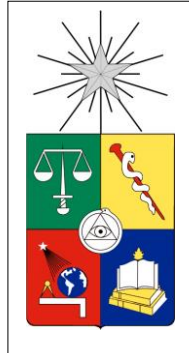


**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



***MUTACIONES DEL GEN DE LA TIROPEROXIDASA (TPO)  
EN PACIENTES CON HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO  
POR DISHORMONOGENÉISIS EN CHILE.***

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN GENÉTICA

MARÍA CLARA ARTEAGA JACOBO

PROFESOR DIRECTOR DE TESIS: PATRICIO GONZÁLEZ HORMAZÁBAL

Mayo 2016

*Agradezco por haber tenido la oportunidad de estudiar aquello que me gusta y que me hace feliz, por el simple hecho de aprender.*

*Por poder contribuir con mi trabajo y mi vocación al desarrollo de la ciencia y aportar en el conocimiento de una enfermedad que afecta la vida de tantas personas.*

*Por haber conocido a personas que creyeron en mí y en mi proyecto, que fueron generosas conmigo, me aceptaron, me acogieron como parte del equipo, me guiaron con mucha paciencia y me dejaron “emprender”. A ellos les agradezco infinitamente por haberme ayudado a crecer del punto de vista profesional y personal.*

*Gracias porque durante este camino, también pude encontrar personas que se convirtieron en mis amigos y me ayudaron a lograr mi meta, compartiendo su alegría y ganas de salir adelante.*

*Este trabajado está dedicado a todos los niños con hipotiroidismo congénito y su familias, a mi tutor y a todos los profesores de mi comisión, a mis amigos David Carrero, Natalia Landeros, Gonzalo Castro y Ghía Gajardo, a mi amada hija Valentina, a mis hermanos Sandra y Pedro, a mi mamá y, especialmente a mi papá, quien me ha apoyado incondicionalmente y me ha enseñado a continuar siempre adelante, con alegría y siguiendo mi propia verdad.*

M. C. A. J.

- *Estudio financiado por la Sociedad Chilena de Pediatría por la obtención del concurso “Semilla para la Investigación 2013”.*

