

Università degli Studi del Piemonte Orientale
“Amedeo Avogadro”



Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare

Ciclo XXIV

RELAZIONE 1° anno

**Ipotiroidismo subclinico: fattori genetici, clinici e
biochimici coinvolti**

Candidato:
Stefania Moia

Responsabile Scientifico:
Prof. G. Bona

SEZIONE 1: Risultati scientifici

1. Introduzione

1.1 Asse ipotalamo-ipofisario

La tiroide è una ghiandola endocrina, di tipo follicolare, localizzata nella regione anteriore del collo; produce due ormoni, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), regolatori della crescita e del metabolismo e secerne inoltre un altro ormone, la calcitonina, coinvolto nella regolazione del calcio (1).

La secrezione e la sintesi degli ormoni tiroidei sono controllate da due ghiandole situate nell'area cerebrale: l'ipofisi e l'ipotalamo. La prima ha lo scopo di produrre la tireotropina, nota anche con la sigla TSH (thyroid-stimulating hormone), che ha il compito di incrementare la produzione degli ormoni T3 e T4, esercitando un'azione trofica sulla tiroide con conseguente ipertrofia delle sue cellule follicolari. L'ipotalamo, a sua volta, influisce sulla regolazione del TSH tramite la produzione dell'ormone liberante la tireotropina, noto anche con la sigla TRH (thyrotropin-releasing hormone). Questa regolazione è nota con il nome di asse ipotalamo-ipofisario.

La tireotropina è una glicoproteina prodotta dall'ipofisi anteriore ed è composta da due subunità proteiche, alfa e beta, che unite formano l'ormone vero e proprio; la subunità alfa è del tutto simile a quella di altre tropine ipofisarie (FSH, LH, HCG), mentre la subunità beta è diversa per ciascuno di queste molecole conferendo loro la specificità biologica (1).

Gli ormoni tiroidei sono prodotti a partire dall'aminoacido tirosina ed esercitano diversi effetti sulla differenziazione, sulla crescita e sul metabolismo grazie all'interazione con i loro recettori nucleari.

La tirosina necessaria alla sintesi è ricavata dalla degradazione della tireoglobulina.

La tireoglobulina è una glicoproteina dimerica di 660kDa, sintetizzata dai tireociti, cioè dalle cellule epiteliali che rivestono i follicoli tiroidei ed è la componente principale della sostanza colloide che si trova nel lume follicolare.

Sulla membrana apicale del tireocita l'enzima tireoperossidasi (TPO), attraverso il meccanismo della perossidazione, catalizza l'organificazione dello iodio presente nei residui tirosinici della tireoglobulina; i residui di tirosina vengono così iodurati a formare 3-monoiodotirosina (MIT) e 3,5-diiodotirosina (DIT).

Lo iodio necessario alla reazione viene trasportato all'interno del tireocita grazie all'azione di un simporto sodio-iodio localizzato sulla membrana delle cellule della tiroide ($\text{Na}^+\text{-I}$ Symporter NIS).

Un residuo di MIT e uno di DIT per condensazione formeranno all'interno del lume follicolare

3,5,3'-triiodotironina (T_3) mentre due residui di DIT daranno origine ad una molecola di tiroxina (T_4) (2).

Esiste un raffinato meccanismo di controllo retroattivo tra la produzione di TSH e la produzione di ormoni tiroidei: questi ultimi, al crescere della loro concentrazione, inibiscono il TSH che pertanto cessa di stimolarne la produzione consentendone un abbassamento in circolo; bassi livelli, d'altra parte, stimolano la produzione di TSH che, stimolando la tiroide, riporta i livelli degli ormoni tiroidei ai valori normali. Il ruolo del TSH è quindi sostanzialmente quello di regolare la proliferazione delle cellule della tiroide e mantenere nei livelli fisiologici i livelli degli ormoni tiroidei.

Deficienze nella produzione o nell'attività degli ormoni tiroidei portano ad ipotiroidismo, una delle più frequenti disfunzioni ormonali riscontrabile in età pediatrica; l'ipotiroidismo è classificabile come terziario se ipotalamico, secondario se ipofisario oppure primario se tiroideo (2).

1.2 Ipotiroidismo subclinico

Le patologie a carico della tiroide sono molte e dovute a diverse cause. Di nostro interesse in questo studio è la condizione denominata ipotiroidismo subclinico idiopatico (Subclinical Hypothyroidism SH), un disordine caratterizzato da una elevata concentrazione sierica di TSH associata a valori di ormoni tiroidei nella norma (3).

L'ipotiroidismo subclinico ha una prevalenza nella popolazione adulta dell'1-10% (4) mentre tale prevalenza è inferiore al 2% in età pediatrica anche se gli studi a riguardo su bambini o adolescenti sono ancora limitati (5,6).

La diagnosi di ipotiroidismo subclinico è determinata solitamente da analisi effettuate in laboratorio in quanto in genere i pazienti sono asintomatici e non manifestano segni o sintomi di disfunzionalità tiroidea.

Il principale segno clinico rilevabile è il gozzo, doppiamente frequente nei soggetti ipotiroidei rispetto alla popolazione normale (3); sintomi frequentemente associati sono anche l'aumento di peso, livelli elevati di colesterolo, scarsa velocità di crescita, anemia, sonnolenza, debolezza e scarso sviluppo psicomotorio e cognitivo (6,7).

Molte patologie sia tiroidee che extra-tiroidee sono associabili alla patogenesi di ipotiroidismo subclinico (8); tra quelle correlabili alla tiroide le più frequenti sono la carenza iodica, la tiroidite di Hashimoto e il morbo di Graves mentre le extratiroidee comprendono il diabete mellito, la fibrosi cistica, il morbo celiaco e l'insufficienza renale cronica (3).

La terapia esistente è a base di somministrazioni di L-tiroxina, ma considerato che nel 40% dei casi i livelli di TSH scendono a livelli normali spontaneamente esistono pareri contrastanti sulla necessità di trattamento (2).

In letteratura è stato ampiamente dimostrato che esistono anche cause genetiche responsabili dell'insorgenza dell'ipotiroidismo subclinico; in particolare nel corso di questi anni è stata notata la relazione esistente tra la presenza di mutazioni localizzate nei geni codificanti per proteine coinvolte nel signaling del TSH e del suo recettore (TSHR) e la patogenesi di ipotiroidismo subclinico.

1.3 Il recettore del TSH (TSHR)

Il TSH esercita la sua azione legandosi al dominio extracellulare (ECD) del recettore del TSH (TSHR). Il TSHR è un classico recettore accoppiato a proteine G (GPCR), formato da sette eliche transmembrana (TMD) ed è presente sulla membrana basolaterale delle cellule follicolari della tiroide. Il gene umano per il TSHR è localizzato sul cromosoma 14q31, è formato da 10 esoni, si estende per oltre 60 kb e codifica per una proteina di 764 aminoacidi (9).

Il TSHR è composto da due subunità, denominate α e β , codificate dallo stesso gene e unite da ponti disolfuro; la subunità α comprende il dominio extracellulare mentre la subunità β contiene la porzione di recettore ancorata alla membrana e il dominio intracellulare (figura 1) (10).

Il TSHR è caratterizzato da un segmento aminotermine glicosilato responsabile del legame ad alta affinità con il TSH, codificato dai primi nove esoni, mentre l'esone 10 codifica per i sette domini transmembrana e la coda citoplasmatica; inoltre una sequenza segnale di 21 aminoacidi precede il grande dominio extracellulare (11).

La glicosilazione della porzione di legame, caratterizzata dal classico "leucine repeat motifs" (LRRs), è indispensabile per il legame ad alta affinità con l'ormone.

Un taglio proteolitico post-traduzionale divide il TSHR nelle sue due subunità, grazie alla rimozione di un segmento polipeptidico di 50 aminoacidi che si estende dal residuo 316 al residuo 366 (Figura 1); i ponti disolfuro sono ridotti grazie a proteine disolfuro isomerasi che portano al rilascio della subunità α dalla porzione ancorata alla membrana e alla conseguente maturazione del recettore. La rimozione di questa porzione aminoacidica porta ad una forma recettoriale attiva in grado di legare l'ormone (12).

