

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
SECRETARIA DE SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA HUMANA

**.ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN *PAX8* EN PACIENTES MEXICANOS CON  
DIAGNÓSTICO DE HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO POR DISGENESIA TIROIDEA.**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA:  
**DRA. PAOLA MOYERS PÉREZ**

ASESOR DE TESIS:  
**DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA**

MÉXICO, 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

DR. JOSÉ N. REYNÉS MANZUR  
DIRECTOR DE ENSEÑANZA

---

DRA. MIRELLA VÁZQUEZ RIVERA  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO

---

DRA. VICTORIA DEL CASTILLO RUIZ  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA HUMANA  
PROFESOR TITULAR DE GENÉTICA MÉDICA

---

DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA  
ASESOR DE TESIS  
INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS D  
ADSCRITO AL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA HUMANA

### A José

Por todo, por ser mi complemento, mi apoyo y mi sustento. Por compartir tu vida y tus sueños. Eres la más grande razón.

### A mis padres

Por su apoyo, dedicación, confianza y amor eterno e incondicional. Son el mejor ejemplo a seguir, gracias a ustedes soy quien soy. Papi siempre en mi mente y mi corazón, la luz que me guía. Mami siempre a mi lado, sin ti no podría.

### A mis hermanos

Por su infinita confianza, por escuchar, por sentirse orgullosos...gracias. Karlita eres la mejor amiga que podría pedir, siempre juntas.

### A mis sobrinos

Gracias por hacerme ver que me encanta ser tía, su tía...los amo.

### A Xóchitl

Por su cariño y apoyo desde el primer día. Gracias a usted tengo lo mejor de mi vida.

### A mis amigas

Gracias a ustedes cuatro estos años fueron mucho mejores, las quiero siempre.

### A mis maestros

Gracias por su paciencia, dedicación y empeño, gracias por su tiempo para hacer de mí un mejor médico. Gracias por convertirse en mis amigos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Ariadna González del Angel por su incansable apoyo y empeño para hacer de nosotros mejores profesionistas, por su dedicación y su tiempo, por siempre estar dispuesta, muchas gracias!

Al Dr. Miguel Angel Alcántara por su ejemplo, por su inspiración para siempre hacer las cosas bien.

A Víctor Martínez, porque sin su ayuda no hubiera podido concluir este trabajo.

A la Dra. Victoria del Castillo por todas sus enseñanzas, siempre recordaré que en nuestra profesión ser un buen clínico es insustituible.

A la M. en C. Luz María Torres Espíndola y al Pasante de Químico Mario Díaz Morales por su participación en este trabajo.

## ÍNDICE

I. MARCO TEÓRICO	6
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
III. JUSTIFICACIÓN	26
IV. OBJETIVOS	26
V. MATERIAL Y MÉTODOS	27
VI. TAMAÑO DE LA MUESTRA	32
VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
VIII. CONSIDERACIONES ÉTICAS	32
IX. RESULTADOS	32
X. DISCUSIÓN	42
XI. HOJA DE CAPTACIÓN DE DATOS	45
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

## **I. MARCO TEÓRICO**

La prevalencia mundial del Hipotiroidismo Congénito (HC) es de 2 a 3 casos por cada 10 000 recién nacidos vivos (1:2500 a 1:3000) (Toublanc JE, 1992 y Klett, M. 1997), sin embargo se han descrito variaciones en la frecuencia tanto geográficas como poblacionales. Algunos autores sostienen que en EUA, en la población de origen hispano se llegan a presentar hasta 5.28 casos por cada 10 000 recién nacidos vivos (1:1894) (Brown AL, y cols 1981, Frasier SD y cols 1982). También se ha determinado la frecuencia por sexo y se ha encontrado una predominancia en el sexo femenino con una relación 2:1, la que se incrementa en hispanos residentes de EUA a 3:1 (Núñez, O. 2003). En México, el Instituto Nacional de Pediatría (INP) es un centro de referencia para el diagnóstico y atención del hipotiroidismo congénito, que cuenta con una experiencia de casi 7 millones de niños tamizados para la detección de dicha enfermedad.

En nuestro país, se ha reportado una elevada prevalencia al nacimiento de HC; existen datos que señalan que esta condición llega a ocurrir hasta en 1 de cada 1,000 recién nacidos vivos (Vela, M y cols 2004). En el INP, tan sólo en el año 2006 se confirmaron cerca de 150 casos de los cuales el 53% fueron disgenesias tiroideas (ectopia y agenesia glandulares).

La explicación de la mayor ocurrencia de este defecto entre nuestra población no se conoce, sin embargo se ha propuesto la intervención de factores ambientales (como la relación bocio-deficiencia de yodo) y factores genéticos (como los factores de transcripción que intervienen en la organogénesis de la tiroides).

## **ASPECTOS MORFOLÓGICOS Y DESARROLLO EMBRINARIO DE LA GLÁNDULA TIROIDES**

La glándula tiroides es la única fuente productora de hormonas tiroideas las cuales son esenciales para el crecimiento, desarrollo y homeostasis metabólica. Además, estas hormonas tiroideas tienen una especial importancia para el desarrollo del sistema nervioso central durante el periodo pre y postnatal. Para lograr lo anterior, se requiere el desarrollo normal de la glándula tiroides, así como su adecuado funcionamiento para la síntesis, almacenamiento y secreción de hormonas tiroideas a través de una secuencia precisa y ordenada de eventos bioquímicos perfectamente regulados, un adecuado aporte de yodo, además de la presencia y función de factores de transcripción tales como PAX8 (Sura, S. 2004; De Vijlder, J. 2003; Gillam, M. 2001).

La glándula tiroidea, es una glándula endocrina, por lo cual, las hormonas que forma pasan directamente al torrente sanguíneo (Solis, J. 2006). El desarrollo de esta glándula inicia desde la 3ª semana de gestación, siendo el primer tejido endócrino glandular que aparece en el desarrollo embrionario del ser humano; durante su formación participan diferentes factores de transcripción como PAX8 (De Felice, M. 2004). La glándula tiroidea produce hormonas tiroideas y calcitonina a través de dos tipos celulares distintos; las células foliculares tiroideas (TFCs) y las parafoliculares ó células C respectivamente. La mayor población celular en la glándula son las TFCs, estas células forman los folículos tiroideos, estructuras esféricas que sirven como almacenamiento y para la liberación controlada de hormonas tiroideas. Las células C se encuentran localizadas en el espacio interfolicular, en su mayoría en una posición parafolicular. (Van Vliet, G, 2003; De Felice, M 2004). Estos dos tipos celulares se originan a partir de estructuras embriológicas distintas.

Las TFCs se originan a partir de un primordio celular endodérmico localizado en la línea media en el piso de la faringe primitiva, entre el primer y segundo arcos branquiales. Este primordio aparece entre el día 20 y 22 del desarrollo embrionario humano y está formado por un grupo de células homogéneas que seguirán una serie de pasos bien determinados para alcanzar el fenotipo de TFCs, a este proceso se le conoce como “especificación celular”, ya que como consecuencia de éste, estas células sufrirán cambios morfológicos y bioquímicos para diferenciarse de las células vecinas y así, especificarse como células tiroideas. Las células C se originan a partir de los cuerpos ultimobranquiales, par de estructuras embrionarias transicionales derivadas de la cuarta bolsa faríngea. Tanto las células del primordio tiroideo como las de los cuerpos ultimobranquiales migran; el primordio se invagina y da lugar al divertículo tiroideo el cual, conforme el embrión y la lengua crecen, desciende a través del cuello. A medida que el divertículo desciende se mantiene comunicado con la base de la lengua a través del conducto tirogloso (Mísero, C. 1998).

A las 7 semanas de gestación, el divertículo tiroideo alcanza su ubicación definitiva en la parte anterior del cuello. Este desplazamiento caudal se acompaña por una rápida elongación del conducto tirogloso, el cual eventualmente se fragmenta y degenera. El rudimento tiroideo se fusiona con las células de los cuerpos ultimobranquiales y ambas estructuras desaparecen como estructuras individuales para formar la glándula tiroidea. Después de la fusión, la glándula comienza a expandirse de forma lateral, lo cual conduce a la formación de su estructura bilobulada. Una vez que se encuentra en su posición

definitiva, se inicia la captura de yodo y la síntesis de hormonas tiroideas, aproximadamente a la semana 10 de gestación. (De Felice, M 2004). Dependiendo del estado funcional de la glándula y del aporte de yodo en la dieta, el coloide tiroideo suele ser el mayor depósito en el organismo de las hormonas tiroxina o T4 y triyodotironina o T3 (Solis, J. 2006). (Tabla 1)

**Tabla 1. Eventos relevantes durante la embriogénesis tiroidea**

Estadio de morfogénesis	Día embrionario
Primordio tiroideo aparece	20 – 22
Divertículo tiroideo inicia migración	24
Conducto tirogloso desaparece	30 – 40
Migración tiroidea se completa	45 – 50
Fusión con cuerpo ultimobranquial	60
Inicia foliculogénesis	70

## **FUNCIONAMIENTO DE LA GLÁNDULA TIROIDES**

La tiroides secreta dos hormonas, la tiroxina o T4 y la triyodotironina o T3. T4 tiene 4 moléculas de yodo, mientras que T3 sólo consta de 3. Las hormonas tiroideas son fundamentales en la embriogénesis y maduración fetal, particularmente en el crecimiento y desarrollo del sistema nervioso (Kopp, P. 2002). Regulan la síntesis de proteínas que participan en la neurogénesis, migración neuronal, formación de axones y dendritas, mielinización, estructuración de sinapsis y regulación de neurotransmisores específicos. La organización neuronal y la mielinización se extienden a la vida postnatal, de modo que las hormonas tiroideas son críticas para las funciones cognitivas, desde el segundo trimestre de gestación hasta los primeros años de vida (Van Vliet, G. 2003).

El yodo, indispensable para la formación de las hormonas tiroideas, se obtiene de la dieta como yoduro, en el intestino se reduce a yodo iónico y de esta forma se absorbe rápidamente. El yodo que ingresa en el organismo es atrapado de forma muy eficaz por la tiroides, por lo que a este mecanismo de captación se le llama "trampa del yodo". (De Vijlder, J. 2003).

## **CLASIFICACIÓN DEL HIPOTIROIDISMO CONGENITO**

### **HIPOTIROIDISMO CONGENITO PRIMARIO Ó ESPORADICO**

El HC es un defecto al nacimiento que puede ocurrir por diversas causas. De acuerdo al sitio anatómico en el cual reside el déficit funcional el hipotiroidismo congénito se ha clasificado en primario (déficit tiroideo), secundario (falla hipofisiaria) o terciario o central por alteración hipotalámica.

El 95% de los hipotiroidismos congénitos son primarios y de ellos el 85-90% corresponden a disgenesias, es decir alteraciones en la organogénesis de la glándula tiroides. Estas disgenesias tiroideas en su mayoría son esporádicas y sólo cerca del 2% son familiares. Estudios realizados en ratones knockout y en gemelos monocigotos discordantes para disgenesia tiroidea, sugieren que mecanismos epigenéticos que llevan a variaciones estocásticas en la expresión de múltiples loci pueden ser los responsables del carácter esporádico de las disgenesias tiroideas (Esperante, S. 2008). Por razones aún no conocidas la frecuencia de estas alteraciones es mayor en mujeres que en varones (2-3:1) (Lorey, F. 1992). Las disgenesias tiroideas pueden subdividirse en tres grupos:

- 1) Tiroides ectópica (usualmente pequeña y sublingual) - 30-45%
- 2) Agenesia - 35-40%
- 3) Hipoplasia - 5%

El 10-15% restante corresponde a dishormonogénesis, producida por algún error en el proceso de síntesis de las hormonas tiroideas y en las que se ha descrito una incidencia de 1 en 30,000 recién nacidos. Se han identificado mutaciones en los genes que codifican a la peroxidasa tiroidea (*TPO*), a la tiroglobulina (*TG*), simportador yodo-sodio (*NIS*), a la pendrina (*PDS*) y a la oxidasa tiroidea 2 (*THOX2*), con herencia autosómica recesiva, asociadas a un espectro clínico muy amplio en este tipo de HC (Grüters, A. 2003; Esperante, S. 2008), sin embargo, también se puede originar por deficiencia de yodo, ó estar asociado a otras enfermedades (síndrome de Down o Edwards, Pierre-Robin, etc.) (Gillam, M., Kopp, P. 2001)

### **HIPOTIROIDISMO CONGENITO SECUNDARIO Y TERCARIO**

Representan el 5% de los hipotiroidismos congénitos; su incidencia es de 1:50,000 a 1:150,000 recién nacidos. Corresponden a déficit aislados del factor hipotalámico liberador de tirotrópina (TRH) o de la hormona estimuladora de la tiroides (TSH), pero también pueden estar asociados a otras deficiencias hipofisiarias (Hormona del crecimiento (GH), hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona foliculoestimulante

(FSH), hormona luteinizante (LH)); estos últimos casos, además de los síntomas propios del hipotiroidismo, presentan manifestaciones clínicas correspondientes a las otras deficiencias hormonales como hipoglicemia, micropene o testículos no descendidos, ictericia prolongada, habitualmente colestásica, defectos de línea media, etc. Estas formas de HC se pueden presentar tanto en forma esporádica como familiar. Estos pacientes no son detectados en los programas de tamizaje de hipotiroidismo neonatal que utilizan TSH, puesto que esta tropina está baja o inapropiadamente normal frente a T4 total y libre bajas. Es importante determinar T4 libre, para diferenciarlo del déficit de la globulina fijadora de tiroxina (TBG), casos en donde T4 total está baja, pero la T4 libre es normal. En los hipotiroidismos secundarios o terciarios siempre se debe descartar un déficit de ACTH antes de tratar con T4 (Toublanc, J. 1992).

