



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
SECRETARIA DE SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

MUTACIONES GERMINALES EN EL GEN *NKX 2-1 (TTF1)*
¿UNA CAUSA FRECUENTE DE HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO
POR DISGENESIA?

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN PEDIATRÍA MÉDICA

P R E S E N T A:

DRA. AIDY GONZÁLEZ NÚÑEZ

TUTOR DE TESIS:
DRA. ARIADNA ESTELA GONZÁLEZ DEL ANGEL

CO-TUTOR DE TESIS:
DR. MIGUEL ANGEL ALCÀNTARA ORTIGOZA



MÉXICO 2015



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.

MUTACIONES GERMINALES EN EL GEN *NKX 2-1 (TTF1)*
¿UNA CAUSA FRECUENTE DE HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO POR DISGENESIA?

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

DRA. ROSAURA ROSAS VARGAS
DIRECTORA DE ENSEÑANZA

DR. MANUEL ENRIQUE FLORES LANDERO
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSTGRADO

TUTOR DE TESIS:
DRA. ARIADNA ESTELA GONZÁLEZ DEL ANGEL

CO-TUTOR DE TESIS:
DR. MIGUEL ANGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA

MUTACIONES GERMINALES EN EL GEN *NKX 2-1 (TTF1)*

¿UNA CAUSA FRECUENTE DE HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO POR DISGENESIA?

AUTORES

Tesista: Dra. Aidy González Núñez, especialista en Pediatría Médica.

Tutor: Dra. Ariadna Estela González del Angel, Especialista en Genética Médica, Doctora en Biomedicina Molecular, Investigador en Ciencias Médicas. Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Genética Humana. Instituto Nacional de Pediatría (INP).

Co-tutor: Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza, Médico Cirujano, Doctor en Ciencias. Investigador en Ciencias Médicas, Jefe del Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Genética Humana (INP).

Biol. Víctor Martínez Cruz, Investigador en Ciencias Médicas, Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Genética Humana (INP).

RESUMEN

Introducción: México es uno de los países que cuenta con la mayor incidencia de hipotiroidismo congénito (HC) a nivel mundial. Teniendo una prevalencia de hasta 1 de cada 1000 recién nacidos vivos; sin embargo, no se conoce una explicación de la mayor ocurrencia de este defecto. En México sólo existe un trabajo, reportado previamente por nuestro grupo, en el que se realizó el análisis molecular del gen *PAX8*, en el cual se identificó a una paciente femenina con agenesia tiroidea que portaba la mutación p.Arg31His; sin embargo, en ese trabajo se concluyó que se requerían estudiar otros genes que participan en el desarrollo de la tiroides, como *NKX2-1*, para conocer su participación en el HC. A nivel mundial, existen sólo 4 estudios en donde se han buscado mutaciones en el gen *NKX2-1* en pacientes que sólo cursan con HC por disgenesia sin otras manifestaciones clínicas, en los cuales no se identificaron alteraciones, por ello los autores concluyeron que mutaciones en *NKX2-1* no son un evento común que condicione HC por disgenesia. A pesar de ello, dado que se ha descrito que la contribución de otros genes como causales de HC puede variar de una población a otra, consideramos importante la realización de este estudio para determinar si mutaciones en el gen *NKX2-1* contribuyen al HC en México. El identificar una mutación en el gen *NKX2-1*, nos permitiría comprender la mayor frecuencia de HC en nuestra población además de brindar un asesoramiento genético certero en los pacientes con mutación caracterizada así como en sus familiares.

Objetivos: 1) Realizar la búsqueda de mutaciones en el gen *NKX2-1* en muestras de sangre periférica de pacientes con diagnóstico confirmado de HC secundario a disgenesia tiroidea canalizados a través de la Unidad de Neurodesarrollo del Instituto Nacional de Pediatría. 2)

Describir sus características clínicas e identificar casos de expresión mínima o no penetrancia mediante el estudio clínico y molecular en los familiares de primer grado de aquellos pacientes en donde se identifique una mutación responsable de HC en el gen *NKX2-1*.

Material y método: el estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del INP con un diseño observacional, descriptivo, transversal, ambispectivo. Se incluyeron 34 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. Se revisaron los expedientes clínicos para registrar las variables clínicas o malformaciones presentes en los pacientes. La búsqueda de mutaciones en el gen *NKX2-1* se realizó mediante amplificación en cadena de la polimerasa de los tres exones codificantes, análisis mediante polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP) y secuenciación automática tipo Sanger.

Resultados: de los 34 pacientes incluidos en el estudio, 27 casos (79.4%) fueron del sexo femenino y 7 del sexo masculino (20.5%). Al 97% (n=33) de los pacientes se les realizó gammagrama, encontrando tiroides ectópica en el 57.5% (n=19) de los pacientes y atirois en el 42.4% (n=14). Solamente en 1 paciente (2.94%) se realizó USG el cual reportó ausencia de tiroides. Se observó un predominio del sexo femenino con respecto al masculino con una proporción de 3.8:1. Las principales características clínicas presentadas en orden de frecuencia fueron hernia umbilical (n=27, 79.4%), ictericia (n=26, 76.4%) y llanto ronco (n=24, 70.5%), en ningún paciente se documentaron malformaciones asociadas. El patrón de migración por SSCP fue normal en todos los pacientes salvo en 5 de ellos en quien se observó una posible anomalía, por lo que se llevó a cabo la secuenciación de ese exón en la cual se descartó la presencia de alguna mutación. En los 34 pacientes estudiados la secuencia analizada del gen *NKX2-1* fue normal por lo que en todos ellos se descartó la presencia de una mutación. Por lo anterior, no se realizó el análisis molecular en ningún familiar de primer grado.

Discusión: En nuestros pacientes, se observó, acorde a literatura, un predominio del sexo femenino. La etiología más común de HC por disgenesia fue la tiroides ectópica, seguida de la atirois, lo que coincide con lo documentado previamente pero no existieron pacientes con hipoplasia tiroidea probablemente por el pequeño tamaño de la muestra. El predominio y orden de frecuencia de las características clínicas presentadas por nuestros pacientes, fueron similares a las previamente descritas en la literatura mexicana; sin embargo, en comparación con la literatura universal, el orden de frecuencia varió, ya que la característica clínica más frecuente en nuestro país fue la hernia umbilical y en otros países se ha documentado a la ictericia como la característica clínica más frecuente. En todos nuestros pacientes se realizó

la búsqueda de mutaciones en los 3 exones del gen *NKX2-1* sin encontrar mutaciones patológicas, lo que coincide con los resultados por otros autores previamente.

Conclusiones: En este estudio no encontramos mutaciones o polimorfismos asociados al gen *NKX2-1*, por lo que se requieren mayores estudios para analizar otros genes candidatos tales como *NKX 2-5* y *FOXE-1* que participan también en el desarrollo de la glándula tiroides para determinar su participación como causal o predisponentes del desarrollo de HC en nuestra población.

NKX2-1 (TTF-1) Germline mutations ¿A frequent cause of congenital hypothyroidism due to dysgenesis?

Summary:

Introduction: Mexico is globally ranked as one of the countries with the highest incidence of congenital hypothyroidism. It has a prevalence of even 1 in every 1000 live birth. Still, we cannot totally explain the higher occurrence of this defect. There is only one report in Mexico, in which our teamwork identified one female patient with thyroid agenesis (pArg31His mutation) through the molecular analysis of PAX 8 gene. In this work we concluded that we needed to study other genes that participate in thyroid development such as NKX2-1 to be able to understand its involvement in congenital hypothyroidism. There are only 4 authors that have searched for genetic mutations of *NKX2-1* in patients with congenital hypothyroidism itself not associated with other clinical findings and they concluded that mutations in NKX2-1 can rarely be the origin of congenital hypothyroidism. A feasible explanation that has been described in others genes is that the etiology of congenital hypothyroidism due to dysgenesis may genetically vary according to the population that is being studied; for this reason we considered important to implement the NKX2-1 study in Mexico. The identification of NKX2-1 mutations in our patients will allow us to better understand the frequency of congenital hypothyroidism in our population as well as to give to our patients and their families an oriented genetic guidance of their specific identified mutation.

Objectives: 1) To search for NKX2-1 mutations by peripheral blood samples of patients with confirmatory diagnosis of congenital hypothyroidism due to thyroid dysgenesis. Patients were included by the Neurodevelopment Unit of National Institute of Pediatrics (INP). 2) To describe their clinical findings and to identify cases of minimal gene expression or nonpenetrance by the clinical and molecular study of first degree relatives of patients with an identified NKX2-1 mutation.

Material and method: this study took place in the Molecular Biology Laboratory of National Institute of Pediatrics, with an observational, descriptive, transversal and ambispective design. We included 34 mexican patients with confirmatory diagnosis of congenital hypothyroidism due to disgenesis. The samples for the DNA extraction and analysis were taken from peripheral blood. The review of medical files was also made to identify clinical variations or malformations of our patients. NKX2-1 mutations were searched by polymerase chain reaction of the three coding exons, analysis by single-strand confirmation polymorphism (SSCP) and Sanger automated sequencing.

Results: 34 patients were included in this study, 27 cases (79.4%) were female gender and 7 (20.5%) male gender. Gammagram was performed in the 97% of them (n=33); we found ectopic thyroid in the 57% of our patients (n=19) and athyreosis in the 42.4% of them (n=14). There was only 1 patient (2.94%) in which ultrasonography was made, finding athyreosis. We found a female gender predominance over male gender, with a 3.8:1 proportion. The main clinical findings found in order of frequency were umbilical hernia (n=27, 79.4%), jaundice (n=26, 76.4%) and hoarse cry (n=24, 70.5%); there were none associated malformations in any of our patients. We found an abnormal migration pattern by SSCP in 5 of our patients, but we discharged any mutation by exon sequencing. In all of our patients the analyzed sequence of NKX2-1 gene was normal, no mutations were found and there was no need to perform molecular analysis to any first degree relative.

Discussion: as it is found in literature review, we also found a predominance of female gender. Ectopic thyroid was the most common etiology for CH due to dysgenesis, followed by athyreosis; this agrees with previous reported essays. We didn't find any patient with thyroid hypoplasia, probably because our sample size was small. The predominance of clinical findings as well as the order of frequency was similar to previous mexican studies, but compared to universal data, the order of frequency was different. Umbilical hernia is the most common clinical manifestation found in our country meanwhile jaundice is the most common finding in other countries. We also agreed with other authors as we searched for mutations in the 3 exons of NKX2-1 gene without positive results.

Conclusion: In this study we didn't find mutations or polymorphisms associated to NKX2-1 gene, further studies are needed to analyze other genes that are also involved in thyroid development such as NKX2-5 and FOXE-1 to determine their involvement as a cause or predisposing factor of congenital hypothyroidism in our population.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, a mis padres **Napoleón González Saldaña, Adelaida Núñez Peña** y a mi hermana **Francis González Núñez** por ser mi ejemplo, mi motivo y mi felicidad.

A mi futuro esposo **Juan Carlos Rodríguez Aldama**, a mi tía **Magda González Saldaña**, a mi cuñado **Juan Manuel Bretón** y a toda mi familia presente y ausente por su amor, constancia y apoyo incondicional.

