de los dominios adyacentes de BCOR, ya que como es sabido, la tirosina por ser un aminoácido aromático tiene propiedades parcialmente hidrofóbicas, mientras que la serina es un aminoácido polar.

Las mutaciones en *BCOR* producen cuadros clínicos enmarcados en una serie de trastornos conocidos como microftalmias sindrómicas, específicamente, la microftalmia sindrómica tipo 2 producida por las mutaciones en *BCOR*, también conocida como síndrome OFCD, tiene características clínicas que se solapan con aquellas encontradas en pacientes con resistencia a las hormonas tiroideas, tales como cardiomiopatías, anomalías esqueléticas y funciones cognitivas disminuidas (94,100). En virtud de estos hallazgos, es posible que exista una relación entre las funciones de BCOR y los THR, dada la capacidad de BCOR de unirse a BCL6 interactuando a través de su dominio POZ, que es el mismo dominio donde BCL6 interactúa con NCoR y SMRT (97), correpresores

que en ausencia de T3, interactúan con los THR en complejo con el RXR para regular la expresión génica (145). No obstante, es importante resaltar que BCOR no tiene una similitud aparente en su secuencia con estos otros dos correpresores, y en estudios de coimmunoprecipitación no fue posible demostrar la interacción entre BCOR con NCoR o SMRT (101) o el THR $\beta$  (97), sin embargo, dicha interacción no ha sido evaluada con el THR $\alpha$ . Por otra parte, es necesario discutir que al proponer a BCOR como candidato de esta patología, se asume un modelo herencia dominante ligado al X, sin embargo, las mutaciones en este gen tienen penetrancia incompleta, ya que se han reportado tanto pacientes femeninas con mutaciones heterocigotas en *BCOR* que no desarrollan la patología (146) como pacientes varones con mutaciones heterocigotas en *BCOR* que si desarrollan la patología (100).

Para poder comprobar esta hipótesis, sería necesario secuenciar esta variante en los demás miembros de la familia para corroborar el modelo de herencia AD, extender los estudios clínicos necesarios para confirmar o descartar la presencia de otros signos y síntomas asociados con el síndrome OFCD o la resistencia, determinar si existe una modulación de la actividad transcripcional de THR $\alpha$  THR $\beta$  por BCOR, y si la variante p.S1431Y afecta la mencionada modulación transcripcional.

Por otra parte, la variante de *KCNJ12* encontrada al secuenciar el exoma del paciente 16 requiere que sea validada por otros métodos, ya que como se mencionó anteriormente, este gen tiene una alta homología con *KCNJ18* (92) y existe el riesgo de que se trate de un falso positivo resultante de un mapeo inexacto (93,109). Una forma de poder validar o descartar esta variante, es implementando un estrategia de secuenciación que permita generar amplicones más largos que faciliten el mapeo (147). Al margen de la veracidad de estos resultados, es interesante mencionar que algunos genes que codifican para canales transportadores de potasio han sido previamente relacionados con el desarrollo de HC: ratones deficientes para *Kcne2* (148) y *Kcnq1* (149) desarrollaron HC y anomalías cardíacas, así mismo, se evidenció que la ausencia de *Kcnq1* en estos ratones disminuye los niveles de captación tiroideos de yoduro radioactivo (150), por otra parte se reportó a un paciente con HC y cardiopatías congénitas con mutaciones en heterocigotas compuestas en *KCNQ1* (151). Es posible que la concentración osmótica de potasio regulada por estos transportadores que mueven potasio hacia al medio extracelular, tenga repercusiones directas en el potencial de membrana requerido para la correcta función de NIS (152).

Otro apartado importante de esta tesis son las mutaciones que alteran el empalme normal del mRNA de los genes *SLC5A5* y *TG*. El empalme del pre-mRNA es un paso esencial en la expresión génica eucariota. Durante la transcripción del DNA por la RNA polimerasa II, es necesario definir los bordes entre intrones y exones a medida que se sintetiza el pre-mRNA. Existen variantes genéticas que comprometen la especificidad del corte y empalme del pre-mRNA, dando como resultado la inclusión o exclusión total o parcial de un intrón o exón, respectivamente, del mRNA maduro, alterando así la secuencia codificante para proteínas (153). Conforme a los criterios ACMG para la clasificación variantes patogénicas de DNA, las variantes localizadas en las posiciones de

corte y empalme +1, -1, +2 y -2, son consideradas como fuertemente patogénicas y usualmente conllevan a que se saltee el exón adyacente a la variante (79). Sin embargo, para comprobar la patogenicidad de este tipo de variantes, se recomienda caracterizar las consecuencias moleculares de las variantes encontradas (71). En este sentido, se ha demostrado que la utilidad de los ensayos de minigén representan un buen enfoque para determinar el efecto de las variantes en el proceso de empalme cuando los genes presentan un perfil de expresión restringido, o es difícil obtener RNA de los tejidos de los pacientes (104,154). Además, se ha demostrado un alto nivel de concordancia entre los resultados obtenidos con estos ensayos y los efectos observados en el RNA del paciente (154).

En cuanto a las variantes de corte y empalme en el gen *TG*, hasta el momento solamente se han reportado 8 variantes en sitios aceptores de corte y empalme, siendo las más numerosas las que se localizan en sitios donadores (68). La caracterización de la variante c.177-2A>C localizada en el sitio aceptor del intrón 2 de *TG*, confirmó el carácter patogénico de esta variante, y nos permitió evidenciar que el mecanismo de patogenicidad de esta variante consiste en la exclusión del exón 3 de *TG*. La secuenciación del paciente 7 nos permitió identificar a la variante c.177-2A>C que se encuentra en heterocigosis compuesta con la variante sin sentido p.Q29\*, y determinar la etiología genética de la patología del paciente, establecer claramente sus bases moleculares, y confirmar el modelo de herencia AR. Desafortunadamente, al momento del diagnóstico no se disponía de la metodología para el dosaje de TG sérica para este paciente, sin embargo, los niveles bajos de T4 son indicativos de que las proteínas truncas producidas por estas variantes, no permitirían la biosíntesis de HT.

Por otro lado, tomando en conjunto los análisis *in silico* e *in vitro* de la variante c.970-3C>A del gen *SLC5A5*, proporcionamos evidencia funcional de que esta variante constituye el primer reporte de una mutación que afecta un sitio canónico de corte y empalme en el gen *SLC5A5* y daría lugar a la eliminación del sitio aceptor WT ubicado en el intrón 7, alterando el empalme normal del mRNA de NIS, generando la mutante sin sentido p.Y324Hfs\*148. La consecuencia funcional del codón de terminación prematuro podría ser una degradación del mRNA mutante a través de la vía NMD (153). Al respecto, se ha descrito la degradación de mRNA de NIS que alberga codones de terminación prematuros en el tejido tiroideo de pacientes portadores de las variantes patogénicas p.R516\* (42) y p.S509Rfs\*6 (52). Esta última referencia corresponde al reporte de la variante c.1940C>G que en el presente trabajo intentó ser abordada mediante la edición del genoma de la línea celular IEC-6 empleando la tecnología CRISPR/Cas9.

Diversos estudios donde se implementó CRISPR/Cas9 para introducir mutaciones puntuales por recombinación homologa usando el mismo vector de Cas9 utilizado en esta tesis, reportan una eficiencia de edición por reparación homologa de menos del 10% (155-157). La tasa de eficiencia de edición puede variar drásticamente en función de la eficiencia de la transfección, el largo y la concentración del oligo donador de DNA, el tipo de vector de Cas9 utilizado (156), la línea celular empleada y el diseño del RNA guía (83). Otro aspecto importante a discutir es el método de validación de la edición

génica, donde los más usados son la secuenciación de Sanger del producto de PCR de la región de interés, y por análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (*RFLP*, por sus siglas en inglés) (83). Sin embargo, mediante estos métodos de genotipificación no es posible detectar aquellos clones con inserciones o deleciones monoalélicas grandes que se superponen con la región de interés donde ocurrió la edición (158). Estos eventos si bien son más comunes cuando el corte de Cas9 se repara por unión de extremos no homólogos, tienen una tasa de aparición entre el 8 y 40% incluso después de haber sido reparado el corte por recombinación homóloga (157). El mecanismo que explica esto es que ocurrió una copia neutral de la pérdida de la heterocigocidad, donde uno de los alelos adquirió la copia correctamente editada del otro alelo que eventualmente fue delecionado. En estos casos, dichas alteraciones evitarían que se amplifique el alelo afectado, y tales clones hemicigotos aparecerían como homocigotos.

