

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

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

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

**ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN *TTF-2* EN PACIENTES CON
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:

DR. JUAN ALBERTO GODÍNEZ CHAPARRO

**TUTOR DE TESIS:
DRA. ARIADNA ESTELA GONZÁLEZ DEL ANGEL**

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



MÉXICO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

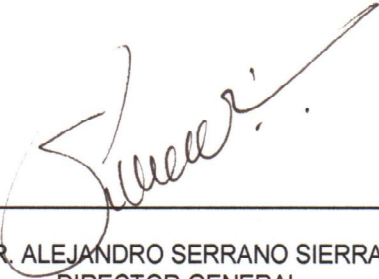


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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



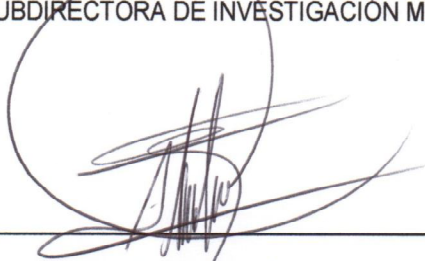
DR. JOSÉ NICOLÁS REYNÉS MANZUR
DIRECTOR DE ENSEÑANZA



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



DRA. ARIADNA ESTELA GONZÁLEZ DEL ANGEL
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 BIOLOGIA MOLECULAR
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA HUMANA

AGRADECIMIENTOS

- A **Dios** por regalarme el don de la vida, caminar junto a mí en cada proyecto que realizo y rodearme de tanta gente maravillosa que fomenta mi crecimiento personal.
- 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 mis hermanas **Bety** y **Gely** por darme esa fuerza, apoyo y compañía cada día. Gracias por ser además de mis hermanas 2 grandes amigas que me escuchan. Las admiró mucho y espero que estemos juntos en los diferentes proyectos de vida que cada uno ha elegido.
- 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.
- A **Víctor Martínez Cruz** por su ayuda y orientación durante este proyecto.
- A mis amigos que estuvieron junto a mí durante esta experiencia que se llamó "Residencia en Pediatría". **Blanca, Magda, Dewi, Romina, Luis y Paco** que nos conocemos ya hace algunos años; y los grandes amigos que me dejó la Residencia: **Alex, Alva, Daniel, Yaraví, Raquel, Rodrigo, Brenda, Meche, Rosario y Marianela**. Me siento afortunado de conocerlos y que formen parte de mi vida.
- 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.
- Finalmente, a la Universidad Nacional Autónoma de México por acogerme en sus filas de estudiantes desde la preparatoria y brindarme las herramientas necesarias para enfrentarme al mundo laboral.

ÍNDICE

RESUMEN	5
I. MARCO TEÓRICO	7
II. JUSTIFICACIÓN	13
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
IV. OBJETIVO	14
V. HIPÓTESIS	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
IX. CONCLUSIONES	31
ANEXO 1	33
ANEXO 2	34
BIBLIOGRAFIA	35

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

AUTORES

Tesista: Dr. Juan Alberto Godínez Chaparro, Especialista en Pediatría Médica.

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).

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

Coautores:

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

Dra. Marcela Vela Amieva, Investigadora en Ciencias Médicas Unidad de Genética de la Nutrición (INP).

Dra. María del Carmen Sánchez-Pérez, Investigadora del Laboratorio de Neurodesarrollo (INP).

Lic. en Enf. Rosario Moreno-Rojas, Laboratorio de Neurodesarrollo (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.

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

I. MARCO TEÓRICO

La prevalencia mundial del Hipotiroidismo Congénito (HC) es de 2 a 3 casos por cada 10 000 recién nacidos (1:2000 a 1:3000) (Toublanc 1992), sin embargo, se han descrito variaciones en la frecuencia tanto geográficas como poblacionales. Toublanc y otros autores refieren que en Estados Unidos de América, en la población de origen hispano se identifican hasta 5.28 casos por cada 10 000 recién nacidos (1:1894) (Brown AL y cols 1981, Frasier SD y cols 1982). En México existe una elevada prevalencia al nacimiento de HC, en algunos estados del país, se observa hasta en 1 de cada 1,000 recién nacidos (Vela M y cols 2004). La explicación de estas diferencias en la frecuencia del HC no se conoce con precisión, sin embargo, se ha propuesto la participación de factores ambientales como la relación bocio-deficiencia de yodo así como la intervención de factores genéticos como mutaciones en los genes que codifican a los factores de transcripción que participan en la organogénesis de la glándula tiroidea (Vijlder 2003, Gulliam 2001).

El HC se clasifica como: primario (deficiencia tiroidea), secundario (deficiencia hipofisiaria) y terciario o central (deficiencia hipotalámica) (Solis 2006). La principal causa del HC es primaria presentándose en el 95% de los casos, de estos, el 80 al 90% resulta de alteraciones en la organogénesis de la glándula tiroidea, conocidos como disgenesias que son fundamentalmente esporádicas, aunque se han registrado en el 2% de los pacientes como una alteración familiar (Solis 2006). Por razones aún desconocidas, la frecuencia de estas alteraciones es mayor en mujeres que en hombres (2-3:1) (Lorey F 1992).

Las disgenesias tiroideas a su vez pueden subdividirse en tres grandes grupos: a) tiroides ectópica usualmente pequeña y sublingual (30-45%), agenesia (35-40%) e hipoplasia (5%) (Solis 2006). El 10% restante, es debido a dishormogénesis, un defecto en los procesos bioquímicos que involucran errores en la síntesis de las hormonas tiroideas (Solis 2006). Algunos genes que se han asociado a las dishormogénesis son: Tiroglobulina (TG), Tiroperoxidasa (TPO), Simportador Sodio/Yoduro (NIS), Pendrina (PDS), el gen *DOUX2* y el gen *DEHAL1* (Montanelli 2010), los casos de dishormogénesis debidos a mutaciones en estos genes muestran una clásica herencia mendeliana autosómica recesiva (Montanelli 2010).

