



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**ANENDOCRINOSIS INTESTINAL POR MUTACIÓN HOMOCIGOTA EN *NEUROG3*.
CASO FAMILIAR**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN PEDIATRÍA

PRESENTA:
DR. RODRIGO MORENO SALGADO

TUTOR: DR. SALVADOR VILLALPANDO CARRIÓN

ASESORES DE TESIS:

DRA. ALEJANDRA DEL PILAR REYES DE LA ROSA
DR. JESUS AGUIRRE HERNÁNDEZ



CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



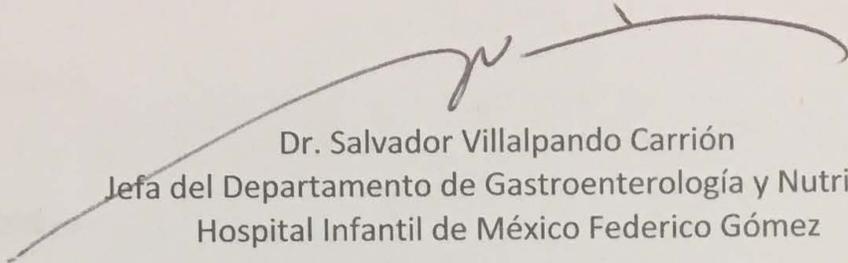
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

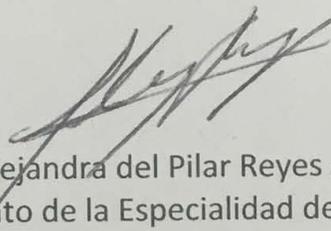
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Director de tesis:

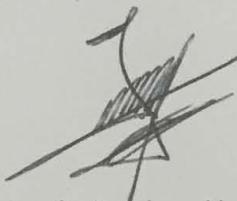


Dr. Salvador Villalpando Carrión
Jefa del Departamento de Gastroenterología y Nutrición
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Asesores de tesis:



Dra. Alejandra del Pilar Reyes de la Rosa
Profesor adjunto de la Especialidad de Genética Médica
Hospital Infantil de México Federico Gómez



Dr. Jesús Aguirre Hernández
Jefe del Laboratorio de Genómica
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dra. Rebeca Gómez Chico Velasco
Directora de Enseñanza
Hospital Infantil de México Federico Gómez

ÍNDICE

Resumen	4
Marco Teórico	5
Antecedentes	5
Descripción del problema	6
Justificación	6
Objetivo Primario	7
Presentación de caso	7
Material y Métodos	8
Resultados	9
Discusión	9
Conclusiones	10
Bibliografía	11
Anexos	12

Resumen

El estudio de las enfermedades diarreicas en pediatría es muy amplio, sin embargo, las diarreas congénitas a pesar de ser conocidas como grupo desde hace mucho tiempo, siguen siendo un tema poco estudiado. Se han descrito recientemente nuevas etiologías de este tipo de enfermedades, tal es el caso de la anendocrinosis intestinal, abriendo nuevas posibilidades en el entendimiento de la fisiología normal del intestino y la fisiopatología de la diarrea.

La anendocrinosis intestinal,¹(Wang et al., 2006) es una entidad caracterizada por diarrea severa de inicio en etapa neonatal que en ocasiones está acompañada de alteraciones de la función pancreática endócrina², principalmente diabetes mellitus tipo 1 y es provocada por una disminución en el número de células endócrinas en intestino y páncreas.

Se ha descrito en esta entidad una actividad disminuida del factor de transcripción Neurogenina 3 por mutaciones recesivas en el gen *NEUROG3* que confieren una disminución o pérdida de función de dicha proteína³. Dicho factor de transcripción es esencial para la diferenciación de las células enteroendócrinas a partir de sus progenitoras pluripotenciales

Se presenta el caso de 2 hermanos con diarrea severa desde el nacimiento. Durante la investigación inicial se descartaron causas infecciosas, enfermedad inflamatoria intestinal y fibrosis quística. En la biopsia intestinal no se encontraron alteraciones estructurales de las microvellosidades ni alteraciones mitocondriales en la microscopía electrónica. Se realizó búsqueda de mutaciones en los genes candidatos asociados a casos de diarrea congénita por medio de secuenciación masiva en paralelo encontrándose una mutación homocigota en *NEUROG3* c.319C>A (p.R107S) siendo ambos padres heterocigotos para esta mutación y un alelo silvestre.