## 1) ÍNDICE GENERAL

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. ÍNDICE GENERAL</b> .....  | <b>4</b>  |
| <b>2. ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....   | <b>6</b>  |
| <b>3. ÍNDICE DE TABLAS</b> .....  | <b>7</b>  |
| <b>4. GLOSARIO</b> .....  | <b>8</b>  |
| <b>5. RESUMEN</b> .....   | <b>9</b>  |
| <b>6. ABSTRACT</b> .....  | <b>10</b> |
| <b>7. INTRODUCCIÓN</b> .....  | <b>11</b> |
| 7.1- Hipotiroidismo Congénito .....   | <b>11</b> |
| 7.2- Tipos de Hipotiroidismo Congénito .....  | <b>12</b> |
| 7.3- Causas de Hipotiroidismo Congénito Primario o Tiroideo .....                                   | <b>13</b> |
| 7.4- Síntesis de Hormonas Tiroideas .....   | <b>13</b> |
| 7.5- El gen <i>TPO</i> en el hipotiroidismo congénito por dishormonogénesis tiroidea.....           | <b>15</b> |
| 7.6- El gen <i>TPO</i> .....  | <b>16</b> |
| 7.7- Estructura y función de la enzima tiroperoxidasa .....   | <b>16</b> |
| 7.8- Mutaciones en el gen <i>TPO</i> conocidas .....  | <b>17</b> |
| 7.9- Prevalencia de mutaciones en gen <i>TPO</i> en otros estudios .....                            | <b>17</b> |
| 7.10- Importancia clínica del estudio de las mutaciones asociadas al hipotiroidismo congénito ..... | <b>19</b> |
| <b>8. HIPÓTESIS</b> .....   | <b>20</b> |
| <b>9. OBJETIVOS</b> .....   | <b>20</b> |
| 9.1- Objetivo General .....   | <b>20</b> |
| 9.2- Objetivos Específicos .....  | <b>20</b> |
| <b>10. METODOLOGÍA</b> .....  | <b>21</b> |
| 10.1- Selección de la muestra .....   | <b>21</b> |
| 10.2- Criterios de inclusión y exclusión .....  | <b>22</b> |
| 10.3- Aspectos bioéticos .....  | <b>22</b> |
| 10.4- Extracción de DNA genómico .....  | <b>23</b> |
| 10.5- Secuenciación de la región codificante del gen <i>TPO</i> .....                               | <b>23</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| 10.6.- Métodos de análisis del significado funcional de los cambios nucleotídicos encontrados.....                         | 24        |
| <b>11. RESULTADOS</b> .....  | <b>25</b> |
| 11.1- Caracterización de la muestra estudiada .....  | 25        |
| 11.2- Cambios nucleotídicos encontrados .....  | 26        |
| 11.3- Cambios no polimórficos candidatos a ser patogénicos, encontrados en los pacientes estudiados.....                   | 28        |
| 11.4- Criterios de patogenicidad analizados en las variaciones nucleotídicas encontradas .....                             | 29        |
| 11.5- Características clínicas y bioquímicas de los pacientes con mutaciones probablemente patogénicas en <i>TPO</i> ..... | 33        |
| 11.6- Genealogías de los pacientes con mutaciones en <i>TPO</i> .....  | 33        |
| <b>12. DISCUSIÓN</b> .....   | <b>35</b> |
| <b>13. CONCLUSIONES</b> .....  | <b>38</b> |
| <b>14. PRODUCTOS</b> .....   | <b>39</b> |
| <b>15. REFERENCIAS</b> .....   | <b>40</b> |
| <b>16. ANEXOS</b> .....  | <b>45</b> |
| 15.1- Anexo 1: Consentimiento informado .....  | 45        |
| 15.2- Anexo 2: Asentimiento informado .....  | 48        |
| 15.3- Anexo 3: Acta Aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.....              | 51        |

## 2) ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Síntesis de hormonas tiroideas .....   | 14 |
| <b>Figura 2:</b> Estructura proteína Tiroperoxidasa .....   | 16 |
| <b>Figura 3:</b> Selección de los pacientes estudiados .....  | 21 |
| <b>Figura 4:</b> Ubicación de las mutaciones encontradas en los dominios de la<br>proteína <i>TPO</i> .....                         | 29 |
| <b>Figura 5:</b> Conservación entre distintas especies para el cambio aminoacídico<br>valina por metionina en la posición 748 ..... | 30 |
| <b>Figura 6:</b> Conservación entre distintas especies para el cambio aminoacídico<br>prolina por leucina en la posición 368 .....  | 31 |
| <b>Figura 7:</b> Genealogía Paciente 5 .....  | 34 |
| <b>Figura 8:</b> Genealogía Paciente 8 .....  | 34 |

### 3) ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>TABLA 1:</b> genes que codifican proteínas que participan en hormonogénesis tiroidea .....   | 15 |
| <b>TABLA 2:</b> Resumen de estudios de mutaciones del gen TPO en pacientes con hipotiroidismo congénito .....                               | 18 |
| <b>TABLA 3:</b> Partidores que serán utilizados para amplificar por PCR los 17 exones del gen <i>TPO</i> .....                              | 23 |
| <b>TABLA 4:</b> Características clínicas, anatómicas y bioquímicas de los pacientes incluidos .....   | 25 |
| <b>TABLA 5:</b> Descripción de las variaciones nucleotídicas encontradas.....   | 26 |
| <b>TABLA 6:</b> Descripción de los cambios nucleotídicos encontrados en los pacientes estudiados .....                                      | 26 |
| <b>TABLA 7:</b> Frecuencia de heterocigotos de c.2242G>A en distintas poblaciones según dbSNP.....  | 27 |
| <b>TABLA 8:</b> Frecuencias alélicas de las variaciones nucleotídicas encontradas en la muestra .....                                       | 28 |
| <b>TABLA 9:</b> Cambios nucleotídicos no polimórficos en el gen <i>TPO</i> candidatos a ser patogénicos .....                               | 28 |
| <b>TABLA 10:</b> Resumen del análisis de los criterios de patogenicidad de las variaciones en <i>TPO</i> no polimorfismos encontrados ..... | 33 |