### **CUADRO CLÍNICO ASOCIADO A HC**

El cuadro clínico de los pacientes con HC es variable, depende del momento del diagnóstico y del inicio del tratamiento, estas manifestaciones están asociadas a una inmadurez generalizada de órganos y sistemas con un metabolismo disminuido como resultado de ausencia de hormonas tiroideas. Los signos y síntomas más comunes del HC no tratado o cretinismo son: macroglosia con protrusión lingual, mixedema facial, frente estrecha, puente nasal plano, hernia umbilical, retraso en el crecimiento y desarrollo, retraso en la maduración ósea, falta de cierre de fontanelas en especial la posterior, piel fría y seca, cabello áspero, grueso, de escaso brillo. Existen alteraciones funcionales como respiración ruidosa y voz ronca, pobre succión o hiporexia, ictericia prolongada y estreñimiento. Se observa letargia, mirada indiferente, lentitud en los movimientos y retraso psicomotor o mental (Letarte, J. 1989). Los datos clínicos de los pacientes con HC neonatal en población mexicana de acuerdo a lo observado por Vela, M. y cols 2004; son fontanela anterior amplia, fontanela posterior amplia, facies tosca, edema palpebral, macroglosia, alteraciones de la deglución, llanto ronco, hernia umbilical, estreñimiento, ictericia, piel seca, hipotermia, somnolencia, hipoactividad e hipotonía. Sin embargo, estas manifestaciones clínicas tardan algún tiempo en aparecer, por lo que los pacientes con HC identificados por estos datos clínicos se considera que se están diagnosticando de forma tardía en su infancia, cuando ya han sufrido daño cerebral extenso (Rovet, J. 2002, Setian, N. 2007).

En recién nacidos es difícil diagnosticarlo por la clínica, debido a que se ha observado que sólo el 5% de los neonatos atirósicos presentan sintomatología (Letarte, J. 1989). Acorde

con lo anterior, en un estudio Danés se encontró que sólo un 10% de los niños afectados fue diagnosticado clínicamente durante el primer mes de vida, un 35% a los 3 meses de vida, un 70% al año de vida y el resto hasta los 3 o 4 años de vida (Pezzuti, I. 2009).

Hace algunos años el HC era la causa principal de retraso mental en niños, debido a que, como ya se mencionó, las hormonas tiroideas son esenciales para el desarrollo neurológico, además de que cada región cerebral requiere de hormonas tiroideas en diferentes y específicas etapas pre o postnatalmente, por ello, los niños con HC sufren grados variables de daño neurológico dependiendo del momento y el tiempo durante el cual estuvieron sin hormonas tiroideas; por lo general, los paciente con HC, presentan daño más extenso, mientras más prolongado es el periodo sin reemplazo hormonal.

Desde la implementación de programas de tamizaje a nivel mundial para la detección temprana del HC, generalmente el tratamiento sustitutivo se inicia antes de que exista evidencia clínica de la ausencia de hormonas tiroideas; por lo que el retraso mental, antes asociado al HC prácticamente ha sido erradicado. Sin embargo, debido a que estos niños pasan un periodo breve pero circunscrito con insuficiencia de hormonas tiroideas, aún se encuentran en riesgo de presentar alteraciones selectivas del neurodesarrollo. (Rovet, J. 2002).

Un meta-análisis realizado en 1996 por Derksen-Lubsen y Verkerk, reportó que existe evidencia que demuestra que los pacientes con HC tratados tempranamente, presentan un coeficiente intelectual (CI) dentro de parámetros normales, pero 6 puntos por debajo de los grupos control. Adicionalmente, estos pacientes presentan déficit en el área visoespacial, motora, de lenguaje, memoria y atención. (Rovet, J. 2002, Conelly, 2001, Bargagna, 2000, Kooistra 1994). En el aspecto escolar pueden presentar menor aprovechamiento y mayor riesgo de desarrollar problemas de aprendizaje particularmente en matemáticas. También se describe que hasta el 20% presenta hipoacusia neurosensorial leve, con una dificultad mayor para la adquisición de lenguaje. (Rovet, J. 2002).

Dentro de los pacientes con HC tratados de forma temprana, existe una gran variabilidad en el tipo y severidad del déficit que pueden presentar. Esta variabilidad parece estar directamente relacionada a factores asociados con la patología, como: etiología, severidad y momento de inicio del hipotiroidismo (pre o postnatal), así como a factores asociados con el tratamiento como: inicio de tratamiento, dosis de inicio y mantenimiento y tiempo que tardan los niveles hormonales en alcanzar los rangos normales (Rovet, J. 2002).

Las principales áreas afectadas en estos pacientes son:

1) Visoespacial – Existen estudios que demuestran que las hormonas tiroideas están involucradas en el desarrollo del tálamo y de los conos en retina. Esta área parece ser la más afectada, en especial en pacientes con atiroisis o con mayor severidad al momento del diagnóstico.

2) Memoria – El hipocampo, estructura necesaria para la integración de la memoria, requiere de hormonas tiroideas después del nacimiento, para un adecuado desarrollo y funcionamiento. En los pacientes con HC y tratamiento temprano, existe alteración en el índice global de memoria, pero la mayor alteración se presenta en la memoria a corto plazo, en especial en pacientes que tardaron mayor tiempo en alcanzar los niveles normales de hormonas tiroideas una vez iniciado el tratamiento.

3) Sensorimotora - El desarrollo de la corteza motora primaria, en el periodo postnatal, requiere de hormonas tiroideas, al igual que la producción de mielina necesaria para la conducción nerviosa. Es la segunda área más afectada, en especial el área de motricidad fina.

4) Atención – El desarrollo y mantenimiento de los sistemas de neurotransmisión, requieren de hormonas tiroideas. El déficit en esta área está relacionado con el nivel de hormonas tiroideas al momento de realizar los exámenes para valorar la atención. Los pacientes con menor atención tenían niveles bajos al momento de realizar estas evaluaciones. (Rovet, J. 2002).

Estudios recientes han demostrado que el HC está asociado con aumento de la prevalencia de malformaciones congénitas. Las malformaciones más frecuentes asociadas a HC son: malformaciones renales y urogenitales, en especial hidronefrosis, agenesia renal e hipospadias, así como alteraciones cardiovasculares, gastrointestinales y esqueléticas. Por lo anterior se sugiere que a todos los pacientes diagnosticados con HC se les evalúe en búsqueda de malformaciones asociadas, en particular del sistema renal (Kumar, J. 2009).

## **DETECCION DEL HIPOTIROIDISMO CONGENITO**

En la mitad de la década de los 70 se iniciaron programas piloto de tamizaje para detección de neonatos con HC, al demostrar su eficacia, estos programas se establecieron a nivel mundial y actualmente son rutinarios en los países occidentales. En el año 2003, aproximadamente 24 millones de neonatos fueron tamizados en todo el mundo y entre 6000 y 8000 casos fueron positivos para HC (Rovet, J. 2003).

En México desde 1988 se han implementado programas de tamizaje de hipotiroidismo congénito cuyo objetivo fundamental es la detección oportuna de esta entidad y de esta forma iniciar la terapia sustitutiva con hormona tiroidea lo antes posible, a fin de evitar las manifestaciones clínicas y complicaciones, en especial el retraso mental y de esta manera también disminuir los costos socioeconómicos propios de la rehabilitación (Vela, M. y cols. 2003).

El método ideal de tamizaje es la determinación de TSH en papel filtro, utilizado tanto en Europa y Japón como en la mayoría de los países Latinoamericanos. En EUA se realiza la determinación de T4 en papel filtro, si la concentración de ésta es baja, entonces se determinan los niveles de TSH, sin embargo de este modo pudieran no detectarse las ectopias tiroideas, las cuales inicialmente pueden presentarse con T4 normal y TSH elevada (Núñez, O. 2003).

En México la concentración de TSH se determina en sangre obtenida del talón del neonato, esta se deposita en una tarjeta de papel filtro especial (tarjeta de Guthrie) para la cuantificación posterior de TSH mediante el método de ELISA (Vela, M. y cols. 2004).

Para el análisis de los resultados el valor de esta hormona se considera sospechoso de hipotiroidismo congénito si excede las 10 mUI/mL (Vela, M. y cols. 2004).

La mayoría de los métodos recomiendan que la muestra de sangre para el tamizaje se tome posterior a las 48 horas del nacimiento, para evitar encontrar falsos positivos por la elevación fisiológica neonatal de TSH (Verter, P. 1993).

Una vez que se ha determinado el nivel de TSH a través del tamiz neonatal, en aquellos casos donde el resultado sea entre 6 y 10mUI/mL se debe realizar la determinación de hormonas tiroideas en sangre venosa entre la segunda y la cuarta semana de vida para confirmar el diagnóstico, ya que esta elevación en el tamiz neonatal podría tratarse de una elevación fisiológica de TSH presente en las primeras semanas de vida de algunos neonatos y los niveles pudieran normalizarse durante este periodo, sin necesidad de iniciar reemplazo hormonal en pacientes eutiroideos (Rose, S. 2006). Si el resultado está elevado por arriba de 10mUI/mL, se debe realizar la determinación de hormonas tiroideas en sangre venosa lo antes posible para confirmar el diagnóstico. Si el resultado se encuentra elevado por arriba de 50mUI/mL se considera diagnóstico de hipotiroidismo y no es necesario realizar más determinaciones en sangre para confirmarlo. Una vez confirmado el diagnóstico bioquímicamente, se debe realizar un estudio de imagen para determinar la etiología del HC. Los estudios más utilizados actualmente son la ecografía tiroidea y el estudio gammagráfico. La ecografía tiroidea ofrece una fácil visualización de

la localización y anatomía, aunque no mide la función. En el caso de los neonatos es poco útil para el diagnóstico de las disgenesias (ectopia), por la dificultad técnica para su realización (Núñez, O. 2003).

El estudio gamagráfico con isótopos radiactivos, principalmente Tecnecio 99, permite localizar tejido tiroideo ectópico y determinar la correlación estructura-función de la glándula tiroidea (Núñez, O. 2003).

## **TRATAMIENTO**

En la mayoría de los pacientes, el HC es un desorden endócrino permanente y requiere tratamiento de por vida para restaurar y mantener el estado eutiroideo, de manera que el no tratar este padecimiento a tiempo y de forma adecuada, conlleva a una alta tasa de mortalidad y morbilidad (Álvarez, P. 2004).

El objetivo principal del tratamiento es lograr el estado eutiroideo a la mayor brevedad, para disminuir el periodo en que los pacientes presentan insuficiencia de hormonas tiroideas postnatalmente y de esta forma reducir el riesgo de presentar manifestaciones clínicas irreversibles (Setian, N. 2007).

El tratamiento de elección es la levotiroxina vía oral, con la administración de una sola dosis al día para obtener niveles plasmáticos constantes de T4 y T3. La levotiroxina tiene una vida media de 7 días y alcanza su máxima respuesta en la segunda semana de tratamiento (Setian, N. 2007). La dosis necesaria es aquella que mantenga la TSH en límites normales y varía de paciente a paciente, sin embargo la dosis recomendada de inicio de tratamiento es: 10-15  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$  en HC. Esta dosis ha sido controversial, ya que como se mencionó, lo que se busca es normalizar los niveles de hormonas tiroideas lo más pronto posible y disminuir el riesgo de retraso mental, sin embargo existe el temor de que una dosis alta produzca hipertiroxinemia, craneosinostosis y problemas conductuales subsecuentes.