Hasta donde tenemos conocimiento, no existe ningún caso reportado de este padecimiento en 2 hermanos vivos y es el primer caso reportado en México. La mutación encontrada en esta familia ha sido reportada previamente por lo que existe la posibilidad de un punto caliente mutacional en el gen *NEUROG3*.

Marco teórico

Antecedentes

La diarrea es una causa frecuente de consulta en pediatría y una causa importante de morbilidad y mortalidad en el mundo. La Organización Mundial de la Salud define diarrea como más de tres evacuaciones al día, sin embargo, cualquier incremento en el número de evacuaciones con respecto al patrón habitual del paciente puede entrar en esta categoría, principalmente si se acompaña de disminución en la consistencia de las mismas o de características inflamatorias como presencia de sangre o moco.

Las diarreas crónicas, definidas arbitrariamente como aquellas que duran más de dos semanas, pueden tener varias etiologías¹⁰ y se definen como congénitas cuando se presentan desde los primeros días o semanas de vida.

Etiología de las diarreas congénitas

Podemos dividir la diarrea congénita según su etiología en aquellas provocadas por defectos en la absorción de nutrientes o electrolitos, por defectos en la estructura de los enterocitos, defectos en la regulación inmune intestinal y por último por defectos en la diferenciación de células enteroendócrinas⁴.

- Defectos en la absorción de nutrientes o electrolitos.
 1. Disminución o ausencia disacaridasas
 2. Transporte anormal de iones o nutrientes
 3. Insuficiencia pancreática
 4. Trafico de lípidos

- Defectos en la estructura de los enterocitos
 1. Enteropatía por penachos
 2. Enfermedad con inclusión de microvellosidades

- Defectos en la regulación inmune intestinal
 1. IPEX (Inmunodesregulación, Poliendocrinopatía y Enteropatía ligada al X)
 2. Síndrome poliglandular autoinmune tipo 1

- Defectos en la diferenciación de células enteroendócrinas.
 1. Anendocrinosis intestinal
 2. Deficiencia de proproteína convertasa 1

De estas causas de diarrea congénita las más comunes son las alteraciones en la regulación

inmune intestinal y los defectos estructurales de las microvellosidades⁵.

Anendocrinosis intestinal

La anendocrinosis intestinal, ¹(Wang et al., 2006) es una entidad caracterizada por diarrea malabsortiva severa de inicio en etapa neonatal que en ocasiones está acompañada de alteraciones de la función pancreática endócrina², principalmente diabetes mellitus tipo 1 y es provocada por una disminución en el número de células endócrinas en intestino y páncreas. Esto se demuestra histopatológicamente por ausencia de células enteroendócrinas con la tinción de Cromogranina A⁸ que en individuos normales se presentan alrededor de 5 células por cripta

Se ha descrito en esta entidad una actividad disminuida del factor de transcripción Neurogenina 3 por mutaciones recesivas en el gen *NEUROG3* que confieren una disminución o pérdida de función de dicha proteína³. Dicho factor de transcripción es esencial para la diferenciación de las células enteroendócrinas a partir de sus progenitoras pluripotenciales.

La neurogenina 3 es factor basal de transcripción altamente conservado evolutivamente con una estructura hélice-vuelta-hélice que interactúa con regiones promotoras de múltiples genes siendo *NEUROD* el más implicado en la diferenciación de células pluripotenciales hacia alguna de las diferentes células enteroendócrinas. En modelos murinos se ha observado también interacción con Rfx6, Pax4, Nkx6.1 y Arx entre otros⁶, asociados principalmente a la diferenciación de células endócrinas de islotes pancreáticos incluyendo las células β .