El cuadro clínico del HC varía en cada paciente y esto depende de la gravedad del hipotiroidismo, el retardo en el diagnóstico y el momento de instauración del tratamiento. Los recién nacidos, sin tratamiento sustitutivo, no exhiben signos o son sutiles debido al paso de hormona tiroidea materna a través de la placenta (Rastogi 2010). Al finalizar la etapa neonatal y en la lactancia pueden presentar problemas en la ingesta de alimentos, ictericia prolongada, llanto ronco, piel gruesa, hipotermia, cianosis distal y bradicardia. En la niñez se agrega macroglosia, bocio, cabello y piel seca así como retraso en el crecimiento; las proporciones corporales se comprometen presentando macrocefalia, cuello corto y segmento superior relativamente largo respecto del segmento inferior (Beardsall 2004, Solis 2006). De continuar sin tratamiento sustitutivo, el paciente desarrolla una fascies caracterizada por mixedema de párpados y labios, frente estrecha, puente nasal plano, macroglosia y cabello seco y áspero (Solis 2006).

El problema de mayor importancia reside a nivel de sistema nervioso central ya que los pacientes pueden presentar bradipsiquia, hipoactividad, ataxia cerebral, pérdida auditiva neurosensorial así como retraso psicomotor o mental (Solis 2006). Además, el HC puede estar asociado con malformaciones congénitas hasta en el 8.4% (Rastogi 2010), de estas, las malformaciones cardiacas presentan la mayor prevalencia; otras malformaciones son el paladar hendido y las genitourinarias (Rastogi 2010).

En un estudio transversal en el 2004 realizado a la población mexicana por Vela-Amieva y cols., en donde se incluyeron 1 319 717 muestras de sangre de recién nacidos mexicanos, se reportaron 731 casos confirmados de HC con una edad promedio al momento del diagnóstico de 60.26 días. De los casos confirmados, las características clínicas que predominaron fueron: hernia umbilical (signo encontrado con mayor frecuencia) seguida de ictericia, piel seca, estreñimiento, fascies tosca, llanto ronco, fontanela posterior amplia, edema, macroglosia, somnolencia, hipoactividad, hipotonía, lentitud a la ingesta e hipotermia.

La patogénesis de las disgenesias es en gran medida desconocido (De Felice 2004); muchos casos de HC por disgenesias ocurren como una enfermedad esporádica; sin embargo, las evidencias indican que los factores genéticos participan en su etiología. Los genes involucrados en las disgenesias tiroideas son principalmente factores transcripcionales (FT), los cuales regulan la expresión de genes específicos durante el desarrollo embriológico y son importantes en el desarrollo oportuno de las células que van a dar origen a la glándula tiroidea; algunos de estos factores son: *TTF-1*, *TTF-2*, *PAX8* y *NKX2-5* (Montanelli 2010).

El gen *TTF-2* también conocido como *FOXE1* (forkhead E1) está localizado en el cromosoma 9q22 y consiste en un solo exón que codifica a una fosfoproteína de 42 kDa que cuenta con 367 aminoácidos. La fosfoproteína presenta una región N-terminal, un dominio en “cabeza de tenedor” altamente conservado (de unión al ADN), un tracto α hélice de polialanina y una región C-terminal (ver Imagen 1) (Clifton- Bligh 1998, Castanet 2002, Castanet 2010a). *TTF-2* funciona como un regulador transcripcional de la organogénesis de la glándula tiroidea, capaz de reconocer y unirse a secuencias de ADN presentes en los promotores de TG y TPO (Castanet 2010a). Investigaciones en ratones muestran que el gen *TTF-2* es absolutamente necesario para la migración descendente del primordio tiroideo que ocurre entre los días 9.5 a 15.5 de gestación (Damante 1998, Castanet 2010a). *FOXE.1* se expresa durante la embriogénesis en todo el intestino anterior incluyendo el futuro esófago. En estadios posteriores del desarrollo, se encuentra expresado en la glándula tiroidea, así como en la lengua, epiglotis, paladar, esófago, coanas y en folículos pilosos (Castanet 2010a).