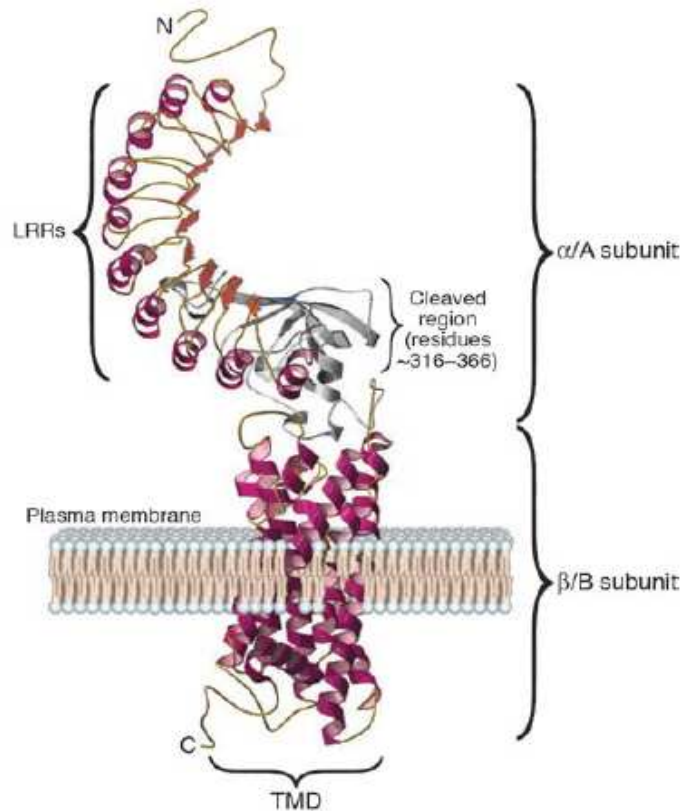


Figura 1. Modello strutturale del TSHR con evidenziate le subunità α e β e i sette domini transmembrana (TMD) (10)

Il corretto folding del dominio extracellulare è garantito dalla formazione di ponti disolfuro; tale dominio infatti contiene 11 residui di cisteina e si è potuto osservare che 8 di queste cisteine presenti nella struttura nel TSHR sono altamente conservate nella sequenza di tutti i recettori che legano ormoni glicoproteici.

La presenza dei ponti disolfuro è necessaria non solo per il corretto folding recettoriale ma anche per la formazione di strutture dimeriche funzionalmente attive del TSHR.

In particolare è noto che il residuo Cys41 è cruciale per la formazione e il mantenimento del sito di legame per il TSH in quanto studi precedenti in vitro hanno dimostrato che la perdita di tale cisteina causa la mancata formazione del ponte disolfuro e l'impossibilità di legare l'ormone (13).

Il TSHR, oltre che sulla membrana basolaterale delle cellule follicolari della tiroide, è espresso anche in tessuti extra-tiroidali; la presenza dell'RNA messaggero del TSHR è stata rilevata anche in fibroblasti, adipociti, linfociti, specifiche regioni del cervello, ghiandola surrenale, miociti cardiaci, fegato e timo, anche se gli studi a riguardo sono ancora limitati (14,15).

Il TSHR subisce una regolazione in base al tempo di emivita dell'RNA messaggero del suo ligando TSH: in caso di elevate concentrazioni di TSH il recettore viene down-regolato (16).

1.4 Signaling cellulare del TSHR

I cambiamenti strutturali nel TSHR, prodotti dall'interazione con l'ormone TSH, attivano le proteine G accoppiate al recettore; queste proteine G contengono tre subunità α , β e γ : la dissociazione della subunità α dal complesso $\beta\gamma$ e la conversione delle molecole di GDP in GTP porta alla trasduzione del segnale e infine alla risposta cellulare (Figura 2) (17).

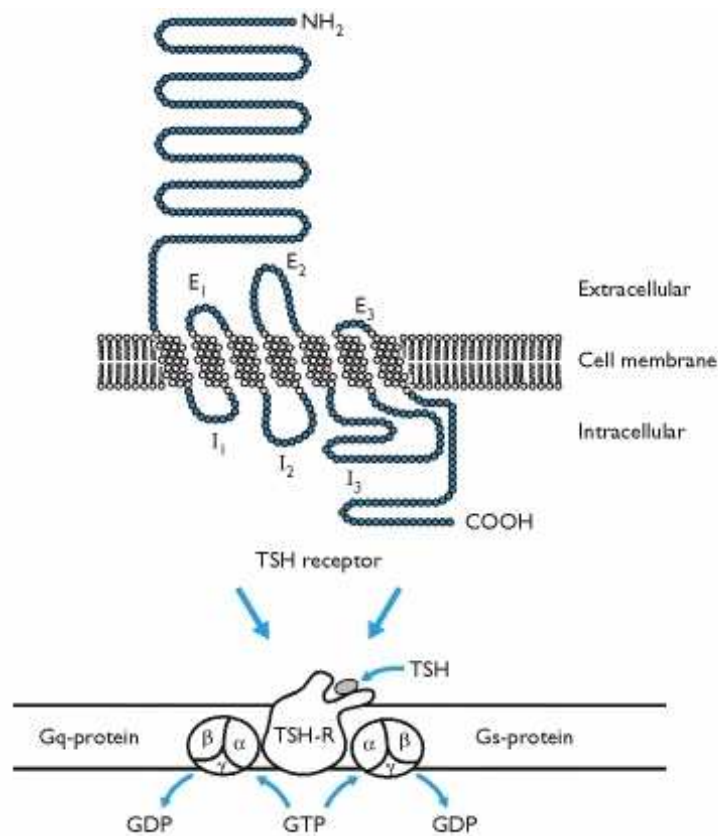


Figura 2. Meccanismo d'azione del TSHR: il legame dell'ormone attiva le proteine G associate al recettore e stimola la conversione del GDP in GTP

E' stato dimostrato che il recettore del TSH è in grado di legare due tipi di proteine G, quelle contenenti la subunità di tipo α_s oppure quelle legate alla subunità $\alpha_{q/11}$ (Figura 3) (17).

Le proteine G associate alla subunità α_s stimolano la via di trasduzione del segnale legata all'adenilato ciclasi, che porta alla produzione del secondo messaggero AMP ciclico (cAMP) e all'attivazione successiva della proteina chinasi A (PKA).

Le proteine G contenenti la subunità $\alpha_{q/11}$ stimolano invece la via della fosfolipasi C (PLC). La fosfolipasi C porta alla conversione dell'inositolo 4,5-bifosfato (PIP₂) in inositolo 1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerolo (DAG). Il conseguente rilascio di Ca²⁺ intracellulare attiva la proteina chinasi C (PKC). L'effetto finale è il mantenimento della crescita e della funzionalità delle cellule della tiroide. Nell'uomo è ormai noto che sono necessarie concentrazioni più elevate di TSH per attivare questa seconda via di trasduzione del segnale accoppiata all'inositolo fosfato rispetto alla via dell'cAMP (17).

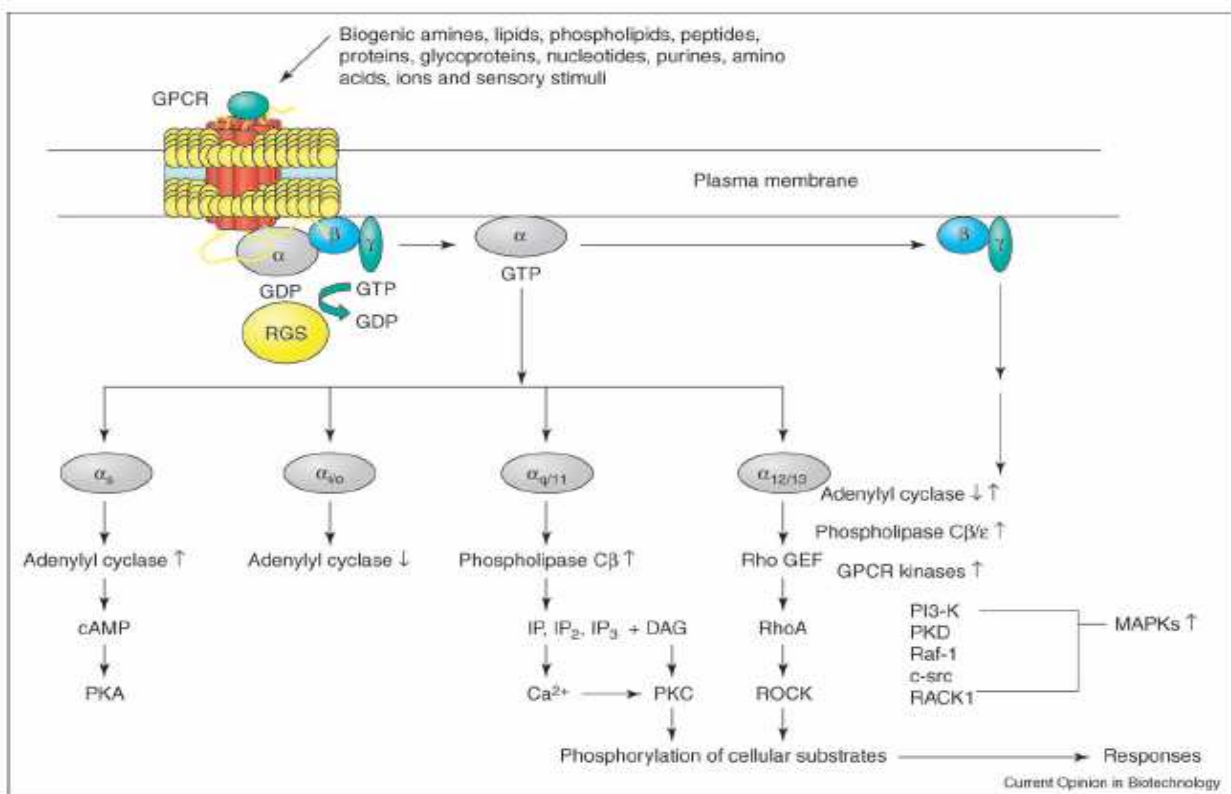


Figura 3. Vie di trasduzione del segnale dei recettori accoppiati a proteine G (GPCR). Il recettore del TSH è in grado di legare due tipi di proteine G: contenenti la subunità di tipo α_s oppure la subunità $\alpha_{q/11}$. Si attivano così due vie di trasduzione del segnale differenti, con attivazione della Proteina chinasi A (PKA) o alternativamente della Proteina chinasi C (PKC) (18).

