



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA DIVISION DE  
ESTUDIOS DE POSGRADO  
SECRETARIA DE SALUD**

**INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

**CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES Y POLIMORFISMOS EN EL GEN  
NKX2.5 EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON SÍNDROME  
DE DOWN Y DEFECTOS DE SEPTACIÓN CARDIACA**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**ESPECIALISTA EN PEDIATRÍA**

**P R E S E N T A:**

**DR. RODRIGO MORALES TOQUERO**

**TUTOR DE TESIS:**

**DR. MIGUEL ANGEL ALCÀNTARA ORTIGOZA**

**CO-TUTOR DE TESIS:**

**DRA. ARIADNA ESTELA GONZÁLEZ DEL ANGEL**



**MÉXICO 2012**



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.



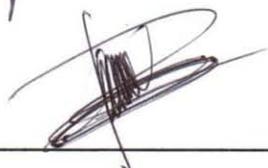
---

DR. ALEJANDRO SERRANO SIERRA  
DIRECTOR GENERAL  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE  
ESPECIALIZACIÓN EN PEDIATRÍA



---

DR. JOSÉ NICOLÁS REYNÉS MANZUR  
DIRECTOR DE ENSEÑANZA



---

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



---

DRA. ARIADNA ESTELA GONZÁLEZ DEL ÁNGEL  
TUTOR DE TESIS  
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA  
DOCTORA EN BIOMEDICINA MOLECULAR  
SUBDIRECTORA DE INVESTIGACIÓN MÉDICA



---

DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA  
CO-TUTOR DE TESIS  
INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS  
JEFE DE LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA HUMANA



## AGRADECIMIENTOS

- A mis **Padres Esther Chaparro Gómez y Juan Cristóbal Godínez Dávalos** que admiro y agradezco todo el apoyo y amor incondicional que me han brindado en mi vida. Gracias por ser mi soporte, mi seguridad, mi ejemplo a seguir y el gran motor que me impulsa a superarme cada día de mi existencia.
- A la **Dra. Ariadna González del Ángel** que fue el pilar fundamental de la realización de este proyecto. Estoy muy agradecido por todo el apoyo, orientación, dedicación, disciplina, entrega y tiempo que me brindo en este trabajo.
- Al **Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza** por haberme permitido formar parte de este proyecto, su tiempo y apoyo en la obtención de resultados y la dedicación en la realización de este proyecto.
- Al Instituto Nacional de Pediatría que por medio de sus Maestros, Pacientes, Residentes, Enfermeras y toda la gente que colabora en esta institución, me dieron las bases para mi formación Académica en Pediatría.

## ÍNDICE

RESUMEN	5
I. MARCO TEÓRICO	7
II. JUSTIFICACIÓN	13
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
IV. OBJETIVO	14
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	14
1. Búsqueda de mutaciones en <i>TTF-2</i>	15
2. Clasificación de la Investigación	16
3. Universo de estudio	17
4. Variables	17
5. Tamaño de la muestra	19
6. Análisis estadístico	19
7. Consideraciones éticas	19
VII. RESULTADOS	19
VIII. DISCUSIÓN	26
BIBLIOGRAFIA	35

# ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN *TTF-2* EN PACIENTES CON HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO POR DISGENESIA.

## AUTORES

**Tesista:** Dr. Rodrigo Morales Toquero

**Tutor:** Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza, Investigador en Ciencias Médicas, Jefe del Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Genética Humana (INP).

**Co-tutor:** Dra. Ariadna Estela González del Angel, Especialista en Genética Médica, Doctora en Biomedicina Molecular, Subdirectora de Investigación Médica del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

## RESUMEN

**Introducción:** El hipotiroidismo congénito (HC) es un defecto al nacimiento que requiere ser detectado y tratado en los primeros días de vida, para evitar discapacidad y muerte. México cuenta con una elevada prevalencia al nacimiento de HC; existen datos que señalan que en nuestro país se presenta hasta en 1 de cada 1000 recién nacidos, a diferencia del resto del mundo que registra 1 caso por cada 2000 o 3000 recién nacidos.

**Justificación:** La explicación de la mayor ocurrencia de este defecto entre nuestra población no se conoce, sin embargo, se ha propuesto la participación de factores ambientales y la intervención de factores genéticos relacionados al HC. El factor de transcripción *TTF-2* participa en el desarrollo de la tiroides, siendo su mecanismo de acción muy complejo. Se han descrito 5 mutaciones que inactivan la acción del Factor Transcripcional (FT) *TTF-2*, además, algunos estudios realizados en el tracto de polialaninas del gen *TTF-2* observaron que la variabilidad en el tamaño de este tracto

podría modular de manera diferencial el desarrollo de la tiroides. Los datos anteriores indican que *TTF-2* podría ser un gen candidato cuyas mutaciones y polimorfismos sean responsables de algunos casos de HC en pacientes mexicanos; el análisis de este gen podría ayudar a conocer mejor el origen de la enfermedad y su posible impacto en el fenotipo.

**Objetivos:** Identificar mutaciones y polimorfismos en el gen *TTF-2* en pacientes mexicanos con diagnóstico confirmado de HC secundario a disgenesia tiroidea así como describir el fenotipo clínico y bioquímico de los pacientes identificados con mutaciones caracterizadas.

**Material y método:** El estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del INP con un diseño clínico, transversal y descriptivo. Se incluyeron 35 pacientes mexicanos con diagnóstico confirmado de HC por disgenesia, se obtuvieron muestras de sangre periférica de los pacientes para la extracción y análisis del DNA. La búsqueda de mutaciones en el gen *TTF-2* se realizó mediante amplificación en cadena de la polimerasa, análisis mediante SSCP y secuenciación automática. Se hizo la revisión de expedientes clínicos para registrar las variables clínicas o malformaciones presentes en los pacientes.

**Resultados:** De los 35 pacientes incluidos en el estudio, 27 casos (77.1%) son mujeres y 8 hombres (22.9%). La etiología del HC fue nódulo sublingual único en 21 pacientes (60%) y agenesia tiroidea en 14 pacientes (40%). En ningún paciente fue identificada una mutación patológica pero si se identificaron 5 polimorfismos tipo SNP en 10 pacientes, 3 previamente reportados en la literatura: rs3021523 (en 1 paciente en estado heterocigoto y 2 pacientes en estado homocigoto), rs3021524 (en un paciente en estado homocigoto), y rs302156 (en 8 pacientes en estado heterocigoto); se identificaron 2 polimorfismos no reportados en literatura: c.608C>G en un paciente en estado homocigoto y c.990C>T en un caso en estado heterocigoto.

**Conclusiones:** A pesar de que el tamaño de muestra analizado es pequeño, no se identificaron mutaciones patológicas por lo que se requieren mayores estudios para determinar la participación del gen *TTF-2* como causal o predisponente al desarrollo de Hipotiroidismo Congénito en nuestra población, así como analizar otros genes candidatos que participan en el desarrollo de la glándula tiroides.

# CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES Y POLIMORFISMOS EN EL GEN NKX2.5 EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON SÍNDROME DE DOWN Y DEFECTOS DE SEPTACIÓN CARDIACA.

## I. MARCO TEÓRICO

### **Aspectos generales y genéticos de las cardiopatías congénitas en el Síndrome de**

**Down:** Las aberraciones cromosómicas de tipo estructural o numérico comúnmente condicionan cardiopatías congénitas (CHD). Se estima que el 12-13.4% de los recién nacidos vivos con una malformación cardíaca en realidad forma parte del espectro clínico de una cromosomopatía subyacente (Lin et al, 2006). De igual forma, un paciente con cromosomopatía presenta 120 veces más riesgo de tener una CHD y una tercera parte de los neonatos con CHD, presentan otras malformaciones o en realidad son parte de una entidad sindrómica (Piacentini et al, 2007). Se ha estimado que hasta el 79.4% de las CHD atribuibles a cromosomopatía se deben a trisomía 21, la microdeleción de 22q11.2 y la trisomía 18 (Lin et al, 2006), sin embargo la CHD presente en estos síndromes, por lo general no es única o específica de cada una de las aneuploidías o de la aneusomía segmentaria 22q11.2. (Lin et al, 2006)

La trisomía 21 o síndrome de Down (DS) es la aneuploidía compatible con la vida más frecuente del ser humano y existe un afectado por cada 750 recién nacidos vivos. Se le considera la principal causa genética de CHD y la causa definida más frecuente de los defectos de septación atrio-ventricular (AVSD) (Barlow et al, 2001). Se sabe que un 40-60% de los pacientes con DS presentan algún tipo de CHD (de Rubens et al, 2003) y es la principal causa de mortalidad de estos pacientes durante los primeros dos años de vida (Rodríguez et al, 1984). Datos recientes arrojados por la cohorte de 1,469 pacientes con DS del National Down Syndrome Project de Atlanta (Freeman et al, 2008), indican que el 44.2% de los pacientes con DS de origen caucásico, afroamericano e hispanico presentan algún tipo de CHD. En nuestro país, existe un número limitado de publicaciones que indiquen la frecuencia de CHD en DS, sin embargo de Rubens y cols., en 2003 reportaron que el 58% de los pacientes con DS captados en el Instituto Nacional de Pediatría presentan CHD, situación similar observada en una población de origen guatemalteco y donde se observó que un 54% de los pacientes con DS cursan con CHD (Vida et al,

2005). En población francesa y sueca, se ha reportado una frecuencia de CHD en DS de sólo 23 y 32%, respectivamente (Kallen et al, 1996). Estas diferencias en la frecuencia de CHD en DS y la explicación al hecho de que sólo el 40-60% de los pacientes con DS desarrollen CHD, aún se desconocen, pero podrían involucrar la participación de factores genéticos y ambientales aún no bien caracterizados (Antonarakis et al, 2004; Roper et al, 2006; Torfs et al, 1997; Romano et al, 2001; Shermna et al, 2007; Freeman et al, 2008).