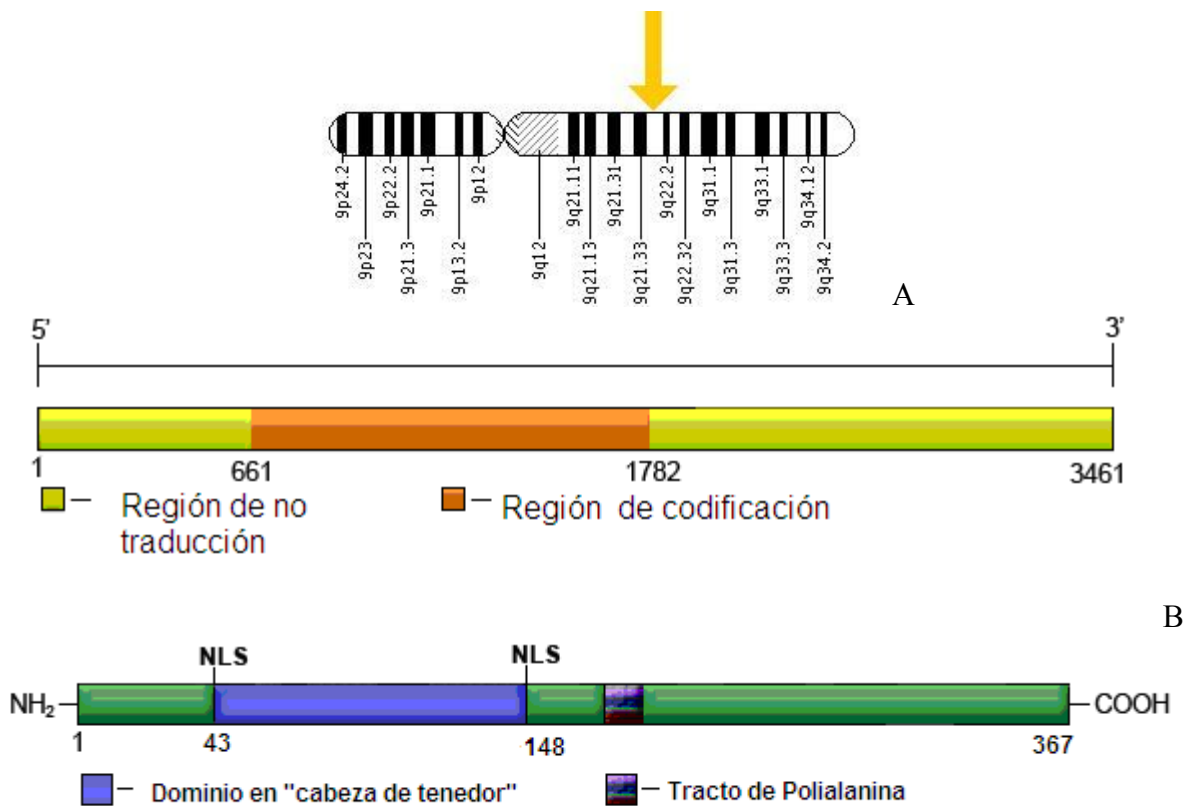


Imagen 1 A. Localización del gen *TTF-2* en el cromosoma 9q22. B. Esquema del gen *TTF-2*. C. Diagrama que representa la proteína de *TTF-2*

Hasta la fecha, han sido reportadas 5 mutaciones en el gen *TTF-2* en estado homocigoto en pacientes con hipotiroidismo por disgenesia, las 5 mutaciones son de sentido erróneo (p.A65V Clifton-Bligh 1998, p.S57N Castanet 2002, p.W97R Huebner 2004, p.R102C Baris 2006 y p.F137S Castanet 2010b) y se localizaron en el dominio de tipo "cabeza de tenedor" que es altamente conservado. Las mutaciones p.A65V y p.R102C condicionan pérdida total de la actividad transcripcional de *TTF-2* y las mutaciones p.S57N y p.F137S sólo pérdida parcial de la función transcripcional, para la mutación p.W97R no se menciona el fenotipo del paciente ni el efecto funcional que condiciona.

Las características clínicas que presentaron en común los 4 pacientes fueron hipotiroidismo congénito, paladar hendido así como cabello seco y frágil. Los pacientes con las mutaciones p.A65V y p.R102C mostraron atresia de coanas y además el caso con la mutación p.A65V mostró una epiglotis bífida. La mutación p.S57N se describe en dos hermanos con un fenotipo menos severo debido a que no presentaron epiglotis bífida ni atresia coanal bilateral. Finalmente, en el paciente con la mutación p.F137S se observó una comunicación interventricular y talla baja así como varias dismorfias faciales (hipertelorismo, sinofris e implantación baja de pabellones auriculares), características clínicas no descritas en los otros pacientes con hipotiroidismo con mutación en *TTF-2*. En este paciente aunque la mutación se identificó en estado homocigoto, fue de llamar la atención el hecho de que sólo la madre mostró el estado heterocigoto para la mutación mientras que el padre mostró un genotipo normal, por lo que los autores realizaron estudios que permitieron establecer que el paciente homocigoto se originó por una disomía uniparental del cromosoma 9 (el par de cromosomas 9 derivaron de la madre y no hubo contribución del padre), siendo el primer caso documentado de hipotiroidismo con mutación en *TTF-2* en estado homocigoto originado por este mecanismo. Estos casos ilustran que el fenotipo asociado a las mutaciones en *TTF-2* es muy variable (Clifton-Bligh 1998, Castanet 2002 y 2010, Baris 2006).

En el gen *TTF-2* se han descrito también polimorfismos o variantes génicas normales, los cuales se consideran polimorfismos de nucleótido único (SNP por sus siglas en inglés) debido a que se deben a una sustitución de una única base. Se ha considerado que la presencia de diversos SNP, sobre todo aquellos presentes en secuencias codificantes o regulatorias de genes, pueden contribuir a la variación fenotípica en el humano en particular con relación a características antropométricas individuales, a la predisposición a desarrollar ciertas enfermedades o a la respuesta del humano al efecto de factores ambientales o a ciertos medicamentos (Pui-Yan Kwok 2003, The international SNP Map Working Group 2001). Hasta donde sabemos, a la fecha en el gen *TTF-2* no se han descrito SNP que se haya demostrado que pueden predisponer al desarrollo del hipotiroidismo.

En el gen *TTF-2* se ha descrito el cambio p.N132D en estado heterocigoto en una paciente con hipotiroidismo, el cambio también se observó en el padre y dos hermanos quienes no presentaban alteraciones en la función tiroidea, al realizarse estudios funcionales *in vitro* p.N132D condicionó una reducción muy leve de unión de la proteína *TTF-2* al promotor del gen tiroperoxidasa, por estos resultados este cambio no se consideró responsable de la disgenesia tiroidea en la paciente pero tampoco se demostró que se tratara de un polimorfismo ya que no se identificó en 104 individuos sanos (Kang 2010).

Un análisis de 10 000 genes humanos mostraron que el 20% cuenta con un tracto homopolímero; de estos, el 16% son tractos de polialaninas (Poly A); estos tractos generalmente se encuentran en genes que codifican factores transcripcionales (Brown 2004). El tracto de polialaninas en la proteína *TTF-2*, inicialmente se describió constituido por 19 residuos de alanina que se localizan en la posición 64-82 posterior al dominio en “cabeza de tenedor” (Chadwick 1997, Castanet 2010a); sin embargo, al ser un polimorfismo del tipo microsatélite; la variabilidad en el número de alaninas presentes en *TTF-2* (*FOXE1*), de acuerdo a lo descrito por Macchia y cols; puede ir desde 12 a 17 alaninas (Macchia 1999).

