



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
SECRETARIA DE SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS GENES *FOXE1* Y *NKX2.5* EN PACIENTES
CON HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO POR DISGENESIA ATENDIDOS
EN EL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

REPORTE PRELIMINAR DE MUTACIONES GERMINALES EN EL GEN *TSHR*

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

SUBESPECIALISTA EN ENDOCRINOLOGÍA PEDIÁTRICA

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 ALCÁNTARA ORTIGOZA



MÉXICO 2016



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.

**ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS GENES *FOXE1* Y *NKX2.5* EN PACIENTES CON
HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO POR DISGENESIA ATENDIDOS EN EL INSTITUTO
NACIONAL DE PEDIATRÍA**

REPORTE PRELIMINAR DE MUTACIONES GERMINALES EN EL GEN *TSHR*

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

**DRA. ROSAURA ROSAS VARGAS
DIRECTORA DE ENSEÑANZA**

**DR. 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**

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 esposo **Juan Carlos Rodríguez Aldama** por ser mi equipo y complemento, por su amor, por ser mi mejor amigo en las buenas y en las malas desde nuestros 18 y 19 años y por hacer mi vida divertida; a mi tía **Nena QPD** por ser mi ejemplo de amor sin límite y sin prejuicios y por seguir siempre presente en nuestras vidas; a mis suegros **Ma. Guadalupe Aldama Sánchez** y **Javier Rodríguez López** por su apoyo incondicional, a mis cuñados **Verónica Rodríguez Aldama** y **Juan Manuel Bretón** por su compañía y amistad; a toda mi familia presente y ausente.

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 mis mentores, mi ejemplo, mi guía e impulso; por trabajar sin importar la hora, el día de la semana o inclusive el estado de salud para que todo estuviera a tiempo, por preocuparse no sólo por el ámbito académico sino también por mí desde hace 5 años.

A **Víctor Martínez Cruz**, biólogo y amigo del laboratorio de Biología Molecular, le agradezco por su paciencia, apoyo, por las risas y por trabajar conmigo como buenos amigos desde el día en que lo conocí.

A **Liss** por siempre inculcarnos el ir más allá, por su disposición a enseñarme, porque para ella no existen horarios o días festivos cuando de ayudarnos se trata, por su apoyo siempre que se lo pedí, por enseñarnos a vivir intensamente y por ser mi ejemplo de sencillez en la medicina.

A **Grey** por ser más que una amiga y estar al pendiente todos los días de mí a pesar de la distancia, agradezco a Dios por tenerla en mi vida.

A **Moni** y **Tobías** por acompañarme en todas las desveladas, por ser el mejor ejemplo de perdón y porque a pesar de su pequeño tamaño, guardan el amor más grande y puro que hay.

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. ÍNDICE
- II. MARCO TEÓRICO
- III. JUSTIFICACIÓN
- IV. OBJETIVOS
- V. MATERIAL Y MÉTODOS
- VI. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO
- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSIÓN
- IX. CONCLUSIÓN
- X. ANEXOS
- XI. REFERENCIAS

ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS GENES *FOXE1* Y *NKX2.5* EN PACIENTES CON HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO POR DISGENESIA ATENDIDOS EN EL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

REPORTE PRELIMINAR DE MUTACIONES GERMINALES EN EL GEN *TSHR*

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 et al; 1992, Klett et al; 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 et al; 1981, Frasier et al; 1982). También se ha determinado la frecuencia por sexo y se ha encontrado predominio en el femenino con una relación 2:1 lo que es más evidente en hispanos residentes en EUA (3:1) (Lorey et al; 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 et al; 2004).

HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO PRIMARIO O ESPORÁDICO

El 95% de los hipotiroidismos congénitos son primarios y de ellos el 85-90% corresponden a disgenesia tiroidea (TD) 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 TD pueden subdividirse en tres grupos:

- Ectopia (tiroidea 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 (Montanelli et al; 2010).

Existen algunas diferencias clínicas, bioquímicas y de estudios de gabinete que permiten distinguir las disgenesias de una alteración por dishormonogénesis; para la distinción de las mismas, además del examen físico y del perfil tiroideo inicial, es de utilidad solicitar Tiroglobulina (Tg) y realizar ya sea gammagrama o USG al paciente. Con respecto al examen físico, en los pacientes con disgenesia, de tipo ectopia o agenesia, no se palpa glándula tiroidea en la región anterior del cuello, mientras que en los casos de dishormonogénesis, siempre se palpa la presencia de glándula, la cual en la mayoría de los casos, está incrementada de tamaño (Grob et al; 2012). Con relación a la TSH, esta se encuentra elevada en todos los tipos de disgenesia siendo generalmente mayor su valor en la agenesia tiroidea; mientras que en los casos de

dishormonogénesis hay una disminución en su producción. Con respecto a la Tg, en las disgenesias, esta varía de acuerdo al tipo, en los casos de agenesia verdadera es indetectable, mientras que en la agenesia aparente se encuentra presente; en la hipoplasia tiroidea puede estar normal o disminuida y en los casos de ectopia usualmente se encuentra elevada; en las dishormonogénesis, la Tg puede estar elevada o disminuida de acuerdo al sitio de afección. Con respecto a los estudios de gabinete, en la agenesia verdadera y agenesia aparente, no hay captación por gammagrama ni se observa glándula por USG; mientras que en los casos de hipoplasia, ambos estudios deben identificar una glándula tiroidea pequeña en región anterior de cuello y en la ectopia, el USG puede o no detectar glándula, mientras que el gammagrama sí detecta la presencia de glándula localizada en un sitio anormal; en las dishormonogénesis, siempre hay detección de glándula in situ por USG, generalmente se observan incrementadas de volumen, mientras que el gammagrama puede o no captar presencia de tejido glandular, dependiendo del receptor involucrado (si la alteración se encuentra localizada en el simporter Na^+/I^- (NIS) / SCL5A5, tienen una captación disminuida o ausente, las que tienen alteración en la peroxidasa tiroidea (TPO), en la dual oxidasa 2 (DUOX2), en el factor de maduración de la dual oxidasa 2 (DUOX2) o a nivel de pendrina/SCL26A4, tienen un alto nivel de captación (Léger et al, 2014) y cuando la afección se encuentra a nivel de la TG o de la iodo tirosina deshalogenasa 1 (IYD / DEHAL1), la captación es normal o alta (Mayayo et al; 2006).

CUADRO CLÍNICO ASOCIADO A HC

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

DETECCION DEL HIPOTIROIDISMO CONGENITO

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, la cual se coloca en una tarjeta de papel filtro especial (tarjeta de Guthrie), para la cuantificación posterior de TSH, esta se realiza por diversas técnicas de acuerdo al centro: análisis inmunoradiométrico (IRMA), radioinmunoanálisis (RIA), análisis inmunoenzimático (EIA), inmunofluorométrico (FEIA) o por el análisis por inmuno-fluorescencia de tiempo resuelto (DELFA) (Lineamiento Técnico, Secretaría de Salud 2007).

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 et al; 1993). Para la interpretación de los resultados, el valor de esta hormona se considera sospechoso de hipotiroidismo congénito si excede 10 mUI/mL (Vela et al; 2004). Cuando el laboratorio que procesa las muestras obtiene un resultado verificado de TSH fuera del punto de cohorte establecido como normal, se debe solicitar a la brevedad una segunda muestra y/o prueba confirmatoria; si existen dificultades para obtener y/o enviar una segunda muestra, se debe realizar un perfil tiroideo o iniciar de inmediato el tratamiento en caso de fuerte sospecha diagnóstica.

Para la confirmación de HC, se determina tirotropina (TSH), tiroxina total (T4t) y tiroxina libre (T4L). Se trata de un caso de HC cuando los resultados indican: TSH mayor de 4.0 μ U/ml, Tiroxina libre (T4l) menor de 0.8 ng/dl, Tiroxina total (T4t) menor de 4 ug/dl. En caso de ser positivo se debe administrar L-tiroxina a dosis de 10 a 15 g/kilo de peso/día, por vía oral, en una sola dosis, en la mañana con mínimo 1 hr de ayuno, la tableta se hace polvo y se mezcla con agua en una cucharita, se administra vaciando el contenido en el interior de la boca para que el niño la pueda ingerir (Lineamiento Técnico, Secretaría de Salud 2007).

Se recomienda si existe la posibilidad, contar con una gammagrafía de tiroides con tecnecio-99m (Tc-99m) y evaluar edad ósea mediante radiografía antero posterior de rodilla (Lineamiento Técnico, Secretaría de Salud 2007). El gammagrama sigue siendo el estándar de oro para detección de HC, sobre todo en los casos de ectopia tiroidea, con una sensibilidad del 91.7%, sin embargo es menos específico para valorar tamaño o morfología tiroidea; se ha reportado que el USG tiene superioridad con respecto al gammagrama para determinar el volumen tiroideo (Perry et al; 2006). Con respecto al radiofármaco del gammagrama, en México se prefiere Tc-99, aunque algunos autores sugieren I123 sobre Tc-99m, ya que este último puede presentar falsos negativos en los casos de ectopia tiroidea (Schoen et al; 2004).

GENES ASOCIADOS A HIPOTIROIDISMO

El HC con dishormonogénesis y bocio es causado por mutaciones en uno de los genes que codifican las proteínas responsables de la síntesis de hormonas tiroideas tales como: tiroglobulina (TG) (Medeiros-Neto et al., 1993), tiroperoxidasa (TPO) (Abramowicz et al., 1992a,b), simporter Na/I (Pohlenz et al., 1997), pendrina (PDS) (Everett et al., 1997), DUOX 2 (Moreno et al., 2002) y DEHAL1 (Moreno et al., 2008). Las mutaciones en estos genes se transmiten con un patrón de herencia autosómica recesiva (Grasberger et al; 2011).

Los genes cuyas variantes en su secuencia se han asociado a la presencia de disgenesia de la glándula tiroides son principalmente factores transcripcionales (FT) específicos de la glándula. Los FT se unen a un sitio blanco del DNA 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. Cuatro de estos genes, llamados paired-domain factor son los principales candidatos asociados a HC por TD: paired box gene 8 (*PAX8*), thyroid transcription factor 1 (*TTF1* o *T/ebp* o *NKX 2.1*), thyroid transcription factor 2 (*FOXE1* o *TTF-2* o *FKHL15*) y *NKX2-5* (*CSX* o *NKX2.5*) (Montanelli et al., 2010). En los cuales se han descrito mutaciones causales de HC en un porcentaje muy bajo de pacientes que oscila entre 0 a 5% (Nettore et al; 2013), por lo que aún se desconoce el mecanismo causal de la mayoría de los casos de TD.

En los últimos años, el gen del receptor de TSH (*TSHR*) también se ha asociado como agente causal de TD a nivel mundial así como de HC con una glándula de tamaño normal, esto último por mutaciones en estado heterocigoto con pérdida de función de *TSHR* (Tonacchera et al., 2007a; Tenenbaum-Rakover et al., 2009), mientras que las mutaciones homocigotas en el *TSHR* causan HC con glándula hipoplásica (Abramowicz et al., 1997). También se ha descrito por algunos autores mutaciones de *TSHR* asociados a aplasia tiroidea (Park et al; 2004, Sura-Trueba et al; 2009, Cangul et al; 2010).

HISTORIA DEL GEN DE *TSHR*:

Expresión y clonación:

1989: se aisló el cDNA del *TSHR* de un banco de cDNA tiroideo humano. La proteína obtenida de 764 aminoácidos tiene una masa molecular de 86.8 kD, contiene un péptido de señalización, 7 regiones transmembranales, 5 sitios potenciales de glucosilación y una región intracitoplasmática corta. La cDNA del *TSHR* codifica para un receptor funcional que activa a la adenilato ciclasa en respuesta a la TSH (Nagayama et al., 1989).

1989: se utilizó al cDNA del *TSHR* de un perro para aislar el cDNA del *TSHR* humano en un banco de cDNA tiroideo. Se identificaron dos transcritos principales de mRNA de 4.6 y 4.4 kb, sugerentes de splicing alternativo (Libert et al., 1989).

1990: se mapeó el gen de *TSHR* en el cromosoma 14, mediante el estudio de DNA de células híbridas (Akamizu et al., 1990). Mediante hibridación in situ se localizó al gen en el cromosoma 14q31 (Rousseau-Merck et al., 1990, Libert et al., 1990).

1990: mediante el análisis de diferentes clonas de cDNA del *TSHR*, se determinó que el polipéptido maduro del *TSHR*, contiene 743 aminoácidos con una masa molecular calculada de 84.5 kD. El receptor putativo de TSH tiene un dominio extracelular de 394 residuos, un dominio transmembrana de aproximadamente 266 residuos y un dominio intracelular de 83 residuos. Se observó un alto grado de homología con la hormona LH y con el receptor de gonadotropina (Misrahi et al., 1990).

2002: se encontró que el gen de *TSHR* puede expresar al menos 5 formas alternativas por splicing (corte y empalme de exones) (Kakinuma et al; 2002).

Características bioquímicas:

1992: se mostró evidencia de que el *TSHR* tiene una estructura heterodimérica. Se determinaron las masas moleculares aparentes de la subunidad alfa (sitio de unión hormonal) y beta: 53 y 33-42 kD respectivamente. Posteriormente se demostró que las 2 subunidades se codifican a partir de un mismo gen (Loosfelt et al., 1992).

1993: cuando Feliciello demostró la expresión del *TSHR* en tejido retroorbital, se pudo establecer una asociación entre enfermedad tiroidea y enfermedad de Graves (Feliciello et al., 1993).

Genética Molecular:

1991: se realizó una revisión de la genética molecular del *TSHR* (Vassart et al., 1991).