La mayoría de las CHD en DS son atribuibles a defectos en la septación cardiaca. Tradicionalmente se ha estimado que las CHD más frecuentemente asociadas al síndrome de Down son los AVSD (45%) debidos a alteraciones en el desarrollo de las almohadillas endocárdicas que conducen a un canal atrio-ventricular completo o incompleto (comunicación interauricular tipo *ostium primum*), seguido de los defectos septales interventriculares (VSD) (2/3) y musculares (1/3) interventriculares (VSD) (35%), los defectos septales interauriculares (ASD) tipo *ostium secundum* (8%), la tetralogía de Fallot (4%), la persistencia de conducto arterioso (PDA) (7%), entre otras CHD (1%) (Freeman et al, 2008:21). De hecho, se estima que el 66-70% de los AVSD se presentan en pacientes con trisomía 21 (Freeman et al, 2008). Así se ha calculado que los pacientes con DS tienen un riesgo relativo (RR) de 550-1,009 para presentar canal atrio-ventricular de tipo completo (Torfs et al, 1998; Kerstann et al, 2004; Cassidy et al, 2005).

**Factores ambientales asociados al desarrollo de cardiopatías congénitas en pacientes con Síndrome de Down:** Se estima que un 2 a 4% de las CHD se atribuyen a agentes teratogénicos. De estos, la diabetes mellitus y la fenilcetonuria materna, cumarínicos, talidomida, antimetabolitos, anticomiciales, alcoholismo y tabaquismo materno, han sido plenamente identificados como condicionantes de CHD. De forma contraria, la suplementación preconcepcional con ácido fólico ha demostrado, prevenir el desarrollo de CHD (Lin et al, 2006). Así, tres estudios clínicos aleatorizados, sugieren que la ingesta pre-concepcional de ácido fólico, reducen en un 25-50% la ocurrencia de CHD, especialmente las atribuibles a defectos del cono troncales (Botto et al). De igual forma, un meta-análisis confirmó que el consumo conjunto pre-concepcional de ácido fólico y multivitamínicos es un factor de protección contra CHD en estudios de casos y controles (OR 0.78, 95% CI 0.67-0.92) y en estudios de cohortes o aleatorizados controlados (OR 0.61, 95% CI 0.40-0.92) (Goh et al, 2006). Estos antecedentes han estimulado investigaciones tendientes a la identificación de factores ambientales asociados a CHD en

productos con DS. El tabaco aunque está plenamente identificado como un agente teratógeno (defectos de cierre de tubo neural, fisuras labio-palatinas), trofógeno (bajo peso al nacimiento) y hadágeno (retraso psicomotor) (Shaw et al, 1996), se considera como un factor de riesgo aún controversial para el desarrollo de CHD en DS (Torfs et al, 1999; Romano et al, 2001, Sherman et al, 2007). El estudio de Torfs et al, reveló que el tabaquismo materno confiere un odds ratio (OR) de 2.0 (95% CI 1.2-3.2) para CHD en DS y particularmente para AVSD (OR 2.3; 95% CI = 1.2-4.5), tetralogía de Fallot (OR 4.6; 95% CI = 1.2-17.0) y para ASD sin VSD (OR 2.2; 95% CI = 1.1-4.3). Recientemente, también se documentó un riesgo elevado (OR 11.8; 95% CI 2.6-53.3) para CHD en fetos sin DS de mujeres fumadoras que además portan un genotipo homocigoto para la variante termolábil de la enzima metileno-tetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) (Hobbs et al, 2006). Este último estudio podría apoyar la participación del tabaco como un factor de riesgo ambiental aditivo al factor de riesgo genético (trisomía 21 y/o genotipo homocigoto termolábil *MTHFR*) para la ocurrencia de CHD en DS.

Otros autores han investigado la exposición de agentes ambientales en etapas tempranas de la gestación como factores de riesgo para CHD en DS, sin embargo a continuación se describen hallazgos que sólo se han reportado en una ocasión, por lo que se requiere de más estudios como para ser considerados como factores ambientales que realmente inciden en un mayor riesgo para CHD en pacientes con DS, (Mokhtar et al, 2001). Se analizaron las exposiciones ambientales de las madres de 514 niños no relacionados con DS y mediante análisis múltiple de regresión logística, su estudio demostró los siguientes factores asociados a CHD en DS: a) uso de antibióticos durante la gestación, b) uso de anticonceptivos orales y c) diabetes materna, éste último, es un conocido factor teratógeno materno para CHD aislada e incluso para AVSD aislado (OR=20.6; 95% CI 5.6–76.4) (Loffredo et al, 2001). The Baltimore-Washington Infant Study Group (Correa et al, 1996) reportó asociaciones significativas entre las CHD de DS y algunas exposiciones laborales, tales como a) joyería y ASD (OR 12.6, 95% CI 2.3-68.6) y VSD membranoso (OR 8.1, 2-33.3); b) Soldadura y defecto de almohadillas endocárdicas (OR 1.8, 1.1-3.0); c) contacto con plomo y atresia de la arteria pulmonar (OR 2.3; 1.1-4.9); d) radiación ionizante y defecto de almohadillas endocárdicas (OR 5.6; 1.7-17.9); cabe mencionar que la exposición paterna a radiación ionizante también se ha reportado como factor de riesgo para AVSD aislado (OR=5.1; CI 1.4–27.4) (Loffredo et al, 2001); e) pintura con coartación de la aorta (OR 3.5, 1.5-8.0) y VSD muscular (OR 3.5; 1.5-8.5); f) pintura y

corazón izquierdo hipoplásico, aunque esta asociación sólo se observó en casos de DS provenientes de familias con antecedentes familiares de CHD. El uso de antitusivos también se ha reportado como un factor de riesgo para AVSD aislado (OR=8.8; CI 1.2–48.2) (Loffredo et al, 2001). En el National Down Syndrome Project de Atlanta (Freeman et al, 2008) no encontró asociación entre el bajo peso al nacimiento de la población afroamericana e hispana como factor de riesgo para AVSD, lo cual podría sugerir al menos en este estudio, que el estatus nutricional prenatal podría no ser un factor ambiental de riesgo para desarrollar CHD.

Finalmente, la existencia de una menor presión del O<sub>2</sub> atmosférico a mayores altitudes se ha postulado como un factor ambiental para explicar la mayor frecuencia de PDA en DS mexicanos (de Rubens et al, 2003). Dada la participación de factores ambientales, en estudios donde se busca entender el componente genético de la CHD y DS, idealmente debería considerarse la exposición prenatal de la madre a teratógenos asociados al desarrollo de CHD en DS, aunque esto no suele referirse en los estudios genéticos (Kerstann et al, 2004; Maslen et al, 2006; Freeman et al, 2008).

### **Generalidades y aspectos genéticos de los defectos de almohadillas endocárdicas**

**o septales atrio-ventriculares en pacientes con Síndrome de Down:** Los términos "defectos de almohadillas endocárdicas", "defecto de septación atrio-ventricular" (AVSD) y "canal atrio-ventricular" (CAVC) son términos indistintos que describen una formación incompleta de las válvulas mitral y tricúspidea, la porción anterior del tabique auricular (defecto *ostium primum*) y la parte posterior del tabique ventricular (Adelfinger G, 2008); estos defectos condicionan una válvula común atrio-ventricular y una deficiencia variable en el flujo de entrada ventricular (Calabro et al, 2006). Estos defectos ocurren alrededor del día 32 y 33 y se deben al desarrollo incompleto del tejido mesenquimatoso que conforma las 4 almohadillas endocárdicas necesarias para la formación de un corazón de 4 cámaras (Adelfinger G, 2001). Esta malformación puede clasificarse en AVSD parcial, transicional o completo, este último es la forma más severa y consiste en una gran comunicación interauricular tipo *ostium primum*, un defecto septal interventricular grande y una válvula común atrio-ventricular conformada por 5 valvas (Gruber et al, 2004; Calabro et al, 2006). El canal atrio-ventricular completo se diagnostica por la clínica al encontrar datos de insuficiencia cardíaca sin cianosis, con presencia de soplo holosistólico en mesocardio, murmullo de regurgitación atrio-ventricular, 2° ruido intenso secundario a

hipertensión arterial pulmonar. En la radiografía de tórax se puede apreciar cardiomegalia e hiperflujo pulmonar. El electrocardiograma muestra un eje de AQRS desviado a la izquierda generalmente a -30 grados y al cuadrante superior, con crecimiento biventricular. La desviación del eje a la izquierda en el electrocardiograma se debe a la unión atrio-ventricular anormal que conduce a un desplazamiento del nodo atrio-ventricular, ello además predispone a los pacientes a bloqueos atrio-ventriculares. La evaluación por ecocardiografía se considera el estándar de referencia para confirmar el diagnóstico de AVSD, ya que además permite su correcta clasificación de acuerdo a los datos anatómicos. Así, este estudio muestra con detalle el defecto interatrial *ostium primum* característico del canal atrio-ventricular completo, los datos anatómicos de las 5 valvas que conforman la válvula atrio-ventricular común y el defecto interventricular en la porción de entrada. La pronta corrección quirúrgica del CAVC es imperativa para prevenir secuelas irreversibles derivadas de las severas alteraciones hemodinámicas, que conllevan al deceso del 50% de los pacientes no tratados quirúrgicamente durante el primer año de vida (Calabro et al, 2006).