Hishinuma y cols. reportaron que la longitud del tracto de polialaninas que se presentó con mayor frecuencia en 101 individuos sanos fueron 14 alaninas (96 individuos) mientras que en el resto de las personas el tracto observado fue de 16 alaninas. (Hishinuma 2001). En otro estudio elaborado por Tonacchera y cols. en el 2004 donde realizó el análisis molecular del gen *TTF-2* en 2 pacientes con HC y paladar hendido, 45 niños con disgenesia tiroidea, 19 niños con labio o paladar hendido, 4 pacientes con hemigenesia tiroidea y 53 sujetos sanos; se mostró que la longitud más frecuente del tracto fue de 14 residuos de alaninas al observarse en 50 de 70 (71%) de los pacientes y en 45 de los 53 (85%) controles sanos; mientras que el tracto de polialaninas de 16 residuos en estado heterocigoto se observó en 18 de 70 (26%) casos y en 4 de 53 (7%) de los sujetos normales, de llamar la atención fue el hecho de que en 1 caso de los pacientes con agenesia tiroidea se reporto un tracto de polialanina de 12 residuos en estado heterocigoto (Tonacchera 2004).

Carré y cols. en el 2007 realizaron la evaluación de la longitud del tracto de polialaninas de *TTF-2* en 115 pacientes con disgenesia tiroidea y 129 controles. Dentro del tracto de polialaninas se identificaron la presencia de 6 diferentes alelos que conducen a 10 genotipos (11/14, 12/14, 12/16, 14/14, 14/16, 16/16, 14/17, 14/19, 16/17 y 17/19). Los alelos que codificaron para el tracto de 14 a 16 alaninas estaban presentes en la mayoría de los sujetos ya que se encontraron en el 95.7% de los alelos de los pacientes y en el 98.8% de los alelos de los sujetos controles, siendo pequeño el número de alelos raros o poco frecuentes observados (11, 12, 17 y 19 alaninas) identificadas en solamente 4.3% de los pacientes y 1.2% de los controles), por su frecuencia, sólo los tractos de 14 y 16 alaninas fueron utilizados para el análisis estadístico y la asociación con disgenesia tiroidea. El análisis estadístico del estudio mostró que la presencia de 14 alaninas en estado homocigoto se encuentra asociado con un riesgo incrementado de disgenesia tiroidea (OR=2.59, $p=0.0005$) mientras que la presencia de 16 alaninas fue inversamente asociado a la presencia de disgenesia tiroidea (OR=0.39, $p=0.0005$), lo que sugiere que la presencia de 16 alaninas en la proteína *TTF-2* probablemente protege contra el desarrollo de hipotiroidismo (Castanet 2010a, Carré 2007). Estudios funcionales han demostrado diferencias en la actividad transcripcional entre proteínas *TTF-2* con 14 o 16 alaninas, lo que sugiere que la variabilidad en el tracto de polialaninas podría tener un efecto en el desarrollo de la tiroides, los datos anteriores indican que *TTF-2* podría ser un gen de susceptibilidad al desarrollo de hipotiroidismo no sindromático en lugar de un gen causal (Castanet 2010a, Carré 2007).

II. JUSTIFICACIÓN

En México no existen reportes de mutaciones y polimorfismos en genes relacionados con el desarrollo de HC por disgenesias, siendo relevante dada la elevada prevalencia de esta enfermedad en nuestro medio comparada con otras poblaciones. Al describirse en la literatura pacientes con mutaciones que inactivan la acción de *TTF-2*, consideramos que puede ser un gen candidato responsable de algunos casos de HC en nuestra población, por lo que el análisis de este gen podría ayudar a conocer mejor el origen de la enfermedad y su posible impacto en el fenotipo.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Las mutaciones y polimorfismos del gen *TTF-2* participan en la etiología de Hipotiroidismo Congénito por disgenesias en pacientes Mexicanos?

IV. OBJETIVO

Identificar mutaciones y polimorfismos en el gen *TTF-2* en una muestra de 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.

V. HIPÓTESIS

- La presencia de mutaciones o polimorfismos en el gen *TTF-2* explican la presencia de Hipotiroidismo Congénito secundario a disgenesia en pacientes Mexicanos.
- Los pacientes que presenten mutaciones en el gen *TTF-2* presentarán además de las características clínicas típicas del Hipotiroidismo Congénito; otros datos clínicos y bioquímicos debidos a la presencia de las mutaciones.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio transversal y descriptivo realizado en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría (INP), se incluyeron pacientes mexicanos con diagnóstico de Hipotiroidismo Congénito secundario a disgenesia tiroidea que fueron canalizados a través de la Unidad de Neurodesarrollo del INP al ser parte de una cohorte de pacientes en seguimiento de su neurodesarrollo. Los pacientes fueron captados en la Unidad de Neurodesarrollo al tener resultados en el tamiz neonatal de TSH anormales, la confirmación del HC se basó en la realización de perfil tiroideo y el diagnóstico de disgenesia tiroidea se estableció por gammagrafía tiroidea.

Para el presente estudio se invitó a los padres a participar al contactarlos en las citas de seguimiento de la Unidad de Desarrollo, a quienes aceptaron participar se solicitó el consentimiento informado a los padres de los pacientes (Anexo 1); se realizó la revisión de expedientes clínicos para registrar las variables clínicas o malformaciones asociadas (Anexo 2) y se obtuvo una muestra de sangre periférica para realizar el análisis molecular en el Laboratorio de Biología Molecular del INP.

El presente trabajo forma parte de un proyecto de Investigación que se lleva a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del INP en el cual se analizan los genes *TTF-1*, *TTF-2* y *PAX8* en un mayor número de pacientes. En este trabajo se presentan los resultados del análisis molecular del gen *TTF-2* en 35 casos.

a) Búsqueda de mutaciones en *TTF-2*

Para realizar el análisis molecular se solicitó consentimiento informado a los padres de los pacientes, se realizó extracción de DNA a partir de una toma de muestra de 3ml. de sangre periférica, mediante la técnica de precipitación salina con el kit Puregene™ (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA).

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

Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa.