1999: se describió una base de datos con las mutaciones hasta entonces reportadas del *TSHR* (Trulzsch et al., 1999).

ASPECTOS MOLECULARES DEL RECEPTOR DE LA HORMONA ESTIMULANTE DE LA TIROIDES (TSHR)

El TSHR junto con el receptor de LH y FSH constituyen la subfamilia 1 del receptor de hormona glucoprotéica (GPHR) de los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) (Rapoport et al., 1998, Sz kudlinski et al., 2002, Vassart et al., 2004).

También es conocido por los siguientes nombres: receptor de la hormona estimulante de la glándula tiroides, receptor-1 de tirotropina, receptor de tirotropina, entre otros. (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TSHR#expression>).

El gen *TSHR* en humanos se encuentra localizado en el cromosoma 14 (14q31.1) y está constituido por 191,314 bases dividido en 10 exones y 9 intrones (NM_000369.2) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcdsBrowse.cgi?REQUEST=GV&DATA=440506&BUILDS=CURRENTBUILDS> y el NM es: NM_000369.2 (Ver Figuras 1 y 2).



Figura 1. Localización del gen de *TSHR* en el cromosoma 14

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TSHR>

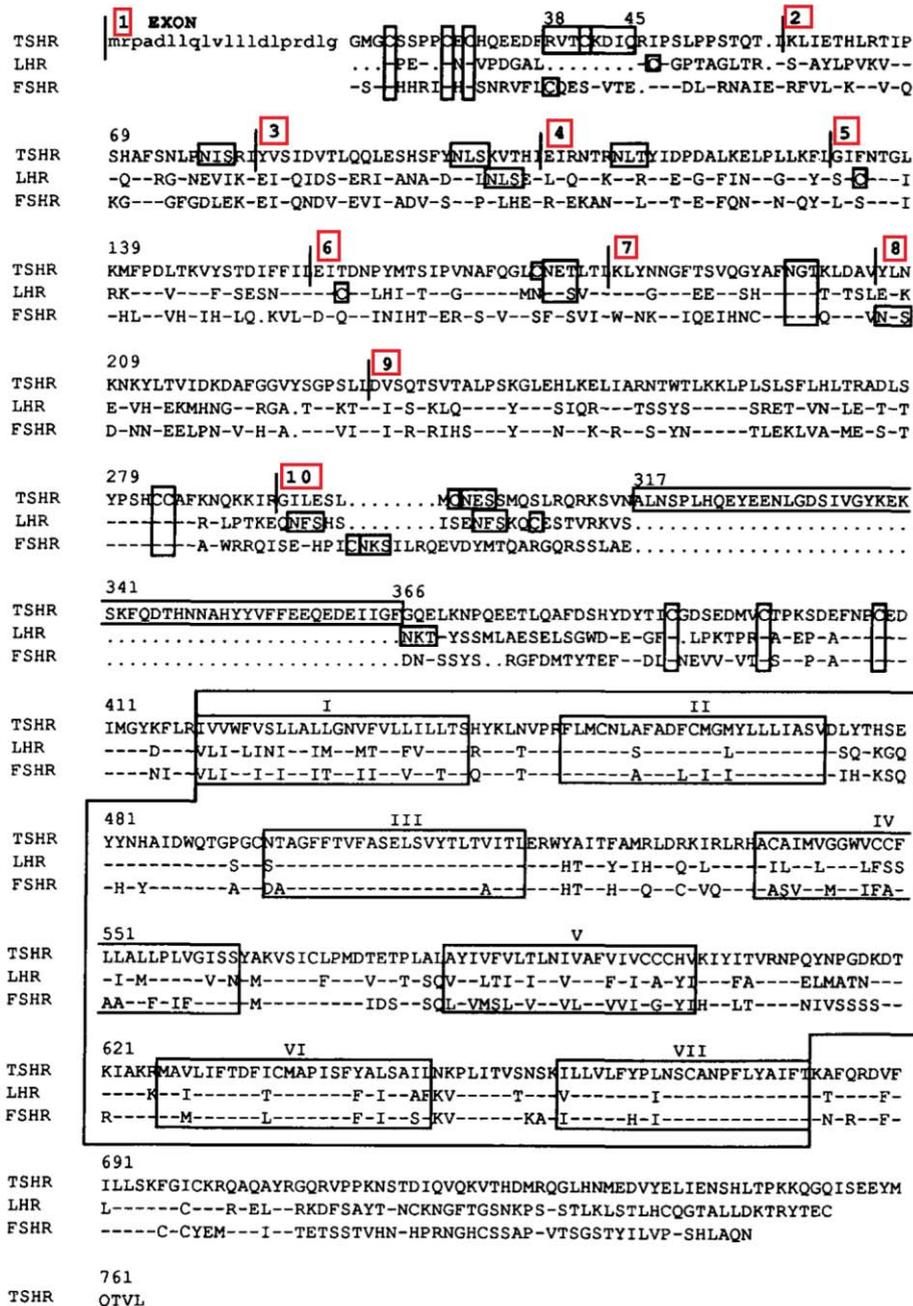


Figura 2. Gen del *TSHR* en donde se muestran sus 10 exones (Nagayama et al; 1992)

La expresión en tejidos del gen de *TSHR* es principalmente en: sangre, nódulos linfáticos, cerebro, médula espinal, corazón, músculo estriado, intestino delgado, colon, adipocitos, riñón, hígado, pulmón, páncreas, tiroides, glándula salival, glándula adrenal, piel, ovarios, útero, próstata y testículos.

(<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TSHR#expression>)

El receptor de tirotrópina juega un papel central en controlar el metabolismo de la célula tiroidea. La actividad de este receptor es mediada por proteínas G, las cuales activan la vía de adenilato ciclasa (Nakabayashi et al., 2002). Las gonadotropinas y la tirotrópina, son hormonas

glucoprotéicas, constituidas por heterodímeros compuestos de una subunidad en común alfa y beta específica. El heterodímero recombinante de dos proteínas adicionales, estructuralmente relacionadas: GPA2 (glycoproteins alpha 2) y GPB5 (glycoproteins beta 5), mostraron activar al receptor de tirotropina, adquiriendo el nombre de tiroestimulina (Dos Santos et al., 2009).

El receptor de tirotropina tiene dos dominios uno extracelular y otro transmembrana-intracelular (Nagayama et al; 1992). El dominio extracelular del receptor de TSH tiene 394 residuos (Misrahi et al., 1990) mientras que la región transmembrana 349 residuos (Davies et al; 2015) y la intracelular 83 residuos aminoacídicos (Misrahi et al., 1990).

El dominio extracelular del receptor de TSH está codificado por 9 exones y parte del exón 10, mientras que el dominio transmembrana-intracelular es codificado completamente por el exón 10 (Rapoport et al., 1998, Szkudlinski et al., 2002, Vassart et al., 2004).

La región distal del dominio extracelular está vinculado con el dominio transmembrana por una región de 141 aminoácidos, conocida como "hinge region" (Rapoport et al; 2007); esta región funciona como un puente estructural en donde se llevan a cabo cambios conformacionales en respuesta a la unión del ligando y está involucrada en la activación del receptor, por lo que también se conoce como "signal specific domain". La región transmembrana está conformada por 7 hélices transmembrana y una corta región citoplasmática carboxilo terminal (Davies et al; 2015) **(ver figura 3).**

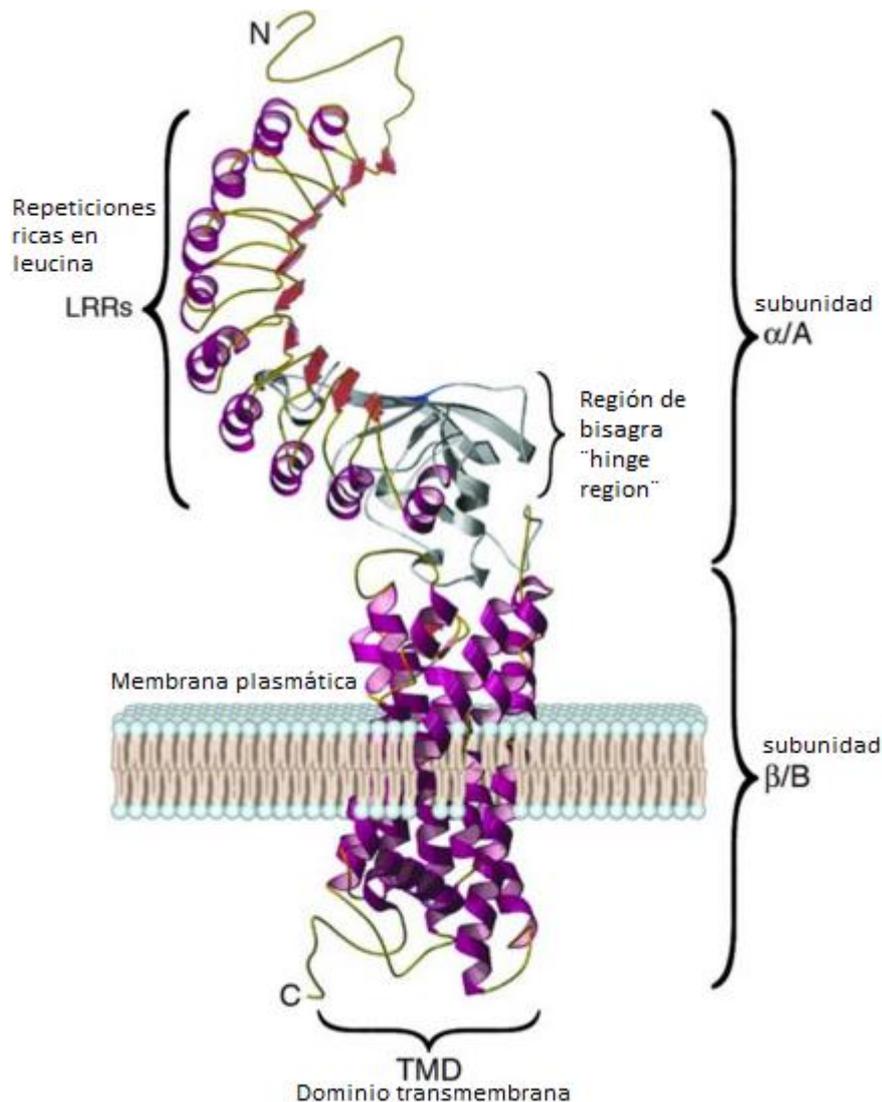


FIGURA 3. Estructura del receptor de TSH. En esta imagen se muestran sus 7 dominios transmembrana (espirales) incrustados en la membrana plasmática y la región citoplasmática terminal, juntos conforman la subunidad β/B . La región separada de 50 aminoácidos (del 316 al 366) se muestra en color gris. Los repetidos ricos en leucina que consisten en 20-24 aminoácidos, se encuentran formando filas en forma de espirales (α hélices y hojas β) en el ectodominio del receptor y conforman la porción mayor de la subunidad α/A . Los repetidos ricos en leucina tienen forma de herradura con una superficie cóncava interna. Se muestran también la región C- terminal y N- terminal (Davies TF et al; 2005, figura adaptada de Núñez MR et al; 2004)

Los receptores: FSHr, LHr, hCGr y TSHR son miembros de la familia GPCR (receptores acoplados a proteína G). Estos receptores tienen una región tipo "serpentina" que contiene 7 hélices transmembrana, capaz de activar a la proteína G, principalmente a su subunidad alfa, para la unión hormonal específica, en este caso de TSHR a TSH. Así mismo, el ectodominio N terminal

también es responsable de la alta afinidad y unión selectiva de la hormona a su receptor. La TSH unida a su receptor, el cual se expresa en la membrana basolateral del tirocito, conduce al acoplamiento de la proteína G α con la activación subsecuente de la adenilato ciclasa, lo que conlleva a un incremento en la formación de AMP que secundariamente conduce a una fosforilación de la protein cinasa A. Esta cascada de AMP cíclico dependiente de TSH es el mayor regulador en el tirocito de su crecimiento, diferenciación y secreción hormonal (Werner et al; 2013) (ver figura 4).

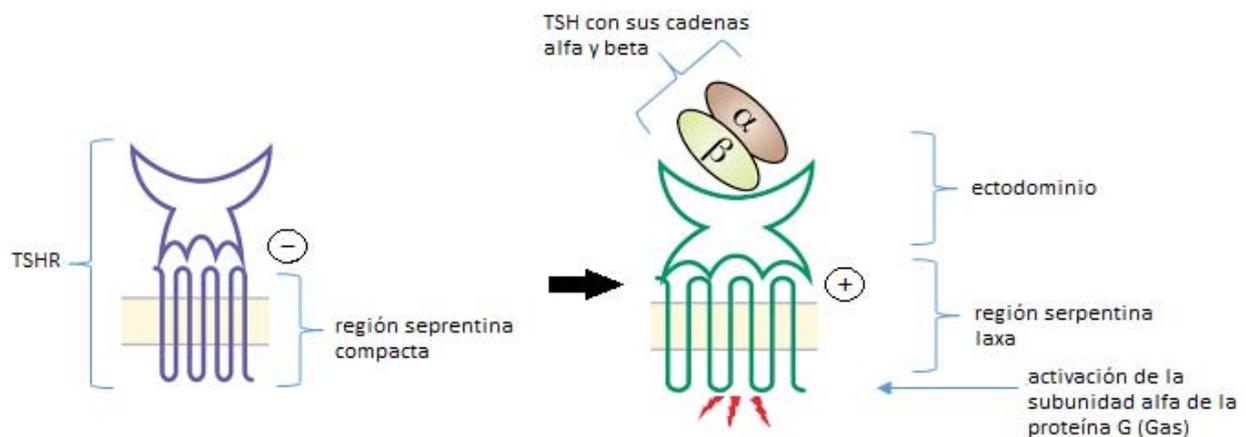


FIGURA 4. En esta imagen se muestra la unión de la TSH a su receptor. El estado basal del receptor se muestra mediante una interacción inhibitoria entre el ectodominio y el dominio de serpentina en donde la región serpentina basal se muestra como estructuras compactas en color azul. Al unirse la TSH a su receptor, el ectodominio funciona como agonista de la región tipo serpentina; las regiones de serpentina activadas se muestran como estructuras laxas en color verde (Vassart et al; 2004).