A mis maestros **Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza** por inculcarme desde 2do año de la facultad el gusto por la investigación y a la **Dra. Ariadna González del Ángel** porque ambos han sido mi guía, mis mentores y mi impulso en este protocolo desde hace 3 años.

A **Víctor Martínez Cruz**, biólogo y amigo del laboratorio de Biología Molecular, le agradezco por su paciencia, apoyo y disposición para enseñarme desde el día en que lo conocí.

A todos mis amigos y amigas que han estado ahí para escucharme, aconsejarme y me han enseñado el valor de la amistad.

A los niños del Instituto Nacional de Pediatría quienes son el motor que me mueve todos los días y me han enseñado no sólo de pediatría sino lecciones de vida.

A mis maestros, compañeros y enfermeras del hospital quienes me han hecho sentir en casa y orgullosa de formar parte de este equipo.

I. ÍNDICE

- I. INDICE
- II. MARCO TEORICO
- III. JUSTIFICACION
- IV. OBJETIVOS
- V. MATERIAL Y MÉTODOS
- VI. DESCRIPCION DEL ESTUDIO
- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSION
- IX. CONCLUSION
- X. ANEXOS
- XI. REFERENCIAS

MUTACIONES GERMINALES EN EL GEN *NKX2.1 (TTF1)*

¿UNA CAUSA FRECUENTE DE HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO POR DISGENESIA?

II. MARCO TEÓRICO

La prevalencia mundial de Hipotiroidismo Congénito (HC) es de 2 a 3 casos por cada 10 000 recién nacidos (1:2500 a 1:3000) (Toublanc JE 1992 y Klett M 1997). 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 (1:1894) (Brown AL y cols 1981, Frasier SD y cols 1982). También se ha determinado la frecuencia por sexo y se ha encontrado predominio en el sexo femenino con una relación 2:1 lo que es más evidente en hispanos residentes en EUA (3:1) (Lorey 1992). En México se ha reportado una elevada prevalencia al nacimiento de HC, ya que existen datos que señalan que en nuestro país, esta condición llega a ocurrir hasta en 1 de cada 1 000 recién nacidos (Vela, M y cols 2004). En el INP, tan sólo en el año 2006 se confirmaron cerca de 150 casos de los cuales 80 fueron disgenesias tiroideas (ectopia y agenesia glandular).

HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO PRIMARIO Ó ESPORÁDICO

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 tiroidea. Estas disgenesias tiroideas en su mayoría son esporádicas y sólo cerca del 2% son familiares.

Las disgenesias tiroideas pueden subdividirse en tres grupos:

- Tiroidea ectópica (usualmente pequeña y sublingual) (30-45%)
- Agenesia (35-40%)
- Hipoplasia (5%)

El hipotiroidismo también puede ser transitorio por el exceso de yodo/bociógenos, por anticuerpos maternos o por prematuridad). El 10-15% restante corresponde a dishormonogénesis, producida por algún error en el proceso de síntesis de las hormonas tiroideas.

CUADRO CLÍNICO ASOCIADO A HC

Los datos clínicos de los pacientes con HC neonatal en población mexicana de acuerdo a lo observado por Vela, M. y cols 2004 son: hernia umbilical, ictericia, piel seca, estreñimiento, facies tosca, llanto ronco, fontanela posterior amplia, edema palpebral, macroglosia, somnolencia, hipoactividad, hipotonía, dificultad en deglución e hipotermia.

DETECCION DEL HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO

El tamizaje de hipotiroidismo congénito inició en la ciudad de Nueva York en 1978 (Harris 2007); a raíz de esto, en 1988 se inició formalmente el tamizaje neonatal en nuestro país con la expedición

de la Norma Técnica 321 y actualmente su realización es obligatoria según lo establece la Norma Oficial Mexicana-007-SSA2-1993.

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). La mayoría de los métodos recomiendan que la muestra de sangre para el tamizaje se tome posterior a las 48 horas de vida para evitar encontrar falsos positivos por la elevación fisiológica neonatal de TSH (Verkerk PH 1993). Para el análisis de los resultados, el valor de esta hormona se considera sospechoso de hipotiroidismo congénito si excede 10 mUI/mL (Vela M y cols 2004).

GENES ASOCIADOS A HIPOTIROIDISMO CONGENITO (HC)

Los genes que están asociados a disgenesia de la glándulas tiroides son principalmente factores transcripcionales (FT) específicos de la glándula. Los FT se unen a un sitio blanco del ADN y regulan (activan o reprimen) la expresión de genes específicos durante el desarrollo embriológico y juegan un papel importante en el desarrollo oportuno de las células que van a dar origen a la glándula tiroidea; un ejemplo de estos factores de transcripción es *NKX2-1*.

Se sabe que la expresión simultanea de los factores de transcripción tiroideos tal como *NKX2-1* se lleva acabo sólo en las células foliculares desde el inicio de la diferenciación tiroidea, esta expresión simultánea persiste a través del desarrollo tiroideo. Estudios en ratones han hecho posible observar que la ausencia de estos factores transcripcionales afecta el desarrollo de la tiroides en varios niveles, por ejemplo, la ausencia de *NKX2-1* afecta la proliferación y aparición de la yema tiroidea después del día 8.5 de gestación.

ASPECTOS MOLECULARES DEL GEN *NKX2-1*

El gen *NKX2-1* en humanos se encuentra localizado en el cromosoma 14q13, tiene un tamaño de 3.8 Kb y está constituido por 3 exones.

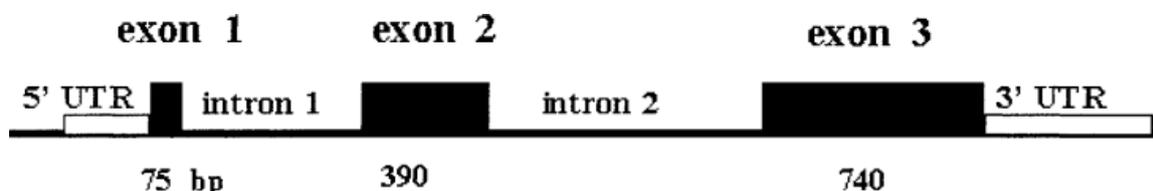


FIGURA 1: Conformación del gen *NKX 2-1* (Doyle 2004)

Dos transcritos principales son producidos de 2.3 y 2.4 Kb; las proteínas codificadas son de 371 y 401 aminoácidos respectivamente, las dos isoformas de la proteína difieren sólo en el N-terminal, pero el significado funcional de las dos isoformas se desconoce, el codón de inicio del producto del gen más abundante se localiza en el exón 2 dando un producto de 38 kDa (Pohlenz J y cols

2002). El factor de transcripción tiroideo presenta en su estructura dos dominios de activación transcripcional independientes, localizados en el amino terminal (dominio N, un homeo dominio (HD) de unión al DNA con motivos hélice vuelta hélice en el carboxilo terminal (dominio C) y un dominio específico Nk2 (Breedveld G y cols 2002). La proteína nuclear es capaz de unirse a secuencias específicas del DNA de promotores de los genes de tiroglobulina (*TG*) y tiroperoxidasa (*TPO*), regulando así la transcripción de estos genes, el gen del receptor de la hormona estimulante de la tiroides (*TSHR*) en células foliculares tiroideas y la proteína surfactante B (*SPB*) en células epiteliales de pulmón (Damante G y Di Lauro R 1994). Esta proteína NKX2-1 se observa en la tiroides, en pulmón y en determinadas áreas del cerebro anterior durante el periodo embrionario (De Felice M y Di Lauro R 2004).

MUTACIONES EN EL GEN *NKX2-1*

No se han descrito recién nacidos con mutaciones en estado homocigoto con pérdida de función en el gen *NKX2-1*, lo que indica que juega un papel esencial en el desarrollo de pulmón y cerebro. Por estudios de este gen en modelos animales se predice que tales mutaciones causarían en el humano muerte inmediatamente después de nacer. Sin embargo, sí se han descrito pacientes con alteraciones en estado heterocigoto por la presencia de una delección en el cromosoma 14q13-21, esta delección compromete el locus *NKX2-1*, (*TTF-1*) (Devriendt K y cols 1998, Iwatani N y cols 2000); también se han descrito pacientes con mutaciones en el gen *NKX2-1*, las cuales son diversas: sin sentido y de sentido erróneo (Krude H y cols 2002, Breedveld G y cols 2002), pequeñas inserciones (Pohlenz J y cols 2002), así como delecciones de una sola base (Breedveld G y cols 2002). Las mutaciones hasta ahora identificadas se localizan en los exones 2 y 3, lo que afecta en la proteína la hélice 3, en aminoácidos conservados dentro del homeodominio de unión a DNA, con lo cual se abate la capacidad de unión a DNA, por la pérdida de la función de un alelo de *NKX2-1* (Devriendt K y cols 1998, Iwatani N y cols 2000, Krude H y cols 2002, Pohlenz J y cols 2002, Breedveld G y cols 2002).

CORRELACIÓN GENOTIPO FENOTIPO.

Se ha reportado que pacientes heterocigotos para delecciones de 14q13-21 o mutaciones en el gen *NKX2-1* dan como resultado un cuadro clínico que incluye alteraciones neurológicas, tiroideas y respiratorias conocido como síndrome cerebro-tiroides-pulmón (OMIM 610978). Los pacientes con HC pueden mostrar una tiroides de tamaño y localización normal o bien disgenética (hipoplasia o ausencia de tiroides), las alteraciones respiratorias ocurren en etapa neonatal caracterizadas por dificultad respiratoria importante (distress respiratorio) y las alteraciones neurológicas incluyen ataxia/coreoatetosis, apraxia troncal y retraso mental. Lo que evidencia que el hecho de presentar un alelo normal no es suficiente para presentar un fenotipo normal y que las manifestaciones observadas se deben a la presencia de haploinsuficiencia del gen *NKX2-1*. (Devriendt K y cols

1998, Iwatani y cols 2000). En los estudios realizados en diferentes poblaciones se observa una alta variabilidad de fenotipo, esto puede deberse tanto al efecto de otros genes modificadores así como a factores ambientales. (De Felice M y Di Lauro R 2004).

Existen muy pocos reportes en la literatura en donde se hayan buscado mutaciones en el gen *NKX2-1* en pacientes que sólo cursen con HC por disgenesia sin otras manifestaciones clínicas, siendo estos: 1) Acebrón en 1995, reportó un caso de HC asociado a un defecto en la síntesis de tiroglobulina debido a la baja expresión de *TTF1*; 2) Perna en 1997, estudió a través de SSCP (polimorfismo conformacional de DNA de cadena sencilla) a 15 pacientes con HC sin encontrar mutación; 3) ese mismo año Lapi analizó mediante SSCP a un número mayor de casos (n= 61) con HC e incluso a 22 de ellos les realizó secuenciación tipo Sanger del gen *NKX2-1*; sin embargo, tampoco encontró alguna mutación asociada; 4) Hishinuma en 1998 estudió mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación a 9 pacientes con HC por disgenesia tiroidea encontrando 3 variantes en estado heterocigotos: c.469G>A, c.866C>A y c.845G>T, sin embargo, estas sustituciones también las observaron en personas sanas por lo que se consideraron variantes no patológicas o polimorfismos; finalmente, 5) Narumi en 2010 estudió en Japón mediante PCR y secuenciación a 102 individuos con HC y sólo encontró una nueva variante benigna en *NKX2-1* (c.178C>T, p.H60W) en un paciente sin manifestaciones extratiroideas. Estos resultados sugieren que mutaciones en el gen *NKX2-1* no son responsables de HC por disgenesia; sin embargo es probable que la etiología del HC por disgenesia sea diferente de acuerdo a la población estudiada, es por esto que en el presente trabajo se consideró que este gen podría ser un candidato cuyas mutaciones expliquen la presencia de HC en población mexicana.