La mezcla para llevar al cabo la amplificación contenía 0.25 U de Taq polimerasa, buffer de PCR 1X, 25mM de MgCl₂, 160 μMol/L de dNTPs, dimetilsulfoxido al 5%, 10 picomoles de cada primer y 200 ng de DNA genómico. Se utilizaron 7 pares de primers para amplificar el único exón del gen los cuales fueron descritos por Castanet M en el 2002. La reacción se llevó a cabo en el termociclador Applied Biosystems modelo Gene Amp PCR System 2720, bajo el siguiente programa: Desnaturalización inicial

durante 5 minutos a 95°C seguida de 35 ciclos a 95°C por 40 seg, alineación (temperatura específica para cada primer) por 40 seg y extensión a 72°C por 1 minuto. Posteriormente se sometieron a una extensión final a 72°C durante 1 minuto y una extensión final de 72°C durante 7 minutos (Castanet M. 2002). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 3 % teñido con bromuro de etidio.

Búsqueda de mutaciones por SSCP en el gen *TTF-2*.

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 llevo a cabo a 95 °C por 3-4 min, posteriormente se dio un choque térmico al sumergirlo en agua con hielo un mínimo de 10 minutos. Los productos desnaturalizados se analizaron por electroforesis en un gel de matriz MDE al 25%, con un corrimiento por 18 a 20 hrs a 6 watts, 8 mA, el revelado de las bandas se realizó con tinción de plata.

Secuenciación.

Cuando se observó un patrón de migración anormal en el SSCP, se amplificó el DNA genómico utilizando el mismo par de primer usado para el SSCP y se secuenciaron ambas hebras forward y reverse mediante secuenciación automática, se comparó la secuencia del gen en la base de datos de GeneBank para identificar si esta descrita previamente como mutación o polimorfismo, los cambios no descritos, de acuerdo al efecto que se considere causen en la proteína, se clasificaron como polimorfismo o mutación.

b) Clasificación de la investigación

Se realizó un estudio clínico, transversal y descriptivo en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría (INP) en el periodo de Julio del 2010 a Abril del 2011.

c) Universo de estudio (población a estudiar):

- Criterios de inclusión
 - o Pacientes mexicanos (ambos géneros) con diagnóstico de Hipotiroidismo Congénito secundario a disgenesia tiroidea canalizados a través de la Unidad de Neurodesarrollo del Instituto Nacional de Pediatría al ser parte de una cohorte de pacientes en seguimiento de su neurodesarrollo. Los pacientes fueron captados al tener resultados en el tamiz neonatal de TSH anormales, la confirmación del HC se basó en la realización de Perfil Tiroideo (TSH, T3 total, T4 total, T4 libre y tiroglobulina) y el diagnóstico de disgenesia tiroidea se estableció por gammagrafía tiroidea.
 - o A través de la revisión de expedientes clínicos se registró en cada caso las manifestaciones clínicas que habían presentado al nacer relacionadas con el hipotiroidismo o si existían malformaciones asociadas.

- Criterios de exclusión
 - o Pacientes en donde la obtención de la muestra de sangre periférica para la extracción del DNA fue inadecuada y no aceptaron una segunda toma de muestra.

d) Variables

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 |

1. Fascie hipotiroidea

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

Macroglosia: Aumento de volumen de la lengua

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

2. Oftalmológico

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

3. Gastrointestinal

Estreñimiento: Disminución en el número y frecuencia de deposiciones

Hernia umbilical: Es una profusión del contenido de la cavidad abdominal por un punto débil del anillo umbilical debido a un defecto del cierre de la pared abdominal

4. Piel y mucosas

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

Ictericia: Síndrome caracterizado por hiperbilirrubinemia y depósito de pigmentos biliares en la piel, mucosas y esclera, adquiriendo una coloración amarillenta.

Cianosis peribucal: Coloración azulada en la región peribucal.

Cianosis distal: Coloración azulada en las partes distales como los dedos y pulpejos dactiles.

5. Neurológico

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

Hipoactivo: Disminución en los movimientos espontáneos.

Hipotermia: Disminución de la temperatura.

e) Tamaño de la muestra

En el presente trabajo se estudió a 35 pacientes confirmados con Hipotiroidismo Congénito por disgenesia (ectópica o agenésia glandular).

f) Análisis estadístico

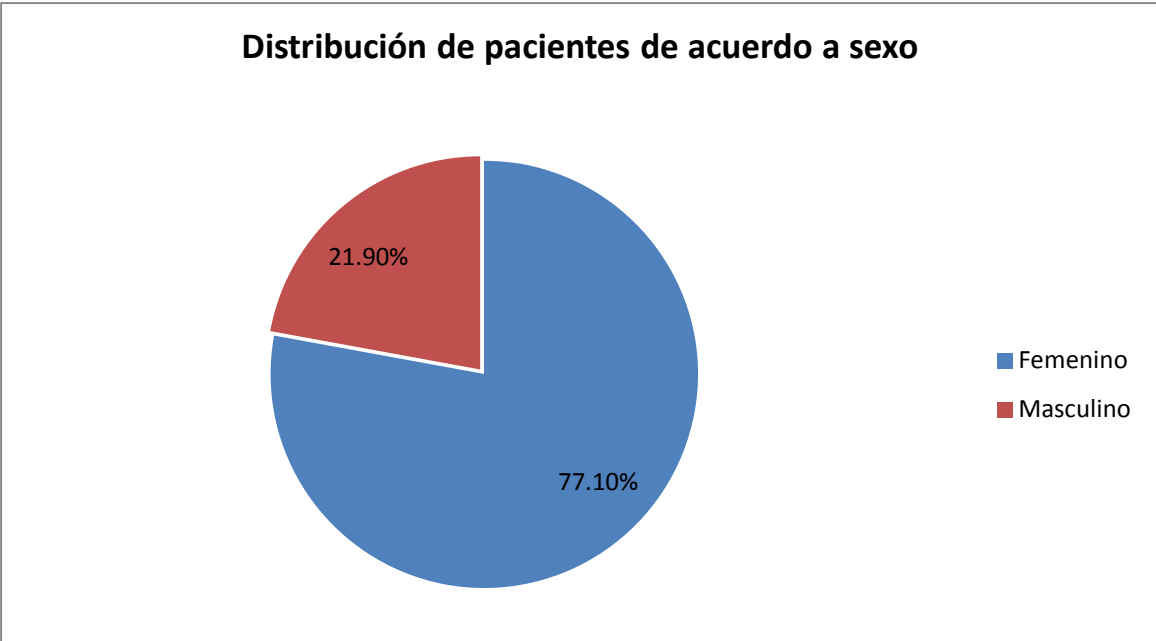
La frecuencia de las mutaciones o polimorfismos se calculó en porcentaje, el análisis de las variables clínicas fue descriptivo.