VARIANTES GÉNICAS PATOLÓGICAS (MUTACIONES) EN EL GEN DE *TSHR*

Se han descrito diferentes mutaciones con pérdida de la función (LOF) del *TSHR*, causales de la resistencia a la TSH: 1) con cambio de sentido (involucran el cambio de un aminoácido), 2) sin sentido (conllevan a un codón de paro prematuro), 3) con cambio en el marco de lectura deleciones/inserciones, 4) alteración en splicing (corte y empalme de exones). Estas mutaciones se encuentran distribuidas a lo largo de toda la secuencia del receptor, sin que se considere exista un sitio donde ocurran con mayor frecuencia "hot spot" (Persani et al; 2010), sin embargo, en el exón 10 se describen >50% de las mutaciones hasta ahora identificadas, siendo más comunes las mutaciones puntuales con cambio de sentido o sin sentido. De acuerdo a las bases de datos Human Genome Data Base (HGDB) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>) y Clin Var ([http://ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=TSHR\[gene\]](http://ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=TSHR[gene])) se han descrito alrededor de 60 mutaciones, de las cuales 50 son puntuales y de estas aproximadamente 35 ocurren en el exón 10. El exón 10

inicia en la base 882 que corresponde a una adenina y termina en la base 2295 que también corresponde a una adenina (tercera base del codón 294 que codifica una glicina hasta el codón 765 con el codón de paro TAA). Se propone que los mecanismos por los cuales hay pérdida de función del receptor son diversos como ausencia o disminución en su expresión en superficie celular, falla de la unión al ligando, inhabilidad para activarse y actuar sobre las proteínas G entre otras.

CORRELACIÓN GENOTIPO FENOTIPO

Las mutaciones del *TSHR* de tipo pérdida de la función (LOF) tienen un amplio espectro en el fenotipo, desde leve hipertirotropinemia en un paciente eutiroideo hasta hipotiroidismo grave (Cassio et al; 2013). La sensibilidad del tejido tiroideo a la TSH puede ir desde sensibilidad parcialmente conservada del tejido tiroideo (como efecto compensatorio a la elevación en los niveles de TSH) hasta pérdida total de la sensibilidad del tejido tiroideo a la estimulación con TSH, con grave alteración en el funcionamiento de la glándula. El grado de resistencia a la TSH depende de la severidad de la alteración en la función del receptor causada por la mutación y del número de alelos mutados (Persani et al; 2010). Cuando ambos alelos portan una mutación severa se observa ausencia total de función, el resultado usualmente es hipotiroidismo congénito grave con glándula tiroidea hipoplásica (resistencia a la TSH descompensada). Las mutaciones menos severas de tipo "pérdida de función", primordialmente heredadas de forma recesiva, se pueden manifestar como formas de hipotiroidismo leve/limitrofe, en las cuales, el incremento inapropiado de los niveles de TSH puede compensar la sensibilidad reducida de la glándula tiroidea (resistencia parcial o completamente compensada a la TSH) (Cassio et al; 2013).

Recientemente algunas mutaciones heterocigotas del *TSHR* de tipo LOF mayormente heredadas de forma dominante, han sido descritas asociadas a hipotiroidismo subclínico no autoinmune (NASH) con glándula tiroidea normal o hipoplásica. Sin embargo la variabilidad fenotípica es característica de las mutaciones del gen de *TSHR*, la misma mutación puede ser asociada a función tiroidea distinta en pacientes diferentes o en miembros de una misma familia y la hipoplasia tiroidea que es preferentemente asociada a mutaciones nulas en un estado homocigoto, es encontrada también en pacientes heterocigotos (Cassio 2013) (**ver tabla 1**).

Resistencia a la TSH	Edad al diagnóstico	Tamiz neonatal para HC	TSH	T4L	USG
Descompensada	Neonatal	Positivo	↑↑	↓	Hipoplasia severa
Parcialmente compensada	Neonatal/infancia	Variable	↑↑	normal ↓	Hipoplasia/tamaño normal
Completamente compensada	Infancia	Negativo	↑	normal	Tamaño normal/ hipoplasia leve

TABLA 1. Resistencia a la TSH de acuerdo a la severidad: variabilidad en edad al diagnóstico, detección por tamiz, laboratorio e imagen (Cassio et al; 2013)

III. JUSTIFICACIÓN

En México la prevalencia de hipotiroidismo es mayor a la reportada en otras poblaciones; sin embargo, no existe una evidente explicación de la mayor ocurrencia de este defecto aunque se ha propuesto la intervención de factores genéticos. Se ha observado que la frecuencia de mutaciones en el gen *TSHR* con pérdida de función varía en diferentes poblaciones, identificada en el 4.3% de casos con un fenotipo de hipotiroidismo congénito en población Japonesa hasta en el 29% de pacientes con hipotiroidismo subclínico no autoinmune en Italianos (Narumi et al; 2009 y Nicoletti et al; 2009); sin embargo, este gen no ha sido aún estudiado en pacientes con hipotiroidismo en nuestro país. El identificar variantes génicas patológicas en el gen de *TSHR*, nos permitiría comprender la mayor frecuencia de hipotiroidismo 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 variantes génicas patológicas en el gen *TSHR* en muestras de sangre periférica de pacientes con diagnóstico confirmado de hipotiroidismo congénito por disgenesia, canalizados a través del servicio de endocrinología, neurodesarrollo y consulta externa de pediatría, del Instituto Nacional de Pediatría.

2.- Específicos

1. Describir las características clínicas de los pacientes con diagnóstico confirmado de hipotiroidismo congénito por disgenesia.

2. Identificar variantes génicas patológicas en el gen de *TSHR* en pacientes con diagnóstico confirmado de hipotiroidismo congénito 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 variante génica patológica responsable de hipotiroidismo en el gen *TSHR*.

Diseño de estudio

Estudio observacional, descriptivo, transversal, ambispectivo.

Población de estudio

Pacientes con diagnóstico de hipotiroidismo congénito por disgenesia canalizados a través del servicio de endocrinología, neurodesarrollo y consulta externa de pediatría, del Instituto Nacional de Pediatría.

Población Objetivo

Pacientes con hipotiroidismo congénito por disgenesia (con agenesia o hipoplasia de la glándula tiroidea) confirmado por perfil tiroideo y estudio gammagráfico y/o ultrasonido tiroideo.

Población Elegible:

Pacientes canalizados a través del servicio de endocrinología, neurodesarrollo y consulta externa de pediatría, del Instituto Nacional de Pediatría.

V. MATERIAL Y METODOS

Criterios de inclusión:

1. Pacientes con diagnóstico de HC en seguimiento en la Unidad de Neurodesarrollo, Endocrinología y del servicio de Consulta Externa de Pediatría del Instituto Nacional de Pediatría (INP).
2. Ambos sexos.
3. Pacientes con diagnóstico confirmado de HC por disgenesia (con agenesia o hipoplasia de la glándula tiroidea). 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) sí= presente
	2) no= ausente

Facies hipotiroidea típica (tosca con puente nasal ancho y labios gruesos) o facies sin características distintivas de alguna patología.

En el caso de pacientes lactantes: fontanela posterior amplia (cierre retardado > 6 meses, de la sutura lambdoidea) o fontanela posterior puntiforme posterior a los 6 meses de vida.

Macroglosia: aumento del volumen de la lengua o lengua de dimensiones normales.

Voz y llanto roncós (voz apagada, lenta, profunda y llanto áspero) o voz y llanto sin alteraciones sugerentes de patología.

Alopecia (disminución y pérdida patológica de cabello, siendo este fino, muy seco, deslustrado y debilitado) o patrón de crecimiento capilar normal.

Piel engrosada (aspecto similar a *piel de naranja* en la que se marcan mucho los surcos nasogenianos) o piel de grosor normal.

Hernia umbilical (protuberancia del revestimiento abdominal, o de una porción de los órganos abdominales a través del área alrededor del ombligo) o ausencia de la misma.

OFTALMOLÓGICO

Edema palpebral (acúmulo anormal de líquido intersticial en la región de párpados inferiores) o ausencia del mismo.

GASTROINTESTINAL

Dificultad en la deglución (lentitud en la ingesta de alimentos) o velocidad adecuada en la ingestión de los mismos.

Estreñimiento (disminución en el número y en la frecuencia de evacuaciones) o patrón evacuatorio normal.

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) o nivel normal de bilirrubinas.

Xerosis (piel seca y áspera por falta de hidratación de la misma) o piel sin alteraciones.

NEUROLÓGICO

Hipotonia (disminución del tono muscular que condiciona alteraciones de succión, deglución y movilidad generalizada) o tono muscular adecuado.

Retraso psicomotor (retardo en la adquisición de habilidades motoras, de socialización y de lenguaje) o desarrollo psicomotriz normal.

Hipoactividad (disminución de los movimientos espontáneos) o actividad normal conservada.

Somnolencia (disminución del estado de alerta o patrón del sueño normal para la edad).

Hipotermia (disminución de la temperatura corporal) o mantenimiento de adecuada temperatura con relación a la ambiental.

Variante patogénica o mutación (cambio en la secuencia de nucleótidos de una región genética que contribuye de manera directa a una enfermedad).

Variante polimórfica o polimorfismo (cambio en la secuencia de nucleótidos de una región genética presente en población sana con una frecuencia mayor al 1%, que no suele asociarse con enfermedad).

VI. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Este trabajo es parte del proyecto 083/2013: "Análisis molecular de los genes *FOXE1* y *NKX2.5* en pacientes con hipotiroidismo congénito por disgenesia atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría", autorizado por los Comités de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Pediatría.

En cada caso se invitó al familiar a que autorizara que el DNA del caso índice, el cual se encontraba resguardado en el laboratorio de Biología Molecular, se utilizara para el análisis del gen *TSHR* para lo cual 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

Como parte del proyecto 08/2013, previamente se había realizado extracción del DNA a partir de sangre periférica colocada en tubos con EDTA como anticoagulante en pacientes con disgenesia tiroidea, la técnica que se utilizó para la extracción del DNA fue por precipitación salina con el kit Puregene™ (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA). El DNA se encuentra resguardado en el Laboratorio de Biología Molecular.

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 formula:

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

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 del *TSHR*

La búsqueda de mutaciones se realizó mediante amplificación en cadena de la polimerasa y secuenciación automática directa del exón 10 del gen. Los primers utilizados, se mencionan a continuación: (**ver tabla 2**).

Secuencias primers ensayo de PCR y secuenciación:

<i>TSHR</i> -M13F-EX10F	5'-GTAAAACGACGGCCAGTTGGCACTGACTCTTTTCTGT-3' (intervalo: c.882-30 a c.882-11)
<i>TSHR</i> -EX10R	5'-GTGTCATGGGATTGGAATGC-3' (intervalo c.*61-c.*80; 3'UTR)
<i>TSHR</i> -EX10FSeq	5'-ACTGTCTTTGCAAGCGAGTT-3' (primer F de secuenciación interna, c.1501-c.1520)
<i>TSHR</i> -EX10RSeq	5'-GTCCATGGGCAGGCAGATAC-3' (primer R de secuenciación interna, c.1719-c.1700)

TABLA 2. Primers para ensayo de PCR: M13F-EX10F y *TSHR*-EX10R, primers para análisis secuenciación del producto de PCR: EX10FSEQ y EX10RSEQ

Tamaño del producto de análisis por secuenciación: 700 a 800 pares de bases, incluyendo sitio aceptor de splicing y codón de paro natural con los primers sobrelapados *TSHR*-EX10FSeq y *TSH*-EX10RSeq. Primers diseñados por medio de la página www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/.

La mezcla para llevar a cabo la amplificación contuvo: *Taq* DNA polimerasa AltEnzyme [5UI/ul] 0.3 ul (1.5 UI/rxn), *Pfu* DNA polimerasa AltEnzyme [5UI/ul] 0.3 ul (1.5 UI/rxn), Buffer *Pfu* AltEnzyme [10X/25 mM MgSO₄] 3 ul, dNTPs XFRA [10 mM/25% deaza-dGTP] 0.5 ul, PCR Enhancer Solution [10X], Invitrogen 3 ul, 20 picomoles de cada primer F (*TSHR*-M13F-EX10F) / R (*TSHR*-EX10R) H₂Odd (cbp 30 ul/rxn) 13.9 ul y 200 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: desnaturalización inicial durante 5 minutos a 94°C seguida de 40 ciclos, con desnaturalización a 94°C por 40 seg, una alineación a 66° C por 1 minuto, extensión a 72°C por 2 minutos, seguida de una extensión final a 72° con duración de 15 minutos. Posteriormente se conservó a 4° C por tiempo indefinido.

La calidad de los productos de PCR fue analizada mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio y cuando la calidad de los amplicones fue óptima, fueron purificados enzimáticamente (ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup, Affymetrix, Inc.), para su posterior análisis por secuenciación automatizada directa de ambas cadenas (tipo Sanger con Big Dye® Terminator Cycle Sequencing kit, Life Technologies).