En cuanto a los resultados obtenidos en esta tesis, sólo se evidenció una inserción en 4 clones, y un cambio de base en un clon, sin embargo, la mitad de clones no presenta mutaciones aparentes en el exón 13 de NIS. Dos posibles escenarios pueden dar explicación a esto: el corte con Cas9 produjo una posible deleción monoalélica que no fuera detectada por la secuenciación de Sanger, provocando la eliminación de la expresión proteica de NIS, produciendo clones hemicigotos para esa región del exón 13 de NIS, o bien, los clones fueron editados en heterocigosis con la variante c.1940C>G, pero dado que los transcritos de la variante c.1940C>G tienen codones de parada prematuros, estos son degradados por la vía NMD, y solamente estamos viendo el alelo WT dado que el templado para validar la edición génica fue RNA. Para el escenario uno sería necesario realizar una PCR cuantitativa alelo específica que permita discriminar entre las secuencias de ambos alelos (159), y para el escenario dos, una estrategia interesante sería implementar la utilización de inhibidores de la vía NMD (160-162) que nos permita detectar la presencia de los transcritos del alelo portador de la variante c.1940C>G. Así mismo, se pueden implementar otras estrategias para incrementar la tasa de edición génica, como producir más clones para aumentar las probabilidades de obtener algún clon correctamente editado, diseñar un segundo RNA guía para descartar que este sea el problema, y aumentar la concentración del oligo donador de DNA al momento de la transfección.

Debido a estos resultados, se desarrolló una caracterización funcional integral de la variante c.1940C>G y de la cual se obtuvieron varias conclusiones: primero, comprobamos los hallazgos de Pohlenz y colaboradores (52) al demostrar por ensayos de minigen que la variante c.1940C>G efectivamente produce la aparición de un codón de parada prematuro y un nuevo sitio 3' acceptor de corte y empalme, generando un transcrito con el exón 13 de NIS íntegro pero portando la variante c.1940C>G, y un segundo transcrito que corresponde a la deleción de 67 pb del exón 13 de NIS; segundo, que la variante p.Y531\* producida por el codón de parada prematuro carece de toda actividad funcional, y que en este paciente estaría en coexistencia con la variante p.S509Rfs\*6 y p.Q267E; tercero, que este paciente desarrolló HC a partir de la interacción entre tres mecanismos de patogenicidad: por un lado, la inserción de

codones de parada prematuros en la secuencia del mRNA de NIS que provocaría su degradación por la vía NMD, por otro lado, las proteínas truncas resultantes de esta mutación que son retenidas intracelularmente, debido a que carecen de motivos presentes en el extremo carboxilo terminal y que son relevantes para el transporte de NIS a membrana plasmática, y por último, la presencia de la variante patogénica p.Q267E (163). La sinergia producida entre estos mecanismos afecta severamente la funcionalidad de NIS, bloqueando la captación de yoduro, interrumpiendo la biosíntesis de HT, y generando el desarrollo de HC dishormonogénico.

El diagnóstico molecular debería ser considerado en todos los pacientes pediátricos con HC, especialmente, en los casos con variantes poco frecuentes de esta enfermedad. Después de identificar a estos pacientes mediante la pesquisa neonatal, es necesario hacer un seguimiento del paciente para determinar si la patología del paciente es permanente o transitoria, y eventualmente perfilar un cuidadoso análisis clínico, bioquímico e imagenológico del paciente para determinar la etiología de la enfermedad, e incrementar las posibilidades de arribar a un diagnóstico molecular preciso. En este contexto, la introducción de plataformas NGS ha permitido un cambio importante en el diagnóstico tradicional y la comprensión de las bases moleculares del HC. La eficiencia de diagnóstico molecular de esta patología antes de la era de los grandes avances en NGS estaba por debajo del 10% (164-167), actualmente, con el uso de paneles de genes la eficiencia diagnóstica ronda alrededor del 57% (48,55,62,72,121,122,124,168,169), y en cuanto al uso de WES esta eficiencia ronda entre el 15 y 40% dependiendo de la patología y la población analizada (108,170). Haciendo una comparación de estas tres técnicas, la secuenciación del gen candidato es útil cuando las características clínicas del paciente apuntan claramente a las alteraciones en un solo gen. Por otra parte, la secuenciación de paneles de genes representa un enfoque interesante tomando en cuenta que existen múltiples genes implicados en el desarrollo de HC, y que existen casos donde se no observan características clínicas distintivas. La secuenciación del exoma tiene la ventaja de estar menos sesgado con respecto al conjunto de genes secuenciados, a diferencia de los paneles de genes que presuponen que las anomalías de relevancia clínica están confinadas a los genes dentro del panel. Sin embargo, el emplear WES implica un mayor desafío técnico y se corre un mayor riesgo de encontrar variantes con significado incierto, lo que hace que la interpretación y notificación de resultados sean difíciles y complejas. Por último, la principal desventaja de estas tres técnicas de secuenciación es que se encuentran restringidas a las regiones codificantes del genoma, por lo que aquellas alteraciones de relevancia clínica que ocurran en regiones intrónicas profundas, regulatorias distales, o ciertos cambios genómicos estructurales, pasarían inadvertidas y no serían contempladas como mecanismos de patogenicidad importantes para el desarrollo de esta patología. Usualmente para detectar este tipo de alteraciones es necesario aplicar una segunda técnica que permita identificar una etiología genética, y en cuanto al HC se refiere, solo unos pocos trabajos han contemplado el estudio de estas alteraciones (151,171).

Nuestro conocimiento sobre las bases moleculares del HC es claramente muy reducido. En el presente trabajo, se reportaron 12 nuevas mutaciones: 4 para el gen *SLC5A5*, 5

para el gen *TG*, 1 en *FOXE1*, 1 en *DUOX2* y 1 más en *BCOR*, nuevo gen candidato para el desarrollo de RHT. No obstante, considerando que se trabajó sobre una población de pacientes con características atípicas, en el presente trabajo, solo en 3 pacientes (1,2 y 7) de 17 se pudo determinar con exactitud la etiología genética de su enfermedad, lo que corresponde al 17.6% de eficiencia diagnóstica. El potencial diagnóstico de las técnicas moleculares estándar no es suficiente para hacer frente a una enfermedad con mecanismos patológicos complejos. La baja eficiencia en el diagnóstico molecular del HC puede explicarse por la hipótesis de "enfermedad común-alelo raro", que sostiene que múltiples variantes genéticas de baja frecuencia alélica, cada una con una penetrancia relativamente alta, son los principales contribuyentes de la susceptibilidad genética a enfermedades comunes (172). Dada la heterogeneidad alélica y de *locus* involucrados en el desarrollo HC, debemos tener en cuenta que aumentar el número de pacientes analizados en un estudio de NGS, no garantiza una mayor eficiencia diagnóstica, sino por el contrario, disminuye la potencia estadística de la muestra, en el caso hipotético de que cada paciente o familia albergue una mutación única. Para superar esta desventaja, el uso de protocolos para diferenciar células madre en células tiroideas funcionales (173-175) representa un sistema prometedor para investigar nuevos genes candidatos para el desarrollo de HC primario, y proponer a la medicina regenerativa como alternativa para el tratamiento de esta patología.