El AVSD conforma del 47% al 75% de las CHD en DS de ascendencia caucásica (21, Piacentini et al, 2007; Freeman et al, 2008) y por lo general corresponden a las formas completas (Freeman et al, 2008), sin embargo, cada vez es mayor la evidencia que la distribución de las CHD en DS, especialmente los AVSD, varían ampliamente de acuerdo a la población estudiada (Rodriguez et al, 1984; Granzotti et al, 2000; de Rubens et al, 2003; Vida et al, 2005; Freeman et al, 2008). En una serie de pacientes no caucásicos con DS, las CHD más frecuentes en pacientes mexicanos fueron ASD tipo *ostium secundum* (24%) y los VSD perimembranosos (22%) (de Rubens et al, 2003), mientras que en pacientes con DS guatemaltecos fue la PDA (28.6%) y el VSD (27.5%) (Vida et al, 2005). De manera notable, los casos de DS con AVSD conformaron sólo el 9.5% de las CHD en pacientes guatemaltecos (Vida et al, 2005), el 6% en pacientes mexicanos (de Rubens et al, 2003) y apenas el 4.5% en pacientes portugueses (Vida et al, 2005). Estas cifras son similares a lo reportado en la cohorte del National Down Syndrome Project de Atlanta, donde sólo el 7.2% de la población con DS de origen hispanico (referidos como Mexicanos y Centroamericanos) muestra canal atrio-ventricular completo (Freeman et al, 2008), por lo que el ser de etnia hispana se identificó como un factor de protección para el desarrollo de AVSD en DS (OR ajustado, 0.48; 95% CI, 0.30-0.77), pero por otro lado y en concordancia por lo reportado en población mexicana y guatemalteca (de Rubens et al,

2003; Vida et al, 2005), ello confiere un ligero incremento en el riesgo para desarrollar ASD (tipo *ostium secundum*) y VSD en comparación con la población caucásica (OR, 1.23; 95% CI, 0.85-1.79) (Freeman et al,2008).

El AVSD también se ha descrito en trisomía 9, 13 y 18, los síndromes 3p-, 8p-, y con menos frecuencia en otras aberraciones cromosómicas estructurales y síndromes monogénicos (Tennstedt et al, 1999; 26; Calabro et al 2006; Piacentini et al, 2007). Las formas no sindrómicas de AVSD tienden a ser del tipo parcial; pueden presentar un modo de herencia multifactorial con agregación familiar o ser heredado como un rasgo autosómico dominante con heterogeneidad de *locus*, penetrancia incompleta y expresividad variable (Sheffield et al, 1997; Robinson et al, 2003; Sarkozy et al, 2005). Se ha calculado un riesgo de recurrencia empírico de hasta el 14.3% (intervalo 9.6-15%) para la descendencia de mujeres con ASVD, una cifra que supera los riesgos calculados para la mayoría de CHD multifactoriales (1-6%) (Zittergruen et al, 1995; Romano et al, 2001; Lin et al, 2006). De hecho, existen reportes de casos de pacientes con DS y ASVD completo que han nacido de madres con ASVD parcial, o de medios hermanos, ambos con AVSD completo, pero uno con DS y el otro sin DS (Loffredo et al, 2001). Lo anterior hace suponer la participación de uno o pocos *loci* de alta predisposición o susceptibilidad para el desarrollo de AVSD y un modelo de herencia poligénico u oligogénico para esta malformación.

**Generalidades y aspectos genéticos de los defectos inter-ventriculares e inter-auriculares en los pacientes con Síndrome de Down:** Los defectos de septación auricular (ASD) se clasifican en cuatro categorías: a) tipo *ostium secundum*, originado por un defecto en el *septum primum*; este comprende el 80% de todas los ASD y el 10% de las CHD; b) tipo *ostium primum*, originado por un defecto en el *septum secundum* y comprende el 10% de todas los ASD; c) seno venoso que es un defecto en la desembocadura de la rama derecha del seno venoso; d) seno coronario que es un defecto en la desembocadura de la rama izquierda del seno venoso. Los ASD comprenden el 10% de todas las cardiopatías congénitas (Gruber et al, 2004). En general y en ausencia de otras patologías cardíacas, los ASD suelen ser asintomáticos a menos que tengan un diámetro igual o mayor 10 mm que condicionen un corto-circuito significativo de izquierda a derecha, que a la larga condicione a su vez una dilatación de cavidades derechas. El ecocardiograma transtorácico permite: estimar la magnitud del

defecto, distinguir los defectos tipo *ostium primum* de los defectos tipo *ostium secundum*, determinar la magnitud del corto-circuito izquierda-derecha e incluso si existe un retorno venoso pulmonar anómalo. Los defectos septales interventriculares (VSD) se pueden clasificar de acuerdo a su localización y extensión en: membranosos o perimembranosos, infracrestales o tipo II (la variante más frecuente y presente en el >80% de todos los casos), conoventriculares, supracrestales o tipo I (5-7% de los casos), defectos atrio-ventriculares o tipo III (5-8% de los casos) que pueden considerarse AVSD parciales y los VSD musculares o tipo IV (Lin et al, 2006). Se ha demostrado que el proceso de septación interventricular requiere la participación del tejido mesenquimatoso del tubo cardiaco y del tejido derivado de las crestas neurales (Gruber et al, 2004). Dependiendo de la extensión del VSD y del compromiso hemodinámico (cortos circuitos de izquierda a derecha), este tipo de defectos suelen sospecharse por la exploración clínica, la cual puede indicar datos de insuficiencia cardiaca, sin cianosis y soplo holosistólico en mesocardio irradiado en "barra". La radiografía de tórax puede mostrar cardiomegalia de grado variable e hiperflujo pulmonar; el electrocardiograma puede mostrar desviación del eje AQRS a la derecha y crecimiento del ventrículo derecho o de ambos ventrículos. El ecocardiograma transtorácico, bidimensional, espectro en color demuestra la extensión, localización, la coexistencia de otras lesión cardiacas asociadas y los datos hemodinámicos del VSD.

**Gen NKX2.5:** Gen expresado en el mesodermo cardiaco, que participa en la septación interauricular y cuyas mutaciones se han descrito en ASD no sindromáticos, en ocasiones acompañados de diferentes grados de bloqueo AV. El gen tipo homeobox *NKX2.5* (5q34) consta de 2 exones, transcribe a un mRNA de 1.53 kb y se traduce en un factor de transcripción tipo homeodominio *NKX2.5*, parálogo al gen *tinnman* que en su versión mutada genera ausencia del vaso dorsal en *Drosophila*, una estructura equivalente al corazón en vertebrados (Gruber, et al, 2004). La mayoría de las mutaciones reportadas del gen *NKX2.5* han sido en el homeodominio, una parte crítica de la proteína que interactúa con el ADN, la cual ha sido asociada con alteraciones septales así como anomalías de conducción cardiaca (Gioli-Pereira et al, 2008). La proteína codificada por el gen *NKX2.5* de 324 aminoácidos, tiene 6 dominios dentro de los cuales destacan el de unión al DNA u "homeodominio", el dominio NK-2 y carboxi-terminal que permite la homodimerización y heterodimerización con otros factores (ejem. GATA4 y TBX5) que activan o inhiben la transcripción (Kasahara et al, 2000), además su función es esencial para el desarrollo y

mantenimiento del nodo atrio-ventricular (AV) (Watanabe et al, 2002; McElhinney et al, 2003; Adelfinger G, 2008). Las mutaciones de este gen que codifica en factor de transcripción cardíaco, ha sido identificado en pacientes con defectos del septum atrial y ventricular, así como alteraciones de conducción en particular del nodo auriculo ventricular, las fibras de Purkinje a expensas de hipocelularidad, y alteraciones en la expresión de los canales de calcio condicionando alteraciones electrofisiológicas con respecto al automatismo del miocito, (Meysen et al, 2007; Wang et al, 2007). Mutaciones amorfas en estado heterocigoto en la secuencia de *NKX2.5*, particularmente aquellas que afectan el homeodominio, se han identificado en casos familiares con herencia autosómico dominante, penetrancia incompleta y expresividad variable manifestada por diversas CHD dentro de las cuales destacan las de tipo ASD tipo *ostium secundum* con alteraciones electrocardiográficas consistentes en diferentes grados de bloqueo AV (Benson et al, 1999; Watanabe et al, 2002; McElhinney et al, 2003; Elliot et al, 2003; Pabst et al, 2008) y otras CHD menos frecuentes como la tetralogía de Fallot (Benson et al, 1999; Sarkozy et al, 2005; Adelfinger G, 2008). Se ha descrito que las mutaciones de origen somático en los dominios de unión del *NKX2.5* han sido asociados específicamente con defectos del tabique auriculo ventricular o defectos del septum ventricular, (Gioli-Pererira et al, 2008; Peng et al, 2010). De igual forma mutaciones en el gen *NKX2.5* se han identificado en el <1-9% de CHD aisladas de casos únicos atribuibles a defectos de septación auricular o ventricular con o sin bloqueo AV y también en defectos de septación tronco-conales (Ikeda et al, 2002; McElhinney et al, 2003; Draus et al, 2009). Respecto a la relación fenotipo-genotipo, aparentemente las mutaciones que no involucran el homeodominio de *NKX2.5* condicionan CHD aisladas pero sin bloqueo AV (McElhinney et al, 2003).

## II. JUSTIFICACIÓN

El síndrome de Down (DS) es la aneuploidía más frecuente del ser humano. Las CHD son el principal factor que determina la sobrevivencia de los pacientes con DS en los primeros años de vida. Los mecanismos genéticos y ambientales asociados a la CHD en DS se desconocen hasta el momento. El actual estudio propone que la presencia de mutaciones en el gene *NKX2.5* podría explicar la etiología de algunos casos de DS con CHD en población mexicana. La caracterización de un defecto molecular en los pacientes estudiados, contribuirá con información relevante acerca de la etiología de las CHD en pacientes mexicanos con DS, así mismo brindará argumentos para definir la relación existente con el fenotipo observado, pues éste último aspecto no ha sido del todo delineado. Además, consideramos que los resultados del presente trabajo constituiría un marco de referencia para más adelante iniciar estudios prospectivos en población con cardiopatías congénitas aisladas y donde se determine la frecuencia de mutaciones en los genes analizados y el efecto fenotípico condicionado.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A diferencia de lo que ocurre con el canal AV y el gen *CRELD1*, a la fecha no hay estudios que aborden la relación de otros genes con los defectos de septación ventricular, auricular y el Síndrome de Down.