Las secuencias obtenidas y que cubren la totalidad del exón 10 de *TSHR*, fueron alineadas con las secuencias de referencia (NG_009206.1 RefSeqGene y NM_000369.2) a través del programa Codon Code Aligner. Se determinó si los cambios observados estaban descritos previamente como variante génica patogénica o polimorfismo en la literatura de acuerdo a la base de datos dbSNP del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), del Human Genome Mutation Database del Instituto Cardiff (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), Clin Var ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=TSHR\[gene\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=TSHR[gene])) y TSH receptor mutation database II (<http://endokrinologie.uniklinikum-leipzig.de/tsh/index.php>). En caso de que se encontraran cambios no descritos, se considerarían patogénicos si el efecto que se predice condiciona en la proteína un codón de paro prematuro o un corrimiento de marco de lectura. De igual forma a las variantes puntuales de sentido erróneo o no sinónimas, se les clasificaría como cambios dañinos o tolerables mediante evaluación *in silico* a través de los programas PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), SIFT (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html) y Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>).

Tamaño de la muestra.

Se estudiaron todos los casos confirmados de HC por disgenesia (considerados como agenesia o hipoplasia) con los cuales se contaba con los datos clínicos y un DNA de buena calidad, el tamaño de la muestra fue a conveniencia, se analizaron 77 pacientes.

Análisis Estadístico

Las frecuencias de las variantes clínicas observadas se calcularon en porcentaje y media, las frecuencias alélicas de las variantes génicas se determinaron mediante el método de conteo alélico.

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, Legal and Social Issues"). El asesoramiento genético se brindó en todos los casos de acuerdo a los resultados obtenidos del estudio molecular.

VII. RESULTADOS

A. RESULTADOS CLÍNICOS

Se incluyeron a 77 pacientes, con diagnóstico de HC por tamiz y/o clínicamente, los cuales se clasificaron en 8 grupos de acuerdo a los hallazgos clínicos y de gabinete (Léger J. et al; 2014):

1. Hipoplasia tiroidea:
 - a. USG o gammagrama: hipoplasia tiroidea
 - b. Tiroglobulina: normal o baja

2. Agenesia / atirois aparente:
 - a. USG o gammagrama: sin glándula
 - b. Tiroglobulina: normal

3. Agenesia / atirois verdadera:
 - a. USG o gammagrama: sin glándula
 - b. Tiroglobulina: menor de 0.5 ng/dl

4. Probable ectopia tiroidea:
 - a. USG: ausencia de glándula
 - b. Tiroglobulina: alta

5. Agenesia/ atirois por estudio de imagen:
 - a. USG o gammagrama: sin glándula
 - b. Tiroglobulina: no determinada

6. Agenesia/atirosis por estudio de imagen, con tiroglobulina discordante:
 - a. USG o gammagrama: sin captación
 - b. Tiroglobulina: elevada

7. Hipoplasia tiroidea por estudio de imagen:
 - a. USG o gammagrama: hipoplasia tiroidea
 - b. Tiroglobulina: no determinada

8. Hipoplasia tiroidea por estudio de imagen, con tiroglobulina discordante:
 - a. USG o gammagrama: hipoplasia tiroidea
 - b. Tiroglobulina: elevada

El grupo 1 quedó constituido por el 6.4% (n=5) del total de los pacientes; el 2 por el 33.7% (n=26); el 3 por 15.5% (n=12); el 4 por 3.8% (n=3); el 5 por el 19.4% (n=15); el 6 por el 7.7% (n=6); el 7 por 10.3% (n=8) y el grupo 8 por el 2.5% (n=2) del total de los pacientes. Para clasificar a los pacientes por el tipo de disgenesia se contó con estudio de imagen en todos ellos (n=77); sin embargo, se realizó gammagrama sólo en el 51.9% (n=40) de los casos y USG en el 48.1% restante (n=37) (**ver tabla 3**).

	Gammagrama		USG	
	Hipoplasia	Agenesia	Hipoplasia	Agenesia
	No. Pacientes	No. pacientes	No. pacientes	No. pacientes
Grupo 1	0	0	5	0
Grupo 2	0	19	0	7
Grupo 3	0	9	0	3
Grupo 4	0	0	0	3
Grupo 5	0	6	0	9
Grupo 6	0	6	0	0
Grupo 7	0	0	8	0
Grupo 8	0	0	2	0

TABLA 3. Se muestran los resultados de los estudios de gabinete (Gammagrama/USG) de acuerdo a los diferentes grupos

El diagnóstico de HC se estableció por tamiz en 74 de los 77 pacientes incluidos, en los otros 3 pacientes el diagnóstico de HC se realizó por presencia de manifestaciones clínicas y se confirmó mediante perfil tiroideo al 2do mes en un paciente del grupo 2 y en el 1er y 3er mes en dos pacientes del grupo 5.

Con respecto a los 74 pacientes en quienes el diagnóstico se realizó por tamiz, en el 93.5 % (n=72) el diagnóstico se hizo con sangre de talón, mientras que en el 2.6% (n=2) el diagnóstico se hizo con sangre de cordón.

El rango de edad de los 74 pacientes al momento del diagnóstico por tamiz fue de 5 a 120 días, mientras que por subgrupos el rango de diagnóstico mínimo, máximo y media se muestra en la tabla 4. En todos los pacientes se realizaron pruebas confirmatorias y al establecerse el diagnóstico de HC se inició tratamiento con levotiroxina (**ver tabla 4**).

Edad al diagnóstico por Tamiz	Mínimo (días)	Máximo (días)	Media (días)
Grupo 1	17	90	47.4
Grupo 2	10	120	53.2
Grupo 3	16	60	41.4
Grupo 4	14	90	54.6
Grupo 5	21	120	46.8
Grupo 6	30	90	50
Grupo 7	5	60	37.1
Grupo 8	21	30	25.5

TABLA 4. Se muestran por grupos, la media de las edades al diagnóstico por tamiz, así como edades mínimas y máximas.

Con respecto al sexo, del total de 77 pacientes, hubo un predominio del femenino sobre el masculino, con un 77.9% (n= 60) y 22.1% (n=17) respectivamente. En la tabla 5 se muestra la distribución del sexo por los grupos de TD (**ver tabla 5**).

	Femenino	Masculino
Grupo 1	3	2
Grupo 2	21	5
Grupo 3	9	3
Grupo 4	3	0
Grupo 5	14	1
Grupo 6	3	3
Grupo 7	5	3
Grupo 8	2	0

TABLA 5. Se muestra la distribución por sexo de acuerdo a los diferentes grupos

Con respecto a las semanas de gestación al nacimiento, del total de nuestros pacientes, 89.6% (n=69) nacieron de término, 9.1% (n=7) pretérmino y 1.3% (n=1) postérmino. De los 7 pacientes que nacieron pretérmino, estos fueron de 32, 33, 33.2, 34, 34, 36 y 36 SDG, en quienes se les realizó diagnóstico confirmatorio a los 30, 30, 60, 30, 5, 60 y 45 días de nacidos respectivamente.

Los pacientes que nacieron pretérmino pertenecieron a los grupos: 1, 2, 5, 7 y el paciente postérmino correspondió al grupo 2.

Se midió tiroglobulina (TG) al momento del diagnóstico en el 68.8% de la población (n=53), en el 31.2% (n=24) restante, no se determinó la misma. Con respecto a los subgrupos, en el grupo 1, el rango de TG fue de 0.4-19.9 ng/dL, con una media de 5.5 ng/dL; en el grupo 2, el rango de TG fue de 0.5 – 49.9 ng/dL, con una media de 11.9 ng/dL; en el grupo 3, todos los pacientes presentaron niveles de TG 0.1 ng/dL; en el grupo 4, el único paciente con TG medida tuvo un valor de 155.9 ng/dL; en el grupo 5, no se midió TG; en el grupo 6, el rango de TG fue de 68.6-300 ng/dL con una media de 122.9 ng/dL; en el grupo 7, no se midió TG en los pacientes; en el grupo 8, el rango de TG fue de 62.7-80.6 ng/dL, con una media de 103 ng/dL (**ver figura 5**).

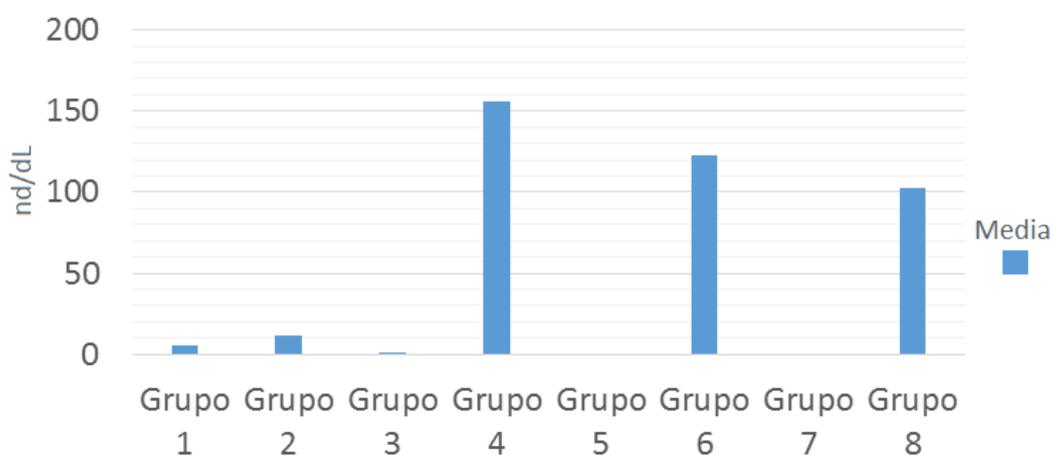


FIGURA 5. Se muestra la media de medición de TG de acuerdo a grupos, en donde se muestra predominio del grupo 4 y ausencia de medición en los grupos 5 y 7

Dentro de los parámetros bioquímicos, el 100 % presentaron valores confirmatorios de TSH elevados, con un rango de 8,2 a 840 uUI/mL y una media de 126,6 (**ver tabla 6 y figura 6**).

Grupos	Media	Mínimo y máximo
1	108,6	43 – 200
2	112,8	46,2- 614,6
3	69,6	8,2-100
4	230,9	36,9-580,9
5	159,2	27,5-840
6	87,6	75-150
7	121,8	19,9-491
8	425,0	75-775

TABLA 6. Se muestran la media, mínimo y máximo de los valores de TSH de acuerdo a grupos

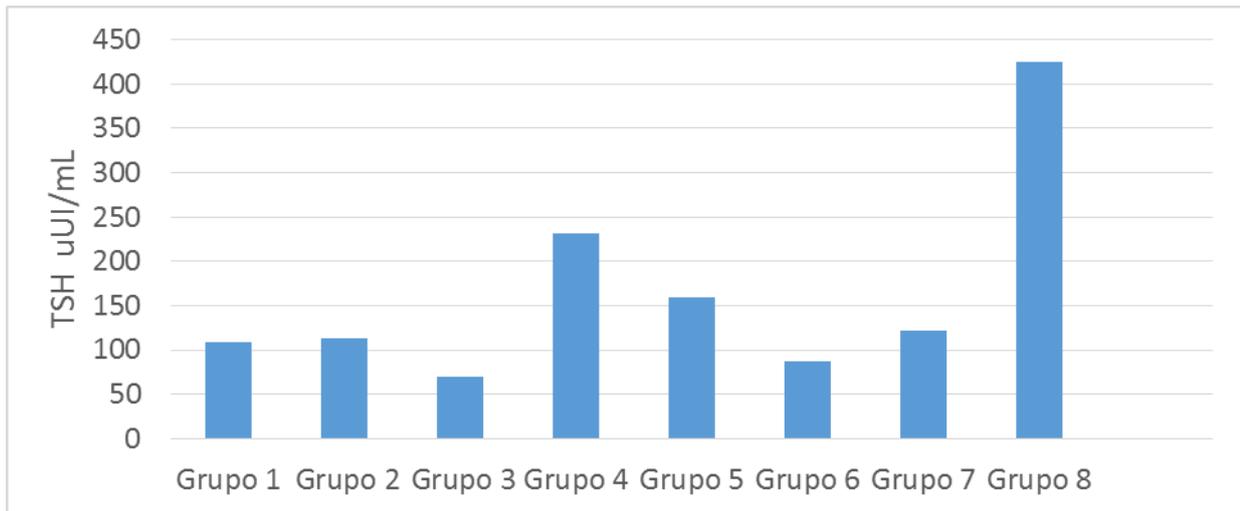


FIGURA 6. Se muestra la media de TSH de acuerdo a los diferentes grupos

Con respecto a la T4L, esta se midió en el 94.8% (n=73) de los pacientes, con un mínimo de 0 y un máximo de 5.9 ng/dL y una media de 0,61 ng/dL (ver tabla 7 y figura 7).