#### 4) GLOSARIO

**TPO:** Tioperoxidasa o peroxidasa tiroidea

**TPO:** Gen que codifica la enzima tioperoxidasa

**HC:** Hipotiroidismo Congénito

**TIOD:** Defecto total de la organificación del yodo

**DH:** Dishormonogénesis

**TSH:** Hormona tiroestimulante o tirotropina

**TRH:** Hormona liberadora de la tirotropina

**TSH-R:** Receptor de hormona tiroestimulante

**T4:** Hormona tiroxina

**T3:** Hormona triyodotironina

**TG:** Tiroglobulina

**TG:** Gen que codifica la proteína tiroglobulina

**PCR:** Reacción en Cadena Polimerasa

**DNA: ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**IRMA:** Ensayo inmunoradiométrico (*ImmunoRadioMetric Assay*)

**DELFA:** Fluorimetría de tiempo demorado (*Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay*)

**EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético

**SSCP:** Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis

**SSMSO:** Servicio de Salud Metropolitano Occidente



## 5) RESUMEN

10 al 15% de los hipotiroidismos congénitos primarios se producen por dishormonogénesis tiroidea. Una de las causas más frecuente se debe a mutaciones del gen de la enzima tiroperoxidasa (*TPO*), de herencia autosómica recesiva. **Objetivo:** Detectar mutaciones del gen *TPO* en 12 pacientes chilenos con hipotiroidismo congénito por dishormonogénesis (DH). Caracterizar clínica y molecularmente estos pacientes. **Metodología:** Se seleccionaron 12 pacientes, menores a 20 años, con hipotiroidismo congénito por dishormonogénesis, controlados en Servicio de Salud Metropolitano Occidente, en Santiago, Chile, según los criterios de inclusión: TSH elevada, hipotiroidismo persistente, tiroides normotópica por ecografía y/o cintigrama tiroideo. Se excluyó aquellos con sordera, Síndrome de Down, hipotiroidismo congénito central o transitorio. Se solicitó consentimiento informado y se preguntó por antecedentes familiares. Se tomaron muestras de sangre para extracción del DNA, se amplificó por PCR los 17 exones del gen *TPO*. Los productos de PCR fueron secuenciados. **Resultados:** Se detectaron 2 mutaciones posiblemente patogénicas del gen *TPO*. Una mutación previamente descrita: c.2242G>A, que produce el cambio del aminoácido valina por metionina en la posición 748 y una mutación nueva: c.1103C>T, que produce el cambio del aminoácido prolina por leucina en la posición 368. Ambos cambios de aminoácidos serían probablemente patogénicos según un análisis con el software Polyphen 2. En 2 de 12 pacientes (16,6%) se detectaron estas mutaciones: uno heterocigoto compuesto de genotipo c.1103C>T/c.2242G>A y el otro heterocigoto c.2242G>A, el segundo probablemente presente una expresión monoalélica del gen mutado. Ambos pacientes presentaron bocio difuso hipercaptante al cintigrama tiroideo y TSH alta en sangre venosa en el examen de confirmación diagnóstica (>190 uUI/mL). **Conclusión:** La frecuencia de pacientes con mutaciones posiblemente patogénicas en *TPO* con hipotiroidismo congénito por dishormonogénesis tiroidea fue 16,6%. Las características clínicas de estos dos pacientes se podrían relacionar a las mutaciones detectadas. El conocimiento de las características clínicas, bioquímicas, anatómicas y genéticas de estos pacientes permitiría un mejor diagnóstico de su patología y ofrecer asesoría genética a la familia de los pacientes afectados.