## 6. CONCLUSIONES

El presente trabajo de maestría permitió obtener las siguientes conclusiones respecto al diagnóstico molecular de pacientes con hipotiroidismo congénito:

- I. La estrategia de secuenciación del gen candidato es de utilidad en el diagnóstico molecular de pacientes con fenotipos definidos, como aquellos con deficiencia en el transporte de yoduro.
- II. La secuenciación de paneles de genes permite analizar un mayor número de genes y pacientes en menor tiempo, pero no garantiza una alta tasa de diagnóstico en pacientes con alguna patología tiroidea congénita.
- III. La secuenciación completa del exoma permite descubrir nuevos genes involucrados en el desarrollo de hipotiroidismo congénito, aunque no tiene una alta tasa de diagnóstico para esta enfermedad.
- IV. La caracterización funcional de las variantes identificadas proporciona evidencias de carácter definitivo para determinar la patogenicidad de dichas variantes, permitiendo una mejor comprensión del fenotipo del paciente.
- V. Es necesario investigar etiologías genéticas alternativas no mendelianas con la finalidad de mejorar la comprensión de las bases moleculares que condicionan el desarrollo del hipotiroidismo congénito, y así mismo aumentar la tasa de diagnóstico molecular de esta patología.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. A. Belfiore DL. Principles of Endocrinology and Hormone Action. Springer, Cham.
2. Williams RH. WILLIAMS TEXTBOOK OF ENDOCRINOLOGY. 13TH ed. Canada: Elsevier.
3. Albarrán J. Endocrinología. 3era ed. Madrid, España: Editorial Panamericana.
4. Koolman J yRK. Bioquímica Humana. Texto y Atlas. 4ta ed. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
5. Geysels RC, Peyret V, Martin M, Nazar M, Reale C, Bernal Barquero CE, Miranda L, Marti MA, Vito P, Masini-Repiso AM, Nicola JP. The Transcription Factor NF-kappaB Mediates Thyrotropin-Stimulated Expression of Thyroid Differentiation Markers. *Thyroid* 2021; 31:299-314
6. Martin M, Geysels RC, Peyret V, Bernal Barquero CE, Masini-Repiso AM, Nicola JP. Implications of Na(+)/I(-) Symporter Transport to the Plasma Membrane for Thyroid Hormonogenesis and Radioiodide Therapy. *J Endocr Soc* 2019; 3:222-234
7. Silveira JC, Kopp PA. Pendrin and anoctamin as mediators of apical iodide efflux in thyroid cells. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2015; 22:374-380
8. Citterio CE, Targovnik HM, Arvan P. The role of thyroglobulin in thyroid hormonogenesis. *Nat Rev Endocrinol* 2019; 15:323-338
9. De Deken X, Miot F. DUOX Defects and Their Roles in Congenital Hypothyroidism. *Methods Mol Biol* 2019; 1982:667-693
10. Chiamolera MI, Wondisford FE. Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology* 2009; 150:1091-1096
11. Glinoe D. Clinical and biological consequences of iodine deficiency during pregnancy. *Endocr Dev* 2007; 10:62-85
12. Caldwell KL, Miller GA, Wang RY, Jain RB, Jones RL. Iodine status of the U.S. population, National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. *Thyroid* 2008; 18:1207-1214
13. Martín M NJ. Congenital Iodide Transport Defect: Recent Advances and Future perspectives. *J Clin Mol Endocrinol* 2016; 1:1-4
14. Levy O, Dai G, Riedel C, Ginter CS, Paul EM, Lebowitz AN, Carrasco N. Characterization of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter with an anti-COOH terminus antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:5568-5573
15. Levy O, De la Vieja A, Ginter CS, Riedel C, Dai G, Carrasco N. N-linked glycosylation of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS). Implications for its secondary structure model. *J Biol Chem* 1998; 273:22657-22663
16. Martin M, Bernal Barquero CE, Geysels RC, Papendieck P, Peyret V, Masini-Repiso AM, Chiesa AE, Nicola JP. Novel Sodium/Iodide Symporter Compound Heterozygous

- Pathogenic Variants Causing Dyshormonogenic Congenital Hypothyroidism. *Thyroid* 2019; 29:1023-1026
17. Li W, Nicola JP, Amzel LM, Carrasco N. Asn441 plays a key role in folding and function of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS). *FASEB J* 2013; 27:3229-3238
  18. Wolff J. Perchlorate and the thyroid gland. *Pharmacol Rev* 1998; 50:89-105
  19. De La Vieja A, Dohan O, Levy O, Carrasco N. Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Physiol Rev* 2000; 80:1083-1105
  20. Van Sande J, Massart C, Beauwens R, Schoutens A, Costagliola S, Dumont JE, Wolff J. Anion selectivity by the sodium iodide symporter. *Endocrinology* 2003; 144:247-252
  21. Nicola JP, Carrasco N, Amzel LM. Physiological sodium concentrations enhance the iodide affinity of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter. *Nat Commun* 2014; 5:3948
  22. Benvenga S, Guarneri F. Homology of pendrin, sodium-iodide symporter and apical iodide transporter. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2018; 23:1864-1873
  23. van den Hove MF, Croizet-Berger K, Jouret F, Guggino SE, Guggino WB, Devuyst O, Courtoy PJ. The loss of the chloride channel, ClC-5, delays apical iodide efflux and induces a euthyroid goiter in the mouse thyroid gland. *Endocrinology* 2006; 147:1287-1296
  24. Marino M, McCluskey RT. Role of thyroglobulin endocytic pathways in the control of thyroid hormone release. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279:C1295-1306
  25. Di Jeso B, Arvan P. Thyroglobulin From Molecular and Cellular Biology to Clinical Endocrinology. *Endocr Rev* 2016; 37:2-36
  26. Coscia F, Taler-Vercic A, Chang VT, Sinn L, O'Reilly FJ, Izore T, Renko M, Berger I, Rappsilber J, Turk D, Lowe J. The structure of human thyroglobulin. *Nature* 2020; 578:627-630
  27. Nicola J. Clinical Relevance of Molecular Diagnosis in Patients with Congenital Hypothyroidism. *J Mol Genet Med* 2017; 11:240
  28. Borrajo GJ. Newborn screening in Latin America at the beginning of the 21st century. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30:466-481
  29. Cherella CE, Wassner AJ. Congenital hypothyroidism: insights into pathogenesis and treatment. *Int J Pediatr Endocrinol* 2017; 2017:11
  30. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 2012; 122:3035-3043
  31. LaFranchi SH. Approach to the diagnosis and treatment of neonatal hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:2959-2967
  32. American Academy of P, Rose SR, Section on E, Committee on Genetics ATA, Brown RS, Public Health Committee LWPES, Foley T, Kaplowitz PB, Kaye CI, Sundararajan S, Varma