III. JUSTIFICACIÓN

En México la prevalencia al nacimiento de hipotiroidismo congénito es mayor a la reportada en otras poblaciones; sin embargo, no se conoce una explicación de la mayor ocurrencia de este defecto aunque se ha propuesto la intervención de factores genéticos. El gen *NKX2-1* es uno de los tres principales factores de transcripción que participan en el desarrollo de la tiroides. Se han descrito diferentes mutaciones que inactivan la acción de *NKX2-1*, lo que condiciona la presencia del síndrome cerebro - tiroides – pulmón que cursa con HC, por lo anterior se ha propuesto que podría ser un gen candidato cuyas mutaciones sean responsables de la mayor frecuencia de hipotiroidismo congénito por disgenesia en nuestra población. Dado que se ha descrito que la participación de otros genes como causales de HC puede variar de una población a otra, consideramos importante la realización de este estudio para determinar si existe una participación del gen *NKX2-1* en México, a pesar de que en los pocos estudios en los que se ha analizado este

gen en pacientes con sólo HC por disgenesia, sin otras manifestaciones clínicas, no hayan identificado mutaciones. El identificar una mutación en el gen *NKX2-1*, nos permitiría comprender la mayor frecuencia de HC en nuestra población además de brindar un asesoramiento genético certero en los pacientes con mutación caracterizada así como en sus familiares.

IV. OBJETIVOS

1.- General

Búsqueda de mutaciones en el gen *NKX2-1* en muestras de sangre periférica de pacientes con diagnóstico confirmado de HC secundario a disgenesia tiroidea canalizados a través de la Unidad de Neurodesarrollo del Instituto Nacional de Pediatría.

2.- Específicos

1. Describir las características clínicas de los pacientes con diagnóstico confirmado de HC por disgenesia.
2. Identificar mutaciones en el gen *NKX2-1* con diagnóstico confirmado de HC por disgenesia.
3. Identificar casos de expresión mínima o no penetrancia mediante el estudio clínico y molecular en los familiares de primer grado de aquellos pacientes en donde se identifique una mutación responsable de HC en el gen *NKX2-1*.

Diseño de estudio

Estudio observacional, descriptivo, transversal, ambispectivo.

Población de estudio

Pacientes con diagnóstico de HC canalizados a través de la Unidad de Neurodesarrollo del Instituto Nacional de Pediatría.

Población Objetivo

Pacientes con HC por disgenesia (hipoplasia, ectopia o atirosis) confirmado por perfil tiroideo y estudio gammagráfico y/o ultrasonido tiroideo.

Población Elegible:

Pacientes canalizados a través de la Unidad de Neurodesarrollo con diagnóstico confirmado de HC quienes se encuentran en seguimiento por dicha Unidad para estimulación.

V. MATERIAL Y METODOS

Criterios de inclusión:

1. Pacientes con diagnóstico de HC en seguimiento en la Unidad de Neurodesarrollo.
2. Ambos géneros.

3. Pacientes con diagnóstico confirmado de HC por disgenesia. La confirmación del diagnóstico se basó en la cuantificación de niveles hormonales tiroideos (perfil tiroideo con TSH, T3 total, T4 total, T3 libre, T4 libre y tiroglobulina) y con el estudio de gammagrama o ultrasonido tiroideo.
4. Padres y hermanos de pacientes en quienes se haya identificado una mutación y que autorizaron su inclusión al estudio mediante firma de carta de consentimiento/asentimiento.

Criterios de exclusión:

1. Paciente en donde el DNA extraído a partir de sangre periférica fue inadecuado y no acepten una segunda toma.

Definición de variables:

Se analizaron las siguientes variables:

VARIABLE	TIPO
Sexo	cualitativa, categórica, nominal, dicotómica
Edad	cuantitativa, numérica, discreta.
Manifestaciones clínicas por aparatos y sistemas:	cualitativa, categórica, nominal, dicotómica
	1) si= presente
	2) no= ausente

Facies hipotiroidea típica: tosca con puente nasal ancho y labios gruesos

Fontanela posterior amplia: cierre retardado (> 6 meses) de la sutura lambdoidea.

Macroglosia: aumento del volumen de la lengua.

Voz y llanto roncós: voz apagada, lenta, profunda y llanto áspero.

Alopecia: disminución y pérdida patológica de cabello, la cual suele ser de tipo androide, con pelo fino, muy seco, deslustrado y debilitado.

Piel engrosada: la piel aparece casi como *piel de naranja*, en la que se marcan mucho los surcos nasogenianos.

Hernia umbilical: es una protuberancia (abultamiento hacia afuera) del revestimiento abdominal, o de una porción de los órganos abdominales a través del área alrededor del ombligo.

OFTALMOLÓGICO

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

RESPIRATORIO

Cianosis peribucal: coloración azulada en región peribucal.

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

GASTROINTESTINAL

Dificultad en la deglución: lentitud en la ingesta de alimentos

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

PIEL Y MUCOSAS

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.

Xerosis: piel seca y áspera por falta de hidratación de la misma.

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.

Hipoactividad: disminución de los movimientos espontáneos.

Somnolencia: disminución del estado de alerta.

Hipotermia: disminución de la temperatura corporal.

VI. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Este trabajo es parte del proyecto 8/2007: ANÁLISIS CLÍNICO Y MOLECULAR DE LOS GENES *TTF-1*, *TTF-2* Y *PAX-8* EN PACIENTES CON HIPOTIROIDISMO, autorizado por los Comités de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Pediatría.

Se captaron a los pacientes con diagnóstico confirmado de HC por disgenesia tiroidea a través de la Unidad de Neurodesarrollo. En cada caso se invitó al familiar a participar y se solicitó carta de consentimiento informado y/o asentimiento (Anexos 1, 2, 3), se asentaron los datos clínicos de las variables a analizar en una hoja de captación de datos (Anexo 4).

Creación del banco de DNA

Se llevó a cabo el análisis mediante extracción del DNA a partir de sangre periférica colocada en tubos con EDTA como anticoagulante, 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 realizó 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 utilizó 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 minutos 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 el gen *NKX2-1*

La búsqueda de mutaciones se realizó mediante amplificación en cadena de la polimerasa (PCR), análisis mediante SSCP y secuenciación automática tipo Sanger.

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

La mezcla para llevar a cabo la amplificación contenía 2.5 U de Taq polimerasa, buffer de PCR 1X, 25mM de MgCl₂, 250 µMol/L de dNTPs, dimetilsulfoxido al 7%, 0.4 µMol de cada primer. Los primers de cada secuencia se enlistan en la tabla 1 (Breedveld G 2002) y 50 ng de DNA genómico. La reacción se llevó a cabo en el termociclador Applied Biosystems modelo Gene Amp PCR System 2720, bajo el siguiente programa:

Exón 1, 3A y 3C, desnaturalización a 94°C durante 5 minutos seguida de 10 ciclos a 94°C por 30 segundos y a 65°C a 1 °C por 30 segundos, a 72°C durante 40 segundos seguido por 25 ciclos a 94°C por 30 segundos y a 55°C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Exón 2, desnaturalización a 94°C por 5 minutos seguida de 10 ciclos a 94°C por 30 segundos, 70°C a 1°C por 30 segundos y 72°C por 40 segundos seguida de 25 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos y una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

Exón 3B, desnaturalización a 94°C por 1 minutos seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg, a 72°C por 2 min y una extensión final a 72°C durante 5 min. (Breedveld G 2002).

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 y Gyapay y cols 1994).

Tabla 1. Primer u oligonucleótidos que se utilizarán para la búsqueda mutaciones en los 3 exones del gen <i>NKX2-1</i> (Breedveld, G. 2002).		
EXÓN	OLIGOS	PPCR
1	F5'GGCAGAAGAGAGGCAGACAG3' R5'GGGGGAGTAACAGAGGAGGA3'	363pb
2	F5'AGCGAGGCTTCGCCTTCC3' R5'CTCTCGCCGCACCTCCTG3'	502pb
3A	F5'GCTAGGCTGCCTGGGTCA3' R5'CGCTGTCCTGCTGCAGTT3'	462pb
3B	F5'GTTCCAGAACCACCGCTACA3' R5'GTTTGCCGTCTTTCACCAG3'	182pb
3C	F5'CAACAGGCTCAGCAGCAGT3' R5'GGTGGATGGTGGTCTGTGT3'	453pb

Búsqueda de mutaciones por SSCP en el gen *NKX2-1*

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 sumergió 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 corrió de 18-20 hrs a 6 watts, 8 mA, con un límite de volts a 850. El revelado de las bandas se realizó con tinción de plata (Kit Biorad).

Secuenciación

En caso de observar un patrón de migración anormal en el SSCP, se realizó la secuenciación tipo Sanger para lo cual se utilizó el mismo par de primer usado para el SSCP y se secuenciaron ambas hebras forward y reverse. Se comparó la secuencia del gen en la base de datos de GeneBank para determinar si se trataba de una variante génica o si lo observado en el SSCP era un falso positivo. De haberse identificado alguna alteración a nivel molecular en caso índice, se realizaría el análisis de manera dirigida en padres por secuenciación automatizada.

Tamaño de la muestra.

Se estudiaron todos los casos confirmados de HC por disgenesia (hipoplasia, ectopia y agenesia glandular) enviados por la Unidad de Neurodesarrollo que se encontraban en seguimiento de junio de 2007 a junio de 2013, el tamaño de la muestra fue a conveniencia, se analizaron 34 pacientes.

Análisis Estadístico

Las frecuencias de mutaciones se calcularon en porcentaje, en caso de haber identificado mutaciones se compararían con los datos descritos en la literatura utilizando Xi cuadrada.

Consideraciones Éticas

Para la inclusión de los pacientes, se solicitó autorización al padre o tutor mediante la firma de un consentimiento informado. La información personal, de identidad y del genotipo fue manejada en forma estrictamente confidencial, siguiendo las normas establecidas por la declaración de Helsinki: Las Buenas Prácticas Médicas y del ELSI (del inglés “Ethical, Legar and Social Issues”). El asesoramiento genético se brindó en todos los casos de acuerdo a los resultados obtenidos del estudio molecular.