**Palabras Clave:** Hipotiroidismo Congénito, Dishormonogénesis, Tiroperoxidasa, *TPO*.

## 6) ABSTRACT

10 to 15% of primary congenital hypothyroidism are due to thyroid dysmorphogenesis. One of the most common causes are mutations in the enzyme thyroid peroxidase gene (*TPO*), an autosomal recessive disease. **Aim:** To detect mutations in the *TPO* gene in 12 Chilean patients with congenital hypothyroidism (CH) by dysmorphogenesis (DH) and Clinically and molecularly characterize these patients. **Methodology:** were included 12 patients under 20 years of age, with congenital hypothyroidism dysmorphogenesis controlled in The Metropolitan West Public Health Service, Santiago, Chile, according to the inclusion criteria: elevated TSH, persistent hypothyroidism, orthotopic thyroid in ultrasound and / or scintigraphy thyroid. We excluded those with deafness, Down syndrome, central congenital hypothyroidism or transient hypothyroidism. Informed consent was requested and family history was investigated. Blood samples for DNA extraction were obtained. 17 exons of *TPO* gene were amplified by polymerase chain reaction. The PCR products were sequenced. **Results:** two pathogenic mutations in *TPO* gene were detected. A mutation previously described: c.2246G> A, which produces a change of the amino acid valine for methionine at position 748, and a new mutation: c.1103C> T, which causes the change of amino acid proline for leucine at position 368. Both amino acid changes are likely pathogenic according to an analysis in Polyphen 2 software. In 2 of 12 (16.6%) of these patients mutations were detected: one composite heterozygote c.1103C> T / c.2246G>A and the other one heterozygote c.2246G>A, the second probably presents monoallelic expression of the mutated gene. Both patients had diffuse goiter, high uptake to the thyroid scintigraphy and high TSH in venous blood in the examination of diagnostic confirmation (> 190 mIU / mL). **Conclusion:** The frequency of patients with potentially pathogenic mutations in *TPO* among cases with congenital hypothyroidism by thyroid dysmorphogenesis was 16.6%. The clinical characteristics of these two patients are likely explained to mutations detected. Knowledge of clinical, biochemical, anatomical and genetic features by the detected mutation of these patients would allow better diagnosis of pathology and provide genetic counseling to the family of the affected patients. **Keywords:** Congenital Hypothyroidism, dysmorphogenesis, thyroperoxidase, *TPO*.

## 7) INTRODUCCIÓN

### 7.1.- Hipotiroidismo Congénito

Se define como hipotiroidismo congénito al déficit de hormonas tiroideas diagnosticado al nacer <sup>(1)</sup>. Generalmente el hipotiroidismo en el período neonatal no causa síntomas o éstos son inespecíficos. Sin embargo, si no es tratado oportunamente con la sustitución de la hormona levotiroxina sódica (T4) sintética <sup>(2)</sup> en las primeras etapas del desarrollo del niño, puede producir alteraciones neurológicas importantes. Esto se explica porque las hormonas tiroideas intervienen de forma crítica durante el desarrollo del sistema nervioso central, influyendo en la migración, diferenciación y señalización neuronal <sup>(3)</sup>.

A nivel mundial se estima una prevalencia de hipotiroidismo congénito de 1 en 2.000 a 1 en 4.000 recién nacidos vivos. Esta enfermedad en Chile tiene una incidencia de 1 en 3.163 recién nacidos vivos <sup>(4)</sup>, siendo la patología endocrina más frecuente en el recién nacido y la causa más frecuente de retraso mental prevenible <sup>(5)</sup>.