Algunos autores han recomendado mantener la dosis inicial en 10  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$  para evitar estas complicaciones del tratamiento y alcanzar un estado eutiroideo en aproximadamente 2 semanas (Rovet, J. 2003). También se recomienda que a mayor severidad de la patología al momento del diagnóstico, más alta sea la dosis de inicio de levotiroxina. La efectividad del tratamiento en el HC se monitorea al realizar mediciones de TSH. El objetivo es mantenerla en rangos normales; en general se requieren 2 semanas para que una dosis alcance su efecto satisfactorio (Bunivicius, R y cols 1999).

## **EVOLUCIÓN Y PRONÓSTICO**

Los pacientes diagnosticados y tratados precozmente tienen mejor pronóstico, ya que cuentan con mayores posibilidades de alcanzar un coeficiente intelectual normal. Estudios recientes han demostrado que si el inicio del tratamiento demora un mes, se producirá una pérdida de 5-10 puntos en el coeficiente intelectual o de desarrollo y cuanto más tiempo se retrase el inicio del tratamiento, mayores serán las secuelas, siendo una de las consecuencias más graves el retraso mental. En un estudio retrospectivo realizado en 1995 se observó que los pacientes a quienes se dio una mayor dosis de inicio presentaron mejor pronóstico intelectual, sin embargo estos pacientes tenían mayor riesgo de presentar problemas conductuales, se desconoce la causa de esto, sin embargo este hallazgo se había observado previamente por los mismos autores en niños que presentaron niveles circulantes elevados de T4 durante el mes anterior a realizar los estudios neuropsicológicos (Rovet, 1995, 2004). Ehrlich observó en un estudio retrospectivo que entre mayor era el tiempo que se tardaba en alcanzar los niveles normales de hormonas tiroideas mayor era el riesgo de tener retraso de lenguaje, alteraciones motoras y pobre discriminación auditiva (Rovet, 2003, Ehrlich, 1992). De acuerdo a Rovet y colaboradores, sin importar la etiología del HC, entre más pronto se normalicen los niveles hormonales mejor es la atención y la memoria de los pacientes. Los mismos autores observaron que los pacientes que requieren mayor número de ajustes de dosis para mantener el estado eutiroideo, tienen mayor riesgo de presentar un pronóstico cognitivo desfavorable (Rovet, J. 2003, Zoeller, 2004).

Después de comenzar el tratamiento con levotiroxina, el niño debe llevar un control clínico y bioquímico frecuente, se recomienda una segunda exploración a los 15 días del diagnóstico, posteriormente cada uno o dos meses hasta los seis meses de vida, cada tres o cuatro meses entre los seis meses y los tres años de edad y a partir de entonces cada seis a doce meses hasta que se complete el crecimiento o con más frecuencia si se duda de la administración del tratamiento, se obtienen valores anormales en los análisis o si se modifican las dosis de control (Vogiatzi, M y cols 1997 and Aronson, R. 1990, Rovet, J. 2003).

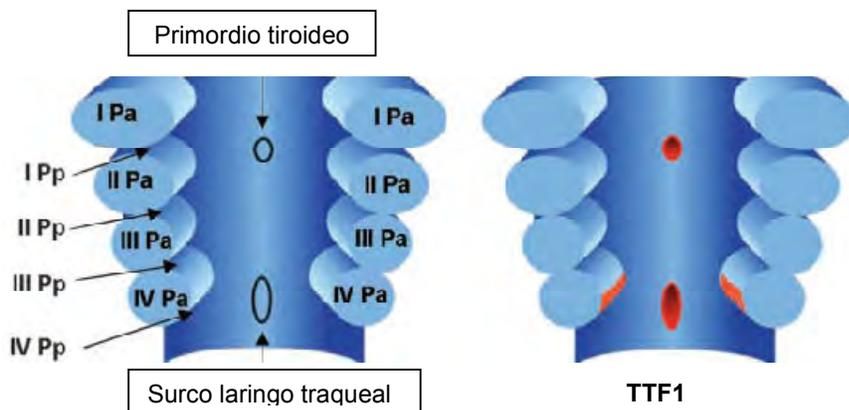
## **GENES ASOCIADOS A HIPOTIROIDISMO CONGENITO (HC)**

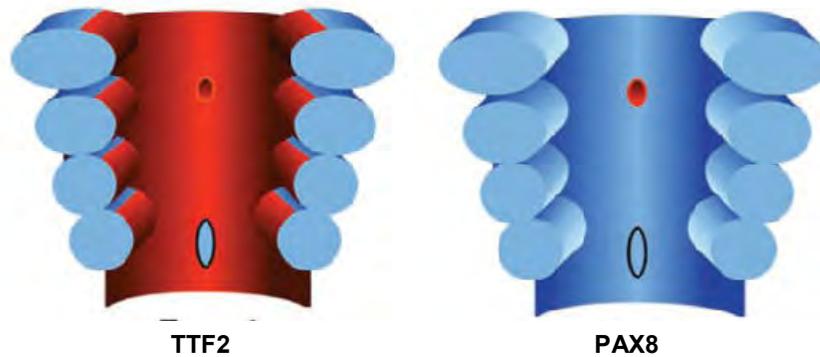
Como previamente se mencionó la etiología del HC se divide en dos grupos: las disgenesias (por alteraciones en la formación de la glándula tiroidea) que constituyen entre el 80 y 85% de los casos de HC y las dishormonogénesis (alteraciones en alguno de

los pasos de la síntesis normal de hormonas) que representan entre un 10 y 15% de los pacientes con HC (Moreno, J. 2004).

La patogenia de las disgenesias es poco conocida; debido a que el 2 % de los casos son familiares, se sugiere la existencia de factores genéticos que participan en este desorden; sin embargo, se acepta que la mayor parte de los casos se presentan de forma esporádica. Los genes que están asociados a la disgenesia tiroidea son principalmente factores transcripcionales (FT) específicos de la glándula. Los FT se unen a un sitio blanco del ADN y regulan (activando o reprimiendo) la expresión de genes específicos durante el desarrollo embrionario y juegan un papel importante en el desarrollo oportuno de las células que van a dar origen a la glándula tiroidea. Ejemplo de estos factores transcripcionales son el factor de transcripción tiroideo 1 (*TTF1*), el factor de transcripción tiroideo 2 (*TTF2*) y el factor de transcripción de dominio pareado 8 (*PAX8*). Por otra parte, los genes que se han asociado a la dishormogénesis incluyen a los genes que codifican a la peroxidasa tiroidea (*TPO*), a la tiroglobulina (*TG*), simportador yodo-sodio (*NIS*), a la pendrina (*PDS*) y a la oxidasa tiroidea 2 (*THOX2*). (Park, SM., 2005).

En el endodermo, la expresión de los factores de transcripción tiroideos se presenta en diferentes regiones de acuerdo al FT del que se trate, por ejemplo: la expresión de *PAX8* sólo está presente en el primordio tiroideo e inicia en la etapa de la especificación celular, esta expresión se mantiene en las TFCs durante todas las etapas del desarrollo embrionario tiroideo y durante la vida adulta. (Figura 1) (De Felice, M. 2004). Estudios en ratones knockout *PAX8<sup>-/-</sup>* (homocigotos) han hecho posible observar que la ausencia de factores transcripcionales tiroideos, afectan el desarrollo de la glándula en varios niveles, por ejemplo la estructura folicular se ve afectada por la falta de expresión de *PAX8* después del día 1.5 de gestación (Damante, G. 1998).





**Figura1. Expresión de FTs (rojo) en la tiroides al inicio de la organogénesis. (Pp – bolsa faríngea, Pa – arco faríngeo)**

### **HALLAZGOS DE ESTUDIOS EN RATONES MUTANTES (PAX8)**

Con base en modelos de ratones knockout se ha revelado la importancia del factor de transcripción PAX8 en la organogénesis de la tiroides.

Estudios en ratones knockout PAX8<sup>-/-</sup> (homocigotos) han revelado ausencia completa de folículos y de células foliculares tiroideas, por lo que esta glándula rudimentaria, se conforma casi completamente de células C. La expresión de los otros factores de transcripción es normal. Clínicamente presentan hipotiroidismo congénito severo y sin tratamiento, mueren después del nacimiento. En estos embriones, el divertículo tiroideo es capaz de evaginarse desde el endodermo pero no puede continuar con el desarrollo normal, en ausencia de este FT el primordio tiroideo aparece más pequeño de lo normal y las células foliculares son prácticamente indetectables (De Felice, M. 2004). PAX8, parece ser un FT no necesario para la especificación inicial de la tiroides (Mansouri, A. 1998), pero sí para la supervivencia de los precursores celulares tiroideos y para la regulación génica de la diferenciación. Estudios en ratones knockout PAX8<sup>+/-</sup> (heterocigotos) no presentan un fenotipo patológico y la glándula tiroidea es histológicamente normal (Mansouri, A. 1998, De Felice, M. 2004).

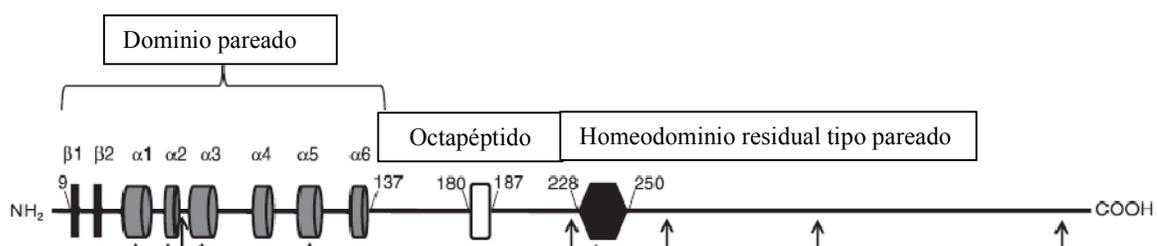
### **ASPECTOS MOLECULARES DE PAX8**

El gen *PAX8* pertenece a la familia de FTs caracterizados por la presencia de un dominio pareado altamente conservado (familia PAX), se encuentra localizado en el cromosoma 2q12-q14, tiene un tamaño de 59.87 Kb y está constituido por 11 exones. El gen transcribe un mRNA de 1361 y codifica para una proteína, la cual está constituida de 450 aminoácidos y tiene un peso aproximado de 48.1 kDa. La proteína presenta en su

estructura un dominio pareado de 128 aminoácidos (paired box) de unión al DNA al final del N-terminal (codificado por exones 2 y 3), un dominio de activación transcripcional en el C-terminal, un octapéptido y un homeodominio central (codificado por el exón 7).

PAX8 juega un papel fundamental en el inicio de la diferenciación celular tiroidea y además en mantener el estado de diferenciación (Di Magliano, M. 2000). En las células foliculares tiroideas PAX8 regula la expresión de TG, NIS y TPO (Robson E, He S, and Eccles M 2006). Existe evidencia de que la proteína PAX8 interactúa con diferentes factores de transcripción, formando complejos en regiones reguladoras de sus genes blancos. Recientemente se ha demostrado que el cofactor transcripcional general p300 es esencial como mediador de la activación de PAX8 en el promotor del gen TG así como del sinergismo funcional entre PAX8 y TTF-1 en la expresión génica tiroidea (Tonacchera, M. 2009).

PAX8 se expresa en el primordio tiroideo, región media y posterior del cerebro y en el riñón durante el desarrollo. En la mayoría de los casos la expresión de los genes PAX se ve atenuando una vez que se ha completado el desarrollo; no obstante en pocos tejidos la expresión de los genes PAX permanece hasta la vida adulta, este es el caso de PAX8 (Robson E, He S, and Eccles M 2006). (Figura 2).