1.5 Mutazioni note presenti nel gene del TSHR

Negli ultimi anni sono state identificate nell'uomo numerose mutazioni puntiformi localizzate nelle regioni codificanti del gene del TSHR, risultate responsabili di vari difetti strutturali nella proteina da esso prodotta. Inoltre un elevato numero di polimorfismi di un singolo nucleotide (single nucleotide polymorphism o SNP) e microsatelliti sono stati identificati nel locus del TSHR.

Le mutazioni riscontrate nel gene del TSHR sono suddivisibili in due categorie, germinali oppure somatiche, e sono solitamente localizzate nella regione transmembrana del recettore.

E' stato dimostrato da studi funzionali in vitro che alcune mutazioni germinali causano ipertiroidismo congenito, incrementando l'attività basale del recettore e rendendolo costitutivamente attivo anche in assenza del ligando (mutazioni "gain of function") (11).

Altre mutazioni germinali interferiscono invece con la normale funzionalità recettoriale e sono così associabili alla resistenza al TSH e all'ipotiroidismo congenito (mutazioni "loss of function") (19).

Le mutazioni di tipo somatico invece portano ad un fenotipo clinico diverso rappresentato dall'adenoma tossico di Plummer e dal gozzo multinodulare tossico e, anche se più raramente, dal carcinoma tiroideo.

Studi precedenti hanno dimostrato che la presenza di mutazioni missenso nel gene del TSHR può essere la causa di una ridotta o di una completa impossibilità di legare il TSH; il mancato legame con l'ormone porta così alla conseguente abolizione di tutto il signaling cellulare.

Il TSH si lega al dominio extracellulare del recettore codificato dai primi 400 residui aminoacidici; studi in vitro hanno però dimostrato che la delezione dei residui 38-45 impedisce il legame dell'ormone al recettore, mentre la perdita dei residui 317-366 non influenza il legame e neanche il conseguente accumulo di cAMP (20).

In altri studi è stato ipotizzato che il ridotto legame con il TSH possa essere probabilmente dovuto ad una ridotta espressione del recettore sulla superficie cellulare (21).

Le mutazioni che coinvolgono invece il dominio intracellulare non comportano modificazioni nel legame con l'ormone; è possibile comunque osservare una diminuzione nella produzione di cAMP, visto che la via di trasduzione di segnale delle proteine G è compromessa (22).

Nel gene del TSHR sono state anche trovate mutazioni di tipo nonsense che portano a forme recettoriali tronche; quando la porzione transmembrana, necessaria per il legame alle proteine G, viene deleta tutta la trasduzione del segnale è inevitabilmente interrotta (23).

Recentemente la scoperta che il TSHR, come molti altri recettori accoppiati a proteine G, può oligomerizzare nelle cellule ha condotto all'ipotesi che la formazione di complessi tra forme wild type e mutate del recettore sia responsabile della parziale resistenza al TSH nei pazienti eterozigoti per queste mutazioni (24).

2. Scopo del lavoro

Lo scopo del presente studio è stato analizzare un gruppo di bambini e adolescenti di età compresa tra 1 e 18 anni con queste caratteristiche: elevati valori di TSH in almeno due misurazioni, ormoni tiroidei nella norma e assenza di autoimmunità tiroidea.

In questo gruppo selezionato di pazienti sono state analizzate alcune caratteristiche cliniche e valutati i parametri biochimici. In tutti i soggetti è stata inoltre condotta la diagnosi molecolare volta ad individuare la presenza di variazioni genetiche nel gene del recettore del TSH.

Scopo finale dello studio era valutare il pattern di distribuzione e il coinvolgimento di tutti i fattori analizzati nell'insorgenza dell'ipotiroidismo subclinico. Nel caso si verifici la presenza di una nuova variazione nel gene del TSHR saranno eseguiti gli studi funzionali in vitro.

3. Materiali e metodi

3.1 Selezione dei pazienti

Sono stati reclutati 88 pazienti (45 maschi e 43 femmine) di età superiore ad un anno, provenienti da diversi centri italiani e i cui genitori hanno acconsentito allo studio. L'età media dei pazienti era di 8,2 anni (range 1-18 anni). Di questi 88 pazienti 28 erano in età prescolare (1-5,9 anni) e 60 erano invece in età scolare (6-18 anni).

Tutti i soggetti inclusi nello studio presentavano in almeno due differenti misurazioni valori sierici di TSH superiori al range di normalità nonostante valori normali di ormoni tiroidei.

Sono stati esclusi dallo studio tutti gli individui che sono risultati positivi per la presenza di anticorpi diretti contro epitopi tiroidei, cioè per anticorpi anti-tireoperossidasi (TPO-Ab) oppure per anticorpi anti-tireoglobulina (Tg-Ab). Inoltre sono stati esclusi i falsi positivi allo screening neonatale per l'ipotiroidismo, oppure i soggetti affetti da patologie correlabili alla tiroide o affetti da malattie croniche.

Per ogni paziente sono state registrate le caratteristiche cliniche e analizzati i parametri biochimici. Per escludere altre eventuali patologie correlabili alla tiroide è stata quantificata inoltre l'escrezione urinaria di iodio (Urinary Iodine Excretion o UIE).

Le caratteristiche cliniche analizzate includevano sesso, età, peso, altezza, stato puberale, familiarità per patologie tiroidee, presenza di gozzo alla palpazione, volume tiroideo e presenza di ecogenicità all'ultrasonografia (US).

I parametri biochimici analizzati includevano invece i valori di TSH, fT3, fT4 e l'escrezione urinaria di iodio giornaliera (UIE).

I livelli sierici di TSH, fT3, fT4, TPO-Ab e Tg-Ab sono stati misurati utilizzando il metodo della chemiluminescenza diretta (Advia Centaur CP Immunoassay System, Siemens Healthcare Diagnostic, Deerfield, IL).

I range di normalità considerati nello studio sono stati:

- 0,35 - 4,5 μ UI/ml per il TSH;
- 2,3 - 4,2 pg/ml per fT3;
- 0,89 - 1,76 ng/dl per fT4;
- titoli anticorpali (TPO-Ab e Tg-Ab) inferiori a 60 IU/ml.

Il valore di TSH, riportato per i pazienti con almeno due misurazioni superiori al range di normalità, è quello riferito alla media delle misurazioni ottenute dallo stesso paziente in analisi differenti.

Di 59 degli 88 pazienti studiati è stato inoltre raccolto un campione urinario mattutino per la determinazione della creatinina e dell'escrezione urinaria giornaliera di iodio (UIE).

La misurazione dell'UIE in un campione urinario casuale non porta però ad una precisa misurazione dell'escrezione di iodio in un singolo individuo, considerata la grande variabilità interindividuale nel volume urinario giornaliero; il valore utilizzato viene pertanto aggiustato in base al rapporto UIE/creatinina ricalcolato sulla base di età e sesso del paziente.

Il protocollo oggetto dello studio è stato approvato dal comitato etico locale e il consenso informato è stato firmato dai genitori di ogni paziente.

3.2 Analisi molecolare del gene del TSHR

Il DNA genomico è stato estratto da sangue periferico mediante la tecnica del salting-out.

I 10 esoni codificanti del gene del TSHR e le regioni introniche fiancheggianti sono state amplificate tramite PCR. L'esone 10, in quanto molto esteso, è stato suddiviso in 4 frammenti fiancheggianti per poterlo amplificare completamente (denominati A,B,C e D).

La reazione di PCR è stata eseguita in un volume finale di 30 μ l utilizzando 100 ng di DNA genomico e la polimerasi AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA). La sequenza dei primers utilizzati e le temperature dei protocolli di PCR sono mostrati in tabella 1.

Il prodotto di amplificazione è stato visualizzato su gel di agarosio al 2% prima dell'analisi dHPLC (denaturing High Performance Liquid Chromatography).

L'analisi dHPLC permette, in condizioni parzialmente denaturanti e sotto un diretto controllo della temperatura, di discriminare all'interno di prodotti eterogenei di PCR, molecole di DNA eteroduplex rispetto alle molecole omoduplex in quanto gli eteroduplex una volta rinaturati presentano un punto di disappaiamento.