En Chile, con el objeto de realizar la pesquisa precoz de esta enfermedad y darle tratamiento oportuno, se inició en 1992 el Programa Nacional de búsqueda masiva de hipotiroidismo congénito, alcanzando actualmente una cobertura cercana al 100% <sup>(4)</sup>. La pesquisa se realiza en Chile con la medición de hormona tirotrófina (TSH) en sangre a los recién nacidos, tomada del talón y almacenado en papel filtro. Hasta el año 2005, para el análisis de las muestras se utilizó el método IRMA (*Immunoradiometric Assay*) cuyo nivel de corte era 20 uUI/ml de TSH. Posterior a ese año, se cambió la metodología del examen a DELFIA (*Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay*), siendo actualmente un nivel de TSH mayor a 15 uUI/ ml sugerente de hipotiroidismo congénito. Este examen se debe realizar a los neonatos de término mayores a 37 semanas de gestación a partir de las 40 horas de vida, a los neonatos de 35 y 36 semanas de gestación a los 7 días de vida y a los neonatos prematuros menores de 35 semana de gestación a los 7 días de vida y repetir en todos a los 15 días de vida <sup>(6)</sup>. Las muestras se analizan en los laboratorios de referencia, siendo uno de estos el Hospital San Juan de Dios.

El examen debe confirmarse si el valor en muestra de papel filtro está sobre los valores de corte. La confirmación se obtiene si en la sangre venosa la TSH es superior a 10 uIU/ml y la T4 es inferior a 10 ug/dl. Con estos resultados se realiza un cintigrama de tiroides para determinar la etiología. Si no es posible realizar el cintigrama prontamente no es impedimento para iniciar tratamiento con T4, ya que el recién nacido debe estar en tratamiento antes de los 15 días de vida. Con estos antecedentes el niño y su familia deben ser derivados al endocrinólogo infantil o al pediatra del servicio que esté a cargo del programa, según corresponda. Debe ser evaluado antes de los 15 días de vida para iniciar la terapia, informar a la familia del pronóstico y educar sobre el seguimiento y el tratamiento (7).

### **7.2- Tipos de Hipotiroidismo congénito:**

El hipotiroidismo congénito puede presentarse de forma transitoria o ser permanente, pudiendo ser clasificado según su origen en hipotiroidismo congénito primario, central o de origen periférico (1). Corresponde a un hipotiroidismo congénito primario, cuando la alteración se encuentra a nivel de la glándula tiroides. El hipotiroidismo congénito central a su vez, puede clasificarse en secundario, cuando se debe a una alteración en la hipófisis, produciéndose un déficit de hormona tiroestimulante (TSH) o terciario, cuando el defecto está en la producción de hormona liberadora de TSH (TRH) por una alteración a nivel hipotalámico (1,8). El hipotiroidismo congénito periférico resulta de defectos en el transporte o metabolismo de las hormonas tiroideas o por resistencia a su acción (1,8).

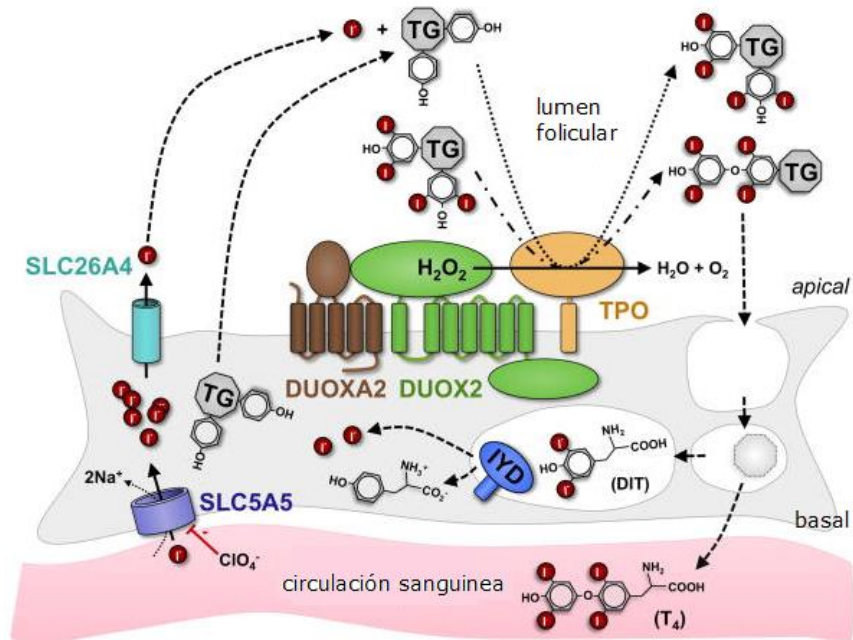
### **7.3- Causas de Hipotiroidismo Congénito Primario o Tiroideo:**

Las causas de hipotiroidismo congénito primario son variadas y la mayoría de ellas son esporádicas, lo que significa que se presenta en personas sin antecedentes familiares de la enfermedad. Sin embargo, se estima que aproximadamente un 10 a 20% de los casos de hipotiroidismo congénito primario serían hereditarios. (9,11).