VII. RESULTADOS

El diagnóstico de HC por disgenesia tiroidea se estableció por perfil tiroideo en los 34 pacientes incluidos y por gammagrafía tiroidea en 33 y sólo en 1 caso el diagnóstico se estableció por imagen con ultrasonido. El rango de edad de los pacientes al momento de la confirmación del diagnóstico por perfil tiroideo fue de 16 días a 60 días, con una media de 43.5 días. De los 34 pacientes incluidos en el estudio, 27 casos (79.4%) fueron del sexo femenino y 7 del sexo masculino (20.5%); ver **gráfico 1**.

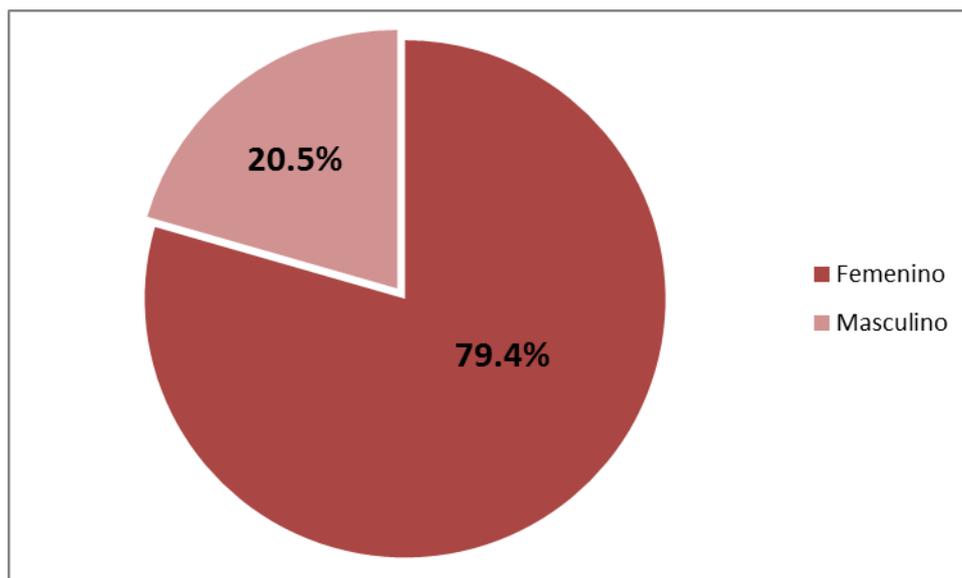


GRÁFICO 1: Distribución de pacientes con HC de acuerdo a género

Con respecto a las semanas de gestación al nacimiento, el 91.1% (n=31) de nuestros pacientes nacieron de término y 8.8% (n=3) nacieron pretérmino (Gráfico 2). De los pacientes que nacieron pretérmino, 1 de ellos nació de 34 SDG y 2 de ellos de 36 SDG. El diagnóstico de HC se realizó a las 36 SDG en el paciente que había nacido de 34 SDG y en los otros dos pacientes prematuros el diagnóstico de HC se realizó a las 37 y 38 SDG.

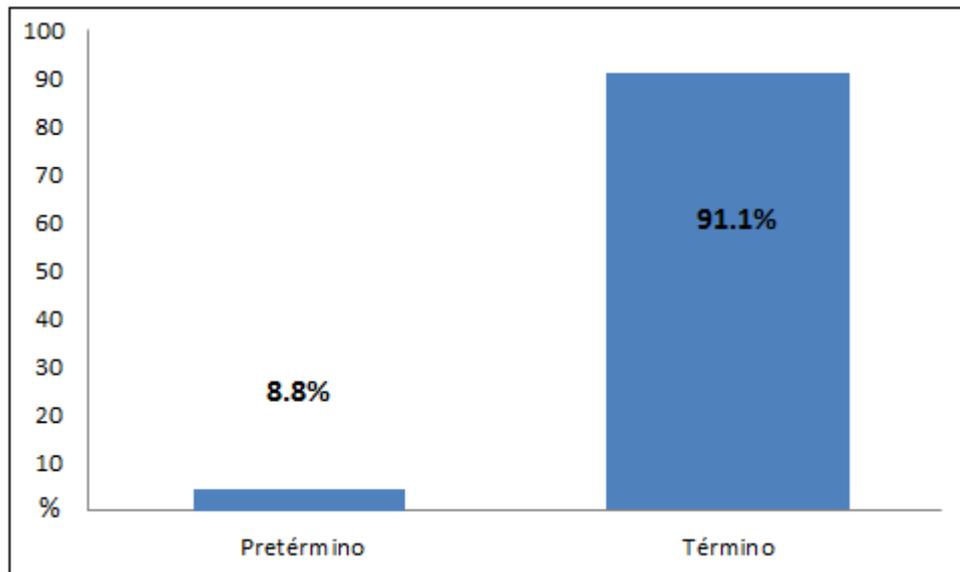


Gráfico 2: Distribución de pacientes con HC de acuerdo a su edad de gestación

Sólo en 28 de nuestros pacientes (82.3%) se midió tiroglobulina al momento del diagnóstico de HC; el rango de edad de los pacientes al momento de su medición fue de 16 a 60 días con una media de 43.82 días. Los niveles de tiroglobulina (TG) se encontraron en un rango de 0.05 a 300 ng/ml (RN 0.5 – 55 ng/ml) con una media de 101.08 ng/ml; ver **gráfico 3**.

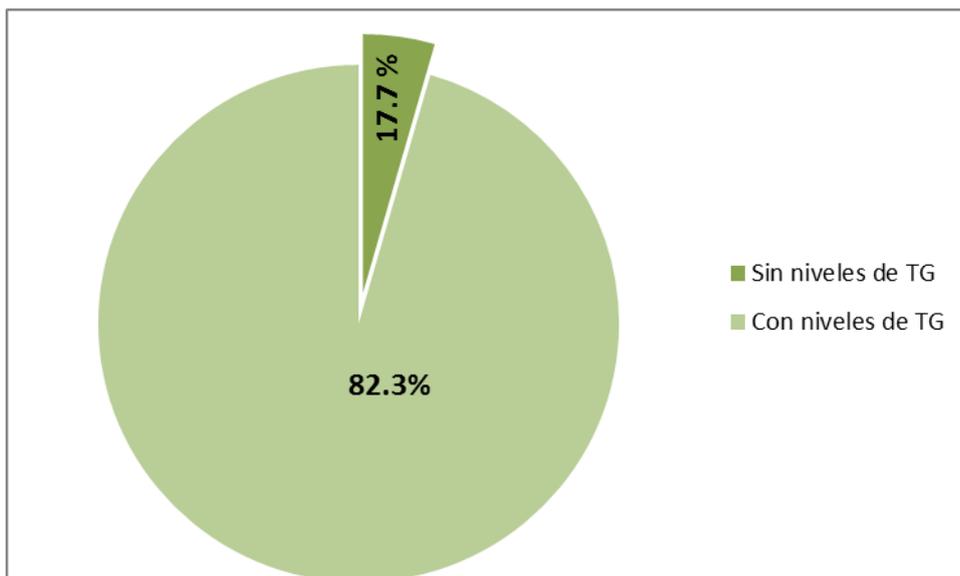


GRÁFICO 3: Distribución de pacientes a quien se les solicitaron niveles de TG al momento del diagnóstico de HC

El peso promedio de los pacientes al nacimiento fue de 3.30 gr (2.230 – 4.700) y la talla promedio fue de 50.1 cm (44 cm - 53 cm).

Las características clínicas que presentaron los pacientes fueron: hernia umbilical (n=27, 79.4%), ictericia (n=26, 76.4%), llanto ronco (n=24, 70.5%), fontanela posterior amplia (n=24, 70.5%), macroglosia (n=20, 58.8%), hipoactividad (n=20, 58.8%), estreñimiento (n=16, 47.0%), piel seca (n=13, 38.2%), edema palpebral (n=12, 35.2%), hipotonía (n=11, 32.3%), hipotermia (n=9, 26.4%), dificultad en la deglución de alimentos (n=7, 20.5%), facies típica (n=7, 20.5%), cianosis peribucal (n=5, 14.7%) y dificultad respiratoria (n=3, 8.8%); en ningún paciente se documentaron malformaciones asociadas; ver **gráfico 4**.

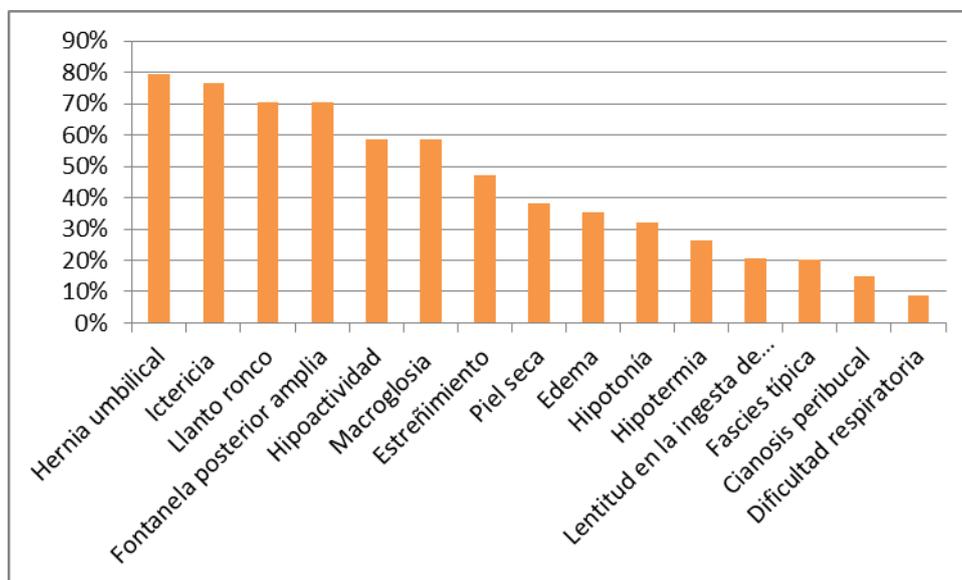


GRÁFICO 4: Manifestaciones clínicas encontradas asociadas al HC de acuerdo a porcentaje

Dentro de los parámetros bioquímicos, el 100 % de nuestros pacientes presentaron valores anormalmente elevados de TSH (rangos normales 0.4 IU/L – 4 IU/L), de los cuales 29 pacientes (85.2%) contaron con valores de TSH por arriba de 75 IU/L, ver **gráfico 5**.