L'eteroduplex si comporta cromatograficamente in modo differente sia dall'omoduplex non mutato che dall'omoduplex mutato: l'eteroduplex è solitamente più veloce (meno trattenuto) degli omoduplex e da ciò si può caratterizzare la presenza di una variazione nucleotidica in un campione. La presenza di una mutazione o di un polimorfismo si evidenzia quindi, mediante picchi ulteriori o con un profilo diverso rispetto al "wild type".

L'analisi dHPLC di ogni campione amplificato è stata eseguita utilizzando lo strumento wave DNA Fragment Analysis System (Transgenomic, Omaha, NE), a due differenti temperature (Tabella 2). 10 μ l di ogni campione sono stati miscelati con un uguale volume di un campione di riferimento wild-type ottenuto utilizzando le stesse condizioni di amplificazione. Per ottenere la formazione di eteroduplex i prodotti di PCR sono stati denaturati e successivamente sottoposti a rinaturazione graduale tra 95 e 41°C.

I campioni risultati positivi all'analisi dHPLC sono stati usati come template per il sequenziamento diretto utilizzando il kit di reazione di sequenza Big-Dye Terminator Cycle (Applied Biosystem, Foster City, CA) e un sequenziatore automatico ABI 3100. Gli elettroferogrammi ottenuti saranno confrontati con le sequenze di riferimento wild type e poi allineati utilizzando software disponibili in rete.

Tabella 1. Sequenza dei primers, dimensione dei frammenti , temperatura di annealing di ogni protocollo di PCR e temperatura di parziale denaturazione di ogni frammento

F = primer forward; R = primer reverse; TD = touch-down PCR

ESONE	Sequenza dei primers (5' → 3')	Dimensione del prodotto PCR (bp)	Temperature di annealing di PCR (°C)	Temperature analisi dHPLC (°C)
1	F-cctctttttccccttctcca R-ccagagatcaagggcatctgcag	400	60-50 (TD)	62.1 60.1
2	F-tggttctttggtatgtttgtga R-acttgcataaatcaatggcag	344	51	53.4 51.4
3	F-gcagaatccatgaggggtgt R-caatgggagctggtttct	301	51	56.1 54.1
4	F-ggtaccctgtggcgtaaag R-atgggtatagcctgggtcg	330	51	56.2 54.2
5	F-ttgtcttcagaacccatgctt R-cactggcatgaagtaaggca	335	60-50 (TD)	54.7 52.7
6	F-ctgctgcagaaggaaagcat R-tccaagagccatactgcctt	227	60-50 (TD)	57.1 55.1
7	F-gcaccacttctcaccagtca R-tctccctggtgtgtgtgtgtgtgt	352	51	58.8 56.8
8	F-gtgctcaagccagaagaaga R-gttgctgtctcgggtaaagg	357	51	54.3 52.3
9	F-tcatctcccaattaacctcagg R-gtggagaggaaattggaagc	410	60-50 (TD)	58.8 56.8
10A	F-gcctggcactgactcttttc R-tcctgagaattgtggtgtgt	419	51	58.7 56.7
10B	F-gttcaaccctgtgtaagaca R-gtttgctgcttcttctcg	446	60-50 (TD)	60.9 58.9
10C	F-ctggtatgccatcaccttgcg R-agcaactccaaaatcttgctg	433	60-50 (TD)	59.2 57.2
10D	F-tctgaacaagcctctcatca R-gacacccccaacacatagct	447	60-50 (TD)	56.9 54.9

3.3 Mutagenesi sito-diretta

Il vettore pSVL (4896 bp) contenente il cDNA wild-type del recettore del TSH è stato gentilmente donato dal Dipartimento di Endocrinologia e Metabolismo dell'Università di Pisa.

70 µl di cellule competenti DH101F' sono state trasformate con 1 µl (concentrazione 10 ng/µl) di vettore contenente il cDNA wild-type del recettore e cresciute overnight a 37°C in piastre di LB/Agar Ampicillina⁺ per selezionare solo le colonie che hanno incorporato il plasmide con la resistenza all'antibiotico.

Il DNA plasmidico è stato successivamente amplificato ed estratto utilizzando il Qiagen Plasmid Maxi Kits. La mutazione è stata introdotta nella sequenza wild-type del cDNA del TSHR usando il kit di mutagenesi Quik Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA). Il corretto inserimento della mutazione W520X è stato verificato tramite sequenziamento diretto dell'intero cDNA del TSHR.

3.4 Analisi statistica

In considerazione del fatto che le variabili cliniche e biochimiche analizzate non sono normalmente distribuite tutte le analisi statistiche sono state eseguite attraverso test non parametrici e i loro valori sono stati espressi come mediana e range interquartile (IQR).

La comparazione tra gruppi è stata ottenuta usando il test χ^2 , il test di Fisher, il test Mann-Whitney U e il test ANOVA di Kruskal-Wallis dove appropriati. La relazione tra variabili continue è stata valutata con il coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman.

Il coefficiente β (95% intervallo di confidenza) per ogni variabile indipendente è stato riportato. L'analisi statistica è stata eseguita con il software STATISTICA versione v.6.1 (Statsoft Inc, Tulsa, OK).

4. Risultati

4.1 Caratteristiche cliniche e parametri biochimici

Le caratteristiche cliniche e i parametri biochimici di tutti i pazienti analizzati nel nostro studio sono stati riassunti in tabella 2.

Tabella 2. Caratteristiche cliniche e parametrici biochimici dei pazienti (n = 88).

	Media	IQR	Range	Range di normalità
Caratteristiche cliniche				
BMI z-score	0.15	-0.66 – 0.90	-2.21 – 2.54	
SDS altezza	0.20	-1.45 – 1.11	-3.78 – 3.39	
Parametri biochimici				
TSH (μ UI/ml)	6.1	5.2 – 7.8	4.6 – 20.3	0.35 – 4.5
fT3 (pg/ml)	3.6	3.5 – 3.9	3.1 – 4.1	2.3 – 4.2
fT4 (ng/dl)	1.3	1.1 – 1.4	0.9 – 1.6	0.89 – 1.76
UIE (μ g/giorno) *	98	66 – 137	19 – 542	

* L'escrezione urinaria giornaliera di iodio (UIE) è stata determinata in 59/88 pazienti (67%)

Degli 88 soggetti analizzati nel nostro studio 10 erano sovrappeso (11,4%) e 15 obesi (17%); la prevalenza della condizione di sovrappeso ed obesità era quindi del 28,4%. 19 soggetti erano al momento delle analisi puberi (21,6%) mentre 69 erano invece prepuberi (78,4%). 17 pazienti erano classificabili come basse stature idiopatiche (19,3%). Inoltre circa la metà dei soggetti presentavano una familiarità per le patologie tiroidee al secondo grado di parentela (45,5%).

In rapporto alle normali dimensioni della ghiandola tiroidea, si è potuto osservare che 8 pazienti presentavano un volume tiroideo ridotto e altri 8 invece un volume tiroideo maggiore rispetto alla norma; 5 soggetti appartenenti a questa ultima categoria presentavano inoltre gozzo alla palpazione (5/8 = 62,5%).

L'analisi ultrasonografica della tiroide ha mostrato un pattern ipoecogeno in 20 pazienti (22,7%). E' stato possibile osservare che la frequenza di ipoecogenicità era più elevata nei pazienti sovrappeso ed obesi rispetto ai normopeso, anche se non significativamente (32 vs 19%; P= 0,3).

La mediana del valore di TSH (IQR) nella popolazione in studio era 6,1 (5.2-7.8) μ UI/ml.

Sono stati riscontrati valori di TSH più elevati nei bambini in età prescolare rispetto a quelli in età scolare [7.1 (5.5-8.6) vs. 5.9 (5.2-7.4) μ UI/ml, P=0.04].

I livelli di TSH inoltre erano significativamente più elevati nei pazienti sovrappeso oppure obesi che in quelli normopeso (6.0-8.3) vs. 5.7 (5.2-7.7) μ UI/ml, P=0.04] (Figura 4). E' interessante notare che nel 56% dei pazienti sovrappeso oppure obesi e nel 30% dei normopeso il valore di TSH era più elevato di 7 μ UI/ml (P=0.04, χ^2 test).

Nel nostro gruppo di pazienti nessuna correlazione è stata trovata tra i livelli di TSH e la presenza di bassa statura idiopatica o di familiarità per patologie tiroidee.

Nessuna correlazione è stata inoltre trovata tra le alterazioni del volume tiroideo oppure tra lo stato puberale e i valori sierici di TSH.

Si è potuto osservare che i livelli di TSH tendevano però ad essere più elevati nei pazienti con tiroide ipoecogena rispetto a quelli con un pattern normale [7.6 (5.5-8.8) vs. 6.0 (5.2-7.4) μ UI/ml, P=0.06] (Figura 4). Questo incremento era poi statisticamente significativo se venivano inclusi nell'analisi solo i pazienti sovrappeso oppure obesi [8.5 (6.8-9.2) vs. 6.8 (6.0-7.4) μ UI/ml, P=0.04] (Figura 4).