Dentro de los hipotiroidismos congénitos primarios, el 85% de los casos se debe a defectos en la formación de la glándula tiroidea o dis-embriogénesis, resultando en ausencia, hipoplasia o ectopia tiroidea. El 10 a 20% de los casos de hipotiroidismo congénito primario son causados por dis-hormonogénesis tiroidea (<sup>9,10</sup>), esto equivale a una incidencia de 1:30.000 recién nacidos en Chile. Estos pacientes se caracterizan por tener una glándula tiroidea anatómicamente normal, pero cuya síntesis de hormonas tiroideas está disminuída o completamente inhibida. El hipotiroidismo congénito primario por dishormonogénesis sigue un patrón de herencia autosómico recesivo (<sup>9,11</sup>).

#### **7.4- Síntesis de Hormonas Tiroideas:**

El proceso de síntesis de las hormonas tiroideas se inicia con la unión de la hormona TSH a su receptor (TSH-R) en las células foliculares del tiroides, lo que estimula la captación de yoduro circulante en la sangre y su transporte hacia el citoplasma por el transportador activo sodio/yoduro (NIS), ubicado en la membrana basal del tirocito. Por otro lado, la unión de TSH a su receptor también estimula la síntesis de la enzima tiroperoxidasa. Posteriormente, el yoduro es transportado a través de la membrana apical (figura 1), hacia el lumen del folículo tiroideo, por el transportador ioduro/cloruro llamado pendrina. La enzima tiroperoxidasa (TPO) y el sistema formado por DUOX2 y DUOX1, son proteínas de membrana apical cuyo dominio catalítico se ubica hacia el lumen folicular. El sistema DUOX2/DUOX1, anteriormente llamado ThOX, genera el peróxido de hidrógeno necesario para que la enzima *TPO* produzca la oxidación del ioduro a iodo, el cual posteriormente se une covalentemente a residuos de tirosina de la proteína tiroglobulina (TG) para formar yodotirosina (organificación yoduro). Finalmente algunos de estos residuos hormonalmente inactivos de yodotirosina (monoyodotirosina y diyodotirosina) se acoplan para formar yodotironinas hormonalmente activas, T4 y T3, las que se liberan a la circulación.



**Figura 1:** Síntesis de hormonas tiroideas. Tomado de <sup>(11)</sup>. Esquema de la célula folicular tiroidea y de las distintas etapas de la hormonogénesis tiroidea: 1) Ingreso activo de yoduro desde la circulación sanguínea via cotransportador NIS codificado por el gen *SLC5A5*; 2) paso facilitado de yoduro hacia el lumen folicular via canal pendrina, codificado por el gen *SLC26A4*; 3) oxidación de yoduro a yodo y organificación de grupos tirosina de la tiroglobulina, (codificada por el gen *TG*), catalizada por la tiroperoxidasa (codificada por el gen *TPO*); 4) acoplamiento de yodotirosinas (MIT y DIT). Los pasos 3 y 4 requieren  $H_2O_2$  producido por el complejo *DUOX2/DUOXA2*. 5) Endocitosis de yodotirosinas ( $T_4$  y  $T_3$ ); 6) liberación de yodotirosinas y degradación por yodotirosina deshalogenasa1 (codificada por el gen *IYD*) permitiendo reciclar yoduro para la nueva síntesis de hormonas tiroideas.