**Figura 2. Representación esquemática de la estructura del gen PAX8**

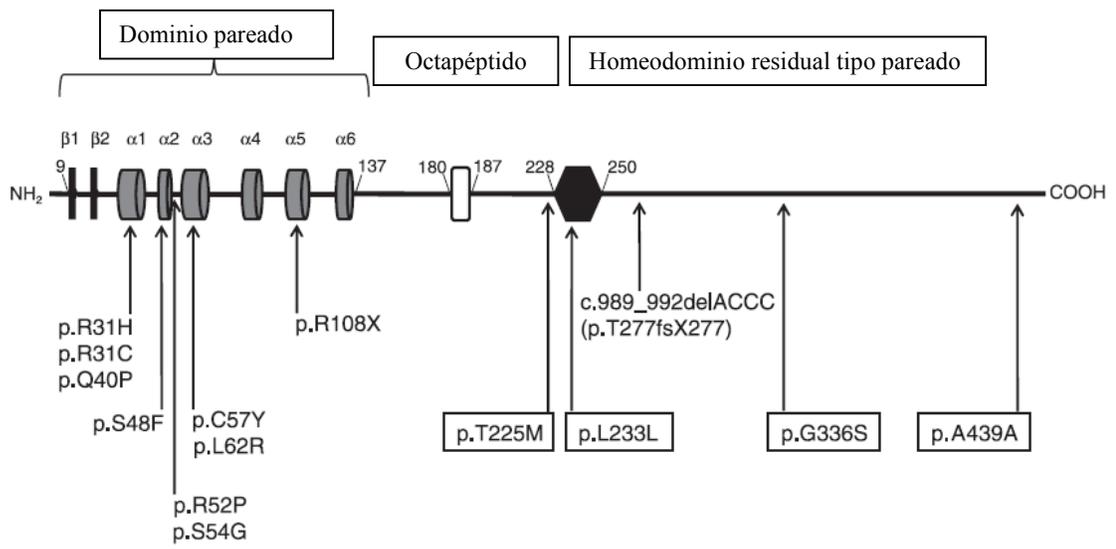
### **MUTACIONES EN EL GEN PAX8 EN HUMANO**

Estudios que han realizado la búsqueda de mutaciones en el gen *PAX8* de pacientes con hipotiroidismo congénito han identificado mutaciones puntuales en estado heterocigoto, sin sentido y de sentido erróneo, las cuales la mayoría se localizaron en los exones 2 y 3 en el N-terminal, mientras que otras como mutaciones tipo deleción y 6 polimorfismos en el C-terminal (De Sanctis, 2004, Meus y cols 2004, Tonacchera, M. 2007, Esperante, S.

2008)) (tabla 2). En los estudios reportados se realizaron análisis de funcionalidad y se utilizaron vectores de expresión para demostrar que las proteínas mutadas perdieron su capacidad de unión a DNA y por lo tanto perdieron su función, la capacidad de activación de promotores de genes blancos o la actividad sinergista con coactivadores. Dos de las mutaciones se encontraron de forma esporádica mientras que las mutaciones familiares son heredadas en forma autosómica dominante (Macchia, P. y cols 1998, Vilain, C. y cols 2001, Congdon, T. y cols, 2001, Komatsu, M. y cols. 2001). En todas las series revisadas, la prevalencia de mutaciones en el gen PAX8 en pacientes con HC y disgenesia tiroidea es baja, lo que sugiere que deben buscarse mutaciones en otros genes candidatos, así como otras posibles causas que expliquen esta entidad, como alteraciones epigenéticas.

### **CORRELACIÓN GENOTIPO FENOTIPO**

Se han descrito pacientes con mutaciones heterocigotas puntuales con pérdida de función en el dominio de unión a DNA (Esperante, S. 2008)., así como también una delección fuera del dominio pareado, la cual causa un cambio en el marco de lectura y un codón de paro prematuro, la proteína producto de esta mutación pierde el extremo C terminal pero estaría presente el dominio pareado, octapéptido y homeodominio, por lo que aún podría unirse al DNA pero no sería capaz de activar a su gen blanco; lo cual indica que el extremo C-terminal es indispensable para la actividad transcripcional de PAX8 , esto fue comprobado realizando experimentos EMSA (ensayo de cambio de movilidad electroforética) utilizando extractos protéicos preparados de células transfectadas con vectores de expresión codificantes de *PAX8* silvestre o mutado (Sanctis, L. y cols. 2004). Todas las mutaciones reportadas hasta la fecha presentan herencia dominante y fenotipos variables que van desde hipoplasia tiroidea leve a severa, agenesia, ectopias e incluso glándula de tamaño y localización normal, aún entre miembros de la misma familia, lo que sugiere que el fenotipo puede ser variable en portadores de la misma mutación (expresividad variable) o de manera alterna no todos los portadores de la mutación desarrollarán el fenotipo anormal (penetrancia incompleta) para el caso de mutaciones heterocigotas (Macchia, P. y cols 1998, Congdon T y cols 2001, Vilain C y cols 2001), lo anterior podría explicarse por el efecto de elementos regulatorios, tanto genéticos como epigenéticos, que tal vez estarían modulando la expresión fenotípica. (Esperante, S. 2008). (Figura 3).



**Figura 3. Representación esquemática de las mutaciones y polimorfismos descritos hasta la fecha en el gen *PAX8***

**Tabla 2. Estudios sobre mutaciones en el gen PAX8 en diferentes poblaciones.**

Autor/Año	País	Núm. de pacientes	Criterios de inclusión	Núm. Pacientes con mutación	Tipo de mutación, localización, efecto en proteína	Método de detección	Fenotipo	
Macchia, P. y cols. 1998	Italia	145	HC, Displasia tiroidea 60 Agenesia 3 Hemiagenesia 43 Ectopia 7 hipoplasia 32 HC no bociogeno	1	(R108X) Exón 3 Sustitución de C>T codón 108 Crea codón de paro En alfa-hélice 5 del dominio pareado. (De novo) Proteína truncada con pérdida de función por reducción de unión a DNA	PCR, SSCP, Secuenciación	HC Tiroides ectópica hipoplasia tiroidea  Sin alteraciones renales	
				1	(R31H) Exón 2 Sustitución de G>A codón 31 En alfa hélice 1 del dominio pareado. (De novo) Proteína con pérdida de función por reducción de unión al DNA.			HC Hipoplasia tiroidea Sin alteraciones renales
				1	(L62R) Exón 2 Sustitución T>G en el Codón62 En alfa hélice 3 del dominio pareado. (Familiar) Proteína con pérdida de función por reducción de unión al DNA.			HC 2 Hipoplasia tiroidea 1 Quiste rudimentario. Sin alteraciones renales
Vilain, C. y cols. 2001	Bélgica	120 controles	Controles 90 donadores anónimos 30 voluntarios sanos.	2	(C57Y) Exón 3 Sustitución G>A en Codón 57 En alfa hélice 3 en el dominio pareado (Familiar)	PCR- Secuenciación	HC Hipoplasia severa. Ictericia persistente	
		59	HC 28 Ectopia 31Hipoplasia tiroidea					

17			Controles sanos			Proteína con pérdida de función, ausencia de activación del promotor del gen TPO		Sin alteraciones renales
Komatsu, M. y cols 2001	Japón	2	HC 1 hipoplasia severa 1 agenesia	2	(R31C) Exón 2 Sustitución C>T en el Codón 31 En alfa hélice 1 en el dominio pareado (Familiar) Proteína con pérdida de función por reducción de unión al DNA	PCR- Secuenciación	HC Hipoplasia severa Agenesia tiroidea Sin estudio de estructura y función renal	
		50	Voluntarios sanos					
Congdon, T. y cols. 2001	Brasil	4	HC, hipoplasia tiroidea	1	(Q40P) Exón 3 Sustitución A>C en el Codón 40 En alfa hélice 1 en el dominio pareado (Familiar).	PCR- Secuenciación	HC Hipoplasia tiroidea Sin alteraciones renales	
		5	Estudio extendido a familia de propósito con mutación no incluida en pacientes originales 5 integrantes 4 sanos 1 hipotiroidismo autoinmune	1	Proteína con pérdida de función por falta de unión al DNA. No activación del promotor del gen TPO.		Tiroides de localización y tamaño normal con hipotiroidismo autoinmune de inicio en adultez Sin alteraciones renales	
Meeus, L. y cols. 2004	Francia	1 familia	4 Integrantes 3 HC. 1 sano	3	(S54G) Exón 3 Sustitución A>G en el Codón 54 Entre alfa hélice 2 y 3 en el dominio pareado (Familiar) Proteína con pérdida de función por falta de unión al DNA con pérdida de activación de transcripción de genes blancos.	PCR- Secuenciación	HC Tiroides de tamaño y localización normal al nacimiento con posterior involución de la glándula resultando en hipoplasia tiroidea. Agenesia renal derecha con hiperparatiurina tubular en 1 paciente	
		54	HC, disgenesia. 16 Agenesia 4 Hipoplasia 34 Ectopia	1	(c989_992delACCC) Exón 7 en el Codón 277 Genera cambio en el marco de lectura y codón de pato	PCR-DHPLC PCR- Secuenciación	HC, ictericia, llanto ronco, succión pobre. Hipoplasia tiroidea Sin estudio de estructura y	
De Sanctis, L. y cols. 2004	Italia							

Grasberger, H y cols. 2005	Estados Unidos	1 Familia	5 Estudio extendido a familia de propósito con mutación no incluida en pacientes originales 5 integrantes asintomáticos	2	prematuro. En el extremo C-Terminal (Familiar) Proteína con pérdida completa de extremo C-terminal, con unión al DNA conservada pero inactiva transcripcionalmente	función renal	Hipotiroidismo compensado, glándula de tamaño y localización normal Eutiroidismo, con glándula de tamaño y función normal
Grasberger, H y cols. 2005	Estados Unidos	1 Familia	12 integrantes 7 HC 1 atiroisis	7	(S48F) Exón 3 Sustitución 143C>T en codón 48 En alfa helice 2 del dominio pareado. Mutación con efecto dominante negativo. (Familiar) Proteína: Unión a DNA y sinergismo con TTF-1 conservadas. Sinergismo con coactivador p300 al 50% en células tiroideas y ausente en células no tiroideas	HC Atiroisis Tiroides de tamaño y localización normal Hipotiroidismo compensado Sin estudio de estructura y función renal	PCR- secuenciación
Tonacchera, M y cols. 2007	Italia	43	HC, disgenesia. 13 Agenesia 23 Ectopia 7 Hipoplasia	3	(F329L) Exón 8 Sustitución T>C en el codon 329 Fuera del dominio pareado (De novo) Proteína: sin alteración en la función: Polimorfismo.	HC. Ectopia y agenesia tiroidea	PCR- Secuenciación  PCR- Secuenciación
				1	(T225M) Exón 6 Sustitución C>T en codón 225 Fuera del dominio pareado	HC. Hipoplasia tiroidea	Análisis funcional.



					Polimorfismo.		localización normal
			133 Individuos sanos	26	c.211+51C>G Intrón 5 Polimorfismo 25 heterocigotos, 1 homocigoto.		Asintomáticos
Esperante, S y cols. 2008	Buenos Aires	60	53 disgenesia 26 agenesias 17 hipoplasias 10 ectopias 7 glándula normal 50 individuos sanos	1	(T225M) Exón 7 Sustitución C>T en codón 255 Fuera de dominio pareado (Familiar) Variante rara Proteína: Con unión a DNA y activación transcripcional conservada. Efecto sinergista con coactivador p300 defectuoso.  (G336S) Exón 9 Sustitución 1006G>A en codón 336 (Familiar) Variante rara Proteína: Con unión a DNA y activación transcripcional conservada.  Sustituciones sinónimas (L233L) Exón 7 Sustitución 699C>T en codón 233 (De novo) Variante rara Proteína sin alteraciones  (A439A) Exón 12 Sustitución 1317A>G en codón 439 (De novo) Variante rara Proteína sin alteraciones	PCR-SSCP Secuenciación	HC Agnesia, hipoplasia Tiroides normal anatómica y funcional

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México la prevalencia al nacimiento de hipotiroidismo congénito es mayor a la reportada en otras poblaciones. La explicación de la mayor ocurrencia de este defecto no se conoce, sin embargo se ha propuesto la intervención de factores genéticos. *PAX8* es uno de los principales factores de transcripción que participan en el desarrollo de la tiroides y su mecanismo de acción es bastante complejo. Se han descrito diferentes mutaciones que inactivan la acción de *PAX8*, por lo que representa un gen candidato como responsable de hipotiroidismo congénito por disgenesia en pacientes mexicanos.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

En México no existen reportes acerca de las mutaciones relacionadas con HC por disgenesias, lo cual es relevante dada la elevada frecuencia del HC. Lo anterior, permitirá conocer mejor el origen de esta enfermedad y su posible impacto en el fenotipo. Saber si existe alguna mutación responsable de este defecto al nacimiento, nos permitiría caracterizar a cada paciente y brindar una mejor atención individualizada al paciente así como a la familia afectada.

En el presente estudio se analizó la frecuencia y tipo de mutación en el gen *PAX8* condicionante de HC en pacientes mexicanos canalizados por la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto Nacional de Pediatría.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **1.- General**

Caracterizar las mutaciones o polimorfismos en el gen *PAX8* en muestras de sangre depositadas en papel filtro de pacientes con diagnóstico confirmado de HC secundario a disgenesia tiroidea canalizados a través de la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto Nacional de Pediatría.