### IV. OBJETIVO

Caracterizar las posibles mutaciones y polimorfismos en el gen, *NKX2.5* en pacientes mexicanos con síndrome de Down y diagnóstico cardiológico y ecocardiográfico de defecto septal auricular (ASD) tipo *ostium secundum* y/o defecto septal ventricular (VSD) membranoso o perimembranoso.

### V. MATERIAL Y MÉTODOS

#### Tipo de estudio

Estudio clínico, prospectivo, descriptivo y transversal. El presente proyecto ha sido aprobado por los comités de ética y científico, bajo el número de registro 1712010

#### Estrategia

Los pacientes elegibles con DS se captarán a través de los servicios de Genética y Cardiología Pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud. Serán evaluados por el Servicio de Cardiología Pediátrica para exploración cardiológica y realización de ecocardiograma bidimensional transtorácico en tiempo real para definir ausencia o clasificación de CHD. El servicio de Genética realizará una historia clínica completa y una anamnesis de exposición a teratógenos durante embarazo en las madres de los pacientes elegibles con DS. Se incluirán los pacientes con DS que tengan cariotipo con trisomía 21 regular; en aquellos casos con DS que no tengan cariotipo el cual es parte de su manejo habitual en el Departamento de Genética, se les realizará el estudio citogenético en linfocitos de sangre periférica en el Laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría y sólo se invitarán a participar en el presente estudio a los pacientes que tengan un cariotipo con trisomía 21 regular. A todos los pacientes se les brindará un asesoramiento genético de acuerdo al resultado de cariotipo y se continuará su seguimiento habitual en la consulta externa de Genética. El estudio molecular de las familias se realizará en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría. El servicio de secuenciación

automatizada se hará a través del servicio externo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM.

### Población elegible

Pacientes con diagnóstico de síndrome de Down canalizados a través de los servicios de Cardiología y Genética del Instituto Nacional de Pediatría.

### **Criterios de selección**

Criterios de inclusión:

1. Pacientes con síndrome de Down con cariotipo trisomía 21 regular.
2. Hombres o mujeres, de cualquier edad.
3. Que hayan nacido en México, cuyos padres y abuelos paternos y maternos también hayan nacido en México.
4. Pacientes con DS de la población objetivo cuyos padres o representantes legales autoricen su inclusión en el estudio mediante firma de carta de consentimiento informado.
5. Pacientes con diagnóstico de síndrome de Down y con cardiopatía congénita de tipo defecto septal interauricular tipo *ostium secundum* o interventricular membranoso o perimembranoso, confirmado por evaluación cardiológica y ecocardiográfica.

Criterios de exclusión:

1. Pacientes con cardiopatías congénitas complejas donde coexistan ASD, VSD o AVSD con otro tipo de CHD conotruncales.
2. Temporalmente pacientes con DS que hayan sido transfundidos en un periodo menor a tres meses

### **Tamaño de la muestra y reporte de resultados**

De acuerdo al porcentaje de detección de mutaciones en los genes *NKX2.5*, condicionantes de CHD aisladas, referido en la literatura, el cálculo del tamaño de muestra se realizó mediante la prueba exacta de Fisher usando la transformación inversa del seno, con un error tipo I o alfa de 0.05, un error tipo II o beta de 0.99.

Tamaño de muestra: 47 pacientes con trisomía 21 regular y con CHD de tipo defecto septal interauricular (ASD) tipo *ostium secundum* o defecto septal interventricular (VSD) membranoso o perimembranoso.

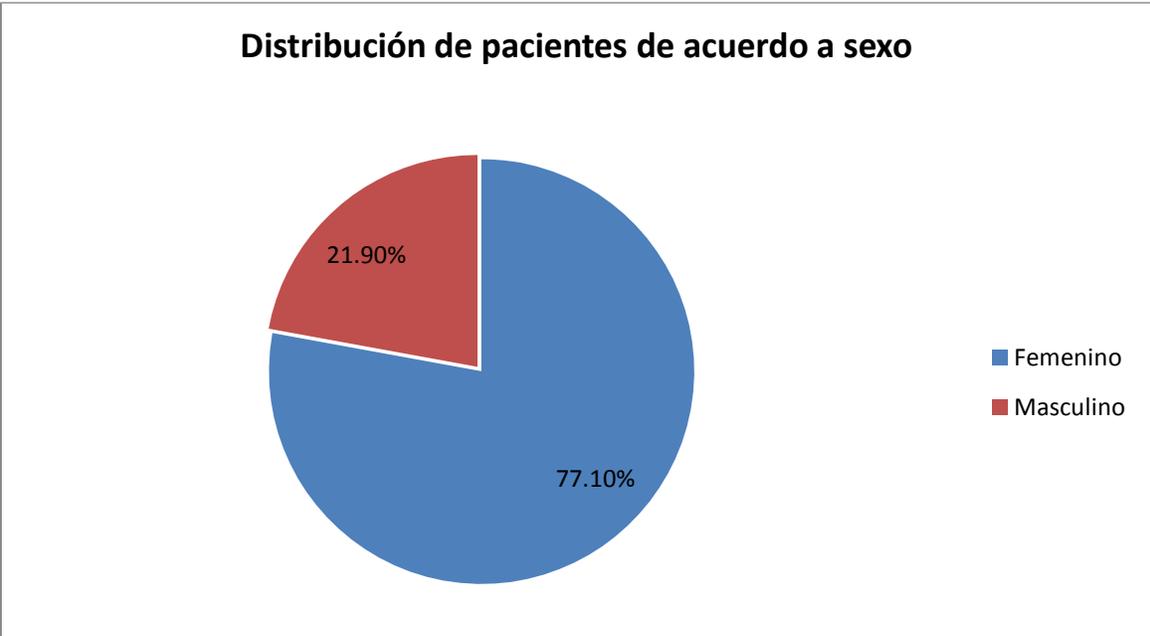
## **Análisis estadístico**

### **a) Univariado.**

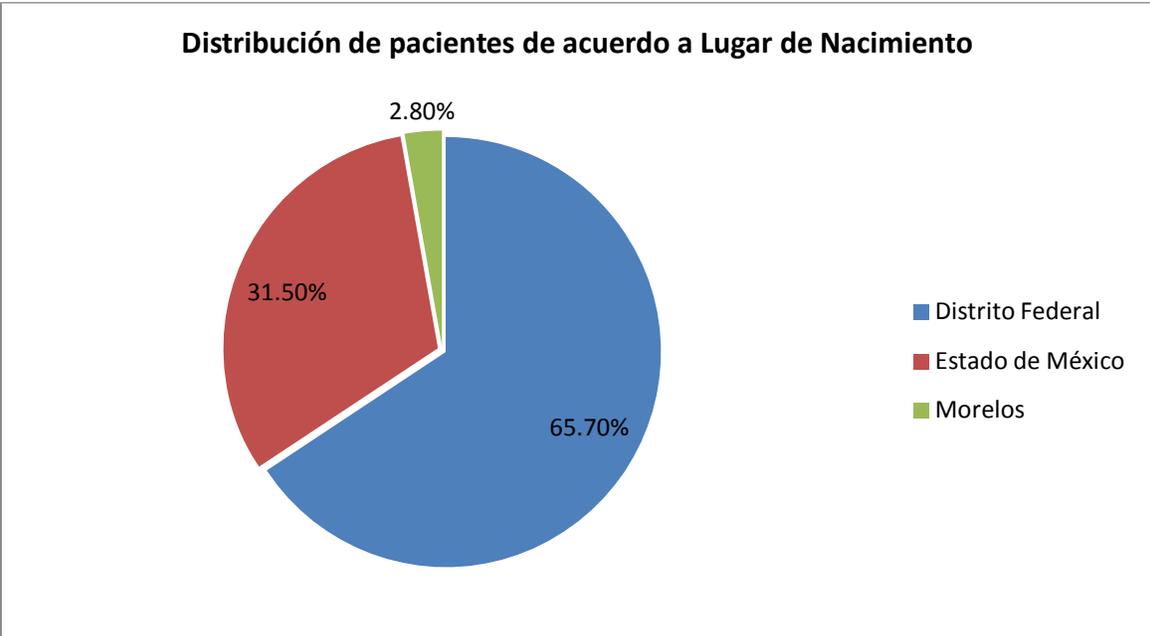
En el caso de las variables cualitativas se determinarán las frecuencias alélicas de las mutaciones o polimorfismos del gen los genes *NKX2.5*. Las frecuencias alélicas de las mutaciones y/o polimorfismos encontrados serán comparadas con los datos descritos en la literatura utilizando la prueba de  $\chi^2$ .

## VII. RESULTADOS

El diagnóstico de HC secundario a disgenesia tiroidea se estableció por perfil tiroideo y gamagrafía tiroidea en los 35 pacientes incluidos. El rango de edad de los pacientes al momento de la confirmación del diagnóstico por perfil tiroideo fue de 13 a 90 días con una media de 43.2 días. De los 35 pacientes incluidos en el estudio, 27 casos (77.1%) son del sexo femenino y 8 masculino (22.9%) ver Gráfica 1. De estos, el 65.7% nacieron en el Distrito Federal (23 casos), el 31.5% en el Estado de México (11 casos) y el 2.8% en el Estado de Morelos (1 caso) ver Gráfica 2.