Grupos	Media	Mínimo y máximo
1	0,9	0,5-1,4
2	0,2	0-1,5
3	0,3	0-1,3
4	0,7	0,5-0,9
5	0,5	0,07-1,5
6	0,1	0,1-0,5
7	2,6	0,75-5,9
8	0,55	0,5-0,6

TABLA 7. Se muestran la media, mínimo y máximo de los valores de T4L de acuerdo a grupos

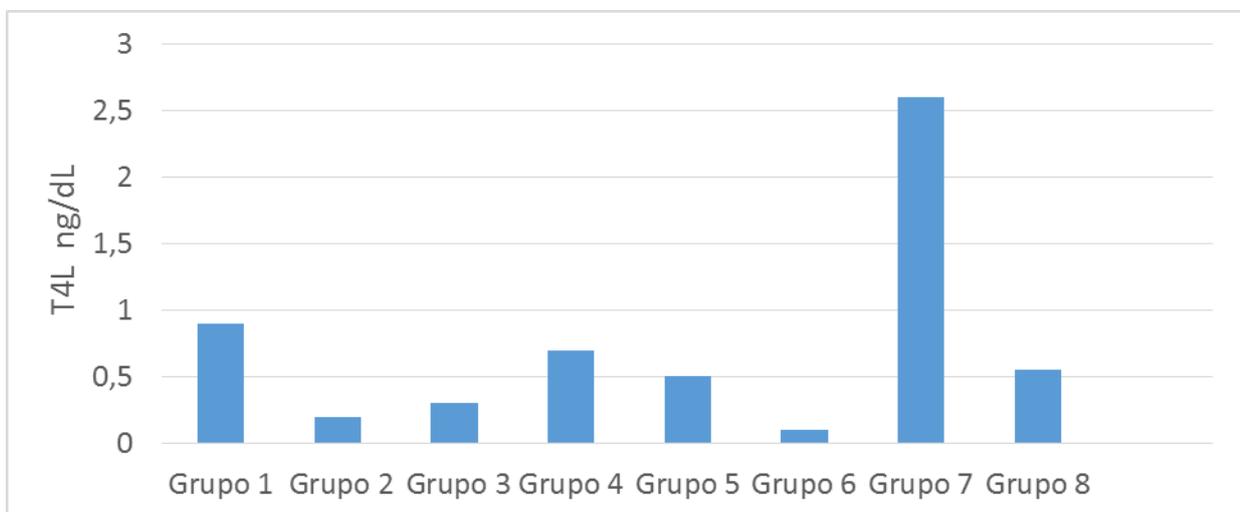


Figura 7. Se muestra la media de T4L de acuerdo a los diferentes grupos

De acuerdo al peso y talla, el rango de peso al nacimiento de los pacientes pretérmino fue de 1.5 a 3 kg, con una media de 2.2 kg, el rango de los pacientes de término fue de 1.6 a 4.2 kg con una media de 3.2 kg y el único caso postérmino tuvo un peso de 3.5 kg. Con respecto a la talla, el rango de talla en los pretérmino fue de 44-52 cm con una media de 46.7, en los pacientes de término fue de 41-54 cm con una media de 50,5 cm y la talla del único caso postérmino fue de 50 cm.

Con respecto a las características clínicas que presentaron los pacientes se observó en orden de frecuencia: ictericia en 68.8% (n=53), hernia umbilical en 55.8% (n=43), fontanela anterior amplia en 51.9% (n=40), estreñimiento en 46.7% (n=36), llanto ronco en 42.8% (n=33), macroglosia en 37.6% (n=29), piel seca en 33.7% (n=26), facies típica en el 25.9% (n=20), edema en 16.8% (n=13), hipotonía en 16.8% (n=13), cianosis peribucal en 14.2% (n=11), lentitud en la ingesta de alimentos en 6.4% (n=5), hipotermia en 6.4% (n=5) y dificultad respiratoria en 5.1% (n=4) (**ver figura 8**).

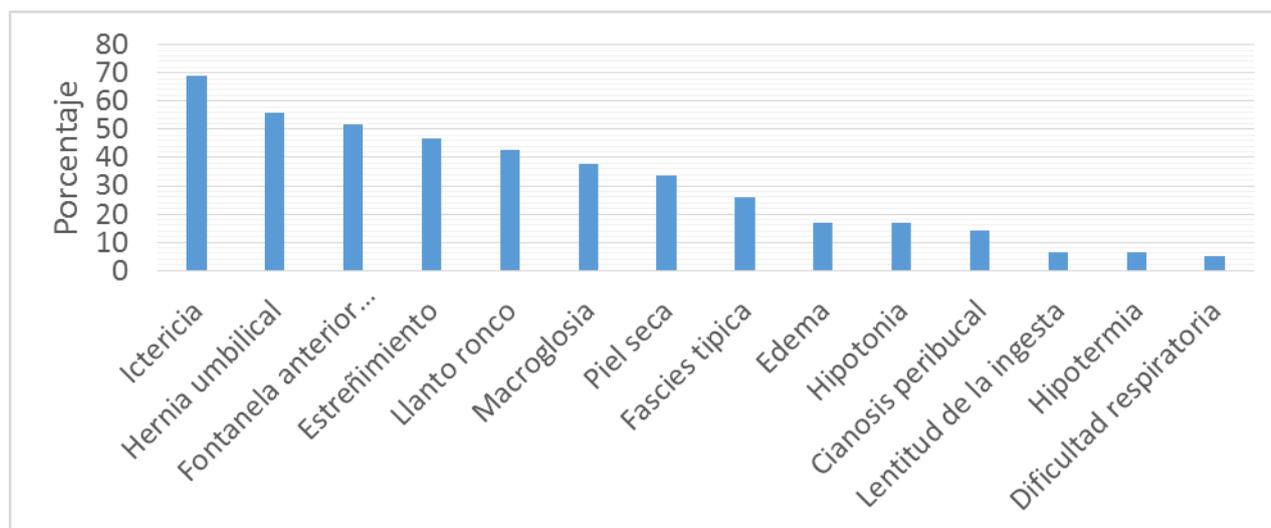


FIGURA 8. Características clínicas encontradas en los pacientes diagnosticados con HC

B. RESULTADOS MOLECULARES

Se realizó el análisis molecular de 77 pacientes pero se excluyó a un paciente del grupo 2 (HC-234) por no presentar un producto de PCR adecuado, por lo que no se logró realizar el ensayo de secuenciación (**ver figura 9**).

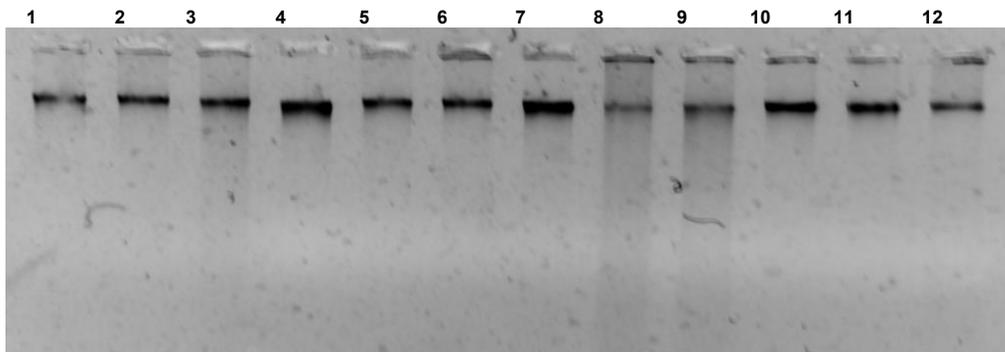


FIGURA 9. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de Etidio se observa de los carriles 1 al 12 DNA obtenido de leucocitos de sangre periférica de pacientes con hipotiroidismo, el cual se considera de buena calidad.

Se realizó la PCR del exón 10 del gen *TSHR* obteniéndose un producto de 1524 pares de bases. Con la secuenciación de este producto se incluye el análisis del sitio aceptor de splicing así como el codón de paro natural con los primers sobrelapados (*TSHR-EX10FSeq* y *TSHR-EX10RSeq*) (ver figura 10).

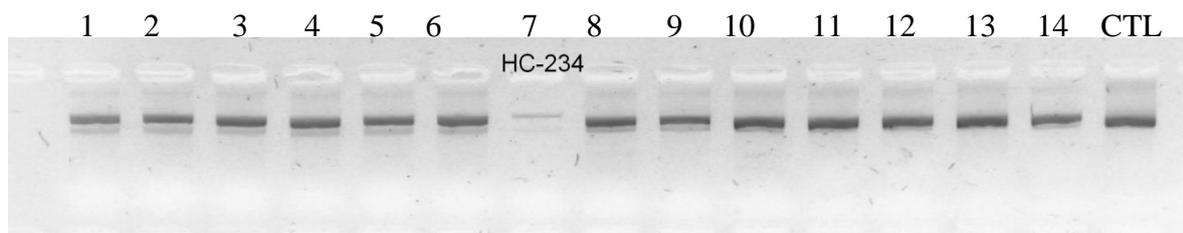


Figura 10. Análisis de productos de PCR (5ul/ de cada reacción) del exón 10 del gen *TSHR* en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (1524 pb): carriles del 1 al 6 y del 8 al 14 productos de PCR acordes al tamaño esperado en 13 pacientes con HC, en el carril 7 no se observa producto amplificado por lo que esta muestra no fue analizada por secuenciación (muestra HC 234), CTL muestra control normal.

La secuenciación del exón 10 del gen *TSHR* en los 76 pacientes incluidos, no reveló la presencia de variantes patogénicas previamente descritas, sin embargo se observaron 3 variantes puntuales ya descritas en la literatura y con rs asignado en la base de dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>)

Uno de los cambios se encontró en un paciente correspondiente al grupo 2 (HC 272), observándose una posición mixta G>A en la posición 1377 del cDNA (c.1377G>A) la cual condiciona un cambio sinónimo en el codón 459 (p.Ala459Ala) el cual se encuentra reportado como un polimorfismo (rs 113951800).

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=7253) de acuerdo a las secuencias de referencia (NG_009206.1 y NM_000369.2) (**ver figura 11**). Las frecuencias alélicas de esta variante en este estudio fueron: G=0.993 (n=151) y A=0.006 (n=1).

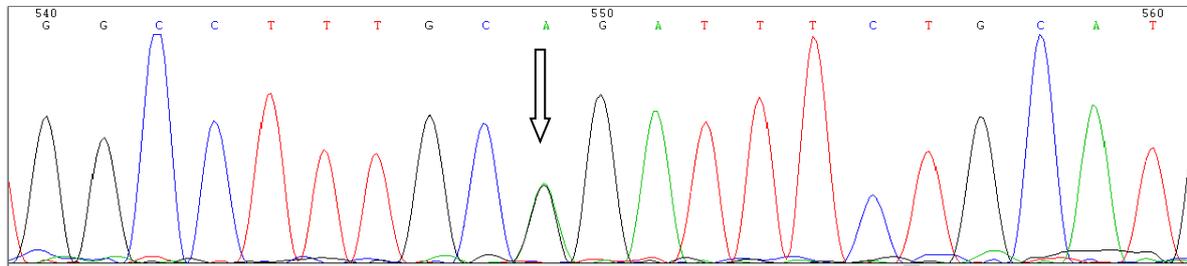


FIGURA 11. Electroferograma parcial del exón 10 del gen *TSHR* (cadena R) de la muestra HC 272. El análisis del electroferograma y de acuerdo a las secuencias de referencia NG_009206.1 y NM_000369.2 muestra una posición con una base mixta o G/A en el nucleótido 1377 (flecha) del cDNA del gen *TSHR* (c.1377G>A) la cual condiciona un cambio sinónimo en el codón 459 (p.Ala459Ala), mismo que se encuentra reportado como polimorfismo (rs 113951800) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=7253).

De igual forma se encontró otro cambio ya reportado c.2181G>C, el cual modifica el sentido del codón 727 de ácido glutámico (GAG) por un ácido aspártico (GAC) p.Glu727Asp, el cual se encuentra reportado en la base de dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) (rs1991517); este cambio se identificó en 11 individuos en estado heterocigoto y en 65 pacientes en estado homocigoto, por lo que la frecuencia alélica para el alelo G es de 0.072 (n=11) y para el alelo C 0.927 (n=141). Los 11 pacientes con esta variante en estado heterocigoto correspondieron a los grupos: 2 (HC 268 y HC302), 3 (HC 315), 5 (HC 256, 273, 324 y 329), 6 (HC 194 y 264), 7 (HC 210) y 8 (HC 238) (**ver figura 12**).