#### **2.- Específicos**

- a.-Identificar mutaciones en el gen *PAX8* en muestras de pacientes con diagnóstico confirmado de HC por disgenesia.
- b.-Describir las características clínicas de los pacientes con diagnóstico confirmado de HC por disgenesia en quienes se identifique una mutación.

## **V. MATERIAL Y METODOS**

Las muestras de sangre depositadas en papel filtro de los pacientes con diagnóstico confirmado de HC por disgenesia tiroidea fueron otorgadas por la unidad de Genética de la Nutrición. En cada caso se asentaron los datos clínicos de las variables a analizar en la hoja de captación de datos. El estudio molecular se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Genética Humana.

### **Creación del banco de DNA**

Se llevó a cabo el análisis mediante extracción del DNA a partir de muestras de tamiz neonatal en tarjetas Guthrie, la técnica que se utilizó para la extracción del DNA fue por precipitación salina con el kit Puregene™ (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA).

### **Cuantificación del DNA**

Se hizo una dilución de 2 µl de la muestra de DNA en 498 µl de agua estéril y se registró la densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm. Para cuantificar la concentración de DNA se aplicó la siguiente fórmula:

$$(D.O) (F) (dil) = (DNA) \mu\text{g/ml}$$

donde:

D.O = densidad óptica a 260 nm

F = constante equivalente a 0.05 (50 ng de DNA = 1 D:O)

Dil = volumen de dilución equivalente a 250 µl

### **Integridad del DNA**

La integridad del DNA se evaluó por medio de electroforesis, mezclando 1 µl de la muestra con 2 µl de colorante azul de bromofenol-xilencianol (0.05%: 0.05%) y 7 µl de agua estéril. La electroforesis se llevó a cabo durante 20 min. a 100 voltios en un gel de agarosa al 0.7% con bromuro de etidio; posteriormente el DNA se observó en un transiluminador con luz ultravioleta y se tomaron fotografías.

### **Búsqueda de mutaciones en PAX8**

La búsqueda de mutaciones y polimorfismos se realizó mediante amplificación en cadena de la polimerasa, análisis mediante SSCP y secuenciación automática.

## a) Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa

### GEN PAX8

La mezcla para llevar a cabo la amplificación contuvo 0.5 U de Taq polimerasa, buffer de PCR 1X, 25mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μMol/L de dNTPs, dimetilsulfóxido al 10%, 20 picomoles de cada primer. Los primers de cada secuencia se enlistan en la tabla 4 (Machia, P. 1998) y 200 ng de DNA genómico.

La reacción se llevó al cabo en el termociclador Applied Biosystems modelo Gene Amp PCR System 2720, bajo el siguiente programa:

Desnaturalización inicial durante 2 minutos a 95°C seguida de 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, alineación (temperatura específica para cada par de primer) por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto. Posteriormente se someterán a una extensión final a 72°C durante 5 minutos (Machia, P. 1998)

Se tomaron 10 μl del producto para analizarlo por electroforesis en un gel de agarosa al 3 % teñido con bromuro de etidio (Moloney y cols., 1997; Gyapay y cols., 1994.).

<b>Tabla 3. Primers u oligonucleótidos para la búsqueda de mutaciones en 11 exones del gen PAX8 (Machia, P. 1998).</b>			
Exon	Oligos	T° Alineamiento	Producto PCR
1	F:5'-GCAGGCATCGAATCTCATC3' R:5'-ACGCACGGACGCTCAG3	58°C	209 pb
2	F:5'-CATAGCTAATCCCCACCCAAAC-3' R: 5'-GCCTGCGGTGAATTTTCGT-3'	58°C	259pb
3	F: 5'-ATTGGGTAATTCTTTGGGATTG-3' R: 5'-CCAGGCCTTTCTTGTCTCTT-3'	59°C	314pb
4	F:5'AGGGGTGTCAAAAAGGCGACTG-3' R: 5'-TGGGTATGCTGAAGGGGAGGTG-3'	61°C	241pb
5	F:5'-TCTCCCTCTCCCCCACTG-3' R: 5'GCAGAGCCCCTACAAAGTCC-3'	58°C	255pb
6	F:5'-GAGCATGAATAGATAGGTCCC-3' R: 5'-CACAGGCTCATTTGGAGAAT-3'	58°C	305pb
7	F: 5'-GTCTCTGTGCGCTGACTTCT-3' R: 5'-CACACCTTCCGCCTGAC-3'	59°C	252pb
8	F: 5'-CCTCCCCGCCATCTCACACC-3' R: 5'-TCCCACCCGCCCATAG-3'	61°C	290pb
9	F: 5'-GCCCCATGGTCCAAGTAC-3' R:5'TGCCTCTGCTCCTTGTGTCCAC-3	61°C	220pb
10	F: 5'TGATGCCCTTCACCTCAC3' R: 5'ATCTGAGGACTCCCAGCTTT3'	59°C	235pb
11	F: 5'GGTGCAATTTTCTTTCTGA3' R: 5'TTCCTTTGTGTGACTCTCTGG3'	61°C	215pb

### **Búsqueda de mutaciones por SSCP en PAX8**

El análisis de SSCP (polimorfismo conformacional de DNA de cadena sencilla) se realizó diluyendo los productos de PCR en buffer acarreador el cual contiene formamida 98%, EDTA 8mM, azul de bromofenol 0.1%, xilencianol 0.1%, la desnaturalización se llevó a cabo a 95 °C de 3-4 min, posteriormente se sumergen en agua con hielo un mínimo de 10 minutos (choque térmico). Posteriormente los productos desnaturalizados se cargaron en un gel de matriz MDE al 25% y se corrieron de 18-20 hrs a 6 watts, 8 mA, con un límite de volts a 850. El revelado de las bandas se realizó con la tinción de plata Kit Biorad.

### **Secuenciación**

Cuando se observó un patrón de migración anormal en el SSCP, se amplificó el DNA genómico utilizando el mismo par de primer usado para el SSCP y se secuenciaron ambas hebras forward y reverse mediante secuenciación automática, se comparó la secuencia del gen en la base de datos de GeneBank para identificar si esta descrita previamente como mutación o polimorfismo; los cambios no descritos, de acuerdo al efecto que se considere causen en la proteína, se clasificaron como polimorfismo o mutación, realizando un análisis in silico utilizando el programa Pmut (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>) y además para determinar con certeza si el cambio observado es un polimorfismo o mutación, se buscaron de manera dirigida en 100 neonatos sin hipotiroidismo, ya que se consideran polimorfismos aquellos cambios que se observen por lo menos en el 1% de la población sana (las muestras en papel filtro en las que se haya descartado hipotiroidismo, se obtuvieron de la Unidad de Genética de la Nutrición y se manejaron de manera anónima).

### **Diseño de estudio**

Es un estudio observacional, descriptivo, transversal, ambispectivo.

### **Población de estudio**

Pacientes con diagnóstico de HC canalizados a través de la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto Nacional de Pediatría y cuyas muestras iniciales de sangre en papel filtro han sido conservadas junto con su ficha de identificación.

### **Población Objetivo**

Pacientes con HC por disgenesia (Ectopia o atiroisis) confirmado por perfil tiroideo y estudio gammagráfico.

### **Población Elegible**

Casos canalizados a través de la Unidad de Genética de la Nutrición-IIB-UNAM-INP con diagnóstico confirmado de HC realizado del 2000 a la fecha, dado que en dicha unidad se cuenta con un registro de pacientes con HC.

### **Criterios de inclusión:**

1. Pacientes con diagnóstico de HC, en quienes se cuente con muestra de sangre en papel filtro.
2. Ambos géneros.
3. Pacientes con diagnóstico confirmado de HC por disgenesia. La confirmación del diagnóstico se basará en la cuantificación de niveles hormonales tiroideos (perfil tiroideo con TSH, T3 total, T4 total, T3 libre, T4 libre y tiroglobulina) y en el estudio gammagráfico.

### **Criterios de exclusión:**

1. Pacientes con hipotiroidismo congénito transitorio, causado por dishormonogénesis o por otra causa diferente a la disgenesia tiroidea.
2. Paciente en donde el DNA extraído de papel filtro sea inadecuado.

### **Definición de variables:**

Se analizarán las siguientes variables:

VARIABLE	TIPO
Sexo	Cualitativa, categórica nominal dicotómica
Edad	Cuantitativa numérica discreta.
Manifestaciones clínicas por aparatos y sistemas. (Referidas en marco teórico)	Cualitativa, categórica nominal dicotómica 1) si= presente 2) no= ausente

### **I. FACIES HIPOTIROIDEA.**

Animia: Facies inexpresiva, cara tosca, labios gruesos

Fontanela posterior amplia: Cierre posterior a los 3 meses de la fontanela lambda.

Macroglosia: Aumento del volumen de la lengua.

Voz ronca: Voz apagada, lenta, profunda y áspera.

## II. OFTALMOLÓGICO.

Edema palpebral: Acumulo anormal de líquido intersticial en la región de párpados inferiores.

## III. GASTROINTESTINAL.

Estreñimiento: Disminución en el número y en la frecuencia de evacuaciones

Hernia umbilical: Es una protrusión del contenido de la cavidad abdominal por un punto débil del anillo umbilical debido a un defecto en el cierre de la pared abdominal. La protrusión puede involucrar intestino delgado, peritoneo, epiplón y ocasionalmente otras vísceras.

## IV. PIEL Y MUCOSAS.

Alopecia: De predominio en región frontal, pelo fino, muy seco y debilitado.

Piel engrosada: Descrita como *piel de naranja*, surcos nasogenianos y pliegues muy marcados.

Ictericia: síndrome caracterizado por hiperbilirrubinemia y depósito de pigmentos biliares en la piel, mucosas y esclera, con lo cual el paciente adquiere una coloración amarilla.

Cianosis peribucal: Coloración azulada en región peribucal.

Cianosis distal: Coloración azulada de partes distales como dedos, región sublingual y de pulpejos dactilares.

## V. NEUROLÓGICO.

Hipotonía: Disminución del tono muscular que condiciona alteraciones de succión, deglución y movilidad generalizada.

Retraso psicomotor: Retardo en la adquisición de habilidades motoras, de socialización y de lenguaje.

Hipoactivo: Disminución de los movimientos espontáneos.

Somnolencia: Disminución del estado de alerta.

Hipotermia: Disminución de la temperatura

## VI. CARDIOLÓGICO

Soplo cardiaco: Sonido cardiaco anormal causado por un flujo sanguíneo turbulento a través del corazón.

## VII. ORTOPÉDICO

Polidactilia: Malformación congénita caracterizada por la presencia de un número superior al normal de dedos en las manos o en los pies.

Luxación congénita de cadera: Falta al nacimiento de la relación de la cabeza del fémur y la acetábulo del hueso iliaco, los cuales conforman la articulación de la cadera.

Pie equino varo: Malformación congénita del pie en la cual la posición de este es en punta (equino) y con la planta girada hacia medial (varo).

## VI. TAMAÑO DE LA MUESTRA

De acuerdo al porcentaje de detección de mutaciones en PAX8 en estudios previos reportados en la literatura, en el presente trabajo se estudiaron 70 casos confirmados de HC por disgenesia (ectopia y agenesia glandular).

## VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las frecuencias de mutaciones se calcularon en porcentaje y se compararon con los datos descritos en la literatura.

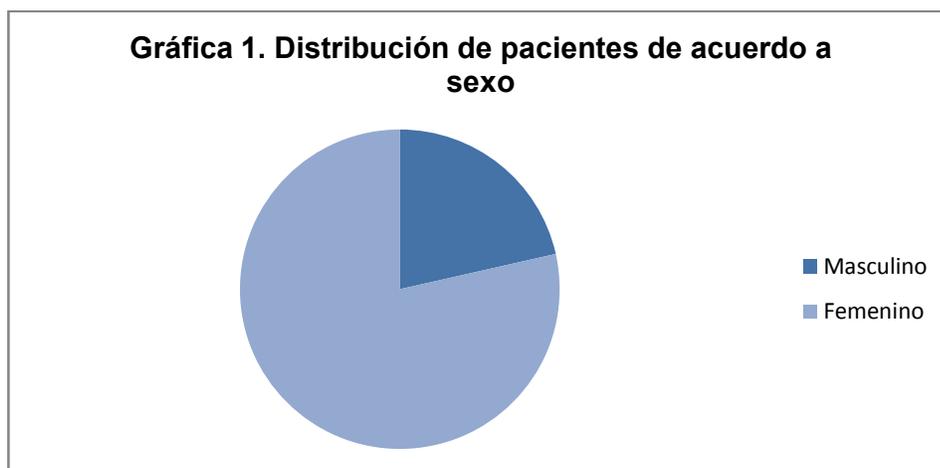
## VIII. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Las muestras con las que se trabajó se tienen archivadas en la Unidad de Genética de la Nutrición y se analizaron de manera anónima, los pacientes una vez establecido el diagnóstico son manejados en sus unidades médicas de origen por lo que no se contará con una carta de consentimiento informado para trabajar con dichas muestras.