A pesar de esto se ha observado en los pacientes con anedocrinosis un comportamiento diferente a los modelos murinos ya que no todos los afectados presentan diabetes mellitus tipo 1 observándose niveles positivos de péptido C lo que indica la existencia de otras vías para la diferenciación de estas líneas celulares que aún no han sido descritas.

El mecanismo por el cual la disminución de las células enteroendócrinas produce diarrea malabsortiva es poco claro, al parecer produce una alteración en el transporte iónico por una ausencia de estimulación parácrina⁷ directa a las células epiteliales intestinales encargadas de la función de absorción y de secreción; y de forma indirecta a través del cambio en la producción de neurotransmisores y péptidos utilizados por el sistema nervioso intestinal.

Descripción del problema

La diarrea continúa siendo un problema importante de salud pública a nivel mundial, principalmente en países en vías de desarrollo, lo cual incluye a una gran parte de los países de Latinoamérica incluyendo a México. Los casos de diarrea congénita son poco comunes y su estudio ha proporcionado un mayor entendimiento de la función normal del intestino. En nuestro medio se desconoce la prevalencia de este tipo de enfermedades por lo que el reporte de cada uno de los casos es de gran importancia especialmente si se cuenta con el estudio molecular confirmatorio que nos permita agregar una descripción de los genes y las mutaciones más frecuentemente afectadas en nuestra población.

Justificación

Debido a la alta prevalencia de enfermedades diarreicas en pediatría, el estudio de casos raros es importante con la finalidad de entender mejor los mecanismos fisiopatológicos de este tipo de enfermedades además de proporcionar más herramientas para el diagnóstico oportuno y probablemente menos invasivo de los casos de diarrea crónica y congénita.

Objetivo primario

Describir el tipo de mutaciones y los genes afectados en pacientes con diarrea congénita a partir de un caso familiar de anendocrinosis intestinal

Presentación del caso

Como antecedentes de importancia los padres de los pacientes son originarios del estado de Hidalgo, no son consanguíneos y aparentemente no existe endogamia ya que la comunidad de la que son originarios tiene una población mayor a 2,000 habitantes

Paciente 1 inicia con evacuaciones líquidas en los primeros días de vida con alimentación exclusiva con seno materno, requiriendo hospitalización a los 2 meses de vida en Hospital General de Pachuca por ictericia, diarrea con volumen de 100 ml/kg/día y choque metabólico con acidosis metabólica requiriendo ventilación mecánica invasiva e infusión continua de fármacos vasoactivos. Se descarta infección por virus de Hepatitis A, B, C, VEB y CMV. Se realiza biopsia hepática con diagnóstico de hepatitis en reparación, en microscopía electrónica sin datos de mitocondriopatía.

Es referido a nuestra institución para abordaje de diarrea crónica al persistir con gasto fecal elevado durante toda la hospitalización previa. Se encuentra en estudios microbiológicos infección por Giardia Lamblia la cual es tratada farmacológicamente, posteriormente con infección por Clostridium Difficile la que remite posterior a terapia antimicrobiana sin

embargo persiste con evacuaciones disminuidas en consistencia, integrándose malabsorción por tinción de Sudan III positiva.

Se realiza primera endoscopia con biopsia intestinal que revela eosinofilia en duodeno con 18 células por campo y vellosidades ligeramente atróficas pero con arquitectura conservada, en microscopía electrónica no se observan alteraciones en microvellosidades. Se inicia alimentación con fórmula aminoacídica con ligera mejoría en el gasto fecal sin remitir la diarrea requiriendo periodos de ayuno y administración de nutrición parenteral total.

En una segunda endoscopia al año de vida se observa presencia de vacuolas lipídicas en vellosidades, concordantes con abetalipoproteinemia sin embargo el cuadro clínico no se considera compatible además de presentar perfil de lípidos normal en muestra de sangre periférica. Por persistir con eosinofilia en esófago, duodeno y mucosa intestinal se sospecha enteritis eosinofílica. Por hipocalcemia e hipofosfatemia con niveles bajos de vitamina D se integra raquitismo. Durante las diversas hospitalizaciones presenta desequilibrios hidroelectrolíticos además de presentar una desnutrición crónica.