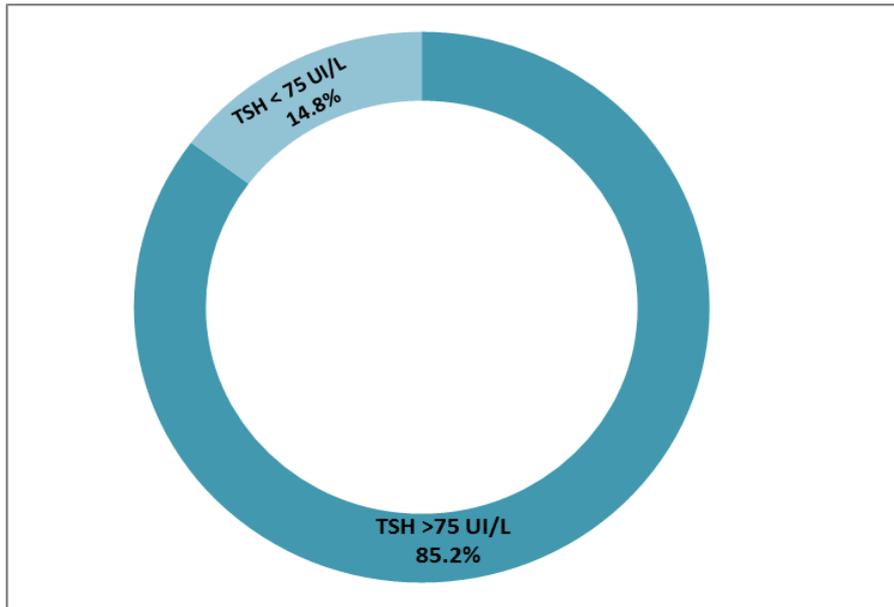


GRÁFICO 5: Porcentaje de pacientes con niveles de TSH >75 UI/L y <75 UI/L al momento del diagnóstico

Al 97% (n=33) de los pacientes se les realizó gammagrama, encontrando tiroides ectópica en el 57.5% (n=19) de los pacientes y atiroisis en el 42.4% (n=14) ver **gráfico 6**. Solamente en 1 paciente (2.94%) se realizó USG el cual reportó ausencia de tiroides.

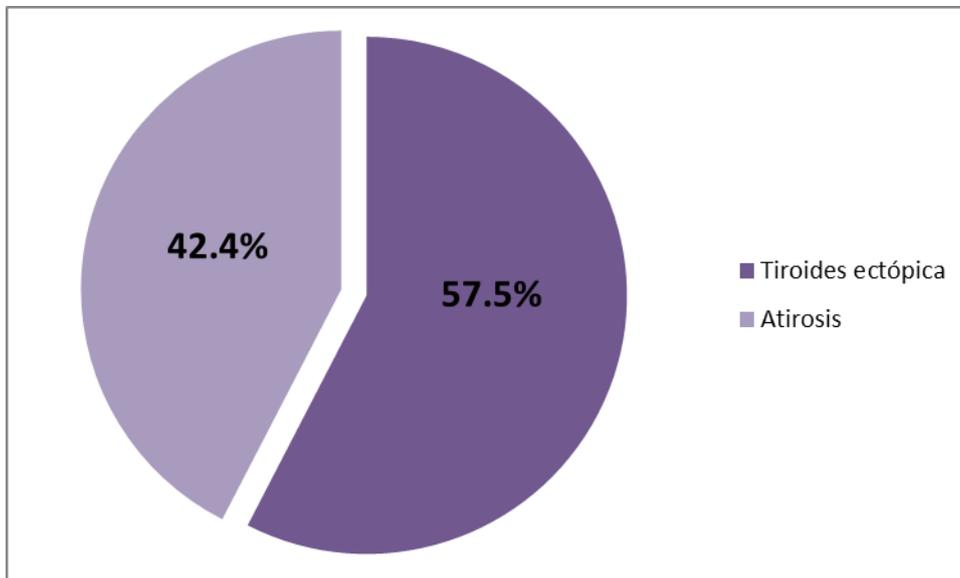


GRÁFICO 6: Distribución en porcentaje acorde al tipo de disgenesia tiroidea

Resultados moleculares

En nuestros 34 pacientes, la búsqueda de mutaciones en los 3 exones del gen *NKX2-1* se realizó mediante SSCP, para lo cual primero se realizó una amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa, posteriormente se tomaron 10 µl del producto para analizarlo por electroforesis en un gel de agarosa al 3 % teñido con bromuro de etidio. Ver **figuras 2,3 y 4**.

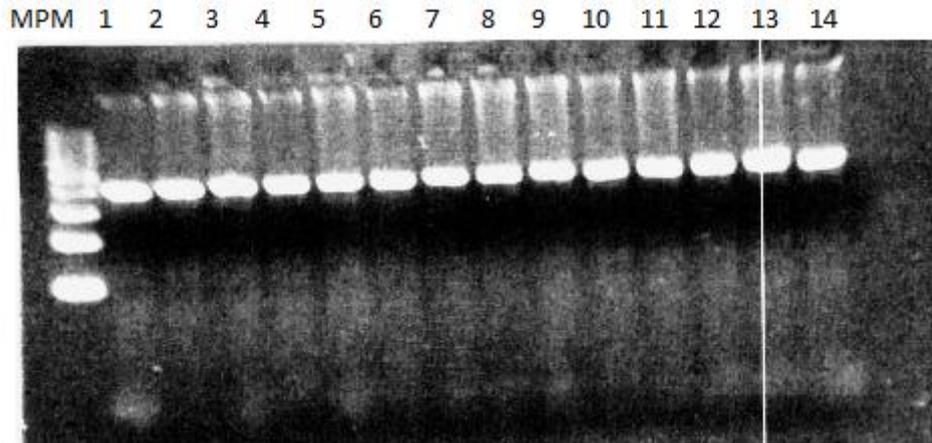


FIGURA 2: Productos de PCR en gel de agarosa al 3% (363 pb) del exón 1 del gen *NKX2-1*. MPM: marcador de peso molecular, carriles 1 a 14: presencia de los productos de PCR acorde al tamaño esperado en 14 pacientes con HC por disgenesia.

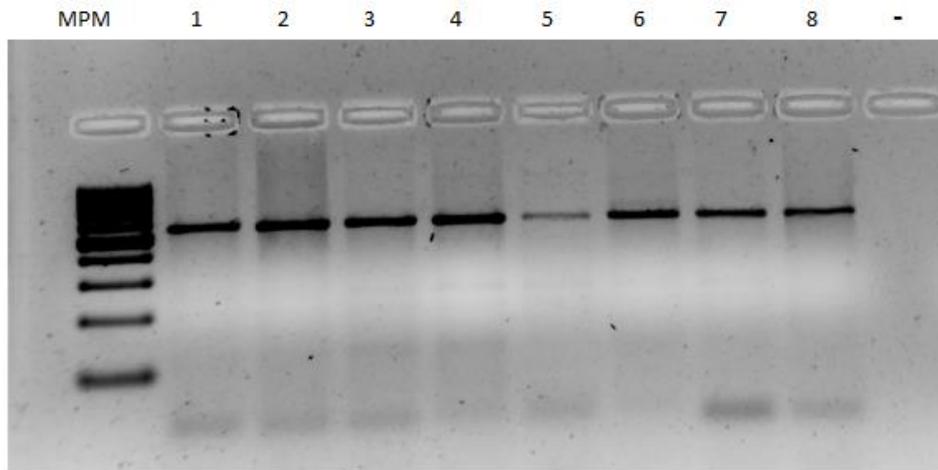


FIGURA 3: Productos de PCR en gel de agarosa al 3% (502 pb) del exón 2 del gen *NKX2-1*. MPM: marcador de peso molecular, carriles 1 a 8: productos de PCR acorde al tamaño esperado en 8 pacientes con HC por disgenesia. (-) Blanco, control sin DNA.

MPM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 CTL

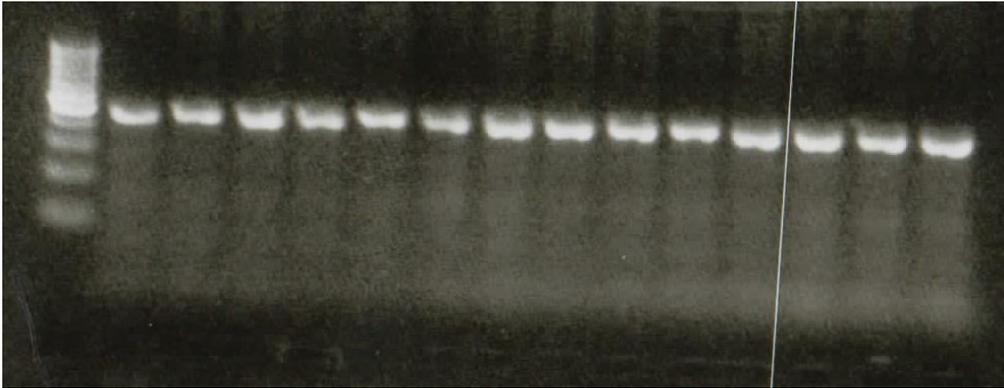


FIGURA 4: Productos de PCR en gel de agarosa al 3% (453pb) del exón 3 (amplicón 3C) del gen *NKX2-1*. MPM: marcador de peso molecular, carriles 1 a 13: productos de PCR acorde al tamaño esperado en 13 pacientes con HC por disgenesia, CTL muestra control normal.

Posteriormente se realizó en los 34 pacientes el análisis mediante SSCP de los 3 exones del gen *NKX2-1*, diluyendo los productos de PCR en su buffer acarreador y llevando a cabo su desnaturalización. Una vez desnaturalizados los productos, se cargaron en un gel de matriz MDE al 25% y el revelado de las bandas se realizó con la tinción de plata Kit Biorad. Ver **figuras 5 y 6**.

CTL CTL 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



FIGURA 5: SSCP del exón 2 del gen *NKX2-1* en gel de matriz MDE al 25% donde se muestra el análisis de 18 muestras (carriles 1 al 18) sin observarse un patrón de migración anormal en ningún carril. CTL Muestras de controles normales sin HC.

CTL 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



FIGURA 6: SSCP del exón 3 del gen *NKX2-1* en gel de matriz MDE al 25% donde se muestra el análisis de 18 muestras (carriles 1 al 18) sin observarse patrón de migración anormal en ningún carril. CTL Muestra control normal sin HC

En 5 de nuestros 34 pacientes, se observó un patrón de migración anormal mediante SSCP, por lo que en estas 5 muestras se amplificó el DNA genómico con el mismo par de primers usado para el SSCP y se realizó secuenciación automática de ambas hebras forward y reverse sin identificar una variante patológica o polimorfismo, por lo que se concluyó que lo observado mediante SSCP fue artefacto propio de la técnica. Ver **figuras 7 y 8**.