L'analisi multipla di regressione ha dimostrato che sia la presenza di giovane età (β =-0.30, 95% CI=-0.51/-0.08, P=0.008) che di sovrappeso oppure obesità (β =0.22, 95%CI=0.06/0.37, P=0.01), indipendentemente contribuiscono ad incrementare i valori di TSH (multiple R=0.31, P=0.02).

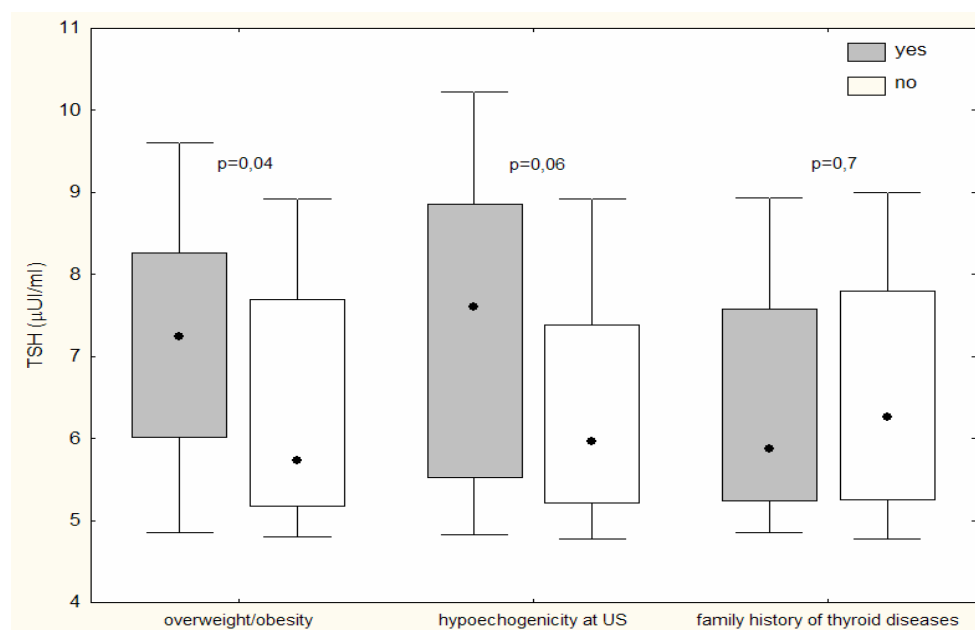


Figura 4. Variazione dei livelli sierici di TSH (μ UI/ml) in rapporto alle condizioni di sovrappeso/obesità, ipoecogenicità tiroidea all'ultrasonografia e familiarità per patologie tiroidee. I risultati sono mostrati come mediana (punto), range interquartile (quadrato), 10° e 90° percentile (whiskers)

Nei 59 pazienti di cui erano disponibili i campioni urinari, il valore medio di escrezione urinaria di iodio (UIE) era 98 (66-137) $\mu\text{g}/\text{giorno}$.

Nessuna correlazione è stata trovata tra UIE e valori elevati di TSH e nessuna differenza è stata osservata tra pazienti normopeso oppure sovrappeso; non si hanno inoltre correlazioni significative con le variazioni nel volume tiroideo o con l'ipoecogenicità.

Il valore di UIE correlava invece positivamente con l'età ($r=0,30$; $P=0,02$). Al contrario era significativamente più basso nei soggetti negativi rispetto a quelli positivi per la presenza di familiarità per patologie tiroidee [81 (50-106) vs. 120 (84-164) $\mu\text{g}/\text{d}$, $P=0.001$].

L'analisi multipla di regressione ha mostrato che solo una mancanza di familiarità per patologie tiroidee ($\beta=0.35$, 95% CI=0.09/0.60, $P=0.001$) contribuisce a diminuire l'escrezione urinaria di iodio mentre l'età non esercita alcuna influenza su tale indice (multiple $R=0.41$, $P=0.006$).

4.2 Analisi molecolare del gene del TSHR

Tutti i pazienti inclusi nello studio sono stati sottoposti ad analisi molecolare tramite sequenziamento diretto; nel gene del recettore del TSH sono state identificate un totale di 19 variazioni note riportate in letteratura:

- 6 mutazioni missenso;
- 3 mutazioni sinonime;
- una inserzione;
- una delezione;
- 8 polimorfismi.

Tutte queste variazioni sono state trovate in condizione di eterozigosi. 10 soggetti degli 88 analizzati sono risultati essere portatori di 8 mutazioni di tipo missenso o di frame-shift, in quanto la mutazione C41S era presente in tre fratelli.

Il numero di soggetti (%) portatori di ogni singola variazione è riportato in tabella 3.

Tabella 3. Numero di pazienti (%) portatori di mutazioni note o polimorfismi nel nostro studio (n = 88).

wt/wt = soggetti omozigoti per l'allele wild-type;

wt/var = soggetti eterozigoti per la variazione;

var/var = soggetti omozigoti per la variazione.

VARIAZIONE	wt/wt	wt/var	var/var
<i>Mutazioni missenso</i>			
C41S	85 (96.6)	3 (3.4)	0
R109Q	87 (98.9)	1 (1.1)	0
P162A	87 (98.9)	1 (1.1)	0
D403N	87 (98.9)	1 (1.1)	0
W488R	87 (98.9)	1 (1.1)	0
M527T	87 (98.9)	1 (1.1)	0
<i>Frame-shift</i>			
123-124 insTGCA	87 (98.9)	1 (1.1)	0
555-561 delTATTCTT	87 (98.9)	1 (1.1)	0
<i>Mutazioni sinonime</i>			
P119P	87 (98.9)	1 (1.1)	0
G245G	86 (97.7)	2 (2.3)	0
A459A	87 (98.9)	1 (1.1)	0
<i>Polimorfismi</i>			
P27T	87 (98.9)	1 (1.1)	0
P52T (rs 2234919)	81 (92)	7 (8)	0
IVS1+63 (rs 2239610)	68 (77.3)	19 (21.6)	1 (1.1)
IVS1-80 (rs 17111401)	83 (94.3)	5 (5.7)	0
IVS6+13 (rs 2241119)	74 (84)	14 (16)	0
N187N (rs 2075179)	74 (84)	14 (16)	0
[CT] _n microsatellite (rs 10651555)	40 (45.5)	30 (34)	18 (20.5)
D727E (rs 1991517)	74 (84)	14 (16)	0

L'effetto inibitorio sulla normale attività recettoriale e sul signaling cellulare del TSHR di tutte queste mutazioni era già noto in quanto è stato precedentemente descritto in studi funzionali disponibili in letteratura.

Le mutazioni sinonime non sono state oggetto di studi funzionali in quanto non comportano sostituzioni aminoacidiche e quindi non alterano né la sequenza, né la funzionalità del recettore.

La variante P27T, anche se trovata in un solo paziente, è dimostrato che non esercita alcun ruolo funzionale e può quindi essere considerata come un semplice polimorfismo.

La mutazione C41S, trovata in eterozigosi in tre fratelli, è localizzata nel dominio extracellulare di legame con l'ormone; studi in vitro hanno dimostrato un suo reale coinvolgimento nell'insorgenza dell'ipotiroidismo subclinico in quanto causa l'impossibilità di legare il TSH e di raggiungere un corretto folding recettoriale.

La frequenza allelica di ogni polimorfismo trovato nei nostri pazienti è riportata in tabella 4.

Tabella 4. Frequenza allelica dei polimorfismi trovati nei nostri pazienti.

wt = wild-type indica l'allele più frequente nella popolazione;

var = indica l'allele meno frequente nella popolazione.

POLIMORFISMO	wt (%)	var (%)	
P27T	C 99.4	A 0.6	
P52T (rs 2234919)	A 96.0	C 4.0	
IVS1+63 (rs 2239610)	G 88.1	C 11.9	
IVS1-80 (rs 17111401)	T 97.2	A 2.8	
IVS6+13 (rs 2241119)	A 92.0	G 8.0	
N187N (rs 2075179)	T 92.0	C 8.0	
[CT]_n microsatellite (rs 10651555)	[CT]₈ 62.5	[CT]₇ 0.6	[CT]₆ 36,9
D727E (rs 1991517)	C 92.0	G 8.0	

La prevalenza di familiarità per patologie tiroidee era 1,9 volte più elevata nei pazienti con mutazioni nel gene del TSHR rispetto a quelli senza mutazioni (80 vs. 42%; P=0.03, Fisher test). Nessuna correlazione è stata invece trovata tra la presenza di variazioni genetiche e l'escrezione urinaria di iodio.

4.3 Nuova mutazione identificata nel gene del TSHR

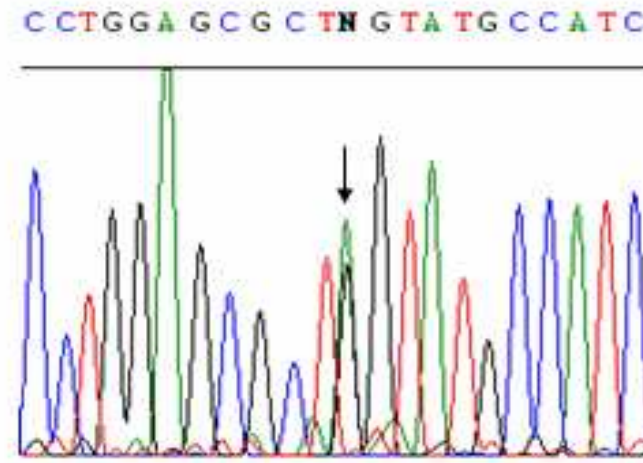
L'analisi molecolare ha rivelato la presenza di una nuova mutazione nel gene del TSHR.