g) Consideraciones éticas

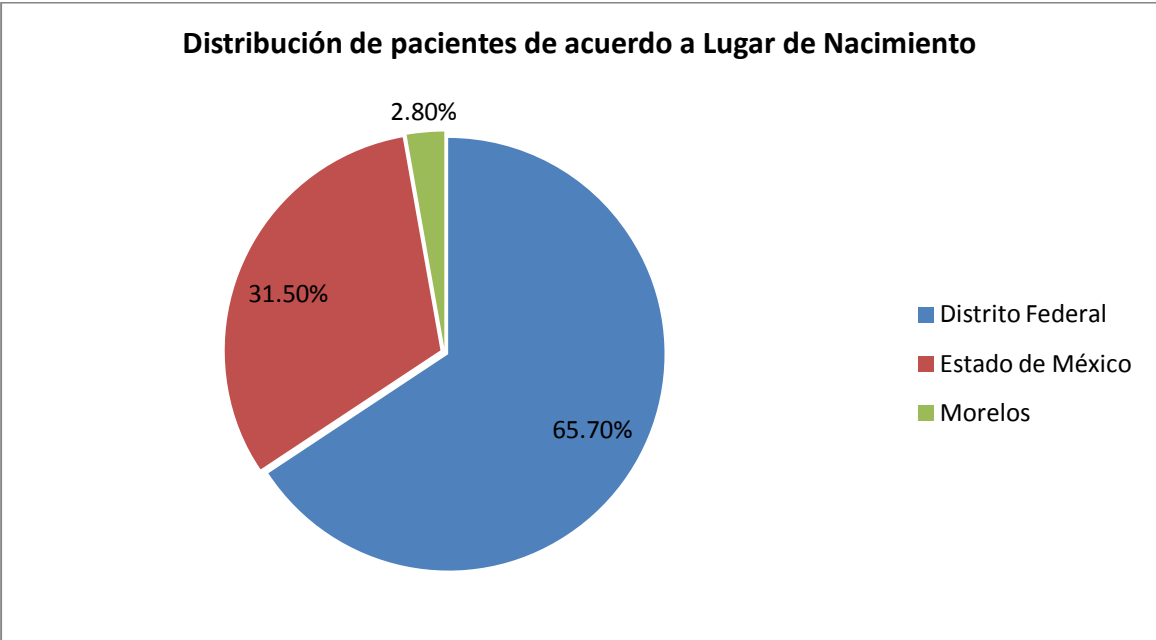
La información personal, de identidad y del genotipo se maneja en forma estrictamente confidencial, siguiendo las normas establecidas por la declaración de Helsinki, las Buenas Prácticas Médicas y del ELSI (del inglés "Ethical, Legal and Social Issues"). El estudio fue aprobado por los Comités de Investigación y Ética del INP.

VII. RESULTADOS

El diagnóstico de HC secundario a disgenesia tiroidea se estableció por perfil tiroideo y gammagrafía 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.