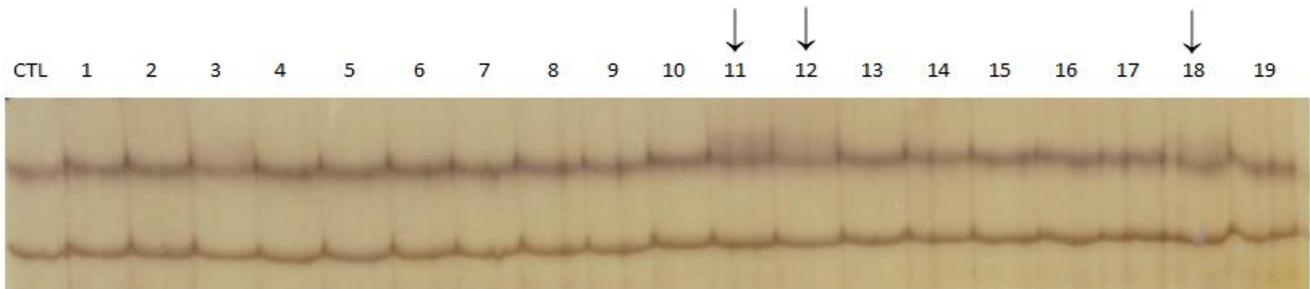


FIGURA 7: SSCP del exón 1 del gen *NKX2-1* en gel de matriz MDE al 25% donde se muestra un patrón de migración probablemente anormal en los carriles 11, 12 y 18, mientras que en el resto de los carriles se observa un patrón electroforético normal. CTL Muestra control normal sin HC

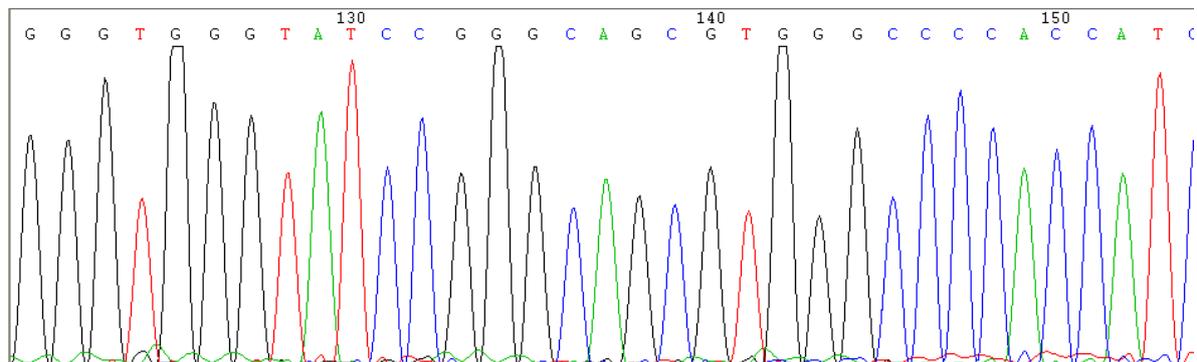


FIGURA 8: Electroferograma derivado de la amplificación y secuenciación automática del DNA genómico de un paciente, con probable patrón de migración anormal en SSCP, en el cual no se identificó mutación en el exón 1 del gen *NKX2-1*

VIII. DISCUSION

Varios autores, entre ellos Rastogi 2010, mencionan que existe mayor incidencia de hipotiroidismo congénito en los asiáticos, nativos americanos y en la población latinoamericana; así mismo Rendón Macías en 2008 mencionó que al estudiar población latinoamericana, México tiene una incidencia mayor de HC comparado con otros países como Chile y Argentina. La importancia de nuestro estudio radicó en tratar de encontrar una explicación a este aumento en la incidencia de HC en población mexicana. Sólo hay un trabajo reportado previamente por nuestro grupo, en el que se realizó el análisis molecular del gen *PAX8* en 100 pacientes mexicanos con HC por medio de SSCP y secuenciación, en el cual se identificó sólo una paciente femenina con agenesia tiroidea que portaba la mutación p.Arg31His, la baja frecuencia de mutaciones en *PAX8* fue acorde a la literatura; sin embargo, en este trabajo se concluyó que se requerían estudiar otros genes que participan en el desarrollo de la tiroides, como *NKX2-1*, para conocer su participación en pacientes con HC (Alcántara, 2012).

Con respecto al género, nuestro estudio, mostró un predominio del sexo femenino (n=27, 79.4%) con respecto al masculino (n=7, 20.5%), con una proporción de 3.8:1. Esto difiere con lo reportado en la literatura anglosajona en donde la relación es de 2:1 (Rose 2006, Rastogi 2010); mientras que en las poblaciones hispanas el predominio en el sexo femenino tiene una relación de 3:1 (Lorey 1992).

En el 97% de nuestros pacientes (n=33) la muestra obtenida para el tamiz de HC fue del talón y el rango de edad de los pacientes al momento de la confirmación del diagnóstico por perfil tiroideo fue de 16 días a 60 días, con una media de 43.5 días, este dato es similar a lo publicado en población Mexicana por Vela y cols., sin embargo, la edad promedio de nuestros pacientes se encuentra 14.5 días mayor para el diagnóstico de HC comparado con otras publicaciones internacionales donde reportan un diagnóstico e inicio de tratamiento a los 19 días. A pesar de esto, el 100% de nuestros pacientes iniciaron su tratamiento el mismo día en que se les realizó su diagnóstico.

De acuerdo a la edad al diagnóstico de HC en nuestros 34 pacientes, solamente en 5 de ellos (14.7%) se realizó un diagnóstico precoz (antes de los primeros 30 días de vida). Este retraso al diagnóstico coincide con publicaciones previas de la Dra Vela de 2004, en donde de 2001 a 2002 se estudió el momento del diagnóstico de HC en los 32 estados de la república mexicana, y el Distrito Federal tuvo un retraso al diagnóstico de 2.5 días con respecto a la meta ideal (primeros 30 días de vida).

Con respecto a las semanas de gestación al nacimiento, el 91.1% (n=31) de nuestros pacientes nacieron de término y 8.8% (n=3) nacieron pretérmino. De los pacientes que nacieron pretérmino, 1 de ellos nació de 34 SDG y 2 de ellos nacieron de 36 SDG. El diagnóstico de HC se realizó a las 36 SDG en el paciente que había nacido de 34 SDG y en los otros dos pacientes prematuros el diagnóstico de HC se realizó a las 37 y 38 SDG. La espera en el diagnóstico antes de los primeros 30 días de vida en estos 3 pacientes en particular, favoreció evitar un diagnóstico erróneo debido a las fluctuaciones de las hormonas tiroideas que se presentan en los pacientes prematuros (Rose 2006).

Con relación al peso al nacimiento de nuestros 31 pacientes (excluyendo a los 3 pacientes pretérmino), en ninguno de ellos documentamos peso bajo para la edad gestacional. Sin embargo en 11 de ellos (32.3%) documentamos peso alto o límite alto para la edad gestacional. A pesar de esto, la media de peso de nuestros 31 pacientes fue de 3.38 kg con talla promedio de 50.41 cm, lo que muestra similitud con lo previamente reportado por la Dra Vela en 2004 quien reportó un peso promedio de 3.298 gr.

El predominio de las características clínicas presentadas por nuestros pacientes, fueron similares a las previamente descritas en la literatura, sin embargo el orden de presentación varió. La hernia umbilical fue la más frecuentemente encontrada en nuestros pacientes (n=27, 79.41%), esta misma característica predominó en el estudio de Vela durante el 2004 con población mexicana (n=244, 43.73%), sin embargo con respecto a la literatura internacional, la hernia umbilical se ha ubicado en 4to lugar (Grant 1992 y Rastogi 2010), mientras que la ictericia prolongada se ubica por ellos en primer lugar y en nuestro estudio en 2do lugar (n=26, 76.4%) al igual que en el de la Dra Vela de 2004 con un 41.58% (n=232).

La etiología más común de HC por disgenesia es la tiroides ectópica, esta frecuencia también se documentó en el presente trabajo ya que 20 de nuestros 34 pacientes, cursaron con tiroides ectópica (58.8%) y la atirois fue reportada en 14 (41.1%). En el estudio no existieron pacientes con hipoplasia tiroidea probablemente por haber sido una muestra pequeña.

Con relación a los resultados moleculares, en nuestros 34 pacientes se realizó la búsqueda de mutaciones mediante amplificación en cadena de la polimerasa (RCP) y análisis de los 3 exones del gen *NKX2-1* mediante SSCP e incluso en 5 casos se realizó secuenciación automática, sin encontrar mutaciones patológicas o variantes polimórficas. Lo anterior, esta acorde a lo observado en estudios previos en donde no se identificaron mutaciones en el gen *NKX2-1* en pacientes con HC sin otras manifestaciones clínicas de origen Italiano (Perna, 1997, Lapi, 1997) y Japonés (Hishinuma, 1998, Narumi en 2010).

Aunque el tamaño de muestra de nuestro estudio fue menor con relación a Lapi (n=61) y Narumi (n=102); el no observar mutaciones en pacientes de origen mexicano; corrobora lo previamente mencionado por estos autores que mutaciones en el gen *NKX2-1* no son responsables de HC por disgenesia.

Debido a que la participación de genes predisponentes de HC como *PAX8* (Alcántara, 2012) y *NKX2-1* parece ser pequeña en nuestra población, se requiere estudiar otros genes candidatos tales como *NKX 2-5* y *FOXE-1* para determinar si polimorfismos o mutaciones en ellos son causales de la mayor prevalencia de esta enfermedad en México.

Otra causa que podría explicar la mayor incidencia de HC en la población mexicana sería la deficiencia en la ingesta de yodo. En un estudio realizado por la Dra. Vela en 2003 en 25 427 recién nacidos de origen mexicano, observó que 24.22% de ellos (n=6158) presentaron hipertirotoxinemia al nacimiento (TSH>5 μ UI/ml), por lo que mencionó que este hallazgo podría deberse a una deficiencia en la ingesta materna de yodo. Lo anterior, esta acorde a lo observado por Martínez - Salgado en el 2002, al estudiar 96 familias mexicanas (niños y madres embarazadas), en quienes a pesar de que todas consumían sal de mesa, sólo el 50% de las familias (n=48) contaban con sal adecuadamente yodada.

Dada la morbilidad que condiciona el HC, en particular cuando no se realiza un diagnóstico temprano con el consecuente inicio de tratamiento, es importante identificar en nuestra población las posibles causas que determinan una mayor incidencia de esta enfermedad, mediante estudios como el presente en el que se analicen factores genéticos, ambientales e incluso epigenéticos, ya que esto nos permitirá determinar si se pueden realizar intervenciones para disminuir su incidencia o contar con estrategias de prevención.

IX. CONCLUSIONES

1. Se observó un predominio del sexo femenino con respecto al masculino con una proporción de 3.8:1
2. En el 97% de nuestros pacientes (n=33) la sangre obtenida para el tamiz fue del talón y la edad al momento del diagnóstico fue similar a lo reportado previamente.
3. El 91.1% (n=31) de nuestros pacientes nacieron de término y 8.8% (n=3) nacieron pretérmino. En estos 3 pacientes el diagnóstico de HC se realizó después de los primeros 30 días de vida lo que permitió realizar un diagnóstico certero (evitando así las fluctuaciones de las hormonas tiroideas que se presentan en los pacientes prematuros).
4. Solamente en 5 pacientes (14.7%) se realizó un diagnóstico precoz de HC (antes de los primeros 30 días de vida); mientras que en los otros 29 pacientes (85.2%) el diagnóstico de HC se realizó entre el primer y segundo mes de vida, a pesar de ello, el inicio del tratamiento se instauró el mismo día en que se les diagnosticó el HC.
5. En el 32.3% de nuestros pacientes (n=11) se documentó peso alto o límite alto para la edad gestacional similar a lo previamente reportado.
6. El predominio y orden de frecuencia de las características clínicas presentadas por nuestros pacientes, fueron similares a las previamente descritas en la literatura mexicana; sin embargo, en comparación con la literatura universal, el orden de frecuencia varió, ya que la característica clínica más frecuente en nuestro país fue la hernia umbilical y en otros países se ha documentado a la ictericia como la característica clínica más frecuente.
7. En nuestros pacientes, la etiología más común de HC por disgenesia fue la tiroides ectópica, seguida de la atiroxis, lo que coincide con lo documentado previamente. En nuestro estudio no existieron pacientes con hipoplasia tiroidea probablemente por el pequeño tamaño de la muestra.
8. En todos nuestros pacientes se realizó la búsqueda de mutaciones en los 3 exones del gen *NKX2-1* sin encontrar mutaciones patológicas, lo que coincide con los resultados por otros autores previamente.
9. Se requiere incluir en la búsqueda a otros genes como determinantes causales de HC por disgenesia en la población mexicana.