In una paziente di 4 anni è stata trovata la sostituzione G→A in posizione 1559 nell'esone 10.

L'aminoacido triptofano in posizione 520 viene così sostituito da un codone di stop (TGG→TAG)

(Figura 5). Tale mutazione denominata W520X è stata trovata in condizione di eterozigosi. Il valore medio di TSH della paziente era 8,9 μ UI/ml.

Figura 5. Elettroferogramma che mostra la sostituzione G \rightarrow A in eterozigosi in posizione 1559 nell'esone 10.



La paziente presenta inoltre due polimorfismi noti:

- P52T in condizione di eterozigosi per la sostituzione C154A (rs2234919);
- inserzione nell'IVS7 di 4 bp (TCTC) in condizione di omozigosi (rs10651555).

Si è proceduto successivamente all'analisi molecolare dei genitori della paziente; la madre è risultata portatrice della stessa mutazione in condizione di eterozigosi, il padre è risultato invece omozigote per l'allele wt. Purtroppo non sono ancora disponibili i dati clinici e le informazioni sullo stato di funzionalità tiroidea della madre.

La mutazione W520X è localizzata nel terzo dominio transmembrana del TSHR e coinvolge un aminoacido altamente conservato tra specie diverse; porta ad una prematura interruzione nella sintesi dell'mRNA del recettore e quindi ad una sua forma tronca priva di buona parte della porzione C-terminale.

Il significato funzionale di questa mutazione e il suo coinvolgimento nell'ipotiroidismo subclinico sarà oggetto di successivi studi funzionali; si possono però ipotizzare danni a carico del signaling cellulare in quanto viene deletato il dominio transmembrana necessario per il legame alle proteine G.

5. Discussione

Nel presente studio sono stati valutati il pattern di distribuzione e il coinvolgimento di determinate caratteristiche cliniche e parametri biochimici nella patogenesi dell'ipotiroidismo subclinico; tutti i soggetti sono stati inoltre analizzati dal punto di vista molecolare per verificare l'eventuale presenza di variazioni genetiche nel gene del TSHR.

La prevalenza della condizione di sovrappeso ed obesità nella nostra popolazione era simile a quella riportata in letteratura nei bambini italiani sani in età scolastica (25). Nei pazienti da noi analizzati i livelli di TSH erano significativamente più elevati nei soggetti sovrappeso oppure obesi rispetto a quelli normopeso. Questi dati sono confermati da studi disponibili in letteratura (26,27). Diversi meccanismi che possono spiegare l'innalzamento dei livelli di TSH nell'obesità sono stati ipotizzati; questi includono l'aumento della produzione di pro-TRH leptina-mediato (28), un feedback alterato dovuto a un minor numero di recettori T3 nell'ipotalamo (29) oppure una diminuzione nell'attività periferica della deiodinasi (30).

La scoperta che i livelli di TSH sono più elevati nell'obesità e che la successiva perdita di peso porta a una diminuzione di questi valori, supporta l'ipotesi che l'aumento di TSH sia un fenomeno reversibile e sia una conseguenza piuttosto che una causa dell'obesità (26).

Nella nostra serie di pazienti è stata trovata una prevalenza di basse stature idiopatiche superiore a quella normalmente riportata in età pediatrica (31). Molto probabilmente ciò può essere dovuto ad un bias di selezione visto che tutti i pazienti da noi analizzati sono stati reclutati da unità di Endocrinologia italiane dove i bambini afferiscono spesso per difetti di crescita. Nonostante ciò non è stata trovata alcuna associazione tra la presenza di bassa statura idiopatica e l'aumento dei valori di TSH.

La relazione tra insufficienza tiroidea e crescita è ancora oggetto di controversie: mentre l'ipotiroidismo conclamato è noto essere una delle potenziali cause di bassa statura nel bambino, solo alcuni studi preliminari hanno investigato l'effetto dell'ipotiroidismo subclinico sulla crescita, mostrando comunque un incremento della velocità di crescita nei bambini in terapia con L-tiroxina (32).

Nel 18% dei nostri pazienti la tiroide presentava un dimensione alterata. La presenza di una tiroide di dimensione maggiore alla norma osservata in 8 pazienti potrebbe essere il risultato di un'iperplasia compensatoria secondaria all'aumento dei valori di TSH. Al contrario la riduzione di volume riscontrata in 8 pazienti potrebbe essere indice di moderata ipoplasia congenita, che comporta una ridotta produzione di ormoni tiroidei associata ad una stimolazione cronica di secrezione di TSH. Nessuna correlazione è stata però trovata suggerendo che le variazioni di volume non sono necessariamente associate all'aumento di TSH.

In 5 degli 8 pazienti con volume tiroideo aumentato era già riscontrabile il gozzo alla palpazione, anche se la percentuale di anomalie rilevabile con questo approccio diagnostico era piuttosto bassa (62,5%), suggerendo che questa tecnica non è attendibile per la diagnosi dell'ingrossamento tiroideo nel bambino.

L'analisi ultrasonografica ha mostrato che i livelli di TSH tendevano ad essere più elevati nei 20 pazienti con tiroide ipoecogena. L'associazione esistente tra ipoecogenicità e ipotiroidismo conclamato è ben nota; nell'ipotiroidismo subclinico è ipotizzabile che l'innalzamento dei valori di TSH potrebbe rappresentare un segno precoce di danno tiroideo (33). Oppure il pattern ultrasonografico irregolare osservato nei 20 pazienti potrebbe essere il risultato di tiroiditi sieronegative, dove l'alterazione ultrasonografica precede la generazione degli anticorpi anti-tiroide come riportato in studi precedenti (34,35).

Una possibile spiegazione dell'ipoecogenicità tiroidea osservata nel 32% dei nostri pazienti sovrappeso ed obesi potrebbe essere la presenza di un lieve grado di infiammazione caratteristico dell'obesità (36). Infatti nell'obesità il tessuto adiposo secreta citochine infiammatorie e alcune di queste, come TNF- α , IL-1 e IL-6, sono secrete in circolo associate a sintomi sistemici (37). È stato dimostrato che queste citochine riescono ad inibire l'espressione dell'mRNA del simporto sodio-iodio e l'uptake di iodio sia nell'uomo che nelle cellule tiroideali di ratto FRTL-5 (38), giocando un ruolo compensatorio nei livelli di TSH osservati nei soggetti obesi. Le citochine infiammatorie, comunque, possono indurre vasodilatazione e aumentare la permeabilità dei vasi tiroidei con conseguente essudazione del plasma e imbibizione del parenchima, fattori che possono spiegare la presenza di ipoecogenicità.

Il link tra ipotiroidismo subclinico e carenza iodica è ben noto. L'escrezione urinaria di iodio è considerata un indicatore dell'immissione di iodio: viene indicata come carenza iodica un valore giornaliero inferiore a 100 μg (39). Nella nostra casistica il valore era di 81 μg nei bambini con nessuna familiarità per patologie tiroidee, mentre era 120 μg nei bambini provenienti da famiglie affette da patologie tiroidee. Quindi una moderata deficienza di iodio è stata riscontrata nei soggetti con ipotiroidismo subclinico, soprattutto in assenza di un background genetico per patologie tiroidee, anche se l'esatto significato di questa associazione rimane da chiarire.

È stato ampiamente dimostrato da studi in letteratura che la presenza di mutazioni germinali di tipo "loss of function" nel gene del TSHR sono associabili alla resistenza al TSH e all'ipotiroidismo.

Queste mutazioni mostrano una trasmissione di tipo autosomico dominante, senza evidenze di penetranza incompleta ma con espressività variabile (19).

Tali mutazioni possono coinvolgere diversi loci nel gene del TSHR e interferiscono così con la normale funzionalità recettoriale (11).

E' stato ipotizzato che l'effetto inibitorio possa essere causato da un ridotto legame del recettore con l'ormone, probabilmente dovuto ad una ridotta espressione del recettore sulla superficie cellulare (21).

Nella nostra serie di pazienti sono state identificate 8 mutazioni non sinonime note: 6 mutazioni missenso, una inserzione e una delezione; tutte queste variazioni sono state trovate in condizione di eterozigosi e sono state dimostrate da studi in vitro come responsabili di una ridotta funzionalità recettoriale (40, 21,41,42).

Probabilmente la formazione di complessi tra le forme wild-type e mutate del recettore è responsabile della parziale resistenza al TSH nei pazienti eterozigoti (24).