- SK. Update of newborn screening and therapy for congenital hypothyroidism. *Pediatrics* 2006; 117:2290-2303
33. Leger J, Olivieri A, Donaldson M, Torresani T, Krude H, van Vliet G, Polak M, Butler G, Espe Pes Slep Jspe Apeg Appes I, Congenital Hypothyroidism Consensus Conference G. European Society for Paediatric Endocrinology consensus guidelines on screening, diagnosis, and management of congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99:363-384
  34. Nicola JP, Reyna-Neyra A, Saenger P, Rodriguez-Buritica DF, Gamez Godoy JD, Muzumdar R, Amzel LM, Carrasco N. Sodium/Iodide Symporter Mutant V270E Causes Stunted Growth but No Cognitive Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100:E1353-1361
  35. Deladoey J, Van Vliet G. Treating congenital hypothyroidism--which levothyroxine? *Nat Rev Endocrinol* 2013; 9:257-258
  36. Van Vliet G, Grosse SD. The continuing health burden of congenital hypothyroidism in the era of neonatal screening. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:1671-1673
  37. van Trotsenburg P, Stoupa A, Leger J, Rohrer T, Peters C, Fugazzola L, Cassio A, Heinrichs C, Beauloye V, Pohlenz J, Rodien P, Coutant R, Szinnai G, Murray P, Bartes B, Luton D, Salerno M, de Sanctis L, Vigone M, Krude H, Persani L, Polak M. Congenital Hypothyroidism: A 2020-2021 Consensus Guidelines Update-An ENDO-European Reference Network Initiative Endorsed by the European Society for Pediatric Endocrinology and the European Society for Endocrinology. *Thyroid* 2021; 31:387-419
  38. Stoupa A, Kariyawasam D, Carre A, Polak M. Update of Thyroid Developmental Genes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2016; 45:243-254
  39. Hannoush ZC, Weiss RE. Defects of Thyroid Hormone Synthesis and Action. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2017; 46:375-388
  40. Nicola JP, Nazar M, Serrano-Nascimento C, Goulart-Silva F, Sobrero G, Testa G, Nunes MT, Munoz L, Miras M, Masini-Repiso AM. Iodide transport defect: functional characterization of a novel mutation in the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter 5'-untranslated region in a patient with congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:E1100-1107
  41. Citterio CE, Machiavelli GA, Miras MB, Gruneiro-Papendieck L, Lachlan K, Sobrero G, Chiesa A, Walker J, Munoz L, Testa G, Belforte FS, Gonzalez-Sarmiento R, Rivolta CM, Targovnik HM. New insights into thyroglobulin gene: molecular analysis of seven novel mutations associated with goiter and hypothyroidism. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 365:277-291
  42. Stoupa A, Al Hage Chehade G, Kariyawasam D, Tohier C, Bole-Feysot C, Nitschke P, Thibault H, Jullie ML, Polak M, Carre A. First case of fetal goitrous hypothyroidism due to SLC5A5/NIS mutations. *Eur J Endocrinol* 2020; 183:K1-K5
  43. Zhang CX, Zhang JX, Yang L, Zhang CR, Cheng F, Zhang RJ, Fang Y, Wang Z, Wu FY, Li PZ, Liang J, Li R, Song HD. Novel Compound Heterozygous Pathogenic Mutations of SLC5A5 in a Chinese Patient With Congenital Hypothyroidism. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021; 12:620117

44. Fujiwara H, Tatsumi K, Tanaka S, Kimura M, Nose O, Amino N. A novel V59E missense mutation in the sodium iodide symporter gene in a family with iodide transport defect. *Thyroid* 2000; 10:471-474
45. Kosugi S, Inoue S, Matsuda A, Jhiang SM. Novel, missense and loss-of-function mutations in the sodium/iodide symporter gene causing iodide transport defect in three Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3373-3376
46. Szinnai G, Kosugi S, Derrien C, Lucidarme N, David V, Czernichow P, Polak M. Extending the clinical heterogeneity of iodide transport defect (ITD): a novel mutation R124H of the sodium/iodide symporter gene and review of genotype-phenotype correlations in ITD. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:1199-1204
47. Kosugi S, Okamoto H, Tamada A, Sanchez-Franco F. A novel peculiar mutation in the sodium/iodide symporter gene in spanish siblings with iodide transport defect. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:3830-3836
48. Makretskaya N, Bezlepkina O, Kolodkina A, Kiyayev A, Vasilyev EV, Petrov V, Kalinenkova S, Malievsky O, Dedov, II, Tiulpakov A. High frequency of mutations in 'dysmorphogenesis genes' in severe congenital hypothyroidism. *PLoS One* 2018; 13:e0204323
49. Wang F, Zang Y, Li M, Liu W, Wang Y, Yu X, Li H, Wang F, Liu S. DUOX2 and DUOX2 Variants Confer Susceptibility to Thyroid Dysgenesis and Gland-in-situ With Congenital Hypothyroidism. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020; 11:237
50. Bruellman RJ, Watanabe Y, Ebrahim RS, Creech MK, Abdullah MA, Dumitrescu AM, Refetoff S, Weiss RE. Increased Prevalence of TG and TPO Mutations in Sudanese Children With Congenital Hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105
51. Sorapipatcharoen K, Tim-Aroon T, Mahachoklertwattana P, Chantratita W, Iemwimangsa N, Sensorn I, Panthan B, Jiaranai P, Noojareern S, Khlairit P, Pongratanakul S, Suprasongsin C, Korwutthikulrangsri M, Sriphrapadang C, Poomthavorn P. DUOX2 variants are a frequent cause of congenital primary hypothyroidism in Thai patients. *Endocr Connect* 2020; 9:1121-1134
52. Pohlenz J, Rosenthal IM, Weiss RE, Jhiang SM, Burant C, Refetoff S. Congenital hypothyroidism due to mutations in the sodium/iodide symporter. Identification of a nonsense mutation producing a downstream cryptic 3' splice site. *J Clin Invest* 1998; 101:1028-1035
53. Pohlenz J, Medeiros-Neto G, Gross JL, Silveiro SP, Knobel M, Refetoff S. Hypothyroidism in a Brazilian kindred due to iodide trapping defect caused by a homozygous mutation in the sodium/iodide symporter gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 240:488-491
54. Montanelli L, Agretti P, Marco G, Bagattini B, Ceccarelli C, Brozzi F, Lettieri T, Cerbone M, Vitti P, Salerno M, Pinchera A, Tonacchera M. Congenital hypothyroidism and late-onset goiter: identification and characterization of a novel mutation in the sodium/iodide symporter of the proband and family members. *Thyroid* 2009; 19:1419-1425

55. Yamaguchi T, Nakamura A, Nakayama K, Hishimura N, Morikawa S, Ishizu K, Tajima T. Targeted Next-Generation Sequencing for Congenital Hypothyroidism With Positive Neonatal TSH Screening. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105
56. Agretti P, Bagattini B, De Marco G, Di Cosmo C, Dionigi G, Vitti P, Tonacchera M. Papillary thyroid cancer in a patient with congenital goitrous hypothyroidism due to a novel deletion in NIS gene. *Endocrine* 2016; 54:256-258
57. Watanabe Y, Ebrahim RS, Abdullah MA, Weiss RE. A Novel Missense Mutation in the SLC5A5 Gene in a Sudanese Family with Congenital Hypothyroidism. *Thyroid* 2018; 28:1068-1070
58. Matsuda A, Kosugi S. A homozygous missense mutation of the sodium/iodide symporter gene causing iodide transport defect. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3966-3971
59. Kosugi S, Bhayana S, Dean HJ. A novel mutation in the sodium/iodide symporter gene in the largest family with iodide transport defect. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:3248-3253
60. Tonacchera M, Agretti P, de Marco G, Elisei R, Perri A, Ambrogini E, De Servi M, Ceccarelli C, Viacava P, Refetoff S, Panunzi C, Bitti ML, Vitti P, Chiovato L, Pinchera A. Congenital hypothyroidism due to a new deletion in the sodium/iodide symporter protein. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003; 59:500-506
61. Martin M, Modenutti CP, Gil Rosas ML, Peyret V, Geysels RC, Bernal Barquero CE, Sobrero G, Munoz L, Signorino M, Testa G, Miras MB, Masini-Repiso AM, Calcaterra NB, Coux G, Carrasco N, Marti MA, Nicola JP. A Novel SLC5A5 Variant Reveals the Crucial Role of Kinesin Light Chain 2 in Thyroid Hormonogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2021;
62. Wang H, Kong X, Pei Y, Cui X, Zhu Y, He Z, Wang Y, Zhang L, Zhuo L, Chen C, Yan X. Mutation spectrum analysis of 29 causative genes in 43 Chinese patients with congenital hypothyroidism. *Mol Med Rep* 2020; 22:297-309
63. Kosugi S, Sato Y, Matsuda A, Ohyama Y, Fujieda K, Inomata H, Kameya T, Isozaki O, Jhiang SM. High prevalence of T354P sodium/iodide symporter gene mutation in Japanese patients with iodide transport defect who have heterogeneous clinical pictures. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:4123-4129
64. Ferrandino G, Kaspari RR, Reyna-Neyra A, Boutagy NE, Sinusas AJ, Carrasco N. An extremely high dietary iodide supply forestalls severe hypothyroidism in Na(+)/I(-) symporter (NIS) knockout mice. *Sci Rep* 2017; 7:5329
65. Targovnik HM, Citterio CE, Rivolta CM. Iodide handling disorders (NIS, TPO, TG, IYD). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2017; 31:195-212
66. Pio MG, Molina MF, Siffo S, Chiesa A, Rivolta CM, Targovnik HM. A novel mutation in intron 11 donor splice site, responsible of a rare genotype in thyroglobulin gene by altering the pre-mRNA splicing process. Cell expression and bioinformatic analysis. *Mol Cell Endocrinol* 2020; 522:111124
67. Siffo S, Adrover E, Citterio CE, Miras MB, Balbi VA, Chiesa A, Weill J, Sobrero G, Gonzalez VG, Papendieck P, Martinez EB, Gonzalez-Sarmiento R, Rivolta CM, Targovnik HM.