X. ANEXOS

ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO (PARA EL CASO ÍNDICE)

ANÁLISIS CLÍNICO Y MOLECULAR DE LOS GENES *TTF-1*, *TTF-2* Y *PAX-8* EN PACIENTES CON HIPOTIROIDISMO

¿Para qué se efectúa este estudio?

Para conocer mejor la causa genética que contribuye a nacer con hipotiroidismo congénito (falla en la función de la tiroides) y es probable que en el futuro los resultados puedan servir para un mejor diagnóstico, pronóstico y tratamiento de esta enfermedad.

¿En qué consiste el estudio?

Se obtendrá una muestra de sangre periférica, de 3 a 5 ml, y se obtendrá el material genético (ADN) de su hijo (a), el cual determina sus características físicas y de éste se analizarán regiones que pueden estar implicadas en el padecimiento de Hipotiroidismo Congénito. Se espera contar con la participación de mínimo 100 pacientes para este estudio.

¿Quiénes pueden participar en el estudio?

Todos los pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría que tengan Hipotiroidismo congénito.

¿Quiénes no podrán participar en el estudio?

Aquellos pacientes que no deseen participar en el estudio.

¿Qué se le pedirá a su hijo que haga?

Se extraerá en una ocasión, una muestra de sangre periférica, de 3 a 5 ml, tomada por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como son el uso de equipo estéril y desechable, así como el uso de guantes.

¿Quién sufragará los gastos del estudio?

Ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación, tendrán un costo para usted.

¿Qué beneficio mi hijo puede esperar?

Directamente no tendrá un beneficio, la información obtenida durante el proyecto de investigación generará conocimiento para conocer mejor la causa genética que contribuye a nacer con hipotiroidismo congénito y es probable que en el futuro los resultados puedan servir para un mejor diagnóstico, pronóstico y tratamiento de esta enfermedad.

¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas?

Puede comunicarse con los investigadores responsables: Dra. Ariadna González del Ángel y Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 Ext. 1306
Presidente del Comité de Ética: Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica. Tel 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.

¿Mi hijo puede negarse a participar en este estudio y se le puede pedir a mi hijo que abandone el estudio?

La participación de su hijo (a) es total y absolutamente voluntaria, pueden abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en la atención de su hijo (a) en cualquier servicio de la Institución.

¿Quiénes van a tener información de los datos de mi hijo?

Los datos personales de su hijo (a) en el estudio, serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito.

La información necesaria para el análisis de los resultados, puede ser evaluada y revisada únicamente por los médicos e investigadores del presente proyecto. De igual forma, toda la información clínica e impresa de su hijo (a) recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos quedarán encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto, tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

¿Qué se va a hacer con las muestras biológicas (extracción de DNA)?

Quedará codificada bajo una clave que no incluya su nombre y datos clínicos en el contenedor de dicha muestra, y ésta quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud y esta muestra sólo podrá ser empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio de Hipotiroidismo congénito, si usted así lo autoriza, para lo cual los investigadores del INP lo recontactarían, y preservando siempre la confidencialidad de la información derivada.

¿Puedo conocer los resultados del estudio?

Si usted así lo solicita, en cualquier momento, se le hará de su conocimiento por los investigadores responsables del estudio.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

Declaro que en forma libre y sin que nadie me presione, decido que mi hijo (a) participe en este estudio, una vez que he leído cuidadosamente este formato y se me ha explicado en forma clara en que consiste este estudio y mis preguntas han sido contestadas. Así mismo entiendo que nuestra participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente hago constar que si deseamos no participar, ello no repercutirá en la atención médica brindada a mi hijo (a) dentro de la Institución y que se me ha informado que ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación, tendrán un costo para mí.

Atentamente

Padre, Madre o tutor	Firma	Fecha
Nombre del niño _____		

Nombre del Testigo	Dirección	Fecha y Firma
Nombre del Testigo	Dirección	Fecha y Firma

Obtuvo el consentimiento: _____	_____
Nombre	Fecha

Recibí copia de este consentimiento

Nombre y firma	Fecha

Investigadores responsables: Dra. Ariadna González del Ángel y Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza. Laboratorio de Biología Molecular, 9º Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 Ext. 1306

Presidente del Comité de Ética: Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica. Tel 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.

ANEXO 2

ASENTIMIENTO INFORMADO (CASO ÍNDICE)

ANÁLISIS CLÍNICO Y MOLECULAR DE LOS GENES *TTF-1*, *TTF-2* Y *PAX-8* EN PACIENTES CON HIPOTIROIDISMO

¿Para qué se efectúa este estudio?

Para conocer mejor la causa genética que origina tu enfermedad.

¿En qué consiste el estudio?

Se te tomará una muestra de sangre de 3 a 5 ml, y se estudiarán regiones que pueden estar implicadas en tu enfermedad. Se espera contar con la participación de mínimo 100 niños como tú, para este estudio.

¿Quiénes pueden participar en el estudio?

Todos los niños atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría que tengan Hipotiroidismo congénito.

¿Quiénes no podrán participar en el estudio?

Aquellos niños que no deseen participar en el estudio.

¿Qué se te pedirá que hagas?

Se te tomará una muestra de sangre periférica, de 3 a 5 ml, tomada por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como son el uso de equipo estéril y desechable, así como el uso de guantes.

¿Quién pagará los gastos del estudio?

Ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación, tendrán un costo para ti.

¿Qué beneficio puede yo esperar?

La información obtenida durante este estudio nos ayudará a saber más sobre tu enfermedad.

¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas?

Puedes comunicarte con los investigadores responsables: Dra. Ariadna González del Ángel y Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza. Así como a la Dra. Matilde Ruiz García en caso de que tengas dudas sobre tus derechos.

¿Puedo negarme a participar en este estudio y puedo abandonar el estudio?

Tu participación es total y absolutamente voluntaria. Puedes decidir ya no querer participar en el estudio en cualquier momento, sin que esto afecte tu atención en cualquier servicio de la Institución.

¿Quiénes van a tener la información de mis datos?

Tus datos personales en el estudio, serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con otras personas.

La información necesaria para el análisis de los resultados, puede ser evaluada y revisada únicamente por los médicos e investigadores del presente proyecto. De igual forma, toda la información clínica e impresa de ti, recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave.

¿Qué se va a hacer con la muestra de sangre que ya no ocupen?

Quedará codificada bajo una clave que no incluya tu nombre y datos clínicos en el contenedor de dicha muestra, y ésta quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del

Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud, manteniendo la confidencialidad de la información derivada.

¿Puedo conocer los resultados del estudio?

Si tú así lo solicitas, en cualquier momento, se te hará de tu conocimiento por los investigadores responsables del estudio.

DECLARACIÓN DE ASENTIMIENTO

Declaro que en forma libre y sin que nadie me presione, decido participar en este estudio, una vez que he leído cuidadosamente este formato y se me ha explicado en forma clara en que consiste este estudio y mis preguntas han sido contestadas. Así mismo entiendo que mi participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente si no quiero participar, ello no afectará en mi atención médica brindada dentro de la Institución y que se me ha informado que ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación, tendrán un costo para mí ni mis papás.

Atentamente

Nombre del Paciente

Fecha y Firma

Nombre del Testigo

Fecha y Firma

Nombre del Testigo

Fecha y Firma

ANEXO 3

CONSENTIMIENTO INFORMADO (PARA FAMILIARES DE 1ER GRADO)

ANÁLISIS CLÍNICO Y MOLECULAR DE LOS GENES *TTF-1*, *TTF-2* Y *PAX-8* EN PACIENTES CON HIPOTIROIDISMO

¿Para qué se efectúa este estudio?

Para conocer mejor la causa genética que contribuye a nacer con hipotiroidismo congénito (falla en la función de la tiroides) y es probable que en el futuro los resultados puedan servir para un mejor diagnóstico, pronóstico y tratamiento de esta enfermedad.

¿En qué consiste el estudio?

Se obtendrá una muestra de sangre periférica, de 3 a 5 ml, y se obtendrá el material genético (ADN) de usted, el cual determina sus características físicas y de éste se analizarán regiones que pueden estar implicadas en el padecimiento de Hipotiroidismo Congénito.

¿Quiénes pueden participar en el estudio?

Todos los familiares de primer grado de los pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría que tengan Hipotiroidismo congénito y se haya localizado una mutación o polimorfismo.

¿Quiénes no podrán participar en el estudio?

Aquellos familiares que no deseen participar en el estudio.

¿Qué se le pedirá a usted que haga?

Se extraerá en una ocasión, una muestra de sangre periférica, de 3 a 5 ml, tomada por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como son el uso de equipo estéril y desechable, así como el uso de guantes.

¿Quién sufragará los gastos del estudio?

Ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación, tendrán un costo para usted.

¿Qué beneficio puede esperar?

Directamente no tendrá un beneficio, la información obtenida durante el proyecto de investigación generará conocimiento para conocer mejor la causa genética que contribuye a nacer con hipotiroidismo congénito y es probable que en el futuro los resultados puedan servir para un mejor diagnóstico, pronóstico y tratamiento de esta enfermedad.

¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas?

Puede comunicarse con los investigadores responsables: Dra. Ariadna González del Ángel y Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 Ext. 1306
Presidente del Comité de Ética: Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica. Tel 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.

¿Puedo negarme a participar en este estudio?

La participación de usted es total y absolutamente voluntaria, puede abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en la atención de su hijo (a) en cualquier servicio de la Institución.

¿Quiénes van a tener información de mis datos?

Los datos personales de usted en el estudio, serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito.

La información necesaria para el análisis de los resultados, puede ser evaluada y revisada únicamente por los médicos e investigadores del presente proyecto. De igual forma, toda la información clínica e impresa de usted recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos quedarán encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto, tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

¿Qué se va a hacer con las muestras biológicas (extracción de DNA)?

Quedará codificada bajo una clave que no incluya su nombre y datos clínicos en el contenedor de dicha muestra, y ésta quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud y esta muestra sólo podrá ser empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio de Hipotiroidismo congénito, si usted así lo autoriza, para lo cual los investigadores del INP lo recontactarían, y preservando siempre la confidencialidad de la información derivada.

¿Puedo conocer los resultados del estudio?