Actualmente se encuentra con alimentación enteral con dieta de 1600 kcal incluyendo todos los grupos de alimentos además de dieta licuada con leche entera de 750 kcal en 500 ml dividida en 2 tomas a la que se agrega atole de harina de arroz. Además con micronutrientes, vitaminas A, C y D, zinc, sulfato ferroso, ácido fólico y aporte suplementario de calcio, fósforo y bicarbonato de sodio.

Paciente 2 conocido a los 3 días de vida por evacuaciones abundantes y líquidas, se cuantifica en 112 ml/kg/día, posterior a reanimación hídrica se inicia manejo vía enteral con fórmula aminoacídica en infusión continua y con nutrición parenteral para mejorar aporte calórico e hidroelectrolítico. Posteriormente se realiza reto ciego con fórmula sin lactosa la cual no es tolerada aumentando significativamente el gasto fecal reiniciándose fórmula aminoacídica.

Se inicia abordaje etiológico de diarrea congénita, se descartan causas infecciosas de la misma. Se confirma malabsorción por medio de tinción de Sudan III en heces siendo positiva en varias ocasiones. Por niveles dudosos de cloruro en sudor se solicita estudio molecular del gen *CFTR* para fibrosis quística, descartándose las mutaciones más frecuentemente reportadas en población mexicana que son $\Delta F508$, G542X, N1303K, $\Delta I507$ y S549N.

Por antecedente de hermano con diarrea congénita se realiza endoscopia con toma de biopsias a diferentes niveles de tracto gastrointestinal. Se reporta microscopía electrónica sin alteraciones ultraestructurales de las mitocondrias ni de las microvellosidades. En microscopía de luz no se observan cambios compatibles con enteropatía por penachos, no se realizó tinción con cromogranina A en búsqueda de células enteroendócrinas.

Se solicita estudio molecular para búsqueda de mutaciones en genes candidatos asociados

con diarrea congénita en ambos pacientes.

Material y Métodos

Se extrajo DNA a partir de una muestra de sangre periférica almacenada en un tubo con EDTA de los dos pacientes y de ambos progenitores sanos para análisis molecular de genes candidatos asociados con diarrea congénita incluyendo *CFTR*, *DGAT1*, *EPCAM*, *GUCY2C*, *MYO5B*, *NEUROG3*, *SLC26A3*, *SLC9A3B1* y *SPINT2* utilizando secuenciación masiva en paralelo con el equipo NextGen Seq 500 de Illumina.

Resultados

Se obtuvo una variante patogénica reportada previamente identificada en la base de datos de ENSEMBL con el código ENST00000242462.4 en el transcrito c.319C>A y en la proteína p.Arg107.Ser. Ambos pacientes son homocigotos para esta mutación encontrándose el estado de portador heterocigoto en ambos padres.

Discusión

Se trata de un caso muy relevante por ser el primer caso reportado en México y el primer caso familiar reportado internacionalmente. Si bien se desconoce la prevalencia de la anendocrinosis intestinal, la cantidad de pacientes que presentan esta patología puede estar subvalorada ya que las enfermedades diarreicas son altamente prevalentes a nivel mundial y continúan siendo una causa importante de mortalidad en los primeros dos años de vida por lo que una gran cantidad de pacientes que fallecen que nunca fueron estudiados pudieron haber cursado con alguno de estos cuadros.

Este punto es apoyado por la mutación c.319C>A (p.R107S) en *NEUROG3* encontrada en nuestros pacientes ya que esta ha sido previamente reportada en una población distinta, incluyendo el caso índice reportado por Wang y colaboradores en 2006 por lo que el estado de portador heterocigoto sano puede estar distribuido en una población heterogénea.