- Molecular analysis of thyroglobulin mutations found in patients with goiter and hypothyroidism. *Mol Cell Endocrinol* 2018; 473:1-16
68. Citterio CE, Rivolta CM, Targovnik HM. Structure and genetic variants of thyroglobulin: Pathophysiological implications. *Mol Cell Endocrinol* 2021; 528:111227
  69. Kim PS, Lee J, Jongsamak P, Menon S, Li B, Hossain SA, Bae JH, Panijpan B, Arvan P. Defective protein folding and intracellular retention of thyroglobulin-R19K mutant as a cause of human congenital goiter. *Mol Endocrinol* 2008; 22:477-484
  70. Wright MT, Kouba L, Plate L. Thyroglobulin Interactome Profiling Defines Altered Proteostasis Topology Associated With Thyroid Dysmorphogenesis. *Mol Cell Proteomics* 2020; 20:100008
  71. Citterio CE, Morales CM, Bouhours-Nouet N, Machiavelli GA, Bueno E, Gatelais F, Coutant R, Gonzalez-Sarmiento R, Rivolta CM, Targovnik HM. Novel compound heterozygous Thyroglobulin mutations c.745+1G>A/c.7036+2T>A associated with congenital goiter and hypothyroidism in a Vietnamese family. Identification of a new cryptic 5' splice site in the exon 6. *Mol Cell Endocrinol* 2015; 404:102-112
  72. Nicholas AK, Serra EG, Cangul H, Alyaarubi S, Ullah I, Schoenmakers E, Deeb A, Habeb AM, Almaghamsi M, Peters C, Nathwani N, Aycan Z, Saglam H, Bober E, Dattani M, Shenoy S, Murray PG, Babiker A, Willemsen R, Thankamony A, Lyons G, Irwin R, Padidela R, Tharian K, Davies JH, Puthi V, Park SM, Massoud AF, Gregory JW, Albanese A, Pease-Gevers E, Martin H, Brugger K, Maher ER, Chatterjee VK, Anderson CA, Schoenmakers N. Comprehensive Screening of Eight Known Causative Genes in Congenital Hypothyroidism With Gland-in-Situ. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101:4521-4531
  73. Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, Nayir A, Bakkaloglu A, Ozen S, Sanjad S, Nelson-Williams C, Farhi A, Mane S, Lifton RP. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:19096-19101
  74. Oliver-Petit I, Bertozzi AI, Grunenwald S, Gambart M, Pigeon-Kerchiche P, Sadoul JL, Caron PJ, Savagner F. Multinodular goitre is a gateway for molecular testing of DICER1 syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2019; 91:669-675
  75. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 2010; 20:1297-1303
  76. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2010; 26:589-595
  77. Rimmer A, Phan H, Mathieson I, Iqbal Z, Twigg SRF, Consortium WGS, Wilkie AOM, McVean G, Lunter G. Integrating mapping-, assembly- and haplotype-based approaches for calling variants in clinical sequencing applications. *Nat Genet* 2014; 46:912-918
  78. Cingolani P, Platts A, Wang le L, Coon M, Nguyen T, Wang L, Land SJ, Lu X, Ruden DM. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)* 2012; 6:80-92

79. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL, Committee ALQA. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17:405-424
80. Ravera S, Reyna-Neyra A, Ferrandino G, Amzel LM, Carrasco N. The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Molecular Physiology and Preclinical and Clinical Applications. *Annu Rev Physiol* 2017; 79:261-289
81. Ferrandino G, Nicola JP, Sanchez YE, Echeverria I, Liu Y, Amzel LM, Carrasco N. Na<sup>+</sup> coordination at the Na<sub>2</sub> site of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113:E5379-5388
82. Nicola JP, Basquin C, Portulano C, Reyna-Neyra A, Paroder M, Carrasco N. The Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter mediates active iodide uptake in the intestine. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; 296:C654-662
83. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 2013; 8:2281-2308
84. Carre A, Hamza RT, Kariyawasam D, Guillot L, Teissier R, Tron E, Castanet M, Dupuy C, El Kholy M, Polak M. A novel FOXE1 mutation (R73S) in Bamforth-Lazarus syndrome causing increased thyroidal gene expression. *Thyroid* 2014; 24:649-654
85. Tan TY, Dillon OJ, Stark Z, Schofield D, Alam K, Shrestha R, Chong B, Phelan D, Brett GR, Creed E, Jarmolowicz A, Yap P, Walsh M, Downie L, Amor DJ, Savarirayan R, McGillivray G, Yeung A, Peters H, Robertson SJ, Robinson AJ, Macciocca I, Sadedin S, Bell K, Oshlack A, Georgeson P, Thorne N, Gaff C, White SM. Diagnostic Impact and Cost-effectiveness of Whole-Exome Sequencing for Ambulant Children With Suspected Monogenic Conditions. *JAMA Pediatr* 2017; 171:855-862
86. Kopp P, Pesce L, Solis SJ. Pendred syndrome and iodide transport in the thyroid. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19:260-268
87. D'Avanzo N, Cheng WW, Doyle DA, Nichols CG. Direct and specific activation of human inward rectifier K<sup>+</sup> channels by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 2010; 285:37129-37132
88. Wible BA, De Biasi M, Majumder K, Tagliatela M, Brown AM. Cloning and functional expression of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel from human atrium. *Circ Res* 1995; 76:343-350
89. Kaibara M, Ishihara K, Doi Y, Hayashi H, Ehara T, Taniyama K. Identification of human Kir2.2 (KCNJ12) gene encoding functional inward rectifier potassium channel in both mammalian cells and *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett* 2002; 531:250-254
90. Andelfinger G, Tapper AR, Welch RC, Vanoye CG, George AL, Jr., Benson DW. KCNJ2 mutation results in Andersen syndrome with sex-specific cardiac and skeletal muscle phenotypes. *Am J Hum Genet* 2002; 71:663-668