Si usted así lo solicita, en cualquier momento, se le hará de su conocimiento por los investigadores responsables del estudio.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

Declaro que en forma libre y sin que nadie me presione, decido participar en este estudio, una vez que he leído cuidadosamente este formato y se me ha explicado en forma clara en que consiste este estudio y mis preguntas han sido contestadas. Así mismo entiendo que nuestra participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente hago constar que si deseo no participar, ello no repercutirá en la atención médica brindada a mi hijo (a) dentro de la Institución y que se me ha informado que ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación, tendrán un costo para mí.

Atentamente

_____ Padre o Madre	_____ Firma	_____ Fecha
_____ Hermano Mayor de 18 años	_____ Firma	_____ Fecha
_____ Nombre del Testigo	_____ Dirección	_____ Fecha y Firma
_____ Nombre del Testigo	_____ Dirección	_____ Fecha y Firma

Obtuvo el consentimiento: _____
Nombre Fecha

Investigadores responsables: Dra. Ariadna González del Ángel y Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 Ext. 1306

Presidente del Comité de Ética: Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica. Tel 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.

ANEXO 4

NÚMERO DE REGISTRO/MUESTRA: _____

**HOJA DE CAPTACIÓN DE DATOS
ANÁLISIS CLÍNICO Y MOLECULAR DE LOS GENES *TTF-1*, *TTF-2* Y *PAX-8* EN
PACIENTES CON HIPOTIROIDISMO**

EXPEDIENTE INP _____
TSH por tamiz: 0= no realizado 1= cordón 2= talón _____

NOMBRE _____ DEL _____ NIÑO
(A) _____
FECHA DE NACIMIENTO _____ SEXO _____
EDAD AL DIAGNÓSTICO _____
EDAD DE INICIO DE TRATAMIENTO _____
EDAD AL INGRESO DEL PROYECTO _____
PESO (al nacer) _____ TALLA (al nacer) _____ SDG _____
NOMBRE _____ DE _____ LA
MADRE _____ EDAD _____
NOMBRE _____ DEL
PADRE _____ EDAD _____
DOMICILIO _____
_____ TELÉFONO

DATOS CLÍNICOS

1=Presente, 2= ausente

FACIES TÍPICA _____ FONTANELA POSTERIOR AMPLIA _____
ICTERICIA _____ EDEMA _____ MACROGLOSIA _____
LLANTO RONCO _____ HIPOTERMIA _____
PIEL SECA (áspera) _____ HIPOTONÍA _____
HIPOACTIVIDAD _____ ESTREÑIMIENTO _____ HERNIA UMBILICAL _____
DIFICULTAD RESPIRATORIA _____ LENTITUD en INGESTA de ALIMENTOS _____
CIANOSIS PERIBUCAL ó DISTAL _____ MALFORMACIONES ASOCIADAS _____
¿CUÁLES? _____

PRUEBAS CONFIRMATORIAS

INP: _____ **EXTRA-INP:** _____

PERFIL TIROIDEO

EDAD DEL PERFIL TIROIDEO

EDAD CRONOLÓGICA

PRUEBA	RESULTADO	Valor referencia*	PRUEBA	RESULTADO	Valor referencia *
T3 Total		72-170 ng/dl	T3 Libre		1.8-6.0 pg/ml
T4 Total		4.5-12.5 mcg/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

*Valores de referencia por técnica de laboratorio de hormonas del INP.

** Edad a la que se realizó: _____

DIAGNÓSTICO: TAMIZ _____ CLÍNICA _____ AMBOS _____

GAMMAGRAMA TIROIDEO: _____ CON TX: _____ SIN TX: _____
 EDAD A LA QUE SE REALIZÓ EL GAMMAGRAMA: _____
 HALLAZGOS: 1= tiroides ectópica, 2=tiroides hipoplásica, 3=ausencia de tiroides

USG TIROIDEO: _____
 EDAD A LA QUE SE REALIZÓ EL USG TIROIDEO: _____
 HALLAZGOS: 1=tiroides ectópica, 2=tiroides hipoplásica, 3=ausencia de tiroides

RESULTADOS DE ANÁLISIS MOLECULAR

GEN	ALTERACIÓN EN LA SECUENCIACIÓN	EXÓN	MUTACIÓN	POLIMORFISMOS IDENTIFICADOS
<i>TTF-1</i>				
<i>TTF-2</i>				
<i>PAX-8</i>				

ÁRBOL GENEALÓGICO:

OBSERVACIONES:

REGISTRO DE FAMILIARES DE CASOS INDICE

FECHA de TOMA de MUESTRA _____
 TIPO DE MUESTRA: _____
 NOMBRE _____ DEL
 FAMILIAR _____
 FECHA DE NACIMIENTO _____ SEXO _____ EDAD _____
 DOMICILIO _____
 _____ TELEFONO _____
 No de Registro interno (muestra DNA): _____.

XI REFERENCIAS

- Acebrón A, Aza-Blanc P, Rossi DL et al. Congenital human thyroglobulin defect due to low expression of the thyroid-specific transcription factor TTF-1. *J Clin Invest*. 1995 Aug;96(2):781-5.
- Alcántara Ortigoza MA, González del Angel A, Martínez Cruz V et al. Molecular analysis of the PAX8 gene in a sample of Mexican patients with primary congenital hypothyroidism: identification of the recurrent p.Arg31His mutation. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012 Jan;76(1):148-50.
- Breedveld GJ, van Dongen JW, Danesino C et al. Mutations in TTF-1 are associated with benign hereditary chorea. *Hum Mol Genet*. 2002 Apr 15;11(8):971-9.
- Brown AL, Fernhoff PM, Milner BA et al. Racial differences in the birth prevalence of congenital hypothyroidism. *J. Pediatr*; 1991;99:934-936.
- Damante G. Thyroid defects due to pax8 gene mutations, *Eur J. Endocrinology* 1998 139:563-566.
- De Felice M, Di Lauro R. Thyroid development and its disorders: Genetics and molecular Mechanisms. *Endocr Rev*. 2004 Oct;25(5):722-46.
- De Felice M, Ovitt C, Biffani E et al. A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nat Genet*. 1998 Aug;19(4):395-8.
- Devrient K, Vanhole C, Mattis G et al. Deletion of thyroid transcription factor-1 gen in an infant with neonatal thyroid dysfunction and respiratory failure. *N Engl J Med* 1998; 338: 1317-8.
- Doyle DA, Gonzalez I, Thomas B et al. Autosomal dominant transmission of congenital hypothyroidism, neonatal respiratory distress, and ataxia caused by a mutation of NKX2.1. *J Pediatr*. 2004 Aug;145(2):190-3
- Frasier SD, Penny R, Snyder R. Primary congenital hypothyroidism in Spanish-surnamed infants in Southern California. *J Pediatr*. 1982 Aug;101(2):315.
- Grant DB, Smith I, Fuggle PW et al. Congenital hypothyroidism detected by neonatal screening: relationship between biochemical severity and early clinical features. *Arch Dis Child*. 1992 Jan;67(1):87-90.
- Hamdan H, Liu H, Li C et al. Structure of the human Nkx2.1 gene. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Mar 13;1396(3):336-48.
- Harris KB, Pass KA. Increase in congenital hypothyroidism in New York State and in the United States. *Mol Genet Metab*. 2007;91(3):268-77.
- Hishinuma A, Kuribayashi T, Kanno Y et al. Sequence analysis of thyroid transcription factor-1 gene reveals absence of mutations in patients with thyroid dysgenesis but presence of polymorphisms in the 5' flanking region and intron. *Endocr J*. 1998 Aug;45(4):563-7
- Iwatani N, Mabe H, Devriendt K et al. Deletion of NKX2.1 gene encoding thyroid transcription factor-1 in two siblings with hypothyroidism and respiration failure. *J. Pediatr* 2000; 137:272-6.
- Klett M. Epidemiology of congenital hypothyroidism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1997;105 Suppl 4:19-23.

- Krude H, Schütz B, Biebermann H et al. Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human NKX2-1 haploinsufficiency. *J Clin Invest*. 2002 Feb;109(4):475-80.
- Lapi P, Macchia PE, Chiovato L et al. Mutations in the gene encoding thyroid transcription factor-1 (TTF-1) are not a frequent cause of congenital hypothyroidism (CH) with thyroid dysgenesis. *Thyroid*. 1997 Jun;7(3):383-7
- Lorey F, Cunningham GC. Birth prevalence of primary congenital hypothyroidism by sex and ethnicity. *Hum Biol*. 1992 Aug;64(4):531-8.
- Martínez Salgado H, Castañeda Limones R, Lechuga Martín del Campo D et al. Deficiencia de yodo y otros posibles bociógenos en la persistencia del bocio endémico en México. *Gac Med Mex*. 2002 Mar-Apr;138(2):149-56
- Montanelli L, Tonacchera M. Genetics and phenomics of hypothyroidism and thyroid dys- and agenesis due to PAX8 and TTF1 mutations. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Jun 30;322(1-2):64-71.
- Narumi S, Muroya K, Asakura Y. Transcription factor mutations and congenital hypothyroidism: systematic genetic screening of a population-based cohort of Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Apr;95(4):1981-5.
- Perna MG, Civitareale D, De Filippis V et al. Absence of mutations in the gene encoding thyroid transcription factor-1 (TTF-1) in patients with thyroid dysgenesis. *Thyroid*. 1997 Jun;7(3):377-81
- Pohlenz J, Dumitrescu A, Zundel D et al. Partial deficiency of Thyroid transcription factor 1 produces predominantly neurological defects in human and mice. *J. Clin Invest* 2002;109:169-73.
- Rastogi MV, LaFranchi SH. Congenital hypothyroidism. *Orphanet J Rare Dis*. 2010 Jun 10;5:17.
- Rendón-Macías ME, Morales-García I, Huerta-Hernández E et al. Birth prevalence of congenital hypothyroidism in Mexico. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2008 Sep;22(5):478-85.
- Rose SR, Brown RS, Foley T et al. Update of newborn screening and therapy for congenital hypothyroidism. *Pediatrics*. 2006 Jun;117(6):2290-303.
- Thorwarth A, Schnittert-Hübener S, Schrupf P et al. Comprehensive genotyping and clinical characterisation reveal 27 novel NKX2-1 mutations and expand the phenotypic spectrum. *J Med Genet*. 2014 Jun;51(6):375-87.
- Toublanc JE. Comparison of epidemiological data on congenital hypothyroidism in Europe with those of other parts in the world. *Horm Res*. 1992;38(5-6):230-5.
- Vela-Amieva M, Gamboa-Cardiel-S, Pérez-Andrade M et al. Epidemiología del Hipotiroidismo Congénito. *Salud Pública de México* 2004;46(2):141-147).
- Vela-Amieva M, Hernández-Osorio C, Gamboa-Cardiel S et al. Hipertirotropinemia en recién nacidos mexicanos. *Salud Pública de Méx*. 2003; 45 (4): 269-75.
- Verkerk PH, Buitendijk SE, Verloove-Vanhorick SP. Congenital hypothyroidism screening and the cutoff for thyrotropin measurement: recommendations from The Netherlands. *Am J Public Health*. 1993 Jun;83(6):868-71.