La variante P27T localizzata nel dominio extracellulare e trovata in eterozigosi in un solo paziente, invece non esercita un ruolo funzionale sull'attività recettoriale, e quindi può essere considerata come un semplice polimorfismo (42).

In una paziente e nella madre è stata identificata una nuova mutazione, W520X, in condizione di eterozigosi che causa l'introduzione di un prematuro codone di stop. L'effetto di questa nuova mutazione sul signaling recettoriale sarà oggetto di successivi studi funzionali; è comunque ipotizzabile una diminuita attività recettoriale in quanto l'introduzione di un codone di stop nell'esone 10 causa una precoce interruzione nella sequenza del TSHR a livello della regione transmembrana. Ci attendiamo che tale mutazione porti ad una ridotta espressione del recettore in membrana oppure ad un minore legame alle proteine G e quindi ridotta produzione di secondi messaggeri come cAMP e inositolo fosfato.

Nel gene del TSHR sono stati inoltre identificati molti polimorfismi di singolo nucleotide (SNPs); 8 polimorfismi noti erano presenti anche nel nostro gruppo di pazienti e le frequenze osservate erano del tutto sovrapponibili a quelle riportate in letteratura (43,44).

Tuttavia per alcuni pazienti non è stata trovata nessuna chiara spiegazione degli elevati valori di TSH osservati. E' ipotizzabile che tali livelli di TSH possano essere influenzati da mutazioni o polimorfismi in altri geni non ancora presi in considerazione nel nostro laboratorio.

Potrebbe essere interessante effettuare la ricerca di mutazioni nei fattori di trascrizione tiroidei come TITF-1, PAX-8 e FOXE1, tutti coinvolti nell'espressione del TSHR (45).

Mutazioni che possono influenzare i livelli di TSH possono essere inoltre localizzate nel gene chiamato PDE-8B, il quale codifica per una fosfodiesterasi ad alta affinità per il cAMP coinvolta nel signaling cellulare del TSHR (46).

L'eventuale analisi molecolare di questi geni nei nostri soggetti con causa ignota di ipotiroidismo subclinico potrebbe spiegare i loro elevati livelli di TSH.

Prospettiva futura dello studio sarà la trasfezione in una linea cellulare del vettore pSVL contenente il cDNA del TSHR con introdotta la mutazione W520X; successivamente verranno valutati gli effetti sull'espressione del recettore sulla membrana cellulare tramite microscopia confocale; in un secondo tempo andremo inoltre a misurare gli effetti della mutazione sulla trasduzione del segnale, cioè a misurare i livelli dei secondi messaggeri prodotti come cAMP e inositolo fosfato.

Bibliografia

1. Kopp P. (2001) The TSH receptor and its role in thyroid disease. *Cell Mol Life Sci* **58**:1301-1322.
2. Setian N. (2007) Hypothyroidism in children: diagnosis and treatment. *J Pediatr* **83**: S209-216.
3. Cooper DS. (2001) Clinical practice. Subclinical hypothyroidism. *N Engl J Med* **345**:260-265.
4. Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G, Ridgway EC. (2000) The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch Intern Med* **160**:526-534.
5. Paoli-Valeri M, Maman-Alvarado D, Jiménez-Lopez V, Arias-Ferreira A, Bianchi G, Arata-Bellabarba G. (2003) Frequency of subclinical hypothyroidism among healthy children and those with neurological conditions in the state of Mérida, Venezuela. *Invest Clin* **44**:209-218.
6. Wu T, Flowers JW, Tudiver F, Wilson JL, Punyasavatsut N. (2006) Subclinical thyroid disorders and cognitive performance among adolescents in the United States. *BMC Pediatr* **6**:12.
7. Aijaz NJ, Flaherty EM, Preston T, Bracken SS, Lane AH, Wilson TA. (2006) Neurocognitive function in children with compensated hypothyroidism: lack of short term effects on or off thyroxin. *BMC Endocr Disord* **6**:2.
8. Arrigo T, Wasniewska M, Crisafulli G, Lombardo F, Messina MF, Rulli I, Salzano G, Valenzise M, Zirilli G, De Luca F. (2008) Subclinical hypothyroidism: the state of the art. *J Endocrinol Invest* **31**:79-84.
9. Vassart, G. & Dumont, J.E. (1992) The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev* **13**:596-611.
10. Davies TF, Ando T, Lin RY, Tomer Y, Latif R. (2005) Thyrotropin receptor-associated diseases: from adenomata to Graves disease. *J Clin Invest* **115**(8):1972-83.
11. Duprez L, Parma J, Van Sande J, Rodien P, Dumont JE, Vassart G, Abramowicz M. (1998) TSH receptor mutations and thyroid disease. *Trends Endocrinol Metab* **9**:133-140.
12. Davies T, Marians R, Latif R. (2002) The TSH receptor reveals itself. *J Clin Invest* **110**:161-164
13. Kursawe R, Paschke R. (2007) Modulation of TSHR signaling by posttranslational modifications. *Trends Endocrinol Metab* **18**:199-207
14. Dutton CM, Joba W, Spitzweg C, Heufelder AE, Bahn RS. (1997) Thyrotropin receptor expression in adrenal, kidney and thymus. *Thyroid* **7**(6):879-884.

15. Sellitti DF, Akamizu T, Doi SQ, Kim GH, Kariyil JT, Kopchik JJ, Koshiyama H. (2000) Renal expression of two 'thyroid-specific' genes: thyrotropin receptor and thyroglobulin. *Exp Nephrol* **8**(4-5):235-243.
16. Akamizu T, Ikuyama S, Saji M, Kosugi S, Kozac C, McBride OW, Kohn LD. (1990) Cloning, chromosomal assignment and regulation of the rat thyrotropin receptor: expression of the gene is regulated by thyrotropin, agents that increase cAMP levels, and thyroid autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:5677-5681.
17. Allgeier A, Offermanns S, Van Sande J, Spicher K, Schultz G, Dumont JE. (1994) The human thyrotropin receptor activates G-proteins Gs and Gq/11. *J Biol Chem* **269**(19):13733-13735.
18. Thomsen W, Frazer J, Unett D. (2005) Functional assays for screening GPCR targets. *Curr Opin Biotechnol* **16**:655-665.
19. Grasberger H, Mimouni-Bloch A, Vantuyghem MC, van Vliet G, Abramowicz M, Metzger DL, Abdullatif H, Rydlewski C, Macchia PE, Scherberg NH, van Sande J, Mimouni M, Weiss RE, Vassart G, Refetoff S. (2005) Autosomal dominant resistance to thyrotropin as a distinct entity in five multigenerational kindreds: clinical characterization and exclusion of candidate loci. *J Clin Endocrinol Metab* **90**:4025-4034.
20. Wadsworth, H.L, Chazenbalk GD, Nagayama Y, Russo D, Rapoport B. (1990) An insertion in the human thyrotropin receptor critical for high affinity hormone binding. *Science* **249**:1423-1425.
21. Clifton-Bligh RJ, Gregory JW, Ludgate M, John R, Persani L, Asteria C, Beck-Peccoz P, Chatterjee VK. (1997) Two novel mutations in the thyrotropin (TSH) receptor gene in a child with resistance to TSH. *J Clin Endocrinol Metab.* **82**(4):1094-1100.
22. de Roux N, Misrahi M, Brauner R, Houang M, Carel JC, Granier M, Le Bouc Y, Ghinea N, Boumedienne A, Toublanc JE, Milgrom E. (1996) Four families with loss of function mutations of the thyrotropin receptor. *J Clin Endocrinol Metab* **81**(12):4229-4235.
23. Jordan N, Williams N, Gregory JW, Evans C, Owen M, Ludgate M. (2003) The W546X mutation of the thyrotropin receptor gene: potential major contributor to thyroid dysfunction in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab* **88**(3):1002-1005.
24. Calebiro D, de Filippis T, Lucchi S, Covino C, Panigone S, Beck-Peccoz P, Dunlap D, Persani L. (2005) Intracellular entrapment of wild-type TSH receptor by oligomerization with mutants linked to dominant TSH resistance. *Hum Mol Genet* **14**:2991-3002.
25. Maffeis C, Banzato C, Talamini G, Obesity Study Group of the Italian Society of Pediatric Endocrinology and Diabetology. (2008) Waist-to-height ratio, a useful index to identify high metabolic risk in overweight children. *J Pediatr* **152**:207-213.
26. Reinehr T, de Sousa G, Andler W. (2006) Hyperthyrotropinemia in obese children is reversible after weight loss and is not related to lipids. *J Clin Endocrinol Metab* **91**:3088-3089.