91. Yuan HX, Yan K, Hou DY, Zhang ZY, Wang H, Wang X, Zhang J, Xu XR, Liang YH, Zhao WS, Xu L, Zhang L. Whole exome sequencing identifies a KCNJ12 mutation as a cause of familial dilated cardiomyopathy. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96:e7727
92. Ryan DP, da Silva MR, Soong TW, Fontaine B, Donaldson MR, Kung AW, Jongjaroenprasert W, Liang MC, Khoo DH, Cheah JS, Ho SC, Bernstein HS, Maciel RM, Brown RH, Jr., Ptacek LJ. Mutations in potassium channel Kir2.6 cause susceptibility to thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis. *Cell* 2010; 140:88-98
93. Mandelker D, Schmidt RJ, Ankala A, McDonald Gibson K, Bowser M, Sharma H, Duffy E, Hegde M, Santani A, Lebo M, Funke B. Navigating highly homologous genes in a molecular diagnostic setting: a resource for clinical next-generation sequencing. *Genet Med* 2016; 18:1282-1289
94. Erbas IM, Demir K. The Clinical Spectrum of Resistance to Thyroid Hormone Alpha in Children and Adults. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2021; 13:1-14
95. Dumitrescu AM, Refetoff S. Impaired Sensitivity to Thyroid Hormone: Defects of Transport, Metabolism and Action. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Hofland J, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, McLachlan R, Morley JE, New M, Purnell J, Singer F, Stratakis CA, Trencle DL, Wilson DP, eds. *Endotext*. South Dartmouth (MA)2000.
96. Aldera AP, Govender D. Gene of the month: BCOR. *J Clin Pathol* 2020; 73:314-317
97. Huynh KD, Fischle W, Verdin E, Bardwell VJ. BCoR, a novel corepressor involved in BCL-6 repression. *Genes Dev* 2000; 14:1810-1823
98. Gearhart MD, Corcoran CM, Wamstad JA, Bardwell VJ. Polycomb group and SCF ubiquitin ligases are found in a novel BCOR complex that is recruited to BCL6 targets. *Mol Cell Biol* 2006; 26:6880-6889
99. Ragge N, Isidor B, Bitoun P, Odent S, Giurgea I, Cogne B, Deb W, Vincent M, Le Gall J, Morton J, Lim D, Study DDD, Le Meur G, Zazo Seco C, Zafeiropoulou D, Bax D, Zwijnenburg P, Arteche A, Swafiri ST, Cleaver R, McEntagart M, Kini U, Newman W, Ayuso C, Corton M, Herenger Y, Jeanne M, Calvas P, Chassaing N. Expanding the phenotype of the X-linked BCOR microphthalmia syndromes. *Hum Genet* 2019; 138:1051-1069
100. Horn D, Chyrek M, Kleier S, Luttgen S, Bolz H, Hinkel GK, Korenke GC, Riess A, Schell-Apacik C, Tinschert S, Wiczorek D, Gillissen-Kaesbach G, Kutsche K. Novel mutations in BCOR in three patients with oculo-facio-cardio-dental syndrome, but none in Lenz microphthalmia syndrome. *Eur J Hum Genet* 2005; 13:563-569
101. Ghetu AF, Corcoran CM, Cerchiatti L, Bardwell VJ, Melnick A, Prive GG. Structure of a BCOR corepressor peptide in complex with the BCL6 BTB domain dimer. *Mol Cell* 2008; 29:384-391
102. Martin M, Modenutti CP, Peyret V, Geysels RC, Darrouzet E, Pourcher T, Masini-Repiso AM, Marti MA, Carrasco N, Nicola JP. A Carboxy-Terminal Monoleucine-Based Motif Participates in the Basolateral Targeting of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> Symporter. *Endocrinology* 2019; 160:156-168

103. Dohan O, Portulano C, Basquin C, Reyna-Neyra A, Amzel LM, Carrasco N. The Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS) mediates electroneutral active transport of the environmental pollutant perchlorate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:20250-20255
104. Tompson SW, Young TL. Assaying the Effects of Splice Site Variants by Exon Trapping in a Mammalian Cell Line. *Bio Protoc* 2017; 7
105. Pohlenz J, Duprez L, Weiss RE, Vassart G, Refetoff S, Costagliola S. Failure of membrane targeting causes the functional defect of two mutant sodium iodide symporters. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2366-2369
106. Mariano Martín CPM, Mauco Lucas Gil Rosas, Victoria Peyret, Romina Celeste Geysels, Carlos Eduardo Bernal Barquero, Gabriela Sobrero, Liliana Muñoz, Malvina Signorino, Graciela Testa, Mirta Beatriz Miras, Ana María Masini-Repiso, Nora Beatriz Calcaterra, Gabriela Coux, Nancy Carrasco, Marcelo Adrián Martí3, Juan Pablo Nicola. . The PDZ protein SCRIB regulates sodium/iodide symporter (NIS) expression at the basolateral plasma membrane. *FASEB J* 2021;
107. Hartman P, Beckman K, Silverstein K, Yohe S, Schomaker M, Henzler C, Onsongo G, Lam HC, Munro S, Daniel J, Billstein B, Deshpande A, Hauge A, Mroz P, Lee W, Holle J, Wiens K, Karnuth K, Kemmer T, Leary M, Michel S, Pohlman L, Thayanithy V, Nelson A, Bower M, Thyagarajan B. Next generation sequencing for clinical diagnostics: Five year experience of an academic laboratory. *Mol Genet Metab Rep* 2019; 19:100464
108. Lalonde E, Rentas S, Lin F, Dulik MC, Skraban CM, Spinner NB. Genomic Diagnosis for Pediatric Disorders: Revolution and Evolution. *Front Pediatr* 2020; 8:373
109. Xue Y, Ankala A, Wilcox WR, Hegde MR. Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing: single-gene, gene panel, or exome/genome sequencing. *Genet Med* 2015; 17:444-451
110. De la Vieja A, Ginter CS, Carrasco N. Molecular analysis of a congenital iodide transport defect: G543E impairs maturation and trafficking of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter. *Mol Endocrinol* 2005; 19:2847-2858
111. Wright EM, Loo DD, Hirayama BA. Biology of human sodium glucose transporters. *Physiol Rev* 2011; 91:733-794
112. Fujiwara H, Tatsumi K, Miki K, Harada T, Miyai K, Takai S, Amino N. Congenital hypothyroidism caused by a mutation in the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter. *Nat Genet* 1997; 16:124-125
113. De la Vieja A, Reed MD, Ginter CS, Carrasco N. Amino acid residues in transmembrane segment IX of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter play a role in its Na<sup>+</sup> dependence and are critical for transport activity. *J Biol Chem* 2007; 282:25290-25298
114. Ravera S, Quick M, Nicola JP, Carrasco N, Amzel LM. Beyond non-integer Hill coefficients: A novel approach to analyzing binding data, applied to Na<sup>+</sup>-driven transporters. *J Gen Physiol* 2015; 145:555-563
115. Martin MG, Turk E, Lostao MP, Kerner C, Wright EM. Defects in Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1) trafficking and function cause glucose-galactose malabsorption. *Nat Genet* 1996; 12:216-220

- 116.** Andersen HJ. Studies of hypothyroidism in children. *Acta Paediatr Suppl* 1961; 50(Suppl 125):1-150
- 117.** Van Middlesworth L. Radioactive iodide uptake of normal newborn infants. *AMA Am J Dis Child* 1954; 88:439-442
- 118.** Levy O, Ginter CS, De la Vieja A, Levy D, Carrasco N. Identification of a structural requirement for thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS) function from analysis of a mutation that causes human congenital hypothyroidism. *FEBS Lett* 1998; 429:36-40
- 119.** Paroder V, Nicola JP, Ginter CS, Carrasco N. The iodide-transport-defect-causing mutation R124H: a delta-amino group at position 124 is critical for maturation and trafficking of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter. *J Cell Sci* 2013; 126:3305-3313
- 120.** Katsanis SH, Katsanis N. Molecular genetic testing and the future of clinical genomics. *Nat Rev Genet* 2013; 14:415-426
- 121.** de Koning TJ, Jongbloed JD, Sikkema-Raddatz B, Sinke RJ. Targeted next-generation sequencing panels for monogenetic disorders in clinical diagnostics: the opportunities and challenges. *Expert Rev Mol Diagn* 2015; 15:61-70
- 122.** Lof C, Patyra K, Kuulasmaa T, Vangipurapu J, Undeutsch H, Jaeschke H, Pajunen T, Kero A, Krude H, Biebermann H, Kleinau G, Kuhnen P, Rantakari K, Miettinen P, Kirjavainen T, Pursiheimo JP, Mustila T, Jaaskelainen J, Ojaniemi M, Toppari J, Ignatius J, Laakso M, Kero J. Detection of Novel Gene Variants Associated with Congenital Hypothyroidism in a Finnish Patient Cohort. *Thyroid* 2016; 26:1215-1224
- 123.** de Filippis T, Gelmini G, Paraboschi E, Vigone MC, Di Frenna M, Marelli F, Bonomi M, Cassio A, Larizza D, Moro M, Radetti G, Salerno M, Ardissino D, Weber G, Gentilini D, Guizzardi F, Duga S, Persani L. A frequent oligogenic involvement in congenital hypothyroidism. *Hum Mol Genet* 2017; 26:2507-2514
- 124.** Long W, Lu G, Zhou W, Yang Y, Zhang B, Zhou H, Jiang L, Yu B. Targeted next-generation sequencing of thirteen causative genes in Chinese patients with congenital hypothyroidism. *Endocr J* 2018; 65:1019-1028
- 125.** Citterio CE, Veluswamy B, Morgan SJ, Galton VA, Banga JP, Atkins S, Morishita Y, Neumann S, Latif R, Gershengorn MC, Smith TJ, Arvan P. De novo triiodothyronine formation from thyrocytes activated by thyroid-stimulating hormone. *J Biol Chem* 2017; 292:15434-15444
- 126.** Mertins P, Mani DR, Ruggles KV, Gillette MA, Clauser KR, Wang P, Wang X, Qiao JW, Cao S, Petralia F, Kawaler E, Mundt F, Krug K, Tu Z, Lei JT, Gatza ML, Wilkerson M, Perou CM, Yellapantula V, Huang KL, Lin C, McLellan MD, Yan P, Davies SR, Townsend RR, Skates SJ, Wang J, Zhang B, Kinsinger CR, Mesri M, Rodriguez H, Ding L, Paulovich AG, Fenyo D, Ellis MJ, Carr SA, Nci C. Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. *Nature* 2016; 534:55-62
- 127.** Sun F, Zhang JX, Yang CY, Gao GQ, Zhu WB, Han B, Zhang LL, Wan YY, Ye XP, Ma YR, Zhang MM, Yang L, Zhang QY, Liu W, Guo CC, Chen G, Zhao SX, Song KY, Song HD. The genetic characteristics of congenital hypothyroidism in China by comprehensive screening of 21 candidate genes. *Eur J Endocrinol* 2018; 178:623-633