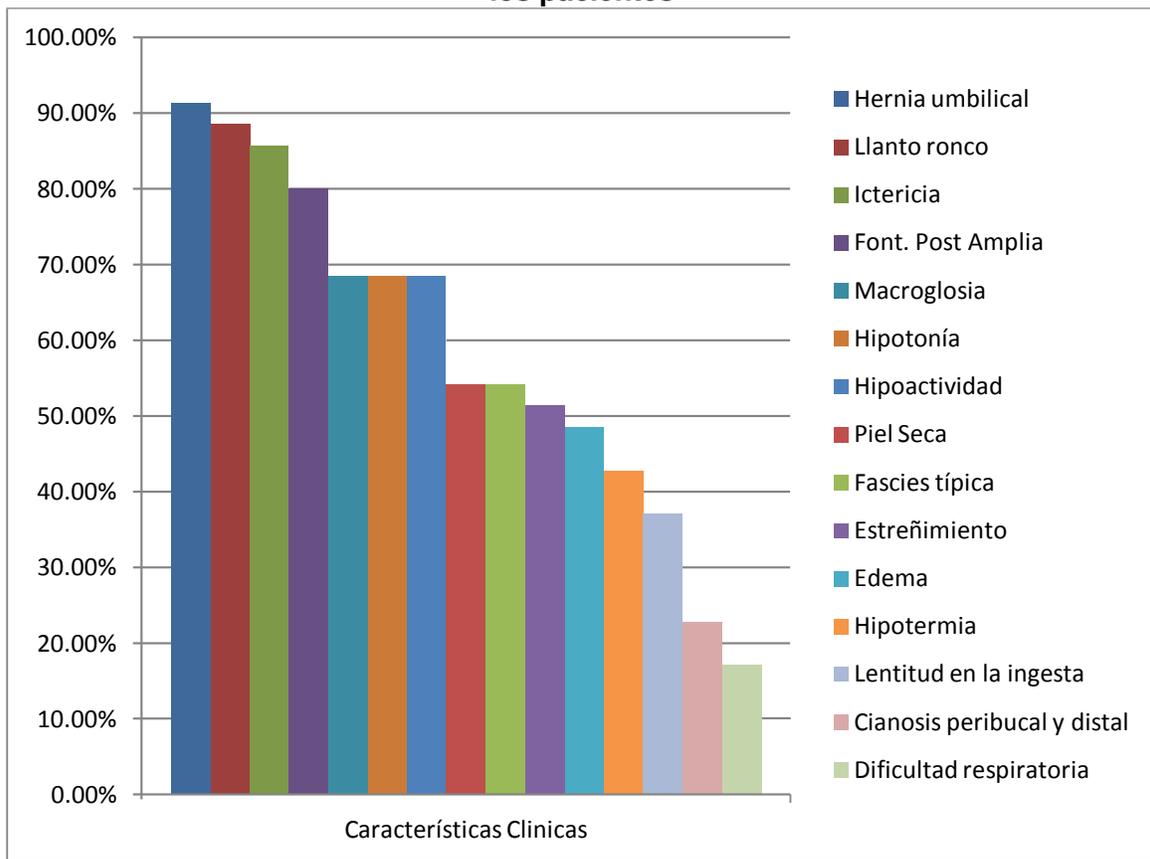
Gráfica 1



Gráfica 2

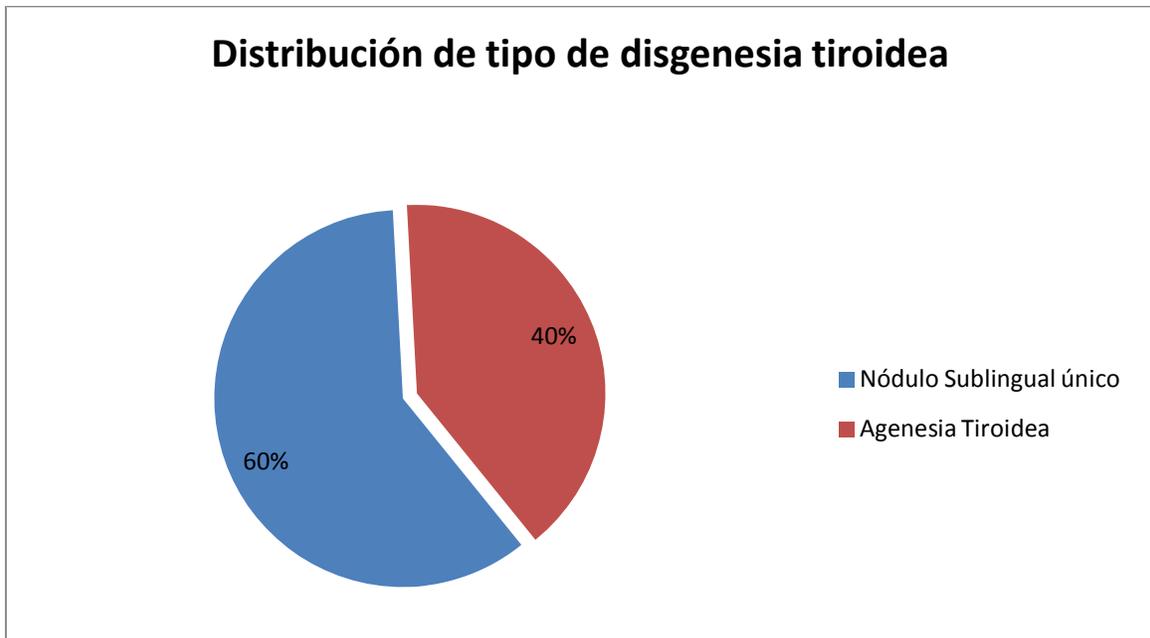
La edad promedio de las madres de los pacientes con HC fue de 25.6 años (14 años - 44 años). El peso promedio de los pacientes al nacimiento fue de 3,315 gr (2,250 - 4,700) y la talla promedio fue de 50cm (44 cm - 53 cm). Las características clínicas que presentaron los pacientes con mayor frecuencia fueron: hernia umbilical (91.4%), llanto ronco (88.5%), ictericia (85.7%), fontanela posterior amplia (80%), macroglosia (68.5%), hipotonía (68.5%), hipoactividad (68.5%), piel seca (54.2%), fascies típica (54.2%), estreñimiento (51.4%), edema (48.5%), hipotermia (42.8%), lentitud en la ingesta (37.1%), cianosis peribucal y distal (22.8%), y dificultad respiratoria (17.1%) ver Gráfica 3. En 8 pacientes (22.8%) se documentaron otras manifestaciones asociadas: 2 casos con displasia acetabular bilateral, 2 casos con hidrocele, un paciente con Comunicación Interventricular, un caso con paladar hendido, un paciente presentó la fontanela posterior puntiforme y un caso se refirió con diastasis de rectos.

**Gráfica que muestra la distribución de las características clínicas que predominaron en los pacientes**



**Gráfica 3**

Dentro de los parámetros bioquímicos, en el 80% de los pacientes se encontraron valores de TSH por arriba de 75 IU/L (rangos normales 0.4 IU/L – 4 IU/L); en 2 pacientes no se contó con niveles de TSH antes del tratamiento. La etiología del HC se determino por gamagrafía tiroidea encontrando nódulo sublingual único en 21 pacientes (60%) y agenesia tiroidea en 14 pacientes (40%) ver Gráfica 4.



Gráfica 4

### Resultados moleculares:

En los 35 pacientes se llevo a cabo la amplificación de los 7 amplicones que permiten analizar el único exón del gen *TTF-2*, aunque se amplificó el amplicón 4 donde se localiza el tracto de polialanina, el tamaño del mismo no se determinó ya que no puede ser analizado por la metodología empleada en este estudio, por lo que no se presentan estos resultados. En ningún paciente se identificó una mutación patológica pero si se identificaron 5 polimorfismos tipo SNP, 3 previamente reportados en la literatura y dos nuevos, los cuales se presentan en la tabla 1 y en los electroferogramas de las imagenes 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5 y 6.

POLIMORFISMO	NUM. PACIENTES EN ESTADO HETEROCIGOTO	NUMERO PACIENTES EN ESTADO HOMOCIGOTO ALELO MENOR
<b>c.387T&gt;C</b> <b>p.Leu129Leu</b> <b>CTT-CTC</b> <b>rs3021523</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>c.504A&gt;C</b> <b>p.Ala168Ala</b> <b>GCA-GCC</b> <b>rs3021524</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>c.825C&gt;T</b> <b>p.Ser275Ser</b> <b>(TCC-TCT)</b> <b>rs3021526</b>	<b>8</b>	<b>0</b>
<b>c.608C&gt;G</b> <b>p.Pro203Arg</b> <b>(CCG-CGG)</b> <b>No reportado</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>c.990C&gt;T</b> <b>p.Pro330Pro</b> <b>(CCC-CCT)</b> <b>No reportado</b>	<b>1</b>	<b>0</b>

Tabla 1: Se describen los 5 polimorfismos tipo SNP identificados al analizar el gen *TTF-2*.

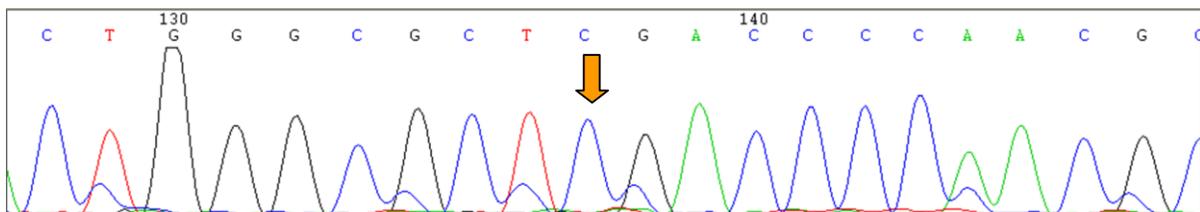


Imagen 2a. Se muestra el electroferograma que evidencia la presencia del polimorfismo previamente descrito rs3021523: c.387T>C (CTT-CTC); p.Leu129Leu; en un paciente homocigoto para el alelo menor ya que en ambos alelos esta presente la base nitrogenada C.