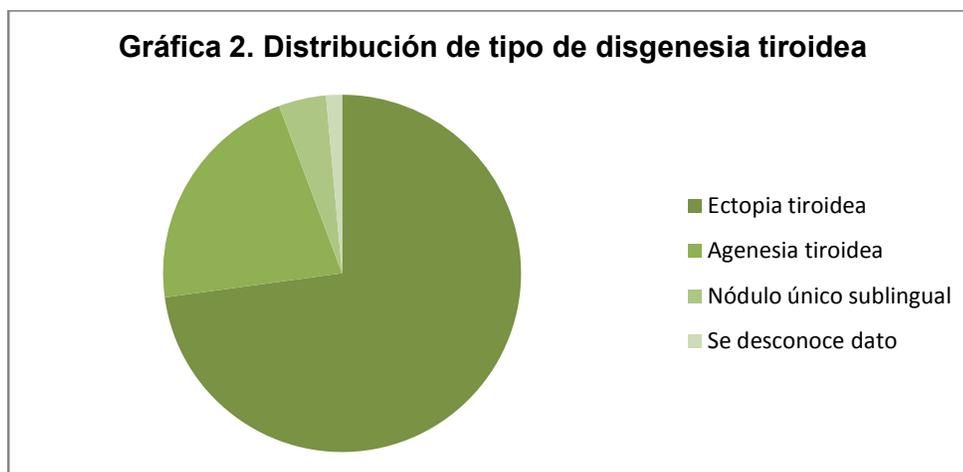
## IX. RESULTADOS

Se captaron un total de 70 pacientes con diagnóstico de HC secundario a disgenesia tiroidea diagnosticado por perfil tiroideo y gammagrafía tiroidea canalizados por la Unidad de Genética de la Nutrición. Todos los casos se consideran esporádicos ya que en la ficha de identidad no se mencionan antecedentes familiares de hipotiroidismo.

El rango de edad de los pacientes en el momento de la captación de datos es de 4 meses a 5.7 años con una media de 2.8 años de edad. De 70 pacientes 55 (78.5%) son de sexo femenino y 15 ( 21.5%) de sexo masculino. (Gráfica 1)



De los 70 pacientes 51 (72.8%) presentaron ectopia tiroidea, 15 (21.4%) agenesia tiroidea, 3 (4.3%) nódulo único sublingual y 1 (1.4%) no tiene el dato del tipo de disgenesia (Gráfica 2)

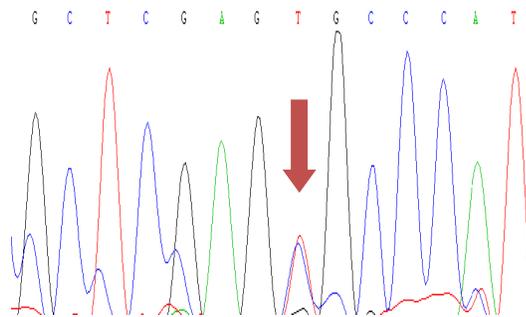


Se identificaron dos mutaciones patogénicas en estado heterocigoto, una de ellas previamente reportada por Macchia y cols. 1998 en el paciente con número 154 c.92G>A (p. R31H) en el exón 2, en el dominio pareado dando como efecto pérdida de la función de la proteína por reducción de unión al DNA; y una mutación nueva en el paciente con número 159 C.712C>T (p. C238R) en el exón 6, fuera del dominio pareado (tabla 4) (Figura4). El análisis por el programa Pmut (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>) reveló que la mutación p.C238R muy probablemente es patogénica; además la C238 está conservada en el perro, ratón y rata. Aún está pendiente su búsqueda en 100 controles sanos, para excluirla como polimorfismo.

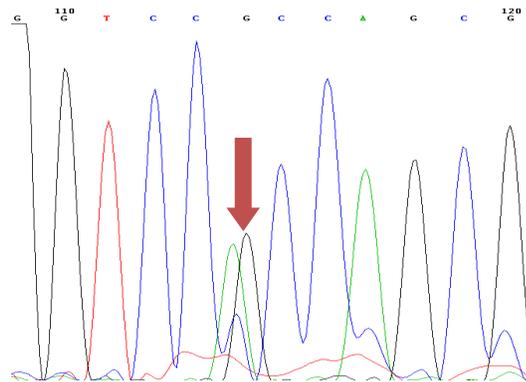
**Tabla 4. Características clínicas de los pacientes con mutación**

Características clínicas	Num. 154 p.R31H	Num 159 p.C238R
Edad actual	2.5 años	1.5 años
Sexo	Masculino	Masculino
Disgenesia tiroidea	No se tiene dato si por ectopia o nódulo	Nódulo sublingual único
Facies típica	No	Si
Fontanela posterior amplia	Si	Si
Ictericia	Si	Si
Edema	No	No
Macroglosia	No	No
Llanto ronco	Si	No
Somnolencia	Si	Si
Hipotermia	No	No
Piel seca o áspera	Si	No
Hipotonia	Si	No
Hipoactivo	No	No
Polidactilia	No	No
Estreñimiento	Si	Si

Hernia umbilical	No	No
Dificultad respiratoria	No	No
Lentitud en ingesta de Alimentos	Si	No
Cianosis peribucal	No	No
Soplo cardiaco	Si	No
Pie equino varo	No	No
Luxación congénita de cadera	No	No



**Figura 4a**



**Figura 4b**

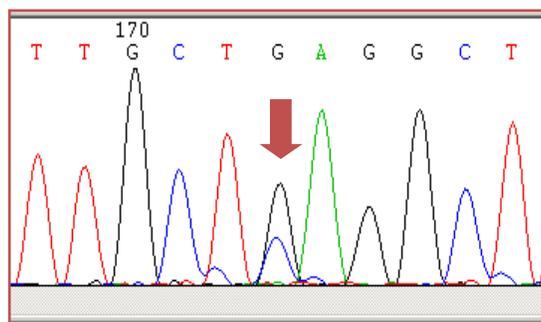
**Figura 4. 4a.** Electroferograma que muestra la nueva mutación c. 712C>T (p. C238R) en el exón 6 en estado heterocigoto. **4b.** Electroferograma que muestra la mutación previamente reportada c. 92G>A (R31H) en el exón 2 en estado heterocigoto.

Se encontraron 2 SNP ya reportados previamente. En el paciente con num. 26 se encontró el polimorfismo c.601+51 C>G o rs4849186 (IVS5 + 51C>G) en el intrón 5 en estado heterocigoto, el cual había sido nombrado de forma errónea en publicaciones

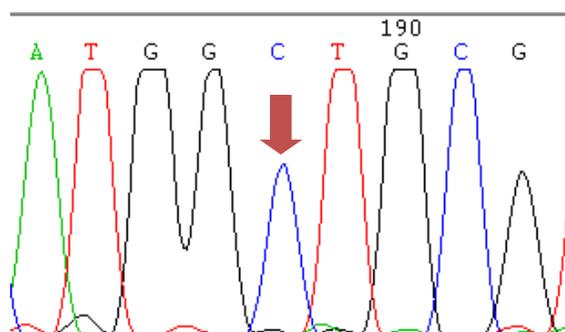
previas como c. 211+51 C>G. En el paciente con num. 75 se encontró, en estado homocigoto el polimorfismo c.168T>C o rs1048939 (G56G) en el exón 2. (Tabla 5) (Figura 5).

**Tabla 5. Características clínicas de los pacientes con polimorfismos previamente conocidos**

Características	Num. 26 c.601+51 C>G	Num 75 c.168T>C
Edad actual	3.9 años	5.5 años
Sexo	Femenino	Masculino
Disgenesia tiroidea	Ectopia	Ectopia
Facies típica	Si	No
Fontanela posterior amplia	Si	No
Ictericia	Si	Si
Edema	Si	No
Macroglosia	Si	No
Llanto ronco	Si	Si
Somnolencia	No	No
Hipotermia	No	No
Piel seca o áspera	Si	No
Hipotonía	Si	No
Hipoactivo	No	No
Polidactilia	No	No
Estreñimiento	Si	Si
Hernia umbilical	Si	No
Dificultad respiratoria	No	No
Lentitud en ingesta de Alimentos	No	Si
Cianosis peribucal	No	No
Soplo cardíaco	No	No
Pie equino varo	No	No
Luxación congénita de cadera	No	No



**Figura 5a**



**Figura 5b**

**Figura 5. 5a.** Electroferograma que muestra el polimorfismo previamente reportado c.601+51 C>G en el intrón 5 en estado heterocigoto. **5b.** Electroferograma que muestra el polimorfismo previamente reportado c.168T>C en el exón 2 en estado homocigoto.

De igual forma se identificaron cuatro cambios puntuales no descritos previamente. En tres pacientes (111, 124 y 138) se identificó el polimorfismo c.885C>T (Y295Y) en el exón 7 (tabla 6) (figura6). En el paciente 153 se identificó el polimorfismo c.1143 C>T (S381S) en el exón 9, en el paciente 29 se detectó el cambio c.1242C>T (S414S) en el exón 10 y en el paciente 73 el polimorfismo c.129G>A (R43R) en el exón 2 (tabla 8) (figura 7). Estas variantes se buscaron en el DNA de 200 individuos sanos sin HC por disgenesia tiroidea para descartarlos como mutaciones. Las frecuencias alélicas de estas variantes superaron el 1% requerido para ser consideradas polimorfismos, a excepción de las variantes c.129G>A y c.885C>T. (Tabla 7)

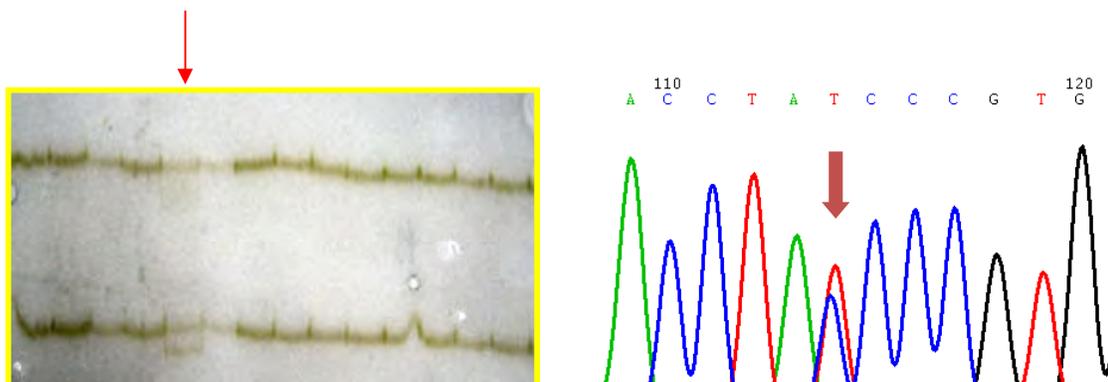
**Tabla 6. Características clínicas de los pacientes con el polimorfismo no descrito previamente c. 885C>T**

Características	Paciente 111	Paciente 124	Paciente 138
Cambio en proteína	p. Y295Y	p. Y295Y	p. Y295Y
Edad actual	4.5 años	4.10 años	5 años
Sexo	Femenino	Femenino	Femenino
Disgenesia tiroidea	Ectopia	Agenesia	Ectopia
Facies típica	Si	No	Si
Fontanela posterior amplia	Si	Si	Si
Ictericia	Si	Si	Si
Edema	Si	Si	Si
Macroglosia	No	Si	No
Llanto ronco	Si	Si	No
Somnolencia	Si	Si	Si
Hipotermia	No	No	No
Piel seca o áspera	Si	Si	No
Hipotonía	Si	Si	Si
Hipoactivo	No	No	No
Polidactilia	No	No	No
Estreñimiento	Si	Si	No
Hernia umbilical	Si	Si	Si

Dificultad respiratoria	No	No	No
Lentitud en ingesta de Alimentos	Si	Si	Si
Cianosis peribucal	No	No	No
Soplo cardiaco	No	No	No
Pie equino varo	No	No	No
Luxación congénita de cadera	No	No	No

**Tabla 7. Polimorfismos y sus frecuencias alélicas en controles sanos del gen *PAX8* descritos en el presente estudio.**

Exon	Cambio	Num alelos	Frecuencia
2	c.129G>A	399 variante mayor 1 variante menor	0.9975 0.0025
7	c.885 C>T	397 variante mayor 3 variante menor	.9925 .0075
9	c.1143C>T	357 variante mayor 43 variante menor	.8925 .1075
10	c.1242 C>T	393 variante mayor 7 variante menor	.9825 .0175



**Figura 6.** SSCP y electroferograma de polimorfismo no descrito previamente c. 885C>T en el exón 7. En el SSCP se señala la alteración en el patrón de migración de la muestra con el polimorfismo (flecha roja), el resto de carriles corresponde a muestras de pacientes sin el cambio. El electroferograma muestra el polimorfismo en estado heterocigoto.