128. Kahara T, Igarashi N, Hishinuma A, Nakanishi Y, Uchiyama A, Miwa A, Ishizawa S, Yamamoto Y, Noto H, Sumiya H, Ishikura K, Usuda R, Iida H. Thyroglobulin gene mutation with cold nodule on thyroid scintigraphy. *Case Rep Endocrinol* 2012; 2012:280319
129. Lazar V, Bidart JM, Caillou B, Mahe C, Lacroix L, Filetti S, Schlumberger M. Expression of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene in human thyroid tumors: a comparison study with other thyroid-specific genes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:3228-3234
130. De Matteis MA, Luini A. Mendelian disorders of membrane trafficking. *N Engl J Med* 2011; 365:927-938
131. Wen G, Ringseis R, Eder K. Endoplasmic reticulum stress inhibits expression of genes involved in thyroid hormone synthesis and their key transcriptional regulators in FRTL-5 thyrocytes. *PLoS One* 2017; 12:e0187561
132. Suzuki K, Mori A, Saito J, Moriyama E, Ullianich L, Kohn LD. Follicular thyroglobulin suppresses iodide uptake by suppressing expression of the sodium/iodide symporter gene. *Endocrinology* 1999; 140:5422-5430
133. Suzuki K, Kohn LD. Differential regulation of apical and basal iodide transporters in the thyroid by thyroglobulin. *J Endocrinol* 2006; 189:247-255
134. Machiavelli GA, Caputo M, Rivolta CM, Olcese MC, Gruneiro-Papendieck L, Chiesa A, Gonzalez-Sarmiento R, Targovnik HM. Molecular analysis of congenital goitres with hypothyroidism caused by defective thyroglobulin synthesis. Identification of a novel c.7006C>T [p.R2317X] mutation and expression of minigenes containing nonsense mutations in exon 7. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010; 72:112-121
135. Vigone MC, Capalbo D, Weber G, Salerno M. Mild Hypothyroidism in Childhood: Who, When, and How Should Be Treated? *J Endocr Soc* 2018; 2:1024-1039
136. Deladoey J, Vassart G, Van Vliet G. Possible non-Mendelian mechanisms of thyroid dysgenesis. *Endocr Dev* 2007; 10:29-42
137. Fugazzola L, Cerutti N, Mannavola D, Vannucchi G, Fallini C, Persani L, Beck-Peccoz P. Monoallelic expression of mutant thyroid peroxidase allele causing total iodide organification defect. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:3264-3271
138. Di Resta C, Galbiati S, Carrera P, Ferrari M. Next-generation sequencing approach for the diagnosis of human diseases: open challenges and new opportunities. *EJIFCC* 2018; 29:4-14
139. Carre A, Stoupa A, Kariyawasam D, Gueriouz M, Ramond C, Monus T, Leger J, Gaujoux S, Sebag F, Glaser N, Zenaty D, Nitschke P, Bole-Feysot C, Hubert L, Lyonnet S, Scharfmann R, Munnich A, Besmond C, Taylor W, Polak M. Mutations in BOREALIN cause thyroid dysgenesis. *Hum Mol Genet* 2017; 26:599-610
140. Stoupa A, Adam F, Kariyawasam D, Strassel C, Gawade S, Szinnai G, Kauskot A, Lasne D, Janke C, Natarajan K, Schmitt A, Bole-Feysot C, Nitschke P, Leger J, Jabot-Hanin F, Tores F, Michel A, Munnich A, Besmond C, Scharfmann R, Lanza F, Borgel D, Polak M, Carre A. TUBB1 mutations cause thyroid dysgenesis associated with abnormal platelet physiology. *EMBO Mol Med* 2018; 10

141. Cangul H, Liao XH, Schoenmakers E, Kero J, Barone S, Srichomkwun P, Iwayama H, Serra EG, Saglam H, Eren E, Tarim O, Nicholas AK, Zvetkova I, Anderson CA, Frankl FEK, Boelaert K, Ojaniemi M, Jaaskelainen J, Patyra K, Lof C, Williams ED, Consortium UK, Soleimani M, Barrett T, Maher ER, Chatterjee VK, Refetoff S, Schoenmakers N. Homozygous loss-of-function mutations in SLC26A7 cause goitrous congenital hypothyroidism. *JCI Insight* 2018; 3
142. Zou M, Alzahrani AS, Al-Odaib A, Alqahtani MA, Babiker O, Al-Rijjal RA, BinEssa HA, Kattan WE, Al-Enezi AF, Al Qarni A, Al-Faham MSA, Baitei EY, Alsagheir A, Meyer BF, Shi Y. Molecular Analysis of Congenital Hypothyroidism in Saudi Arabia: SLC26A7 Mutation Is a Novel Defect in Thyroid Dyshormonogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2018; 103:1889-1898
143. Ishii J, Suzuki A, Kimura T, Tateyama M, Tanaka T, Yazawa T, Arimasu Y, Chen IS, Aoyama K, Kubo Y, Saitoh S, Mizuno H, Kamma H. Congenital goitrous hypothyroidism is caused by dysfunction of the iodide transporter SLC26A7. *Commun Biol* 2019; 2:270
144. Opitz R, Hitz MP, Vandernoot I, Trubiroha A, Abu-Khudir R, Samuels M, Desilets V, Costagliola S, Andelfinger G, Deladoey J. Functional zebrafish studies based on human genotyping point to netrin-1 as a link between aberrant cardiovascular development and thyroid dysgenesis. *Endocrinology* 2015; 156:377-388
145. Watson PJ, Fairall L, Schwabe JW. Nuclear hormone receptor co-repressors: structure and function. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 348:440-449
146. Kraus C, Uebe S, Thiel CT, Ekici AB, Reis A, Zweier C. Microphthalmia is not a mandatory finding in X-linked recessive syndromic microphthalmia caused by the recurrent BCOR variant p.Pro85Leu. *Am J Med Genet A* 2018; 176:2872-2876
147. Mueller PW, Lyons J, Kerr G, Haase CP, Isett RB. Standard enrichment methods for targeted next-generation sequencing in high-repeat genomic regions. *Genet Med* 2013; 15:910-911
148. Roepke TK, King EC, Reyna-Neyra A, Paroder M, Purtell K, Koba W, Fine E, Lerner DJ, Carrasco N, Abbott GW. Kcne2 deletion uncovers its crucial role in thyroid hormone biosynthesis. *Nat Med* 2009; 15:1186-1194
149. Frohlich H, Boini KM, Seebohm G, Strutz-Seebohm N, Ureche ON, Foller M, Eichenmuller M, Shumilina E, Pathare G, Singh AK, Seidler U, Pfeifer KE, Lang F. Hypothyroidism of gene-targeted mice lacking Kcnq1. *Pflugers Arch* 2011; 461:45-52
150. Purtell K, Paroder-Belenitsky M, Reyna-Neyra A, Nicola JP, Koba W, Fine E, Carrasco N, Abbott GW. The KCNQ1-KCNE2 K(+) channel is required for adequate thyroid I(-) uptake. *FASEB J* 2012; 26:3252-3259
151. Fu C, Luo S, Zhang Y, Fan X, D'Gama AM, Zhang X, Zheng H, Su J, Li C, Luo J, Agrawal PB, Li Q, Chen S. Chromosomal microarray and whole exome sequencing identify genetic causes of congenital hypothyroidism with extra-thyroidal congenital malformations. *Clin Chim Acta* 2019; 489:103-108
152. Purtell K, Roepke TK, Abbott GW. Cardiac arrhythmia and thyroid dysfunction: a novel genetic link. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42:1767-1770