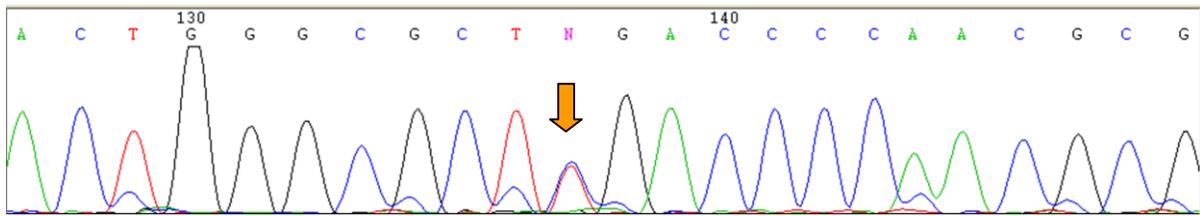


Imagen 2b. Se muestra el electroferograma que evidencia la presencia del polimorfismo previamente descrito rs3021523: c.387T>C (CTT-CTC); p.Leu129Leu; en un paciente heterocigoto, ya que la flecha señala la presencia de la base Timina en un alelo y Citosina en el otro.

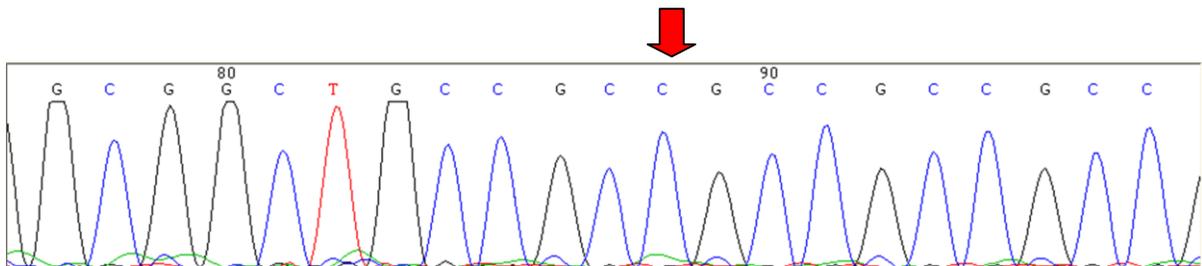


Imagen 3a. Se muestra el electroferograma que evidencia la presencia del polimorfismo previamente descrito rs3021524: c.504A>C (GCA-GCC), p.Ala168Ala; en un paciente homocigoto para el alelo menor ya que en ambos alelos esta presente la base nitrogenada C.

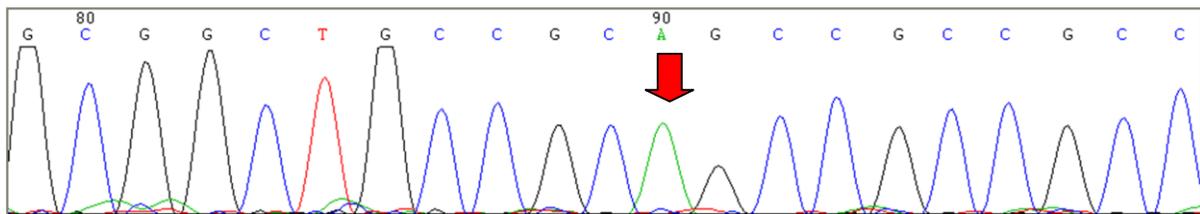


Imagen 3b. Se muestra el electroferograma que evidencia la presencia del polimorfismo previamente descrito rs3021524: c.504A>C (GCA-GCC), p.Ala168Ala; en un paciente homocigoto para el alelo mayor ya que en ambos alelos esta presente la base nitrogenada A.

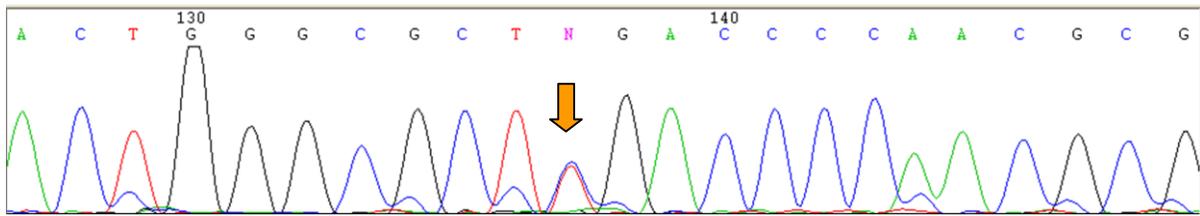


Imagen 4. Electroferograma que muestra en estado heterocigoto el polimorfismo previamente descrito rs3021526, c.825C>T (TCC-TCT), p.Ser275Ser, la flecha indica la presencia de dos picos imbrincados que representan la presencia de la base nitrogenada C en un alelo y la T en el otro.

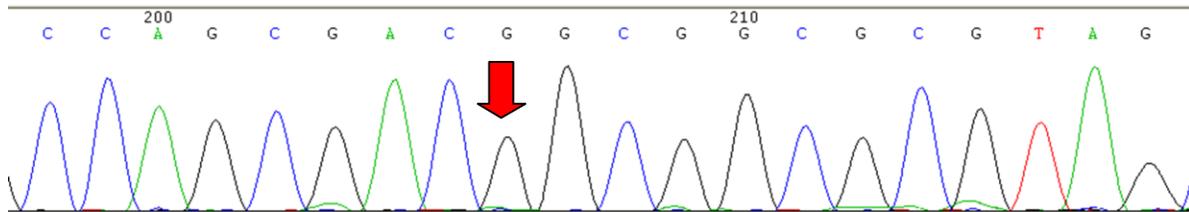


Figura 5. Electroferograma que muestra el polimorfismo c.608C>G (CCG-CGG); p.Pro203Arg, no reportado previamente, la flecha indica la presencia de la base nitrogenada G en ambos alelos (homocigoto para alelo G).

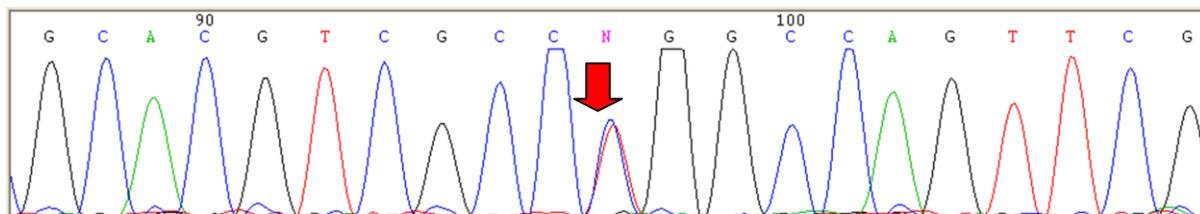


Imagen 6. Electroferograma que muestra en estado heterocigoto el polimorfismo c.990C>T p.Pro330Pro, no reportado previamente en el cual hay un cambio del codon CCC por CCT, la flecha indica la presencia de dos picos imbrincados que representan la presencia de la base nitrogenada C en un alelo y la T en el otro.

POLIMORFISMO	FRECUENCIA ALELO	FRECUENCIA ALELO
	MAYOR	MENOR
c.387T>C	0.928	0.071
c.504A>C	0.971	0.028
c.825C>T	0.885	0.114
c.608C>G	0.971	0.028
c.990C>T	0.985	0.014

Tabla 2 Se muestran las frecuencias alélicas de los 5 polimorfismos identificados.

## VIII. DISCUSIÓN

Nuestro estudio, realizado en 35 pacientes con HC secundario a disgenesia tiroidea, mostró un predominio del sexo femenino con respecto al masculino lo cual es acorde con lo reportado en poblaciones hispanas donde la frecuencia es mayor en el sexo femenino con una relación de hasta 3:1 (Lorey 1992, Nuñez 2003). La edad de los pacientes al momento del diagnóstico fue de 43.2 días, este dato es similar a lo publicado en población Mexicana (Vela 2009), sin embargo, la edad promedio de nuestros pacientes se encuentra 14.2 días mayor para el diagnóstico de HC comparado con otras publicaciones internacionales donde reportan un diagnóstico e inicio de tratamiento a los 19 días (Vela 2009); la posible explicación es que aunque el programa de tamiz neonatal se realiza a nivel nacional, las 3 entidades federativas, de las cuales son originarios nuestros pacientes, cuentan con diferencias socioeconómicas, geográficas y de infraestructura lo que probablemente condiciona el retraso en algunos casos del diagnóstico confirmatorio y el inicio del tratamiento.

En lo referente a las variables de peso del recién nacido y edad de la madre, se documentó valores similares a lo publicado por Vela en el 2004 quien reportó el peso del recién nacido promedio de 3,298 gr y la edad de la madre de 25.38 años, comparado con 3,1315 gr y 25.6 años observados en nuestro estudio.

El comportamiento que presentan las características clínicas es similar a lo descrito en la literatura mundial de Hipotiroidismo Congénito ya que en nuestros casos se documentó a la hernia umbilical como la característica clínica más frecuente, esta misma característica predominó en el estudio de Vela durante el 2004 en la población mexicana. Las otras manifestaciones asociadas al HC reportadas en este estudio fueron semejantes a lo descrito en la literatura, sin embargo, se observó un porcentaje mayor de pacientes que presentaron malformaciones ya que Oliveri reporta una frecuencia de 8.4% en 1420 analizados (Oliveri 1991, Rastogi 2010) y en nuestro estudio la frecuencia fue de 22.8%, esta diferencia puede ser debida a que los tamaños de muestra fueron muy diferentes ya que en este estudio se analizaron sólo 35 pacientes.