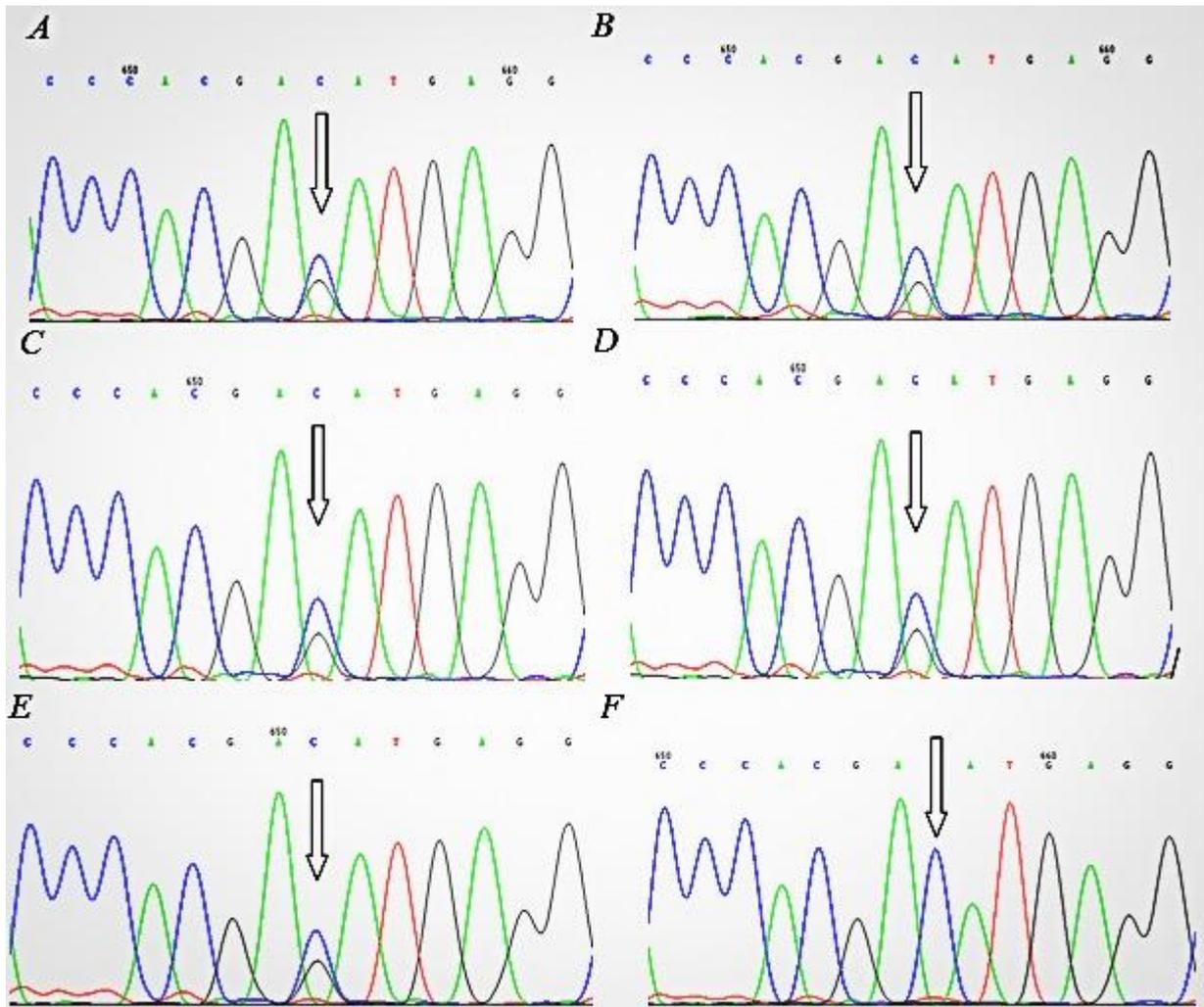


Figura 12. Electroferogramas parciales del exón 10 del gen *TSHR* (cadena F) El análisis de los electroferogramas y de acuerdo a las secuencias de referencia NG_009206.1 y NM_000369.2, muestra una posición con una base mixta o G/C en el nucleótido 2181 del cDNA del gen *TSHR* c.2181G>C el cual cambia el sentido del codón 727 de ácido glutámico (GAG) por un ácido aspártico (GAC) p.Glu727Asp dicha variante se encuentra reportada en dbSNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=7253) (rs1991517), el cambio se observa en estado heterocigoto en las figuras A, B, C, D, E mientras que en la figura F se encuentra en estado homocigoto para el alelo C (flechas).

Además se encontró otra variante en el exón 10 del gen *TSHR* la cual genera una posición mixta T>C en la posición 1264 del cDNA (c.1264T>C), y condiciona un cambio de sentido en el codón 422 de triptófano (TGG) por una arginina (CGG) (p.Trp422Arg). Esta variante se encuentra reportada en la base de dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) (rs746029360) y en ExAC se encuentra descrita únicamente en 2 alelos de 11578 de origen latino. El análisis *in silico* con los programas SIFT, Mutation Taster y PolyPhen, lo considera un cambio dañino. El caso que la presenta es del sexo femenino (HC 324), clasificada en el grupo 5 (agenesia tiroidea por estudio

de imagen con ultrasonido sin medición de tiroglobulina), en quien se estableció el diagnóstico a través del tamiz neonatal reportado al mes de edad, fecha en la cual inicio manejo con presencia de fontanela anterior amplia, estreñimiento y hernia umbilical como características clínicas asociadas al HC (ver figura 13).

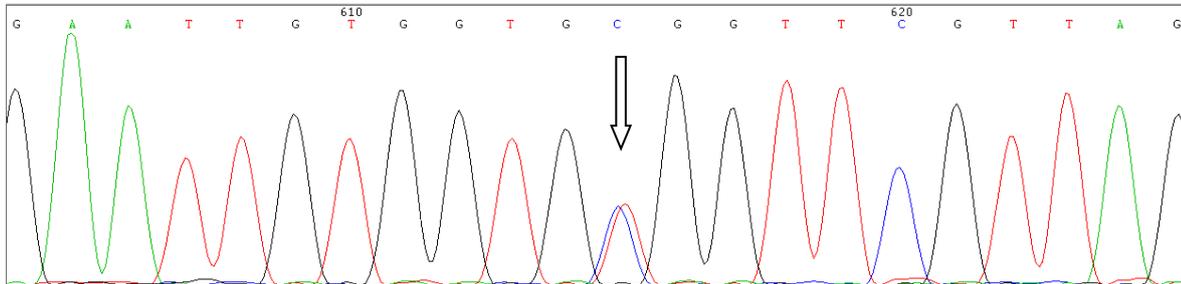


FIGURA 13. Electroferograma parcial del exón 10 del gen *TSHR* (cadena R) de la muestra HC 324. El análisis del electroferograma y de acuerdo a las secuencias de referencia NG_009206.1 y NM_000369.2, muestra una posición con una base mixta o T/C en el nucleótido 1264 (flecha) del cDNA del gen *TSHR* c.1264T>C el cual cambia el sentido del codón 422 de triptófano (TGG) por uno de arginina (CGG) p.Trp422Arg dicha variante se encuentra reportada en la base dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs746029360>) y en ExAC con una frecuencia alélica de 0.00001647, (rs746029360, descrita sólo en 2 alelos de 11578 de origen latino (ExAC); no así en las bases de datos HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>), CLIN VAR ([http://ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=TSHR\[gene\]](http://ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=TSHR[gene])) o TSH Receptor mutation database: (<http://endokrinologie.uniklinikum-leipzig.de/tsh/index.php>).

VIII. DISCUSION

A. CLÍNICA

En el 2013, la Dra Cassio mencionó que los pacientes con hipoplasia tiroidea pueden estar subdiagnosticados como agenesia, ya que en varios casos, se utiliza únicamente como herramienta diagnóstica USG o gammagrama; y debido a que el USG es operador dependiente, cuando la glándula tiene un tamaño reducido, no alcanza a ser vista por el operador que realiza el estudio; mientras que, en los casos de gammagrama, cuando la tiroides es demasiado pequeña, puede no captar adecuadamente el radiofármaco. Por tal motivo ella sugiere la toma de tiroglobulina como coadyuvante para el diagnóstico diferencial entre estas dos entidades; Beltrao en 2010, propuso que la TG es el mejor método para valorar la presencia de tejido tiroideo, ya que esta es una proteína específica de la glándula tiroidea. En el presente estudio, algunos pacientes se clasificaron como atirosis o hipoplasia sólo con base al estudio de imagen (ultrasonido o gammagrama) ya que se cuenta con medición de TG únicamente en el 68.8% de los casos, lo anterior debido a que la información de las pruebas tiroideas confirmatorias se tomó de manera

retrospectiva del expediente clínico y varios casos no contaban con la medición de TG sin ser un criterio de exclusión, por lo anterior, se decidió clasificar a los pacientes en 8 grupos haciendo la aclaración de si contaban o no con TG y si sus niveles estaban acorde a lo observado con el estudio de imagen.

Con respecto a la distribución por grupos, se esperaba encontrar de manera más factible variantes génicas patológicas en los pacientes del grupo 1 con hipoplasia tiroidea y con menor posibilidad en los del grupo 2 y 3, agenesia verdadera y agenesia aparente respectivamente, ya que son los casos que cuentan con gammagrama y medición de tiroglobulina en este trabajo y al ser los fenotipos clínicos que se describen con mayor frecuencia en la literatura asociados a mutaciones en el gen *TSHR*.

En tres pacientes no se puede descartar que se traten de ectopia verdadera ya que en ellos el diagnóstico se consideró como probable, debido a que aunque el USG reportó ausencia de glándula y la medición de la TG fue alta (Léger J. et al; 2014), en estos casos la certeza de que se trata de ectopia requiere el estudio con gammagrama para determinar presencia o no de tejido tiroideo, dado que en estos pacientes no se pudo realizar este último estudio se decidió mantenerlos en este trabajo para descartar en ellos mutaciones en el gen *TSHR*.

Con respecto a los pacientes del grupo 6 y 8, en quienes se encontró agenesia o hipoplasia por estudio de imagen, con TG discordante (elevada); se mantuvieron en el estudio ya que de acuerdo a reportes de literatura, Abramowicz en 1997 encontró también mutación en el gen de *TSHR* p.(Ala553Thr) en una familia de padres consanguíneos y 4 hijos; en quienes los padres y dos hermanos sin manifestación de HC fueron heterocigotos para la mutación, mientras que los otros dos hijos, fueron homocigotos; estos dos últimos, inicialmente se diagnosticaron con agenesia tiroidea mediante examen físico y gammagrama con Tc-99m, posteriormente por USG tiroideo se hizo el diagnóstico de hipoplasia tiroidea; ambos con TG elevada al momento del diagnóstico. Así mismo Sura-Trueba en 2009, encontró una mutación homocigota en el gen de *TSHR* p.(Gln489His) en dos hijos, de padres consanguíneos del norte de África, con diagnóstico de atirosis/agenesia tiroidea por USG y por imagen por Resonancia Magnética (IRM) a pesar de haber contado con niveles normales de TG. En la literatura se refiere que la elevación de la TG en plasma en casos con disgenesia, puede ser secundaria a una polarización incompleta de los tirocitos, un señalamiento anormal de la TG por acumulación en el retículo endoplásmico rugoso de *TSHR* mal plegada o por rompimiento intercelular de folículos displásicos (Abramowicz et al; 1997).

A pesar de que el estándar de oro para la detección de HC es el gammagrama (Perry et al; 2006), en este trabajo se incluyeron sólo 40 pacientes que contaban con este estudio, mientras que se

realizó USG en los 37 restantes, lo anterior se debe a que en nuestra Institución, en los últimos años, no se tiene disponible el equipo para la realización del gammagrama. Llama la atención que en los pacientes a quienes se les hizo gammagrama, en ningún caso se detectó hipoplasia tiroidea, lo que coincide con lo previamente mencionado por la Dra Cassio en 2003, de que en los casos de hipoplasia muy severa, existe la posibilidad de que el radiofármaco no sea correctamente captado por la glándula, originando un diagnóstico erróneo de aplasia tiroidea. En los pacientes a quienes se les realizó USG, se detectó tanto hipoplasia como aplasia tiroidea, sin embargo al ser un estudio operador dependiente, tiene como limitante que difícilmente se logran detectar los casos de ectopia tiroidea; como ejemplo en la literatura se menciona un estudio de 40 pacientes con HC por DT, con rango de edad entre 12 días, en los cuales la detección de ectopia tiroidea por gammagrama fue de 91.7% contra sólo 9.1% con USG (Perry et al; 2006).

El diagnóstico de HC se estableció por tamiz en 74 de los 77 pacientes, el sitio de toma de tamiz en todos nuestros pacientes fue adecuado, ya que se realizó en talón o cordón umbilical, los cuales son los dos sitios aceptados por el Lineamiento Técnico de la Secretaría de Salud, 2007.

El rango de edad al diagnóstico de HC por tamiz neonatal de los 74 pacientes fue de 5 a 120 días con media de 30 días; 38 pacientes fueron diagnosticados antes de los 30 días y 36 pacientes después, con un máximo de 120 días. No conocemos el motivo del retraso en el diagnóstico, sin embargo, el 100% iniciaron su tratamiento el mismo día en que se les realizó el diagnóstico de HC. Es ampliamente conocido que la edad de detección de HC es muy importante, en México se recomienda que el tamiz neonatal debe realizarse dentro de los primeros 5 días con un máximo de 30 días cuando la sangre es proveniente de talón (Lineamiento Técnico de la Secretaría de Salud, 2007). La Dra Vela en 2004, quien del año 2001 a 2002, estudió la edad al diagnóstico de niños con HC provenientes de los 32 estados de la república mexicana, observó que en el Distrito Federal hubo un retraso de 2.5 días con respecto a la meta ideal (primeros 30 días de vida); para mejorar esto y disminuir las secuelas de un diagnóstico y manejo tardío, ella menciona como principal condicionante el factor operativo (lo que involucra el proceso de tamiz desde la toma de muestra hasta la confirmación del caso).

Con relación al sexo de los pacientes hubo un predominio del femenino sobre el masculino, con una relación de 8:2; aunque esta diferencia en el sexo de los afectados con HC se encuentra descrito en la literatura, en este estudio el predominio de mujeres fue mayor a lo reportado tanto en literatura latinoamericana como anglosajona, en donde mencionan una relación 3:1 (Lorey et al; 1992) y 2:1 respectivamente (Rose et al; 2006, Rastogi et al; 2010); sin embargo, desconocemos la causa de esta diferencia.

De acuerdo a las semanas de gestación al nacimiento, el 9.1% de los pacientes nacieron pretérmino, a todos se les realizó perfil tiroideo confirmatorio una vez que había transcurrido el tiempo en el que puede existir fluctuación en las hormonas tiroideas, salvo en un paciente de 34 semanas de gestación, perteneciente al grupo 7, en quien el diagnóstico confirmatorio se realizó al 5to día de vida. Dado que el presente estudio es transversal, no contamos con el registro de los resultados de seguimiento de pruebas tiroideas de este paciente, sin embargo, de acuerdo al Lineamiento Técnico de la Secretaría de Salud, 2007, debió haberse confirmado el diagnóstico al repetir las pruebas de función tiroidea entre las siguientes 4 y 8 semanas al ser pretérmino, con el fin de que dicha medición sea cuando se haya concluido el tiempo de inmadurez del eje hipotálamo - hipófisis- tiroides, con la consecuente disminución transitoria de T4.