27. Radetti G, Kleon W, Buzi F, Crivellaro C, Pappalardo L, di Iorgi N, Maghnie M. (2008) Thyroid Function and Structure Are Affected in Childhood Obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **93**:4749-4754.
28. Nillni EA, Vaslet C, Harris M, Hollenberg A, Bjorbak C, Flier JS. (2000) Leptin regulates prothyrotropin-releasing hormone biosynthesis. Evidence for direct and indirect pathways. *J Biol Chem* **275**:36124-36133.
29. Burman KD, Latham KR, Djuh YY, Smallridge RC, Tseng YC, Lukes YG, Maunder R, Wartofsky L. (1980) Solubilized nuclear thyroid hormone receptors in circulating human mononuclear cells. *J Clin Endocrinol Metab* **51**:106-116.
30. Krotkiewski M. (2002) Thyroid hormones in the pathogenesis and treatment of obesity. *Eur J Pharmacol* **440**:85-98.
31. Wit JM, Clayton PE, Rogol AD, Savage MO, Saenger PH, Cohen P. (2008) Idiopathic short stature: definition, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Growth Horm IGF Res* **18**:89-110.
32. Cetinkaya E, Aslan A, Vidinlisan S, Ocal G. (2003) Height improvement by L-thyroxine treatment in subclinical hypothyroidism. *Pediatr Int* **45**:534-537.
33. Loy M, Cianchetti ME, Cardia F, Melis A, Boi F, Mariotti S. (2004) Correlation of computerized grey-scale sonographic findings with thyroid function and thyroid autoimmune activity in patients with Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Ultrasound* **32**:136-140.
34. Rago T, Chiovato L, Grasso L, Pinchera A, Vitti P. (2001) Thyroid ultrasonography as a tool for detecting thyroid autoimmune diseases and predicting thyroid dysfunction in apparently healthy subjects. *J Endocrinol Invest* **24**:763-769.
35. Vejbjerg P, Knudsen N, Perrild H, Laurberg P, Pedersen IB, Rasmussen LB, Ovesen L, Jorgensen T. (2006) The association between hypoechoogenicity or irregular echo pattern at thyroid ultrasonography and thyroid function in the general population. *Eur J Endocrinol* **155**:547-552.
36. Kershaw EE, Flier JS. (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* **89**:2548-2556.
37. Chrousos GP. (1995) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* **332**:1351-1362.
38. Pekari AE, Hersham JM. (1998) Tumor necrosis factor, ceramide, transforming growth factor-beta1, and aging reduce Na⁺/I⁻ symporter messenger ribonucleic acid levels in FRTL-5 cells. *Endocrinol* **139**:703-712.
39. World Health Organization, UNICEF, ICCIDD. (2008) Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring their elimination. A guide for programme managers. http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/iodine_deficiency/9789241595827/en/index.html

40. Tonacchera M, Di Cosmo C, De Marco G, Agretti P, Banco M, Perri A, Gianetti E, Montanelli L, Vitti P, Pinchera A. (2007) Identification of TSH receptor mutations in three families with resistance to TSH. *Clin Endocrinol (Oxf)* **67**:712-718.
41. Camilot M, Teofoli F, Gandini A, Franceschi R, Rapa A, Corrias A, Bona G, Radetti G, Tatò L. (2005) Thyrotropin receptor gene mutations and TSH resistance: variable expressivity in the heterozygotes. *Clin Endocrinol (Oxf)* **63**: 146-151.
42. De Marco G, Agretti P, Camilot M, Teofoli F, Tatò L, Vitti P, Pinchera A, Tonacchera M. (2009) Functional studies of new thyrotropin receptor (TSHr) mutations identified in patients affected by hypothyroidism or isolated hyperthyrotropinaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)* **70**:335-338.
43. Teofoli F, Camilot M, Tatò L. (2007) Lack of association between thyrotropin receptor gene polymorphisms and subclinical hypothyroidism in children. *J Endocrinol Invest* **30**:163-166.
44. Esperante SA, Rivolta CM, Caputo M, González-Sarmiento R, Targovnik HM. (2008) Identification and characterization of new variants of three associated SNPs and a microsatellite in the TSH receptor gene which are useful for genetic studies. *Mol Cell Probes* **22**:281-286.
45. Nagasaki K, Narumi S, Asami T, Kikuchi T, Hasegawa T, Uchiyama M. (2008) Mutation of a gene for thyroid transcription factor-1 (TITF1) in a patient with clinical features of resistance to thyrotropin. *Endocr J* **55**:875-878.
46. Arnaud-Lopez L, Usala G, Ceresini G, Mitchell BD, Pilia MG, Piras MG, Sestu N, Maschio A, Busonero F, Albai G, Dei M, Lai S, Mulas A, Crisponi L, Tanaka T, Bandinelli S, Guralnik JM, Loi A, Balaci L, Sole G, Prinzi A, Mariotti S, Shuldiner AR, Cao A, Schlessinger D, Uda M, Abecasis GR, Nagaraja R, Sanna S, Naitza S. (2008) Phosphodiesterase 8B gene variants are associated with serum TSH levels and thyroid function. *Am J Hum Genet* **82**:1270-1280.

SEZIONE 2

Attività formativa

Corsi frequentati:

Journal Club in lingua inglese –Prof.ssa Mara Giordano

Partecipazione a seminari interni al Dipartimento di Scienze Mediche:

Production of bio-farmaceuticals in plants.

Prof. L. Santi 5 dicembre 08

Le cellule Mesenchimali Staminali per il trattamento delle malattie neurologiche.

Prof. A. Uccelli 12 dicembre 08

La malattia celiaca

Prof. R. Troncone 09 gennaio 09

Porpora trombocitopenica autoimmune: nuovi orientamenti fisiopatologici e terapeutici.

Prof. F. Zaja 13 gennaio 09

Interazioni geni-ambiente nella eziologia della sclerosi multipla: studi sui gemelli.

Prof. M. Salvetti 27 gennaio 09

Non solo motoneuroni: il contributo del muscolo scheletrico alla patogenesi della sclerosi laterale amiotrofica.

Prof. A. Musarò 10 febbraio 09

When a fine tuner of signaling pathways becomes a dangerous amplifier: the case of the Proliferation-inducible kinase Pin1 in cancer.

Prof. G. Del Sal 20 febbraio 09

Il metabolismo degli endocannabinoidi e la sua rilevanza terapeutica.

Prof. M. Maccarone 26 febbraio 09

La proteomica: un nuovo modo di guardare al mondo delle proteine.

Prof. P. Pucci 18 marzo 09

Le nanotecnologie applicate alla medicina.

Prof. G. Peluso 19 marzo 09

I bioreattori nella Medicina Rigenerativa: dalla ricerca alla realtà di una start-up.

Dott.ssa S. Mantero 09 aprile 09

Patologia dei tumori cerebrali. Recenti acquisizioni in tema di diagnosi e prognosi.

Prof. D. Schiffer 22 aprile 09

Polarized inflammation in tumor development.
Prof. A. Sica 30 aprile 09

Effetti anti-steatogeni ed anti-tumorali degli agonisti del recettore dell'ormone tiroideo.
Prof. A. Columbano 05 maggio 09

Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: design of stimuli-responsive nanomaterials for cancer diagnosis and therapy.
Dott.ssa B. Palazzo 06 maggio 09

Transfection Technologies: Mechanism and Optimization.
Prof. B. Gopalakrishnan 11 maggio 09 (Discaff)

Ipercolesterolemia e progressione di malattia in patologia umana.
Prof. G. Poli 12 maggio 09

Neurotossicità delle proteine "misfolded" nelle malattie del motoneurone.
Prof. A. Poletti 12 maggio 09

Functional Genomics of Brain.
Prof. S. Gustincich 14 maggio 09

Congressi frequentati (elenco completo: denominazione congresso, sede e data):

02/10/09 *Le obesità genetiche: dalla fisiopatologia alla clinica*
Istituto Auxologico Italiano Villa Caramora- Verbania

09/10/09 *Trattamento con IGF-1 ricombinante: aspetti fisiopatologici e clinici*
Istituto Auxologico Italiano Villa Caramora- Verbania

Comunicazioni a congressi:

A) comunicazioni presentate personalmente (orali o poster)

B) Altre comunicazioni

Poster: Riccomagno S, Moia S, Bellona S, Petri A, Vivenza D, Godi M, Prodam F, Corneli G, Valenzise M, Giordano M, Momigliano-Richiardi P, Bona G. *“Role of SOCS2 in regulating GH signaling: screening of variations associated with idiopathic short stature, preliminary data”*.
47th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) Istanbul, Turkey, September 20-23 2008

Poster: Riccomagno S, Moia S, Bellone S, Petri A, Trovato L, Prodam F, Walker GE, Salerno M, Valenzise M, Bona G. *“Molecular analysis of GH-R gene in children with idiopathic short stature and partial GH insensitivity”*.
91st Annual Meeting of the Endocrine Society (ENDO) Washington DC, June 10-13 2009

Articoli scientifici pubblicati nel corso del dottorato:

Rapa A, Monzani A, **Moia S**, Vivenza D, Bellone S, Petri A, Teofoli F, Cassio A, Cesaretti G, Corrias A, de Sanctis V, Di Maio S, Volta C, Wasniewska M, Tatò L, Bona G. (2009) Subclinical Hypothyroidism in Children and Adolescent: A Wide Range of Clinical, Biochemical and Genetic Factors Involved. *J Clin Endocrinol Metab* **94**(7):2414-2420.