El residuo de arginina en la posición 107 está conservado en el homólogo de Neurogenina 3 en más de 20 especies estudiadas incluyendo *Caenorhabditis elegans* y no se encontró afectado en más de 100 controles sanos. Este residuo se encuentra en la primera hélice del dominio bHLH y es vital para la interacción con las regiones promotoras de los blancos de este factor de transcripción.

Clínicamente se presenta también una gran diferencia en nuestros pacientes con respecto a lo reportado con anterioridad. En los primeros tres pacientes reportados se inició nutrición parenteral total por la imposibilidad de iniciar alimentación enteral adecuada presentando complicaciones esperadas como sepsis relacionada a catéter y hepatopatía crónica secundaria. Un paciente requirió trasplante en bloque de hígado e intestino con lo

que pudo iniciarse la alimentación enteral manteniéndose de esa forma por un año hasta su fallecimiento por causas no especificadas. En cambio, ambos pacientes reportados en este trabajo, a pesar de continuar con gastos fecales elevados, se mantienen con una dieta que incluye todos los grupos alimentarios y que cumple sus requerimientos calóricos.

La edad reportada de inicio de Diabetes Mellitus tipo 1 en pacientes con mutaciones en *NEUROG3* es variable, en el caso reportado por Rubio-Cabezas² y colaboradores se presentó como diabetes neonatal. Dicho paciente presentó un estado de heterocigoto compuesto con las mutaciones c.82G>T (p.E28X) y c.404T>C (p.L135P). En cambio, de los 3 pacientes reportados por Wang se observó el inicio de Diabetes Mellitus tipo 1 a los 8 años en los 2 pacientes homocigotos para la mutación p.R93L.

El paciente reportado con la misma mutación que en nuestro caso no presentó Diabetes Mellitus sin embargo falleció a los 35 meses de vida por lo que se desconoce si esta mutación predispone a la aparición de este problema endocrinológico.

Conclusiones

Se describe el primer caso de anendocrinosis intestinal reportado en México. Se encontró por medio de secuenciación masiva una mutación homocigota c.319C>A en el gen *NEUROG3*. Esto abre la posibilidad de utilizar estudios moleculares en el diagnóstico de diarrea congénita previo al uso de técnicas invasivas como la endoscopia con toma de biopsias. En caso de utilizar estudios histopatológicos en el abordaje de diarrea congénita, es importante incluir la tinción de Cromogranina A para la búsqueda intencionada de células enteroendócrinas y así diagnosticar esta entidad.

Esta patología es de reciente descripción y ha contribuido a mejorar el entendimiento de la fisiología normal del intestino y la fisiopatología de la diarrea con áreas aún por clarificar como el papel que juegan las hormonas intestinales en la absorción y secreción de nutrientes y iones en la luz intestinal.

Bibliografía

1. Wang, J., Cortina, G., Wu, S. V., Tran, R., Cho, J.-H., Tsai, M.-J., ... Martín, M. G. (2006). Mutant neurogenin-3 in congenital malabsorptive diarrhea. *The New England Journal of Medicine*, 355(3), 270–280.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa054288>
2. Rubio-Cabezas, O., Jensen, J. N., Hodgson, M. I., Codner, E., Ellard, S., Serup, P., & Hattersley, A. T. (2011). Permanent neonatal diabetes and enteric anendocrinosis associated with biallelic mutations in NEUROG3. *Diabetes*, 60(4), 1349–1353.
<https://doi.org/10.2337/db10-1008>
3. McGrath, P. S., Watson, C. L., Ingram, C., Helmrath, M. A., & Wells, J. M. (2015). The basic helix-loop-helix transcription factor neurog3 is required for development of the human endocrine pancreas. *Diabetes*, 64(7), 2497–2505.
<https://doi.org/10.2337/db14-1412>
4. Berni Canani, R., Terrin, G., Cardillo, G., Tomaiuolo, R., & Castaldo, G. (2010). Congenital Diarrheal Disorders: Improved Understanding of Gene Defects Is Leading to Advances in Intestinal Physiology and Clinical Management. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 50(4), 1.
<https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181d135ef>
5. Catassi C, Fabiani E, Spagnuolo MI, et al. Severe and protracted diarrhea: results of the 3-years SIGEP multicenter survey. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;29:63 – 8.
6. McGrath, P. S., Watson, C. L., Ingram, C., Helmrath, M. A., & Wells, J. M. (2015). The basic helix-loop-helix transcription factor neurog3 is required for development of the human endocrine pancreas. *Diabetes*, 64(7), 2497–2505.
<https://doi.org/10.2337/db14-1412>
7. Henry J. Binder, M. D. (2006). Causes of chronic diarrhea. *The New England Journal of Medicine*, 355(3), 236–239. <https://doi.org/10.1056/NEJMp068124>
8. Sayar, E., Yilmaz, A., Islek, A., Elpek, G. O., Flanagan, S. E., & Artan, R. (2013). Chromogranin-A Staining Reveals Enteric Anendocrinosis in Unexplained Congenital Diarrhea. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 57(4), e21. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3182560f26>
9. Canani, R. B., Castaldo, G., Bacchetta, R., Martín, M. G., & Goulet, O. (2015). Congenital diarrhoeal disorders: advances in this evolving web of inherited enteropathies. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12(5), 293–302.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.44>