Dentro de los parámetros bioquímicos, el 100% de los pacientes presentaron valores confirmatorios elevados de TSH, en un rango de 8,2 a 840 uUI/ml, con una media de 126,6 uUI/ml, sin existir correlación entre el tamaño glandular y los niveles de TSH entre los grupos 1, 3 y 4; ya que la media de niveles de TSH fue más alta en los pacientes con ectopia e hipoplasia tiroidea (230,9 y 108,6 uUI/mL respectivamente) y más baja en los pacientes con agenesia/atirois verdadera (69,6 uUI/mL), lo cual no es esperado de acuerdo a reportes en la literatura; incluyendo el del 2016 de Uyttendaele quien estudió 139 pacientes con HC y en donde los valores de TSH más altos los observó, como era de esperarse, en los casos de atirois (64 ectopia tiroidea y 46 atirois, con valores de TSH de 158.4 uUI/mL y 252 uUI/mL respectivamente) (Uyttendaele et al; 2016).

De acuerdo a la T4L, esta se midió en el 94.8% de los pacientes, los niveles más bajos se encontraron en los pacientes con diagnóstico de atirois/agenesia tiroidea, grupos 2,3 y 6. Esto era esperado, ya que entre menos tejido tiroideo existe, hay menor producción y secundariamente, menor conversión de hormonas tiroideas en tejidos periféricos (Guyton et al; 2000).

Con respecto al peso, la media de pacientes de término fue de 3.2 kg, lo que era esperado y mostró gran similitud con lo reportado por la doctora Vela en 2004, quien estudió a 731 recién nacidos con diagnóstico confirmado de HC en quienes la media de peso al nacimiento fue de 3 298 kg.

La media de talla de los pacientes pretérmino fue de 46.7 cm, del paciente posttérmino fue de 50 cm y de los de término fue de 50.5 cm, las cuales son tallas esperadas de acuerdo a sus semanas de gestación y las cuales no se afectaron por el diagnóstico de HC al nacimiento debido a que no contaban con comorbilidades asociadas.

El predominio de las características clínicas presentadas por los pacientes, fueron similares a las previamente descritas en la literatura, sin embargo el orden de presentación varió. La ictericia fue la más frecuentemente encontrada en el 68.8% (n=53), lo que coincide con lo reportado en la literatura universal; Rastogi en 2010 también describe a la ictericia como el signo principalmente asociado a HC, sin embargo él posiciona a la dificultad para la ingesta en segundo lugar (Rastogi et al; 2010), mientras que en nuestros pacientes, el segundo hallazgo observado fue la hernia umbilical (n=43, 55.8%) y fontanela anterior amplia en tercer lugar (n= 40, 51.9%). En comparación con la literatura mexicana, la doctora Vela en 2004, observó a la hernia umbilical (43.63%) como la manifestación clínica más frecuentemente, seguida de ictericia (41.58%) y piel seca (36.9%) (Vela et al; 2004). Las diferencias entre nuestros casos y los descritos en literatura son esperadas dado que el HC es una entidad con amplia variabilidad clínica.

B. MOLECULAR

En los últimos años, el gen del receptor de TSH (*TSHR*) también se ha asociado como agente causal de disgenesia tiroidea a nivel mundial. Aunque está constituido por 10 exones es en el exón 10 donde se describen más del 50% de las mutaciones hasta ahora identificadas, siendo las más comunes de tipo puntual. De acuerdo a las bases de datos Human Genome Data Base (HGDB) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>) y Clin Var ([http://ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=TSHR\[gene\]](http://ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=TSHR[gene])), se han descrito alrededor de 60 mutaciones, de las cuales 50 son puntuales y de estas aproximadamente 35 ocurren en el exón 10; por lo anterior, en este trabajo, se reportan los hallazgos del análisis de sólo el exón 10; sin embargo, se tiene contemplado realizar el estudio de los demás exones.

En los pacientes analizados no se observaron variaciones génicas patológicas, sin embargo se identificaron 3 variantes previamente descritas en la literatura.

La primera c.1377G>A, condiciona un cambio sinónimo en el codón 459 (p.Ala459Ala), mismo que se encuentra reportado como polimorfismo en la base de datos dbSNP con el número rs113951800 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=113951800) con unas frecuencias alélicas de G=0.9933 (n=151) y A=0.0066 (n=1), lo que es muy similar a lo observado en otras poblaciones como: en descendientes de mexicanos residentes en Los Ángeles, Estados Unidos (EU) (G=1.0000 A=0.0000), colombianos de la región de Medellín (G= 0.9840 A= 0.0160), hindúes Gujarati residentes en Houston (G= 0.9369 A= 0.0631), chinos (G= 0.9946, A= 0.0054), ingleses (G= 0.9780 A=0.0220) y residentes de Tokio en Japón (G=1.0000 A= 0.000) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>).

El polimorfismo c.2181G>C fue el que se observó con mayor frecuencia en nuestra población, el cual cambia el sentido del codón 727 de ácido glutámico (GAG) por un ácido aspártico (GAC) p.Glu727Asp; dicha variante se encuentra reportada en la base dbSNP con la referencia rs1991517 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs1991517>), para esta variante se observó una frecuencia del alelo G de 0.072 (n=11) y para el alelo C de 0.927 (n=141); estas frecuencias son muy similares a las observadas en otras poblaciones, tanto de origen mexicano residentes en EU Los Ángeles (G= 0.1094 C= 0.8906) como en población asiática (G=0.1796 C=0.8204) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>). Yuan en el año 2008 estudió a 79 pacientes con hipotiroidismo congénito por disgenesia tiroidea o hipotiroidismo subclínico, encontrando este polimorfismo c.2181G>C en 30 de 79 pacientes (4 en estado homocigoto G/G y 26 en estado heterocigoto C/G), con una frecuencia alélica de G= 0.2151 y C= 0.7848 (Yuan et al; 2008), las cuales son muy parecidas a las de nuestro estudio. No observó alguna asociación entre este polimorfismo y el HC, debido a que al hacer la comparación entre pacientes y 100 controles (4 en estado homocigoto G/G y 29 en estado heterocigoto C/G, con una frecuencia alélica de G=0.185 y C de 0.815) no encontraron una diferencia estadística significativa.

La variante c.2181G>C a pesar de ser un cambio no sinónimo p.Glu727Asp, se considera un polimorfismo dado que el ácido glutámico es poco conservado evolutivamente lo que sugeriría que la proteína puede tolerar su cambio sin verse afectada, el estudio *in silico* en 3 programas (SIFT, Mutation Taster y PolyPhen) lo predicen como no patogénico y porque se ha observado en controles sanos (Yuan et. al.2008).

La tercera variante c.1264T>C, cambia el sentido del codón 422 de triptófano (TGG) por uno de arginina (CGG) p.Trp>Arg; dicha variante se encuentra reportada como un polimorfismo en dbSNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=746029360) así como en ExAC, en esta última con una frecuencia alélica de 0.00001647 (rs746029360), descrita sólo en 2 alelos de 11578 alelos de origen latino, en las dos bases de datos anteriormente mencionadas no se refiere el fenotipo clínico de las personas que lo presentan. Consideramos que en esta variante los datos que no apoyan de que se trata de un polimorfismo son: no se encuentra reportada en individuos homocigotos, el aminoácido triptófano se encuentra muy conservado hasta en 12 especies diferentes lo que sugiere que su cambio sería poco tolerable con posibilidad de afectar la función de la proteína y que en el análisis *in silico* con 3 programas (SIFT, Mutation Taster y PolyPhen) se considera dañino. Esta variante no está reportada como patogénica en las bases de datos: HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>), CLIN VAR ([http://ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=TSHR\[gene\]](http://ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=TSHR[gene])) y TSH Receptor mutation database: (<http://endokrinologie.uniklinikum-leipzig.de/tsh/index.php>).

La variante c.1264T>C la observamos sólo en un alelo de una paciente con agenesia por estudio de imagen y dado que consideramos que no hay suficiente evidencia en la literatura para considerar a este cambio como un polimorfismo sino como una variante de significado clínico incierto, para correlacionar si es responsable del hipotiroidismo en nuestra paciente, realizaremos en un futuro en los padres y en su único hermano mayor pruebas de función tiroidea, aunque se refieren clínicamente sanos y el análisis dirigido de esta variante, así como la búsqueda de esta en 100 controles sanos y de acuerdo a los resultados determinaremos si tenemos mayores fundamentos para definir su patogenicidad.

En el presente trabajo no encontramos variaciones genéticas patológicas al igual que algunos autores como Cortinhas en 2015 quien estudió a 106 pacientes brasileños con HC primario en donde identificó 5 polimorfismos pero no variantes génicas patológicas (Cortinhas et al; 2015); pero a diferencia de otras poblaciones en donde se han descrito mutaciones en el gen *TSHR* como: Lee en 2011, en 79 pacientes coreanos con hipotiroidismo congénito corroborado por gammagrama identificó en 13 de ellos mutaciones en *TSHR*: 3 en estado homocigoto para p.Arg450His, 2 heterocigotos compuestos (p.Arg450His/p.Arg519Cys y p.Arg450His/p.Gly132Arg) y 8 heterocigotos (cinco con la mutación p.Arg450His y uno con las mutaciones p.Gly132Arg, p.Gly245Ser y p.Phe525Ser, respectivamente), todas previamente descritas excepto la mutación p.Phe525Ser; con lo que la frecuencia de mutación en el gen *TSHR* en este grupo fue de 16.5% (Lee et al; 2011). En población japonesa, Narumi de 1979 a 2006 estudió a 103 pacientes con HC, quien encontró 4 mutaciones en 6 pacientes (4.3%), el primero homocigoto p.Arg450His, el segundo, heterocigoto compuesto (p.Gly132Arg/p.Arg450His); el tercero, heterocigoto compuesto (p.Asp403Asn/p.Arg450His); dos casos heterocigotos para p.Arg450His y un caso heterocigoto para p.Ala204Val. Las mutaciones identificadas por Narumi ya habían sido descritas excepto dos de ellas (p.Gly132Arg y p.Ala204Val) (Narumi et al; 2009). Esta diferencia en la detección de mutaciones en el gen *TSHR* apoya el hecho de que la identificación de éstas puede variar de un grupo étnico a otro sin embargo, dado que en este estudio sólo se analizó el exón 10, no se descarta que este gen pueda ser responsable de algunos casos de hipotiroidismo, por lo que está pendiente analizar los otros 9 exones codificantes en los cuales también se han encontrado mutaciones en otras poblaciones (Davies et al; 2015).

Además del gen de *TSHR*, se requiere analizar otros genes candidatos que participan en el desarrollo de la glándula tiroidea para determinar su participación como causales de HC por disgenesia en la población mexicana.

IX. CONCLUSIÓN

- Se observó una proporción del sexo femenino vs masculino (8:2), mayor a lo descrito en literatura, aunque no conocemos la explicación a esto.
- De los 74 pacientes diagnosticados por tamiz, hubo un retraso en el diagnóstico en el 48.6% (n=36) con respecto a la media ideal (30 días), esto es importante modificar ya que la detección oportuna de HC evita el desarrollo de secuelas neurológicas a corto, mediano y largo plazo.
- Se considera una limitante del presente estudio el que no a todos los pacientes se les realizó gammagrama, el cual es considerado el estudio estándar de oro para el diagnóstico por imagen de HC, por lo que no se descarta que algunos pacientes no estén clasificados correctamente, como por ejemplo los 3 casos con probable ectopia tiroidea lo cual está basado sólo por ultrasonido.
- Otra limitante para la clasificación de los pacientes es que no todos contaron con la medición de tiroglobulina, como se recomienda en literatura, por lo que algunos se clasificaron como agenesia/atirosis o hipoplasia tiroidea con base sólo al estudio de imagen.
- No se descarta la participación de mutaciones en el gen *TSHR* como causales de hipotiroidismo en nuestra población ya que está pendiente analizar los otros 9 exones codificantes, en los que se localizan el 50% de variantes génicas patogénicas descritas.
- Se identificaron 3 variantes previamente descritas en la literatura: una sinónima y dos no sinónimas.
- La variante c.1377G>A, p.Ala459Ala mostró frecuencias alélicas muy similares a las reportadas en otras poblaciones.
- El polimorfismo, c.2181G>C, p.Glu727Asp fue el que se observó con mayor frecuencia en nuestra población, con frecuencias alélicas similares a lo reportado en otras poblaciones.
- La tercera variante c.1264T>C, p.Trp422Arg, esta reportada en las bases de datos dbSNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=746029360) y en ExAC, como polimorfismo; sin embargo; consideramos que no hay suficiente evidencia en la literatura que apoye lo anterior, por lo que debe ser clasificada como una variante de significado clínico incierto.
- Para definir la patogenicidad de la variante c.1264T>C, p.Trp422Arg se requiere realizar pruebas de función tiroidea y análisis molecular en los padres y en el único hermano de nuestra paciente así como buscarla en 100 controles sanos.
- Además del gen de *TSHR*, se requiere analizar otros *genes candidatos* que participan en el desarrollo de la glándula tiroidea para determinar su participación como causales de HC por disgenesia en la población mexicana.

X. ANEXOS

ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO (PARA EL CASO ÍNDICE)

ANÁLISIS CLÍNICO Y MOLECULAR DEL GEN DEL *TSHR* PACIENTES CON HIPERTIROTROPINEMIA

¿Para qué se efectúa este estudio?

Para conocer mejor la causa genética que contribuye a presentar hipertirotropinemia 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 (DNA) de su hijo (a), el cual determina sus características físicas y de éste se analizarán regiones que pueden estar implicadas en el padecimiento de hipertirotropinemia. 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 hipertirotropinemia no secundaria a causas externas.

¿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 presentar hipertirotrópinemia 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 se volverían a poner en contacto con usted, y preservando siempre la confidencialidad de la información derivada.