Las principales malformaciones reportadas en la literatura son las cardíacas, el paladar hendido y las malformaciones genitourinarias (Rastogi 2010). En un estudio realizado por Oliveri y cols. en Italia de 1991 a 1998 donde se incluyeron a 1420 pacientes con HC, observaron malformaciones asociadas en sistema nervioso central, digestivo, genitourinario y respiratorio; además identificaron anomalías musculoesqueléticas, dermatológicas, oftalmológicas y en el sistema vascular periférico así como labio y paladar hendido; sin embargo en los reportes internacionales no se mencionan alteraciones menores como diastasis de rectos o fontanela puntiforme que son 2 malformaciones reportadas en 2 de nuestros pacientes, esto último aunado a las diferencia en el tamaño de muestras, podrían explicar el porcentaje más alto de malformaciones observado en nuestra población.

La etiología más común de HC por disgenesia es la tiroides ectópica, esta frecuencia también se documentó en el presente trabajo, la siguiente causa de disgenesia en nuestro estudio fue atirosis, frecuencia compatible con lo reportado en la literatura. En el estudio no existieron pacientes con hipoplasia tiroidea probablemente por ser una muestra pequeña, ya que la hipoplasia sólo se describe en el 5% de los casos de disgenesias tiroideas (Solis 2006).

Con relación a los resultados moleculares, en ninguno de los pacientes analizados se identificó una mutación patológica en el gen *TTF-2*; está pendiente analizar el tamaño del tracto de polialaninas ya que por la metodología empleada en este estudio no era factible analizarlo.

Se identificaron 5 polimorfismos tipo SNP en 10 pacientes, 3 de los cuales ya están descritos en la literatura y dos son cambios nuevos ya que no se encuentran referidos en la base de datos dbSNP Short Genetic Variations (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>).

De los polimorfismos previamente descritos el rs3021523 se debe a la sustitución de T>C por lo que el triplete CTT se modifica a CTC, este cambio se considera sinónimo ya que no se modifica el aminoácido Leucina en la posición 129 (p.L129L). Este cambio lo observamos en un caso en estado heterocigoto y en dos casos en estado homocigoto, las frecuencias alélicas de este polimorfismo como se muestra en la tabla 3, son diferentes en nuestro estudio comparado con otras poblaciones (dbSNP Short Genetic Variations), esta observación no parece deberse a la diferencia en el tamaño de muestra ya que en Japoneses-Asiáticos se analizaron 88 alelos muestra similar a la del presente trabajo de 70 alelos. La frecuencia de alelos para ciertos polimorfismos pueden variar importantemente de una población a otra por lo que tal vez en nuestra población, comparada con otras. el alelo más frecuente es el T y no el C, sin embargo, consideramos que se requieren mayores estudios en nuestra población para corroborar este hallazgo.

POBLACIÓN	FRECUENCIA ALELO T	FRECUENCIA ALELO C
Europeos del HapMap 102 alelos	0.292	0.708
Japoneses – Asiáticos del HapMap 88 alelos	0.023	0.977
Africanos Sub-Sahara del HapMap 120 alelos	0.017	0.983
Presente estudio, población mexicana, 70 alelos	0.928	0.071

Tabla 3. Frecuencias alélicas del polimorfismo c.387T>C en otras poblaciones y la observada en el presente trabajo.

El segundo polimorfismo que observamos en nuestra población previamente descrito (rs3021524) se debe al cambio de una adenina por una citosina en la posición 504, lo que genera el cambio de la tripleta GCA por GCC, pero no modifica el aminoácido que se codifica a partir de ella (p.Ala168Ala); este polimorfismo se observó sólo en un paciente en estado homocigoto, en la tabla 4 se compara nuestro hallazgo con las frecuencias alélicas observadas en Japoneses, la cual es la única población en la que se refiere este dato para este polimorfismo (dbSNP Short Genetic Variations); se puede observar que las frecuencias alélicas son muy similares.

POBLACIÓN	FRECUENCIA ALELO A	FRECUENCIA ALELO C
Japoneses, 92 alelos	0.989	0.011
Presente estudio, población mexicana, 70 alelos	0.971	0.028

Tabla 4. Frecuencias alélicas del polimorfismo c.504A>C en población Japonesa y la observada en el presente trabajo.

El tercer polimorfismo identificado en este trabajo, previamente descrito en la literatura, tiene el número de referencia rs3021526, el cual se origina por el cambio de una C por T: c.825C>T (TCC-TCT), en el cual tampoco se cambia el aminoácido que se codifica por la tripleta (p.Ser275Ser), este polimorfismo se observó en 8 pacientes en estado heterocigoto y no se detectó ningún caso en estado homocigoto para el alelo T. En la tabla 5 se muestran las frecuencias alélicas de este polimorfismo en otras poblaciones (dbSNP Short Genetic Variations), en la cual se observa que en nuestra población el alelo más frecuente es el C, a diferencia de las otras poblaciones que es el T, aunque el tamaño de muestra en nuestro estudio es pequeño y se requiere aumentarla para corroborar este hallazgo, parece que en nuestra población las frecuencias alélicas de este polimorfismo son diferentes a lo descrito en otras poblaciones.

POBLACIÓN	FRECUENCIA ALELO C	FRECUENCIA ALELO T
Europeos 120 alelos	0.450	0.550
Japoneses – Asiáticos del 120 alelos	0.125	0.875
Africanos Sub-Sahara del 118 alelos	0.322	0.678
Presente estudio, población mexicana, 70 alelos	0.895	0.114

Tabla 5. Frecuencias alélicas del polimorfismo c.825C>T en otras poblaciones y la observada en el presente trabajo.

Los dos polimorfismos identificados en este trabajo, que no han sido previamente descritos en otras poblaciones también son del tipo SNP sinónimos ya que no cambian el aminoácido que codifican c.608C>G (p.Pro203Arg) y c.990C>T (p.Pro330Pro), ambos se identificaron en un sólo paciente, el primero en estado homocigoto y el segundo en estado heterocigoto. Se requieren mayores estudios para conocer las frecuencias alélicas de estos polimorfismos en nuestra población con un tamaño de muestra mayor al analizado en este trabajo, así como la descripción en otras

poblaciones para conocer si se observan frecuencias alélicas similares o diferentes a la nuestra.

En este trabajo no se identificó una mutación patológica en 35 pacientes con hipotiroidismo congénito, sin embargo se identificaron 5 polimorfismos tipo SNP sinónimos, por lo que parece improbable que estos tengan relación con el desarrollo de hipotiroidismo en nuestra población, esta pendiente por analizar en este gen el tracto de polialaninas para definir si en nuestra población se observa el alelo con 14 alalinas, el cual se ha descrito que predispone al desarrollo de hipotiroidismo.

## **IX. CONCLUSIONES**

1. En este estudio los pacientes fueron más frecuentemente del sexo femenino, similar a lo reportado en poblaciones hispanas por Lorey en 1992 y Nuñez en el 2003.
2. La edad promedio al momento del diagnóstico del HC fue similar a lo reportado por Vela en el 2009 en población Mexicana.
3. Las características clínicas reportadas en nuestro estudio fueron similares a lo publicado por Vela en el 2004 en población Mexicana, siendo la hernia umbilical la característica clínica más frecuente.
4. En el presente trabajo se tuvo una mayor frecuencia de malformaciones congénitas asociadas a HC comparado con reportes internacionales, probable a que nuestro tamaño de muestra es pequeño.
5. Predomino la ectopia tiroidea como la etiología más común de disgenesias tiroideas similar a lo reportado en otras poblaciones.

6. No se identificó una mutación patológica en los pacientes, pero si se identificaron 5 polimorfismos tipo SNP sinónimos en 10 pacientes, 3 previamente reportados en la literatura: rs3021524 (en un paciente en estado homocigoto), rs3021523 (en 1 paciente en estado heterocigoto y 2 pacientes en estado homocigoto), y rs302156 (en 8 pacientes en estado heterocigoto); y se identificaron 2 polimorfismos no reportados en literatura: c.608C>G en un paciente en estado homocigoto y c.990C>T en un caso en estado heterocigoto.
7. De los 3 polimorfismos previamente reportados, rs3021524 presentó una frecuencia alélica similar a la reportado en la literatura mientras que los polimorfismos rs3021523 y rs3021526 no mostraron las mismas frecuencias alélicas comparado con otras poblaciones, esta discrepancia puede deberse a que hay variabilidad en frecuencias alélicas entre poblaciones de diferentes orígenes étnicos o bien al hecho de diferencias en el tamaño de la muestra.
8. Se requiere aumentar el número de pacientes en los que se estudie el gen *TTF-2* para establecer su participación como gen causal o predisponente de HC por disgenesia en nuestra población.
9. Queda pendiente por analizar en el gen *TTF-2* el tracto de polialaninas, para definir si en nuestra población el alelo con 14 alaninas predispone al desarrollo de hipotiroidismo.
10. Deben realizarse otros estudios genéticos, como el presente trabajo, que analicen genes que codifican otros Factores Transcripcionales involucrados en el desarrollo tiroideo como *TTF-1*, *PAX8* y *NKX2-5* para tratar de conocer si son factores genéticos que contribuyen a la alta frecuencia de HC por disgenesia en México.