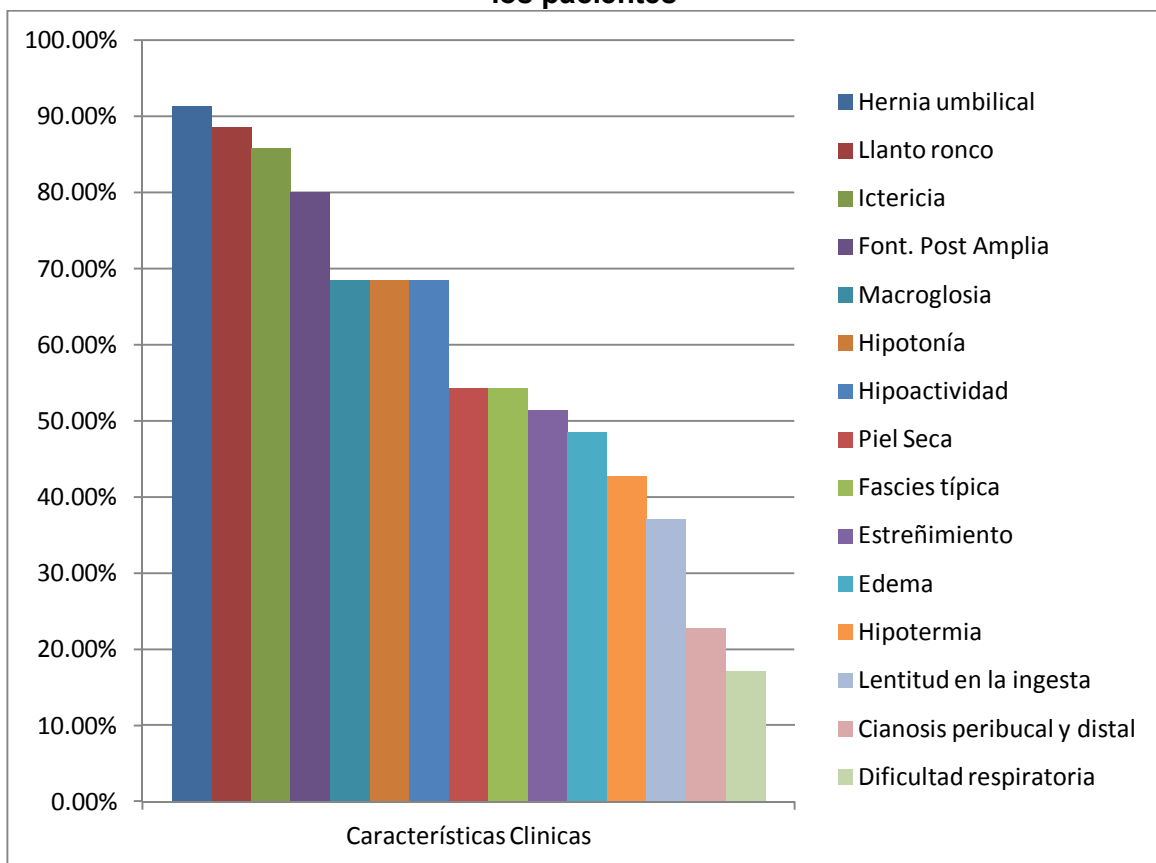
Gráfica 1



Gráfica 2

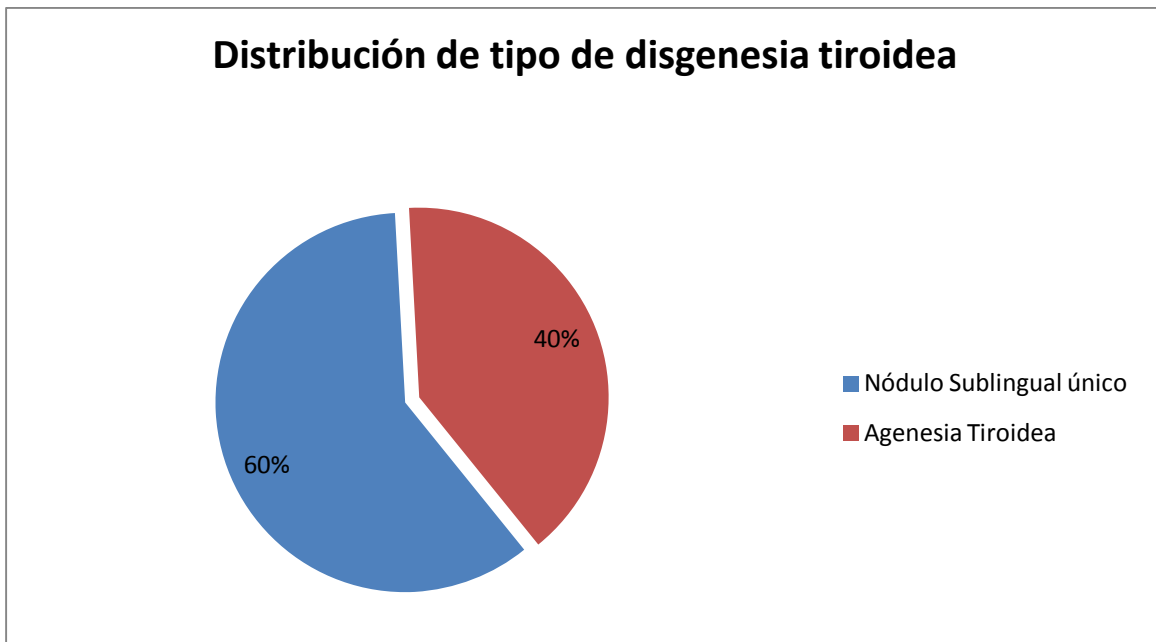
La edad promedio de las madres de los pacientes con HC fue de 25.6 años (14 años - 44 años). El peso promedio de los pacientes al nacimiento fue de 3,315 gr (2,250 - 4,700) y la talla promedio fue de 50cm (44 cm - 53 cm). Las características clínicas que presentaron los pacientes con mayor frecuencia 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 determinó por gammagrafía 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 llevó 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 imágenes 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5 y 6.

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

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

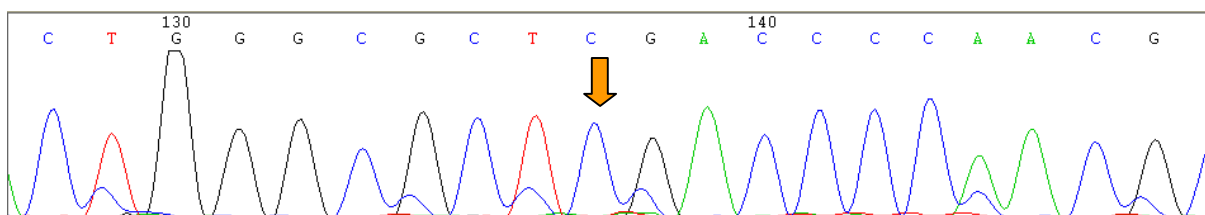


Imagen 2a. Se muestra el electroferograma que evidencia la presencia del polimorfismo previamente descrito rs3021523: c.387T>C (CTT-CTC); p.Leu129Leu; en un paciente homocigoto para el alelo menor ya que en ambos alelos esta presente la base nitrogenada C.

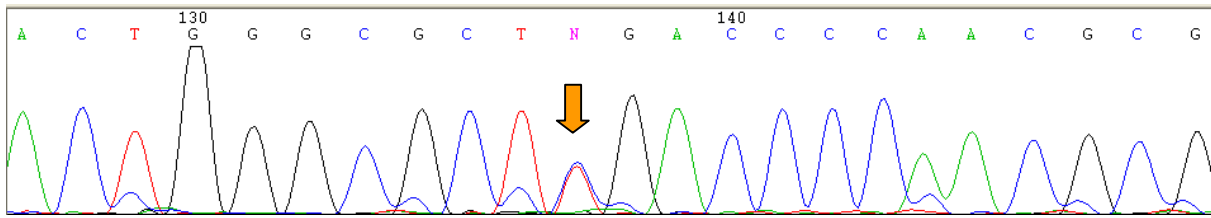


Imagen 2b. Se muestra el electroferograma que evidencia la presencia del polimorfismo previamente descrito rs3021523: c.387T>C (CTT-CTC); p.Leu129Leu; en un paciente heterocigoto, ya que la flecha señala la presencia de la base Timina en un alelo y Citosina en el otro.