**Tabla 8. Características clínicas de los pacientes con los polimorfismos no descritos previamente c.1143C>T, c. 1242C>T y c.129G>A.**

Características	Paciente 153 c.1143 C>T	Paciente 29 c. 1242 C>T	Paciente 73 c.129G>A
Cambio en proteína	p.Ser381Ser	p.Ser414Ser	p.Arg43Arg
Edad actual	2.10 años	4.2 años	5.2 años
Sexo	Masculino	Femenino	Masculino
Disgenesia tiroidea	Ectopia	Ectopia	Ectopia
Facies típica	No	No	No
Fontanela posterior amplia	No	Si	No
Ictericia	No	No	Si
Edema	No	No	No
Macroglosia	No	No	No
Llanto ronco	No	Si	No
Somnolencia	Si	Si	No
Hipotermia	No	No	No
Piel seca o áspera	No	No	No
Hipotonia	Si	No	Si
Hipoactivo	No	Si	No
Polidactilia	No	No	No
Estreñimiento	No	No	Si
Hernia umbilical	No	Si	No

Dificultad respiratoria	No	No	No
Lentitud en ingesta de Alimentos	No	Si	No
Cianosis peribucal	No	No	No
Soplo cardiaco	No	No	No
Pie equino varo	No	No	No
Luxación congénita de cadera	No	No	No

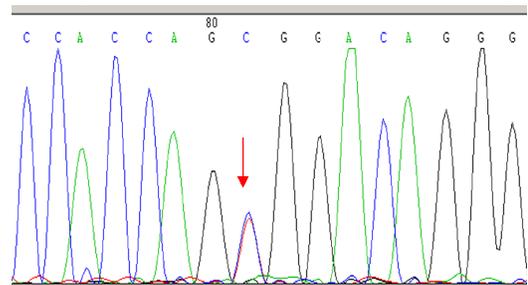
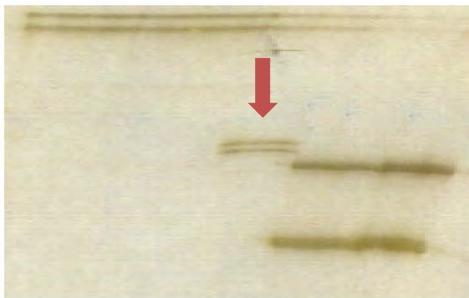


Figura 7a

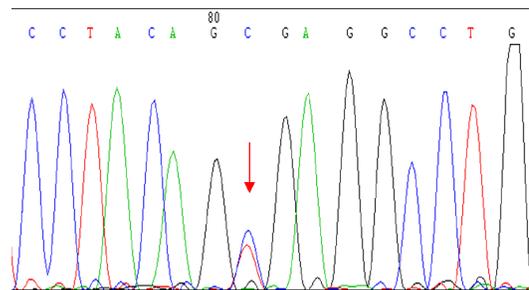


Figura 7b

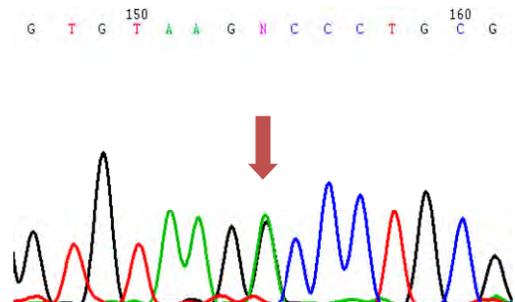


Figura 7c

**Figura 7.** 7a. SSCP y electroferograma del polimorfismo no reportado previamente c. 1143C>T en el exón 9. El SSCP muestra la alteración en el patrón de migración de la muestra con el polimorfismo, los primeros carriles corresponden a muestras de pacientes sin la alteración en el exón 9 y los últimos carriles muestran el patrón de migración normal de otro exon. El

electroferograma muestra el polimorfismo en estado heterocigoto. **7b.** SSCP y electroferograma del polimorfismo no reportado previamente c. 1242C>T en el exón 10. El SSCP muestra la alteración en el patrón de migración de la muestra con el polimorfismo, el resto de carriles corresponde a muestras de pacientes sin la alteración. El electroferograma muestra el polimorfismo en estado heterocigoto. **7c.** SSCP y electroferograma del polimorfismo no reportado previamente c. 129G>A en el exón 8. El SSCP muestra la alteración en el patrón de migración de la muestra con el polimorfismo, el resto de carriles corresponde a muestras de pacientes sin la alteración. El electroferograma muestra el polimorfismo en estado heterocigoto.

## **X. DISCUSIÓN**

En este estudio se analizaron 70 pacientes con diagnóstico de HC secundario a disgenesia tiroidea, de ellos el 78.5% son de sexo femenino y el 21.5% de sexo masculino, lo cual es acorde a lo previamente reportado en poblaciones hispanas donde la frecuencia es mayor en el sexo femenino con una relación de hasta 3:1. En la población analizada en este estudio la mayoría de los pacientes presentó ectopia tiroidea, seguido en frecuencia de agenesia tiroidea, lo cual también es acorde con lo previamente reportado en diferentes poblaciones.

El gen *PAX8* juega un papel fundamental en el desarrollo embrionario de la tiroides y en la regulación de genes específicos de tiroides en la vida adulta. Ratones knockout homocigotos para alelos nulos de *PAX8* desarrollan hipoplasia tiroidea severa, mientras que los heterocigotos han sido descritos como no afectados. En humanos se ha demostrado que las mutaciones con pérdida de función de este gen son sintomáticas en estado heterocigoto. La causa de esta discrepancia, aún no se conoce. En el análisis realizado en este estudio, se encontraron 2 mutaciones en estado heterocigoto, una de ellas previamente reportada por Macchia y cols. (R31H) y la otra aún no reportada (C238R). El paciente con la mutación R31H fue diagnosticado por niveles bajos de TSH en el tamiz neonatal y corroborado por niveles bajos de T4, no presentaba facies característica, sin embargo presentaba otras manifestaciones típicas de H.C. como fontanela posterior amplia, ictericia, llanto ronco, somnolencia, piel seca, hipotonía, estreñimiento y soplo cardiaco. El tipo de disgenesia presentada en nuestro paciente no se tiene registrado en la ficha de identidad.

Macchia y cols. reportaron en 1998 esta mutación, encontrada por análisis molecular del gen *PAX8* en un paciente con diagnóstico de HC por niveles bajos de TSH en el tamiz neonatal, así como niveles bajos de T4. Se realizó estudio de imagen detectando

hipoplasia tiroidea y se estudio al resto de la familia del paciente siendo todos sanos y sin la mutación. Esta mutación se localiza en el exón 2, en el dominio pareado dando como efecto pérdida de la función de la proteína por reducción de unión al DNA. Komatsu y cols. describen una mutación localizada también en la posición 31 (R31C), siendo la arginina de esta posición codificada por el codón CGC; y sugieren que la presencia de mutaciones en esta posición pueden atribuirse a la hipermutabilidad de los dinucleótidos CpG en el genoma humano, proponiendo al codón 31 como un “hot spot”, es decir, un sitio susceptible a mutaciones en el gen *PAX8*. El paciente reportado por Komatsu y cols. fue diagnosticado con H.C. por hipertirotrópinemia en el tamiz neonatal así como niveles bajos de T4. Se realizó ultrasonido cervical detectándose hipoplasia tiroidea severa. La madre de este paciente fue diagnosticada con hipotiroidismo desde los 14 años y su ultrasonido cervical reveló agenesia tiroidea, por lo que se realizó secuenciación directa del gen *PAX8* encontrándose la mutación R31C.

La mutación C238R, reportada por primera vez en este trabajo, se localiza en el exón 6, fuera del dominio pareado. Aún no se ha realizado análisis funcional para determinar el efecto de esta mutación en la función génica, sin embargo creemos que se trata de un cambio patogénico, ya que, además de que la cisteína en la posición 238 en el exón 6 es un aminoácido conservado en otras especies, como el perro, la rata y el ratón; de acuerdo al análisis del programa Pmut es muy probable que sea patogénica, ya que el valor predictivo para este cambio es 0.822 (mayor de 0.5), lo cual predice que se trate de un cambio patogénico; así como el valor de confiabilidad es de 6 lo cual indica un nivel alto de certeza en la predicción. La disgenesia tiroidea que presenta el paciente en quien se encontró esta mutación es un nódulo único sublingual y las manifestaciones clínicas al momento del diagnóstico eran facies típica, fontanela anterior amplia, ictericia, somnolencia y estreñimiento. Se encontraron 2 SNP ya reportados previamente el c.601+51 C>G en el intrón 5 y el c.168T>C en el exón 2, ambos son SNPs de referencia y se encuentran publicados en la base de datos de SNP en NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica). De acuerdo a esta base de datos, el primero de estos ha sido validado como polimorfismo por que presenta una frecuencia >1% en diferentes poblaciones, como en población caucásica, afro-americana, asiática variando las frecuencias de acuerdo a la población estudiada desde 0.759 hasta 0.982.

También se identificaron cuatro cambios puntuales no descritos previamente: el c.885C>T (Y295Y) en el exón 7, el c.1143C>T (S381S) en el exón 9, el c.1242C>T (S414S) en el exón 10 y el c.129G>A (R43R) en el exón 2. Estas 4 variantes producen cambios

sinónimos en la proteína, por lo que son consideradas no patogénicas y fueron buscadas en controles sanos para determinar sus frecuencias y poder clasificarlas como polimorfismos, encontrando que las frecuencias alélicas de los cambios c.1143C>T y c.1242C>T fueron mayores al 1%, correspondiendo a polimorfismos comunes, sin embargo las variantes c.129G>A y c.885C>T no alcanzaron este porcentaje, por lo que se consideran polimorfismos poco frecuentes o variantes raras. En todos los pacientes en los que se encontró algún polimorfismo, no se encontró ninguna mutación. De acuerdo a la base de datos NCBI, el gen *PAX8* es altamente polimórfico, se han descrito más de 150 SNPs en humanos, sin embargo el más reciente polimorfismo agregado a esta base de datos tiene una referencia del año 2005 (Hillier, et al. Nature, 2005), por lo que pareciera que en los últimos años no se han identificado nuevos cambios en este gen.

La frecuencia de mutaciones en el gen *PAX8* en pacientes con HC por disgenesia analizados en el presente estudio fue del 2.9%, lo cual no parece diferir de lo reportado en estudios previos; al igual que lo descrito en estos estudios, las mutaciones se encuentran en estado heterocigoto, lo cual está acorde con el modelo de haploinsuficiencia condicionante de HC secundario a disgenesia tiroidea por mutaciones en *PAX8* y en otras entidades condicionadas por mutaciones en los genes de la familia *PAX*. Estos resultados apoyan tanto el hecho de que las mutaciones en el gen *PAX8* son una causa rara de HC secundario a disgenesia, como el que esta entidad tiene una etiología genéticamente heterogénea; por lo que el estudio molecular de otros genes implicados en el desarrollo y función de la tiroides ayudará a entender la fisiología de esta entidad en nuestra población.

Como se mencionó previamente, el adecuado desarrollo de la glándula tiroides depende, entre otras cosas, de la presencia y función de factores de transcripción como *PAX8*, además de éste se sabe que participan otros factores como *TTF1* y *TTF2*. Mutaciones en estos genes podrían explicar la presencia de HC en otros pacientes de nuestra población en los cuales no se encontró alteración en *PAX8*, por lo que en el Laboratorio de Biología Molecular de nuestro Instituto se ha iniciado el análisis molecular de estos dos genes.