**ANEXO 2**

**HOJA DE CAPTACIÓN DE DATOS  
ANÁLISIS CLÍNICO Y MOLECULAR DE LOS GENES *TTF-1*, *TTF-2* Y *PAX8* EN PACIENTES  
MEXICANOS CON HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO**

REGISTRO INP \_\_\_\_\_ T.S.H. por tamiz \_\_\_\_\_ CORDÓN \_\_\_\_\_ TALON \_\_\_\_\_  
 FECHA de TOMA de MUESTRA \_\_\_\_\_ HOSPITAL \_\_\_\_\_  
 Lugar de TOMA de MUESTRA (población) \_\_\_\_\_

NOMBRE DEL NIÑO \_\_\_\_\_  
 FECHA DE NACIMIENTO \_\_\_\_\_ SEXO \_\_\_\_\_ PESO (al nacer) \_\_\_\_\_  
 TALLA (al nacer) \_\_\_\_\_  
 NOMBRE DE LA MADRE \_\_\_\_\_ EDAD \_\_\_\_\_  
 NOMBRE DEL PADRE \_\_\_\_\_ EDAD \_\_\_\_\_  
 DOMICILIO \_\_\_\_\_ TELÉFONO \_\_\_\_\_

**DATOS CLINICOS**

FASCIES TÍPICA \_\_\_\_\_ FONTANELA POSTERIOR AMPLIA \_\_\_\_\_ ICTERICIA \_\_\_\_\_  
 EDEMA \_\_\_\_\_ MACROGLOSIA \_\_\_\_\_ LLANTO RONCO \_\_\_\_\_  
 HIPOTERMIA \_\_\_\_\_ PIEL SECA (áspera) \_\_\_\_\_ HIPOTONÍA \_\_\_\_\_  
 HIPOACTIVO \_\_\_\_\_ ESTREÑIMIENTO \_\_\_\_\_ HERNIA UMBILICAL \_\_\_\_\_  
 DIFICULTAD RESPIRATORIA \_\_\_\_\_ LENTITUD en INGESTA de ALIMENTOS \_\_\_\_\_  
 CIANOSIS PERIBUCAL ó DISTAL \_\_\_\_\_ MALFORMACIONES ASOCIADAS \_\_\_\_\_

**PRUEBAS CONFIRMATORIAS**

PERFIL TIROIDEO  
 FECHA del PERFIL TIROIDEO \_\_\_\_\_ EDAD CRONOLÓGICA \_\_\_\_\_

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 de laboratorio de hormonas del Ins. Nal. De Pediatría

EDAD ÓSEA (edad cronológica) \_\_\_\_\_

GAMAGRAMA  
 FECHA de GAMAGRAMA \_\_\_\_\_ EDAD CRONOLÓGICA \_\_\_\_\_ HALLAZGOS \_\_\_\_\_

**RESULTADOS DE ANÁLISIS MOLECULAR**

GEN	ALTERACION EN LA MIGRACIÓN EN SSCP	EXÓN	MUTACIÓN	OBSERVACIONES
<i>TTF-1</i>				
<i>TTF-2</i>				
<i>PAX8</i>				

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bamforth JS, Hughes IA, Lazarus JH and cols. Congenital hypothyroidism, spiky hair, and cleft palate. *J Med Genet* 1989; 26:49-51.
2. Baris I, Arisoy AE, Smith A and cols. A novel missense mutation in human TTF-2 (FKHL15) gene associated with congenital hypothyroidism but not athyreosis. *J. of Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(10): 4183-87.
3. Beardsall K, Ogilvy-Stuart AL. Congenital hypothyroidism. *Current Paediatrics* 2004; 14:422-29.
4. Brown AL, Fernhoff PM, Milner BA and cols. Racial differences in the birth prevalence of congenital hypothyroidism. *J Pediatr* 1981; 99: 934-36.
5. Brown LY, Brown SA. Alanine tracts: the spanning story of human illness and trinucleotide repeats. *Trends Genet* 2004; 20:51-8.
6. Castanet M, Park SM, Smith A and cols. A novel loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 2051-59.
7. Castanet (a) M, Polak M. Spectrum of Human Foxe1/TTF2 Mutations. *Horm Res Paediatr*. 2010; 73:423-29.
8. Castanet (b) M, Mallya U, Agostini M and cols. Maternal Isodisomy for Chromosome 9 Causing Homozygosity for a Novel FOXE1 Mutations in Syndromic Congenital Hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(8): 4031-36.
9. Carré A, Castanet M. and cols. Polymorphic length of FOXE1 alanine stretch: evidence for genetic susceptibility to thyroid dysgenesis. *Hum Genet* 2007; 122:467-76.
10. Chadwick BP, Obermayr Frishchauf AF. FKHL15, a new human member of the Forhead Gene Family Located on Chromosome 9q22. *Genomics* 1997; 41:390-96.
11. Clifton-Bligh RJ, Wentworth JM, Heinz P and cols. Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nat Genet* 1998; 19: 399-401.
12. Damante G. Thyroid defects due to Pax8 gene mutations. *Eur J Endoc* 1998; 139:563-66.
13. De Felice M, Di Lauro R. Thyroid Development and Its Disorders: Genetics and Molecular Mechanisms. *Endocr Rev* 2004; 25(5) 722-46.
14. Frasier SD, Penny R, Zinder R. Primary congenital hypothyroidism in Spanish-surnamed infants in Southern California. *J Pediatr* 1982; 101: 315.
15. Guillam MP, Kopp P. Genetic defects in thyroid hormone synthesis. *Curr Opin Pediatr* 2001; 13:364-72.
16. Hishinuma A, Ohyama Y, Kuribayashi T and cols. Polymorphism of the polyalanine tract of thyroid transcripotor factor-2 gene in patients with thyroid dysgenesis. *Eur J Endocrinol* 2001; 143:385-89.
17. Huebner A, Thorwath A, Biebermann H and cols. Congenital Hypothyroidism due to the thyroid agenesis and cleft palate resulting for a novel homozygous mutation of FOXE1 (TTF2). *Hormon Res* 2004; 64 (suppl 2):19.
18. Kang I, Musa M, Harun F and cols. Characterization of mutations in the FOXE1 gene in a cohort of unrelated Malaysian patients with congenital hypothyroidism and thyroid dysgenesis. *Biochem Genet* 2010; 48: 141-151.
19. Lorey FW, Cunningham GC. Birth prevalence of primary congenital hypothyroidism by sex and ethnicity. *Hum Biol* 1992; 64; 531-38.
20. Macchia PE, Mattei MG and cols. Cloning, chromosomal localization and identification of polymorphisms in the human thyroid transcripotor factor 2 gene (TITF2). *Biochimie* 1999; 81:433-40.

21. Montanelli L, Tonacchera M. Genetics and phenomics of hypothyroidism and thyroid dys- and agenesis due to PAX8 and TTF1 mutations. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 322: 64-71.
22. Oliveri A, Stazi M and cols. A population-based study of the frequency of additional congenital malformations in infants with Congenital Hypothyroidism: Data from the Italian Registry for Congenital Hypothyroidism (1991-1998). *J Clin Endocrinol* 2002; 87(2): 557-62.
23. Pui-Yan Kwok and Xiangning Chen. Detection of Single Nucleotide Polymorphisms. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2003, 5:43-60.
24. Solís, JC, Valverde C. Hipotiroidismo Neonatal: fisiopatogenia, aspectos moleculares, metabólicos y clínicos. *Rev Invest Clin* 2006, 58 (4): 318-34.
25. Rastogi M, LaFranchi SH. Congenital Hypothyroidism. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5:17.
26. The international SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001, 409:928-933.
27. Tonacchera M, Banco M, Lapi P and cols. Genetic Analysis of TTF-2 Gene in Children with Congenital Hypothyroidism and Cleft Palate, Congenital Hypothyroidism or Isolated Cleft Palate. *Thyroid* 2004; 8:584-88.
28. Toublanc, JE, Comparison of epidemiological data on congenital hypothyroidism in Europe with those of other parts of the world. *Horm Res* 1992; 38:230-35.
29. Vela M, Gamboa S, Pérez ME y cols. Epidemiología del hipotiroidismo congénito en México. *Salud Pública de México* 2004; 46 (2): 141-47.
30. Vela-Amieva M, Ibarra-González I, Rodríguez-León G y cols. Optimización del tiempo de diagnóstico del Hipotiroidismo Congénito en el estado de Tabasco, México. *Salud en Tabasco* 2009; 15:823-29.
31. Vijlder J. Primary congenital hypothyroidism: defects in iodine pathways. *Europ J Endocrinol* 2003; 149: 247-56.
32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

## ANEXO 1

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (menores de edad)

México, DF., a \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_

Por medio de las presente hago constar que estoy de acuerdo en que mi hijo (a) \_\_\_\_\_ y yo participemos en el proyecto **“ANÁLISIS CLINICO Y MOLECULAR DE LOS GENES *TTF-1*, *TTF-2* Y *PAX8* EN PACIENTES MEXICANOS CON HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO”**, que se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Pediatría. Se me ha explicado que para la realización del estudio, se requiere una muestra de sangre periférica, la cual será tomada con todos los requisitos de seguridad por lo que no representa ningún riesgo para ninguno de nosotros. Además me han informado que de la muestra de sangre se obtendrá el material genético, cuyo análisis permitirá identificar las mutaciones que se asocian con el Hipotiroidismo Congénito y es probable que en el futuro los resultados puedan servir para un mejor diagnóstico, pronóstico y tratamiento de esta patología.

Así mismo, se me ha indicado que toda la información derivada del estudio es absolutamente confidencial y que nuestra participación es completamente voluntaria, por lo que si no deseamos participar, ello no repercutirá en la atención de mi hijo (a).

Atentamente

\_\_\_\_\_  
Padre, Madre o tutor

\_\_\_\_\_  
Testigo

Médico responsable: Dra. Ariadna González del Ángel.

Tel. 10-84-09-00 Ext. 1306