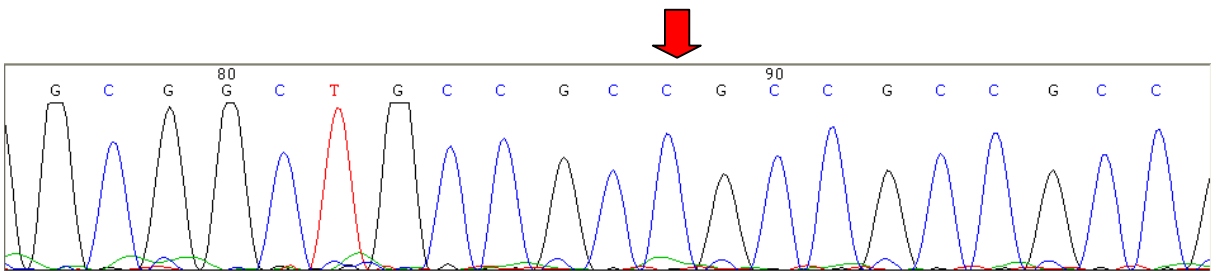


Imagen 3a. Se muestra el electroferograma que evidencia la presencia del polimorfismo previamente descrito rs3021524: c.504A>C (GCA-GCC), p.Ala168Ala; en un paciente homocigoto para el alelo menor ya que en ambos alelos esta presente la base nitrogenada C.

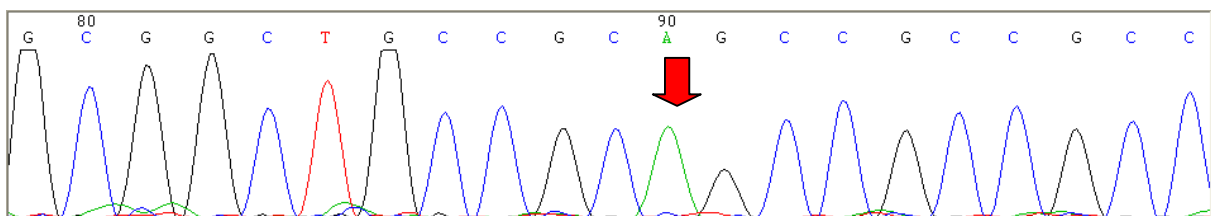


Imagen 3b. Se muestra el electroferograma que evidencia la presencia del polimorfismo previamente descrito rs3021524: c.504A>C (GCA-GCC), p.Ala168Ala; en un paciente homocigoto para el alelo mayor ya que en ambos alelos esta presente la base nitrogenada A.

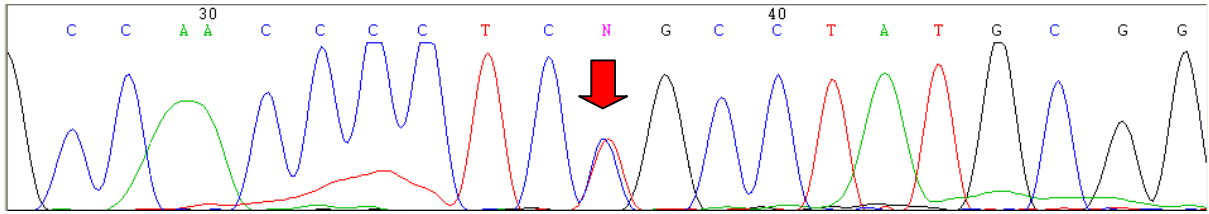


Imagen 4. Electroferograma que muestra en estado heterocigoto el polimorfismo previamente descrito rs3021526, c.825C>T (TCC-TCT), p.Ser275Ser, la flecha indica la presencia de dos picos imbrincados que representan la presencia de la base nitrogenada C en un alelo y la T en el otro.

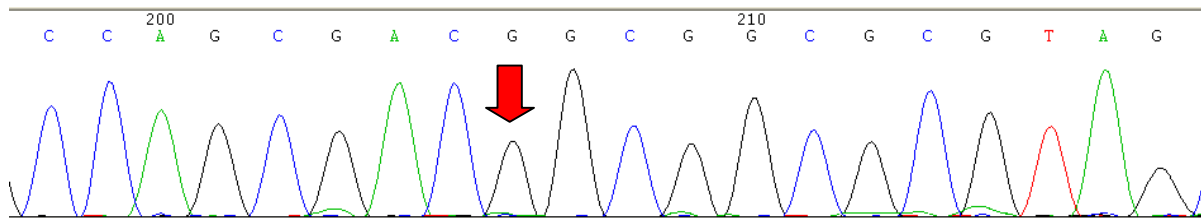


Figura 5. Electroferograma que muestra el polimorfismo c.608C>G (CCG-CGG); p.Pro203Arg, no reportado previamente, la flecha indica la presencia de la base nitrogenada G en ambos alelos (homocigoto para alelo G).

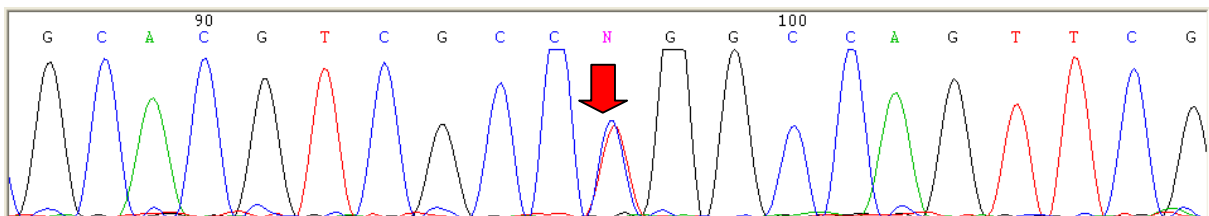


Imagen 6. Electroferograma que muestra en estado heterocigoto el polimorfismo c.990C>T p.Pro330Pro, no reportado previamente en el cual hay un cambio del codon CCC por CCT, la flecha indica la presencia de dos picos imbrincados que representan la presencia de la base nitrogenada C en un alelo y la T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

POLIMORFISMO	FRECUENCIA ALELO	
	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 substitución 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 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

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	ALTERACIÓN 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 Frishchaf 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/>