**XI. HOJA DE CAPTACIÓN DE DATOS  
ANÁLISIS CLÍNICO Y MOLECULAR DEL GEN PAX8 EN PACIENTES MEXICANOS CON  
HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO.**

No de FOLIO \_\_\_\_\_ T. S. H. por tamiz \_\_\_\_\_ CORDÓN \_\_\_\_\_ TALÓN \_\_\_\_\_  
 FECHA de TOMA de MUESTRA \_\_\_\_\_ HOSPITAL \_\_\_\_\_  
 Lugar de TOMA de MUESTRA(población) \_\_\_\_\_

NOMBRE DEL NIÑO (A) \_\_\_\_\_  
 FECHA DE NACIMIENTO \_\_\_\_\_ SEXO \_\_\_\_\_ PESO \_\_\_\_\_ TALLA \_\_\_\_\_  
 NOMBRE DE LA MADRE \_\_\_\_\_ EDAD \_\_\_\_\_  
 NOMBRE DEL PADRE \_\_\_\_\_ EDAD \_\_\_\_\_  
 DOMICILIO \_\_\_\_\_ TELEFONO \_\_\_\_\_

**DATOS CLÍNICOS**

FACIES TÍPICA \_\_\_\_\_ FONTANELA POST AMPLIA \_\_\_\_\_ ICTERICIA \_\_\_\_\_ EDEMA \_\_\_\_\_  
 MACROGLOSIA \_\_\_\_\_ LLANTO RONCO \_\_\_\_\_ SOMNOLENCIA \_\_\_\_\_ HIPOTERMIA \_\_\_\_\_  
 PIEL SECA (áspera) \_\_\_\_\_ HIPOTONÍA \_\_\_\_\_ HIPOACTIVO \_\_\_\_\_ POLIDACTILIA \_\_\_\_\_  
 ESTREÑIMIENTO \_\_\_\_\_ HERNIA UMBILICAL \_\_\_\_\_ DIFICULTAD RESPIRATORIA \_\_\_\_\_  
 LENTITUD en la INGESTA de ALIMENTOS \_\_\_\_\_ CIANOSIS PERIBUCAL ó DISTAL \_\_\_\_\_

**PRUEBAS CONFIRMATORIAS**

FECHA de PERFIL TIROIDEO \_\_\_\_\_ EDAD OSEA \_\_\_\_\_ GAMMAGRAMA \_\_\_\_\_

PRUEBA	RESULTADO	Val. Referencia*	PRUEBA	RESULTADO	Val. Referencia*
T3 Total		72-170 ng/dl	T3 Libre		1.8-6.0 pg/ml
T4 Total		4.5-12.5 mg/dl	T4 Libre		0.8-1.9 ng/dl
Tiroglobulina		0.8-55.0 ng/dl	T.S.H.		0.4-4.0 uUI/ml
T B G		13-39 uUI/ml			

\*Valores de referencia por técnica del laboratorio de hormonas del Ins. Nal. de Pediatría.

**RESULTADOS DEL ANALISIS MOLECULAR**

GEN	ALTERACIÓN EN LA MIGRACIÓN EN SSCP	EXÓN	MUTACIÓN	OBSERVACIONES
PAX8				

## **XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Álvarez P., San Juan M., Cordido F. Hipotiroidismo. Guías Clínicas, 2004; 2(29), 1 - 3.
- Arenz S., et al. Intellectual Outcome, Motor Skills and BMI of Children with Congenital Hypothyroidism: A Population-based Study. *Acta Paediatrica*, 2008; 97: 447-450.
- Aronson R., Ehrlich RM, Bailey J.D., Rovet J.F., Grow in children with congenital hypothyroidism detected by neonatal screening. *J. Pediatric*, 1990; 116: 33-37.
- Bamforth J., Hughes I., Lazarus J., Weaver C., Harper P., Congenital hypothyroidism, spiky hair, and cleft palate. *J. Med. Genet*, 26, 49-51.
- Brown A.L., Fernhoff P.M., Milner B.A., Elsas L.S. Racial differences in the birth prevalence of congenital hypothyroidism. *J. Pediatr*, 1981; 99: 934-936.
- Bunevicius R., Kazanavicius G., Zalinkevicius R., Prage A. Effects of thyroxine as compared with thyroxine plus triiodothyronine in patients with hypothyroidism. *N Engl J Med*, 340; 424-429.
- Congdon T., Nguyen L.Q., Noguera C., Habiby R., Medeiros-Neto G., Kopp P. A novel mutation (Q40P) in PAX8 associated with congenital hypothyroidism and hypoplasia: evidence for phenotypic variability in mother and child. *J. Clin Endocrinol Meta*, 2001; 86: 3962-3967.
- Damante G. Thyroid defects due to pax8 gene mutations, *Eur J. Endocrinology*, 1998; 139: 563-566.
- De Felice M. and Di Lauro R. Thyroid development and its disorders: Genetics and molecular Mechanisms, 2004; 25: 722-746.
- De Felice M., Ovitt C., Biffani E., Rodriguez-Mallon A., Arra C., Anastassiadis K., Macchia P., Mattei M., Mariano A., Scholer H., Machia V., Di Lauro R. A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nat Genet*, 19: 395-8.
- De Vijlder, J. Primary congenital hypothyroidism: defects in iodine pathways. *European Journal of Endocrinology*, 2003; 149: 247-256.
- Di Magliano M., Di Lauro R., Zannini M. Pax 8 has a key role in thyroid cell differentiation. *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 2000; 97: 13144-9.
- Esperante S., Rivolta C., Miravalle L., Herzovich V., et al. Identification and characterization of four rare sequence variants (p.T225M, p.L233L, p.G336S and p.A439A) in patients with congenital hypothyroidism and dysgenetic thyroid glands. *Clinical Endocrinology*, 2008; 68: 828-835.
- Frasier S.D., Penny R., Zinder R. Primary congenital hypothyroidism in Spanish-surnamed infants in Southern California. *J. Pediatr.*, 1982; 101: 315
- Gillam, M., Kopp, P. Genetic defects in thyroid hormone synthesis. *Current Opinion in Pediatrics*, 2001; 13: 364-372.
- Grüters, A., Biebermann, H., Krude, H. Neonatal Thyroid Disorders., *Horm Res*, 2003; 59: (suppl1):24-29.
- Klett, M. Epidemiology of congenital hypothyroidism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1997; 105Suppl 4: 19-23.
- Komatsu M., Takahashi T., Takahashi I., Nakamura M., Takada G. Thyroid dysgenesis caused by PAX8 mutation: the hypermutability with CpG dinucleotides at codon 31. *J Pediatr*, 2001; 139: 597-9.
- Kopp, P. Perspective: Genetic Defects in the Etiology of Congenital Hypothyroidism. *Endocrinology*, 2002; 143 (6): 2019-2024.
- Kumar, J., Gordillo R., Kaskel, F., Druschel C., Wooniecki R. Increased Prevalence of Renal and Urinary Tract Anomalies in Children with Congenital Hypothyroidism. *The Journal of Pediatrics*, 2009; 154: 263-6.

Letarte J., Garagorri J.M. Congenital hypothyroidism: laboratory and clinical investigation of early detected infants. En: Coliu J, Ducharme JR, Guyda HS, (eds.). *Pediatric Endocrinology*, 1989. 2nd edition, New York; Raven Press. p 449-471.

Lorey F., Cunningham, G. Birth prevalence of primary congenital hypothyroidism by sex and ethnicity. *Hum Biol*, 1992; 64: 531-538.

Macchia P., Lapi P., Krude H., Pirro M., Missero C., Chiovato L., Souabni A., Baserga M., Tassi V., Pinchera A., Fenzi G., Gruters A., Busslinger M., Di Lauro R. PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid agenesis. *Nat Genet*, 1998; 19: 83-86.

Mansouri A., Chowdry K., and Gruss P. Follicular cells of the thyroid gland require PAX-8 function. *Nature Genetics*, 1998; 19:87-90.

Mathai S., et al. A Novel Therapeutic Paradigm to Treat Congenital Hypothyroidism. *Clinical Endocrinology*, 2008; 69: 142-147.

Meeus L., et al. Characterization of a novel loss of function mutation of PAX8 in a familial case of congenital hypothyroidism with in-place, normal-sized thyroid. *J. Clin Endocrinol Metab*, 2004; 89: 42-85-91.

Mísero, C., Cobellis, G., De Felice, M., et al. Molecular events involved in differentiation of thyroid follicular cells. *Molecular Cell Endocrinol*, 1998; 140 (1-2): 37-43.

Moreno J.C. Fundamentos moleculares del hipotiroidismo congénito *Ann Pediatr*, 2004; 60 (supl2): 36-41.

Moya C., de Nanclares G., Castaño L., Potau N., Bilbao R., Carrascosa, Núñez O. Hipotiroidismo Congénito. *Paediatrica*, 2003; 5(2): 93-100.

Phaik Y., Harun F., Junit S. *The Internet Journal of Endocrinology*, 2007; 3 (2).

Park, S.M. and Chatterjee. Genetics of congenital hypothyroidism. *J. Med. Genet*, 2005; 42: 379-389.

Pezzuti I., et al. Congenital Hypothyroidism: The Clinical Profile of Affected Newborns Identified by The Newborn Screening Program of The State of Minas Gerais, Brazil. *Jornal de Pediatria*, 2009; 85 (1): 72-79.

Robson E., He S., and Eccles M. A Panorama of PAX genes in cancer and development. *Nature Review*, 2006; 6: 52-62.

Rose S., et al. Update of Newborn Screening and Therapy for Congenital Hypothyroidism. *Pediatrics*, 2006; 2290 – 2305.

Rovet J., Daneman D. Congenital Hypothyroidism: A Review of Current Diagnostic and Treatment Practices in Relation to Neuropsychologic Outcome. *Pediatric Drugs*, 2003; 5 (3): 141-49.

Rovet J. Congenital Hypothyroidism: An Analysis of Persisting Deficits and Associated Factors. *Child Neuropsychology*, 2002; 8 (3): 150-162.

Sanctis L., et al. Familial PAX8 Small Deletion (c.989delACCC) Associated with Extreme Phenotype Variability. *The J. Clin. Endocrinol Metab*, 2004; 89: 5669-74.

Setian N. Hypothyroidism in Children: Diagnosis and Treatment. *Jornal de Pediatria*, 2007; 83-05 Supp/ S209.

Solís, J., Valverde, C. *Revista de Investigación Clínica*, 2006; 58 (4): 318-334.

Sura, S., Augre, J., Mattei, G., et al. PAX8, TITF1, and FOXE1 gene expression patterns during human development : New insights into human thyroid development and thyroid dysgenesis-associated malformations. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2005; 90(1): 455-462.

Taji E., Biebermann H., Límanová O., Hníková 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. *European Journal of Endocrinology*, 2007; 156: 521-529.

Tonacchera M., Banco M.E., Di Cosmo C., Agretti P., De Marco G., Ferrarini E., Ordookhani A., Perri A., Chiovato L., Santini F., Vitti P., and Pinchera A. Genetic analysis of the PAX8 gene in children with congenital hypothyroidism and a novel sequence variant. *Clinical Endocrinology*, 2007; 67: 34-40.

Toublanc J. Comparison of epidemiological data on congenital hypothyroidism in Europe with those of other parts of the world. *Horm Res*, 1992; 38: 230-235.

Van Vliet G. Development of the thyroid gland: lessons from congenitally hypothyroid mice and men. *Clin Genet*, 2003; 63: 445-455.

Vela M., Hernández C., Gamboa S., et al. Hipertirotropinemia en recién nacidos mexicanos. *Salud Pública de Méx.*, 2003; 45 (4): 269-275.

Vela-Amieva M., Gamboa-Cardiel-S., Pérez-Andrade M., Ortiz J., Ortega V. Epidemiología del Hipotiroidismo Congénito. *Salud Pública de México*, 2004; 46(2): 141-147.

Verter P., Buitendijk S., Verloove S. Congenital hypothyroidism screening and the cutoff for thyrotropin measurement: recommendations from the Netherlands. *Am. J. Public Health*, 1993; 83: 868-871.

Vilain C., Rydlewski C., Duprez L., Heinrichs C., Abramowicz M., Malvaux P., et al. Autosomal dominant transmission of congenital thyroid due to loss-of-function mutation of PAX8. *J. Clin. Endocrinol Metab*, 2001; 86: 234-8.

Vogiatzi M.G., Kirkland J.L. Frequency and necessity of thyroid function tests in neonates and infants with congenital hypothyroidism. *Pediatrics*, 1997; 100: E6.

Vono J. and Kopp P. Thyroglobulin Gene Mutations and Other Genetic Defects Associated With Congenital Hypothyroidism. *Arq Bras Endocrinol Metab*; 48: 70-82.

Web: <http://www.hormone.org>. The Hormone Foundation.