153. Dufner-Almeida LG, do Carmo RT, Masotti C, Haddad LA. Understanding human DNA variants affecting pre-mRNA splicing in the NGS era. *Adv Genet* 2019; 103:39-90
154. Bonnet C, Krieger S, Vezain M, Rousselin A, Tournier I, Martins A, Berthet P, Chevrier A, Dugast C, Layet V, Rossi A, Lidereau R, Frebourg T, Hardouin A, Tosi M. Screening BRCA1 and BRCA2 unclassified variants for splicing mutations using reverse transcription PCR on patient RNA and an ex vivo assay based on a splicing reporter minigene. *J Med Genet* 2008; 45:438-446
155. Fontaine V, Duboscq-Bidot L, Jouve C, Hamlin M, Curjol A, Briand V, Janiak P, Hulot JS, Pruniaux-Harnist MP, Charron P, Villard E. Generation of iPSC line from MYH7 R403L mutation carrier with severe hypertrophic cardiomyopathy and isogenic CRISPR/Cas9 corrected control. *Stem Cell Res* 2021; 52:102245
156. Sharma A, Toepfer CN, Ward T, Wasson L, Agarwal R, Conner DA, Hu JH, Seidman CE. CRISPR/Cas9-Mediated Fluorescent Tagging of Endogenous Proteins in Human Pluripotent Stem Cells. *Curr Protoc Hum Genet* 2018; 96:21 11 21-21 11 20
157. Weisheit I, Kroeger JA, Malik R, Klimmt J, Crusius D, Dannert A, Dichgans M, Paquet D. Detection of Deleterious On-Target Effects after HDR-Mediated CRISPR Editing. *Cell Rep* 2020; 31:107689
158. Owens DDG, Caulder A, Frontera V, Harman JR, Allan AJ, Bucakci A, Greder L, Codner GF, Hublitz P, McHugh PJ, Teboul L, de Bruijn M. Microhomologies are prevalent at Cas9-induced larger deletions. *Nucleic Acids Res* 2019; 47:7402-7417
159. Lee HB, Schwab TL, Koleilat A, Ata H, Daby CL, Cervera RL, McNulty MS, Bostwick HS, Clark KJ. Allele-Specific Quantitative PCR for Accurate, Rapid, and Cost-Effective Genotyping. *Hum Gene Ther* 2016; 27:425-435
160. Cheruiyot A, Li S, Nickless A, Roth R, Fitzpatrick JAJ, You Z. Compound C inhibits nonsense-mediated RNA decay independently of AMPK. *PLoS One* 2018; 13:e0204978
161. Durand S, Cougot N, Mahuteau-Betzer F, Nguyen CH, Grierson DS, Bertrand E, Tazi J, Lejeune F. Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) by a new chemical molecule reveals the dynamic of NMD factors in P-bodies. *J Cell Biol* 2007; 178:1145-1160
162. Bokhari A, Jonchere V, Lagrange A, Bertrand R, Svrcek M, Marisa L, Buhard O, Greene M, Demidova A, Jia J, Adriaenssens E, Chassat T, Biard DS, Flejou JF, Lejeune F, Duval A, Collura A. Targeting nonsense-mediated mRNA decay in colorectal cancers with microsatellite instability. *Oncogenesis* 2018; 7:70
163. De La Vieja A, Ginter CS, Carrasco N. The Q267E mutation in the sodium/iodide symporter (NIS) causes congenital iodide transport defect (ITD) by decreasing the NIS turnover number. *J Cell Sci* 2004; 117:677-687
164. Narumi S, Muroya K, Asakura Y, Adachi M, Hasegawa T. Transcription factor mutations and congenital hypothyroidism: systematic genetic screening of a population-based cohort of Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:1981-1985

165. Narumi S, Muroya K, Abe Y, Yasui M, Asakura Y, Adachi M, Hasegawa T. TSHR mutations as a cause of congenital hypothyroidism in Japan: a population-based genetic epidemiology study. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:1317-1323
166. Al Taji E, Biebermann H, Limanova Z, Hnikova O, Zikmund J, Dame C, Gruters A, Lebl J, Krude H. Screening for mutations in transcription factors in a Czech cohort of 170 patients with congenital and early-onset hypothyroidism: identification of a novel PAX8 mutation in dominantly inherited early-onset non-autoimmune hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* 2007; 156:521-529
167. Bakker B, Bikker H, Vulsma T, de Randamie JS, Wiedijk BM, De Vijlder JJ. Two decades of screening for congenital hypothyroidism in The Netherlands: TPO gene mutations in total iodide organification defects (an update). *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:3708-3712
168. Yu B, Long W, Yang Y, Wang Y, Jiang L, Cai Z, Wang H. Newborn Screening and Molecular Profile of Congenital Hypothyroidism in a Chinese Population. *Front Genet* 2018; 9:509
169. Santos-Silva R, Rosario M, Grangeia A, Costa C, Castro-Correia C, Alonso I, Leao M, Fontoura M. Genetic analyses in a cohort of Portuguese pediatric patients with congenital hypothyroidism. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2019; 32:1265-1273
170. Alfares AA. Applying filtration steps to interpret the results of whole-exome sequencing in a consanguineous population to achieve a high detection rate. *Int J Health Sci (Qassim)* 2018; 12:35-43
171. Thorwarth A, Mueller I, Biebermann H, Ropers HH, Grueters A, Krude H, Ullmann R. Screening chromosomal aberrations by array comparative genomic hybridization in 80 patients with congenital hypothyroidism and thyroid dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:3446-3452
172. Schork NJ, Murray SS, Frazer KA, Topol EJ. Common vs. rare allele hypotheses for complex diseases. *Curr Opin Genet Dev* 2009; 19:212-219
173. Arauchi A, Matsuura K, Shimizu T, Okano T. Functional Thyroid Follicular Cells Differentiation from Human-Induced Pluripotent Stem Cells in Suspension Culture. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017; 8:103
174. Ma R, Morshed SA, Latif R, Davies TF. TAZ Induction Directs Differentiation of Thyroid Follicular Cells from Human Embryonic Stem Cells. *Thyroid* 2017; 27:292-299
175. Antonica F, Kasprzyk DF, Opitz R, Iacovino M, Liao XH, Dumitrescu AM, Refetoff S, Peremans K, Manto M, Kyba M, Costagliola S. Generation of functional thyroid from embryonic stem cells. *Nature* 2012; 491:66-71