Anexos

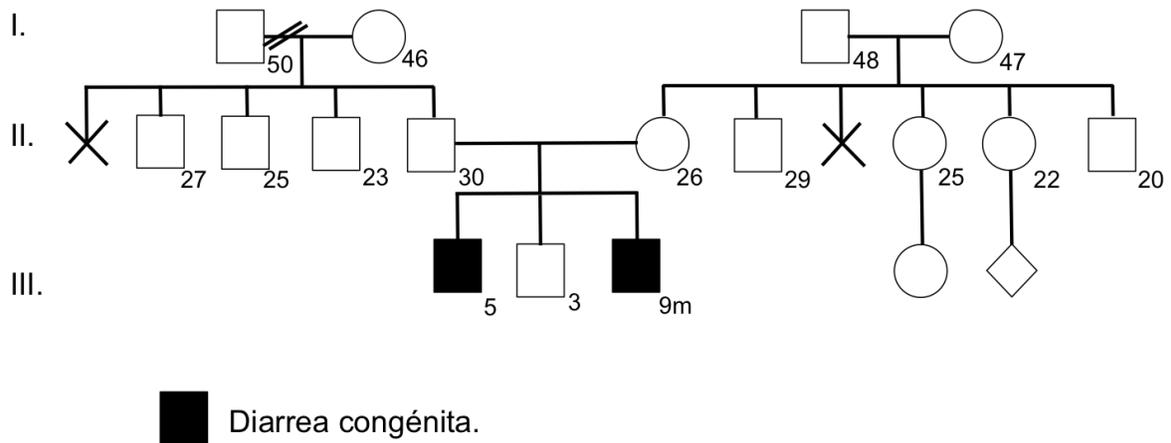


Figura 1 Árbol Genealógico

Enfermedad	MIM	Gen	Herencia
Fibrosis quística	219700	<i>CFTR</i>	Autosómica recesiva
Enteropatía congénita por penachos	613217	<i>EPCAM</i>	Autosómica recesiva
Diarrea congénita <u>clorídrica</u>	214700	<i>SLC26A3</i>	Autosómica recesiva
Inclusión de microvellosidades	251850	<i>MYO5B</i>	Autosómica recesiva
Diarrea secretora de sodio	270420	<i>SPINT2</i>	Autosómica recesiva
<u>Anendocrinosis</u> intestinal	610370	<i>NEUROG3</i>	Autosómica recesiva
Diarrea Congénita tipo 6	614616	<i>GUCY2C</i>	Autosómica dominante
Diarrea Congénita tipo 7	615863	<i>DGAT1</i>	Autosómica recesiva
Diarrea secretora de sodio	616868	<i>SLC9A3R1</i>	Autosómica recesiva

Tabla 1 Genes candidatos de diarrea congénita estudiados con NextGen Seq500