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 2

ASENTIMIENTO INFORMADO (CASO ÍNDICE)

ANÁLISIS CLÍNICO Y MOLECULAR DEL GEN DEL *TSHR* PACIENTES CON HIPERTIROTROPINEMIA

¿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 pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría que tengan hipertirotropinemia no secundaria a causas externas.

¿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 DEL GEN DEL *TSHR* PACIENTES CON HIPERTIROTROPINEMIA

¿Para qué se efectúa este estudio?

Para conocer mejor la causa genética que contribuye a presentar hipertirotropinemia 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 (DNA) de usted, el cual determina sus características físicas y de éste se analizarán regiones que pueden estar implicadas en el padecimiento de hipertirotropinemia

¿Quiénes pueden participar en el estudio?

Todos los familiares de primer grado de los pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría que tengan hipertirotropinemia 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 DEL GEN DEL TSHR PACIENTES CON
HIPERTIROTROPINEMIA**

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

LENTITUD en INGESTA de ALIMENTOS _____

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**		0.5-55.0 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>TSHR</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

A.

1. Abramowicz MJ, Duprez L, Parma J, et al. Familial congenital hypothyroidism due to inactivating mutation of the thyrotropin receptor causing profound hypoplasia of the thyroid gland. *J. Clin. Invest.* 1997; 99, 3018–3024.
2. Abramowicz MJ, Targovnik HM, Varela V, et al. Identification of a mutation in the coding sequence of the human thyroid peroxidase gene causing congenital goiter. *J. Clin. Invest.* 1992a; 90, 1200–1204.
3. Abramowicz MJ, Vassart G, Christophe D, et al. Functional study of the human thyroid peroxidase gene promoter. *Eur. J. Biochem.* 1992b; 203, 467–473.
4. Akamizu T, Ikuyama S, Saji M, et al. Cloning, chromosomal assignment, and regulation of the rat thyrotropin receptor: expression of the gene is regulated by thyrotropin, agents that increase cAMP levels, and thyroid autoantibodies. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1990; 87: 5677-5681.
5. Cassio A, Nicoletti A, Rizzello A, et al. Current loss-of-function mutations in the thyrotropin receptor gene: when to investigate, clinical effects, and treatment. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2013; 5 Suppl 1:29-39.
6. Everett LA, Glaser B, Beck JC, et al. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat. Genet.* 1997; 17, 411–422.
7. Feliciello A, Porcellini A, Ciullo I, et al. Expression of thyrotropin-receptor mRNA in healthy and Graves' disease retro-orbital tissue. *Lancet.* 1993; 342: 337-338.
8. Kakinuma A, Nagayama Y. Multiple messenger ribonucleic acid transcripts and revised gene organization of the human TSH receptor. *Endocr. J.* 2002; 49: 175-180.
9. Libert F, Lefort A, Gerard C, et al. Cloning, sequencing and expression of the human thyrotropin (TSH) receptor: evidence for binding of autoantibodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 165: 1250-1255.
10. Libert, F, Passage E, Lefort A. Localization of human thyrotropin receptor gene to chromosome region 14q31 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 1990; 54: 82-83.
11. Loosfelt H, Pichon C, Jolivet A, et al. Two-subunit structure of the human thyrotropin receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1992; 89: 3765-3769.
12. Medeiros-Neto G, Targovnik HM, Vassart G, et al. Defective thyroglobulin synthesis and secretion causing goiter and hypothyroidism. *Endocr. Rev.* 1993; 14,165–183.
13. Misrahi M, Loosfelt H, Atger M, et al. Cloning, sequencing and expression of human TSH receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990; 166: 394-403.
14. Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, et al. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347, 95– 102.

15. Moreno JC, Klootwijk W, van Toor H, et al. Mutations in the iodotyrosine deiodinase gene and hypothyroidism. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358, 1811–1818.
16. Nagayama Y, Rapoport B. The thyrotropin receptor 25 years after its discovery: new insight after its molecular cloning. *Mol Endocrinol.* 1992; Feb;6(2):145-56.
17. Nagayama Y, Kaufman KD, Seto P, et al. Molecular cloning, sequence and functional expression of the cDNA for the human thyrotropin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 165: 1184-1190.
18. Nakabayashi K, Matsumi H, Bhalla A, et al. Thyrostimulin, a heterodimer of two new human glycoprotein hormone subunits, activates the thyroid-stimulating hormone receptor. *J Clin Invest.* 2002; Jun;109 (11):1445-52.
19. Persani L, Calebiro D, Cordella D, et al. Genetics and Phenomics of hypothyroidism due to TSH resistance. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 322:72-82.
20. Pohlenz J, Medeiros-Neto G, Gross JL, et al. Hypothyroidism in a Brazilian kindred due to iodide trapping defect caused by a homozygous mutation in the sodium/iodide symporter gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 240, 488–491.
21. Rapoport B, Chazenbalk GD, Jaume JC, et al. The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies. *Endocr. Rev.* 1998; 19, 673–716.
22. Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Loosfelt H, et al. Assignment of the human thyroid stimulating hormone receptor (*TSHR*) gene to chromosome 14q31. *Genomics.* 1990; 8: 233-236.
23. Szkudlinski MW, Fremont V, Ronin C, et al. Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol. Rev.* 2002; 82, 473–502.
24. Tenenbaum-Rakover Y, Grasberger H, Mamanasiri S, et al. Loss-of-function mutations in the thyrotropin receptor gene as a major determinant of hyperthyrotropinemia in a consanguineous community. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009; 94,1706–1712.
25. Tonacchera M, Di Cosmo C, De Marco G, et al. Identification of TSH receptor mutations in three families with resistance to TSH. *Clin. Endocrinol. (Oxf.).* 2007; 67, 712–718.
26. Trulzsch B, Nebel T, Paschke R. The thyrotropin receptor mutation database. *Thyroid.* 1999; 9: 521-522.
27. Vassart G, Pardo L, Costagliola S, et al. A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors. *Trends Biochem. Sci.* 2004; 29, 119–126.
28. Vassart G, Parmentier M, Libert F, et al. Molecular genetics of the thyrotropin receptor. *Trends Endocr. Metab.* 1991; 2: 151-156.
29. Montanelli L, Tonacchera M. Genetics and phenomics of hypothyroidism and thyroid dys- and agenesis due to PAX8 and TTF1 mutations. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 30;322 (1-2):64-71.

30. Nicoletti A, Bal M, De Marco G, et al. Thyrotropin stimulating hormone receptor gene analysis in pediatric patients with non-autoimmune subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94:4187-4194.
31. Park SM, Clifton-Bligh RJ, Betts P, et al. Congenital hypothyroidism and apparent athyreosis with compound heterozygosity or compensated hypothyroidism with probable hemizyosity for inactivating mutations of the TSH receptor. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004; 60:220-227.
32. Cangul H, Morgan NV, Forman JR, et al. Novel *TSHR* mutations in consanguineous families with congenital nongoitrous hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010; 73:671-677.
33. Narumi S, Muroya K, Abe Y, et al. *TSHR* mutations as a cause of congenital hypothyroidism in Japan: a population-based genetic epidemiology study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94:1317-1323.
34. Sura-Trueba S, Aumas C, Carre A, et al. An inactivating mutation within the first extracellular loop of the thyrotropin receptor impedes normal posttranslational maturation of the extracellular domain. *Endocrinology.* 2009; 150:1043-1050.
35. Tamiz Neonatal Detección y Tratamiento Oportuno e Integral del Hipotiroidismo Congénito, Lineamiento Técnico. Secretaría de Salud, Ciudad de México 2007.
36. Dos Santos S, Bardet C, Bertrand S, et al. Distinct expression patterns of glycoprotein hormone- α 2 and - β 5 in a basal chordate suggest independent developmental functions. *Endocrinology.* 2009; 150(8):3815-22.
37. Grob LF, Martínez-Aguayo A. Hipotiroidismo congénito: un diagnóstico que no debemos olvidar. *Rev Chil Pediatr.* 2012; 83 (5): 482-491.
38. Nettore IC, Cacace V, De Fusco C, et al. The molecular causes of thyroid dysgenesis: a systematic review. *J Endocrinol Invest.* 2013; 36(8):654-64.
39. Davies TF, Latif R. Targeting the thyroid stimulating hormone receptor with small molecule ligands and antibodies. *Expert Opin Ther Targets.* 2015; 19(6):835.
40. Davies TF, Ando T, Lin RY, et al; Thyrotropin receptor-associated diseases: from adenomata to Graves disease. *J Clin Invest.* 2005; 115(8):1972-83.
41. Núñez MR, Sanders J, Jeffreys J, et al; Analysis of the thyrotropin receptor-thyrotropin interaction by comparative modeling. *Thyroid.* 2004; 14(12):991-1011.
42. Perry RJ, Maroo S, Maclennan AC, et al; Combined ultrasound and isotope scanning is more informative in the diagnosis of congenital hypothyroidism than single scanning. *Arch Dis Child.* 2006; 91(12):972-6.
43. Schoen EJ, Clapp W, To TT, et al. The key role of newborn thyroid scintigraphy with isotopic iodide (^{123}I) in defining and managing congenital hypothyroidism. *Pediatrics.* 2004; 114(6):e683-8.

44. Léger J, Olivieri A, Donaldson M, et al. European Society for Paediatric Endocrinology consensus guidelines on screening, diagnosis, and management of congenital hypothyroidism. *Horm Res Paediatr.* 2014; 81(2):80-103.
45. Grasberger H, Refetoff S. Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dysmorphogenesis. *Curr Opin Pediatr.* 2011; 23(4):421-8.
46. Rapoport B, McLachlan SM. The thyrotropin receptor in Graves' disease. *Thyroid.* 2007; 17(10):911-22.
47. Werner, Ingbar's, Braverman LE, et al. *The Thyroid A Fundamental and Clinical Text.* Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p.48.
48. Rose SR, Brown RS, Foley T, et al. Update of newborn screening and therapy for congenital hypothyroidism. *Pediatrics.* 2006; 117(6):2290-303.
49. Uyttendaele M, Lambert S, Tenoutasse S, et al. Congenital Hypothyroidism: Long-Term Experience with Early and High Levothyroxine Dosage. *Horm Res Paediatr.* 2016; 85(3):188-97.
50. Yuan ZF, Mao HQ, Luo YF, et al. Thyrotropin receptor and thyroid transcription factor-1 genes variant in Chinese children with congenital hypothyroidism. *Endocr J.* 2008; 55(2):415-23.
51. 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.
52. Klett M. Epidemiology of congenital hypothyroidism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 1997; 105 Suppl 4:19-23.
53. Brown AL, Fernhoff PM, Milner J, et al. Racial differences in the incidence of congenital hypothyroidism. *J Pediatr.* 1981; 99(6):934-6.
54. Frasier SD, Penny R, Snyder R, et al. Primary congenital hypothyroidism in Spanish-surnamed infants in Southern California. *J Pediatr.* 1982; 101(2):315.
55. Lorey F, Cunningham GC. Birth prevalence of primary congenital hypothyroidism by sex and ethnicity. *Hum Biol.* 1992; 64(4):531-8.
56. 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.
57. Poder Ejecutivo Federal. Norma Técnica No. 321 para la prevención del retraso mental producido por hipotiroidismo congénito. *Diario Oficial de la Federación.* 22 de septiembre de 1988:88-90.
58. NOM-007-SSA2-1993 Atención de la mujer durante el embarazo, parto y puerperio y del recién nacido. Criterios y procedimientos para la prestación del servicio.
59. 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; 83(6):868-71.

60. Vela AM, Gamboa CS, Pérez AM, et al. Epidemiología del Hipotiroidismo Congénito. Salud Pública de México. 2004; 46(2):141-147.
61. Beltrao CB, Juliano AG, Chammas MC, et al. Etiology of Congenital Hypothyroidism using thyroglobulin and ultrasound combination. Endocrine Journal. 2010; 57(7), 587-593.
62. Rastogi MV, LaFranchi SH. Congenital hypothyroidism. Orphanet J Rare Dis. 2010; 10;5:17.
63. Mayayo E, Labarta JI, Mar GM. Enfermedad Tiroidea. An Pediatr Contin. 2006; 4(6):361-74.
64. Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiología Médica. 10 Ed. México. Mc Graw Hill.2000.pp.1031-1043
65. Lee ST, Lee DH, Kim JY, et al. Molecular screening of the TSH receptor (*TSHR*) and thyroid peroxidase (TPO) genes in Korean patients with nonsyndromic congenital hypothyroidism. Clin Endocrinol (Oxf). 2011; 75(5):715-21.
66. Cortinhas AEA, Andrade RC, de Melo ACE, et al. Evaluation of the *TSHR* gene reveals polymorphisms associated with typical symptoms in primary congenital hypothyroidism. J Pediatr Endocrinol Metab. 2016; 29(1):71-6.

B.

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS:

1. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TSHR#expression>
2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcdsBrowse.cgi?REQUEST=GV&DATA=440506&BUILD=CURRENTBUILDS>
3. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TSHR>
4. Human Genome Data Base (HGDB): <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>
5. www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
6. PolyPhen: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
7. SIFT: http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html
8. Mutation Taster: <http://www.mutationtaster.org/>
9. Base de dbSNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>
10. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=7253
11. Base dbSNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs746029360>
12. ExAC: <http://exac.broadinstitute.org/>
13. CLIN VAR: [http://ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=TSHR\[gene\]](http://ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=TSHR[gene])
14. TSH Receptor mutation database: <http://endokrinologie.uniklinikum-leipzig.de/tsh/index.php>
15. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=113951800
16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>
17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs1991517>
18. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=746029360