La mayoría de los pacientes con dis-hormonogénesis tiroidea son portadores de mutaciones en genes que codifican enzimas que participan en la síntesis de las hormonas tiroideas. Hasta el momento, se conocen 7 genes cuyas mutaciones causan alteración en la síntesis de hormonas tiroideas, ya sea por defectos en el transporte de yodo hacia el tirocito (*SLC5A5/NIS*), defecto en la organificación del yodo (*TPO*, *DUOX2*, *DUOXA2*, *SLC26A4*), alteraciones en la síntesis de tiroglobulina (*TG*) o deficiencia de la yodotirosina deshalogenasa (*IYD/DEHAL1*). <sup>(12)</sup> En la tabla 1 se describen la localización citogenética, la proteína que codifican, el modo de herencia, las características moleculares y clínica de los pacientes que presentan mutaciones en alguno de los 7 genes que participan en la hormonogénesis tiroidea.

**Tabla 1:** genes que codifican proteínas que participan en hormonogénesis tiroidea

| Gen            | OMIM   | Proteína              | Locación citogenética | Herencia | Característica             |
|----------------|--------|-----------------------|-----------------------|----------|----------------------------|
| <i>SCL5A5</i>  | 601843 | NIS                   | 19p13.11              | AR       | Alteración transporte iodo |
| <i>TPO</i>     | 606765 | Tiroperoxidasa        | 2p25.3                | AR       | Defecto organificación     |
| <i>TG</i>      | 188450 | Tiroglobulina         | 8q24.22               | AR       | Defecto organificación     |
| <i>IYD</i>     | 612025 | DEHAL 1               | 6q25.1                | AR       | Defecto degradación        |
| <i>DUOX2</i>   | 606759 | Complejo DUOX2/DUOXA2 | 15q21.1               | AR<br>AD | Defecto organificación     |
| <i>DUOXA2</i>  | 612772 | Complejo DUOX2/DUOXA2 | 15q21.1               | AR<br>AD | Defecto organificación     |
| <i>SLC26A4</i> | 605646 | PDS                   | 7q22.3                | AR       | Defecto organificación     |

AR: autosómico recesivo, AD: autosómico dominante, PDS: pendrina, DEHAL1: yodotirosina deshalogenasa

### 7.5- El gen *TPO* en el Hipotiroidismo congénito primario por dishormonogénesis tiroidea:

La causa más frecuente de dishormonogénesis es por mutaciones en el gen *TPO* (<sup>13,14,15,16,17</sup>).

Según el único estudio en el que se han analizado mutaciones en 7 genes candidatos (*TG*, *TPO*, *SLC5A5*, *SLC26A4*, *DUOX2*, *DUOXA2*, *IYD*) relacionados al hipotiroidismo congénito por dishormonogénesis, en 102 pacientes japoneses con hipotiroidismo congénito por dishormonogénesis, 15 pacientes presentaron mutaciones en alguno de los 7 genes estudiados (14,7%), entre los cuales 2 pacientes presentaron mutaciones en el gen *TPO* (<sup>18</sup>). La prevalencia estimada de mutaciones en *TPO* en Japón sería 1:177.000, lo cual es inferior a lo reportado en la población Holandesa (<sup>19</sup>) y en otras series.

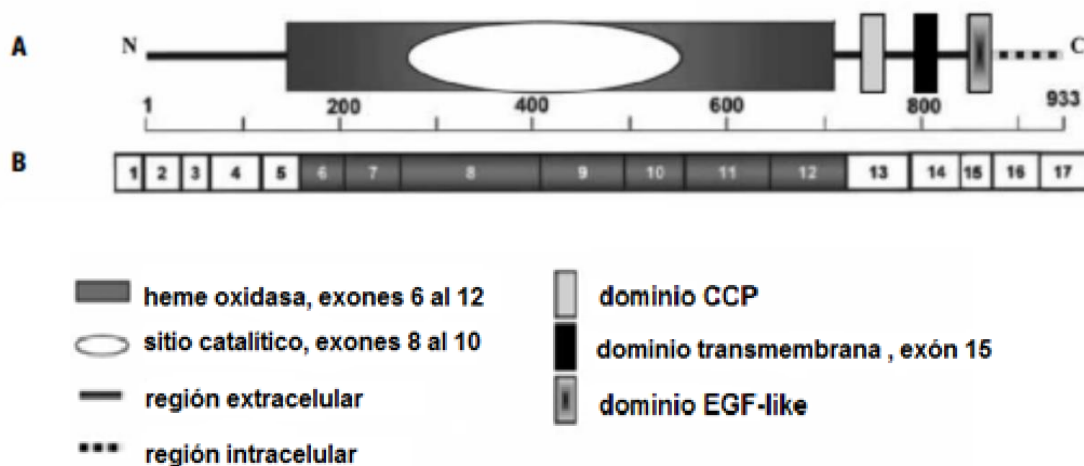
## 7.6- Gen *TPO*:

El gen *TPO*, (OMIM 606765), se encuentra en el cromosoma 2p25. Se compone de 17 exones y 16 intrones. Abarca unas 150 kilobases de ADN genómico. Codifica la enzima peroxidasa tiroidea, una molécula de 933 residuos de aminoácidos con una única región que atraviesa la membrana (<sup>21,24</sup>).

## 7.7- Estructura y función de la enzima tiroperoxidasa:

La peroxidasa tiroidea o tiroperoxidasa es una hemoproteína con actividad peroxidasa, específica del tejido tiroideo, ubicada en la membrana apical de las células foliculares tiroideas.

La estructura proteica consta de un gran ectodominio N-terminal extracelular, una región transmembrana y una cola corta C-terminal citoplasmática. El ectodominio se compone de un péptido de señal N-terminal, un propéptido y tres dominios: un dominio N-terminal, similar a mieloperoxidasa (MPO-like), un dominio de proteína de control del complemento (CCP-like), y un dominio C terminal, similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF-like). Su sitio catalítico está en el sitio heme oxidasa, que es codificado por los exones 8 al 10 del gen *TPO* (<sup>20</sup>).



**Figura 2:** Estructura proteína Tiroperoxidasa. Tomado de (<sup>20</sup>). (A) Esquema que muestra los dominios de la proteína: región heme oxidasa (exones 6 al 12); sitio catalítico (exones 8 al 10); dominio transmembrana (exón 15); dominios CCP y EGF-like; regiones intra y extracelular de la proteína. (B) cDNA de *TPO* con sus 17 exones.



La tiroperoxidasa es una enzima clave en la síntesis de las hormonas tiroideas. Realiza las reacciones de oxidación, organificación y acoplamiento, etapas fundamentales para la síntesis de hormonas tiroideas. Los defectos en esta enzima producen un déficit severo en la síntesis de hormonas tiroideas y un hipotiroidismo congénito primario permanente <sup>(21)</sup>.

Los defectos en la síntesis de hormonas tiroideas producen una disminución de la secreción de estas hormonas, disminuyendo el feedback negativo que ellas ejercen sobre la hipófisis anterior, llevando a un aumento de la secreción de TSH, lo que estimula la glándula tiroidea. A consecuencia de lo anterior, los pacientes con hipotiroidismo primario por dishormonogénesis, como es el caso de los defectos en la tiroperoxidasa, además pueden nacer con bocio (aumento de tamaño de la glándula tiroidea) o desarrollarlo en el período postnatal, especialmente si no reciben oportunamente el tratamiento de suplementación con levotiroxina <sup>(11)</sup>. Por lo tanto, el hallazgo de mutaciones en el gen *TPO* en neonatos con hipotiroidismo congénito primario indica que el paciente requerirá tratamiento de por vida con hormona tiroidea y que en futuros embarazos se debe descartar la presencia de bocio prenatal para evitar posibles complicaciones obstétricas <sup>(22)</sup>.

#### **7.8- Mutaciones en el gen *TPO* conocidas:**

La primera mutación del gen *TPO* fue reportada por Abramowicz et al. en 1992 <sup>(21)</sup>. Según una revisión realizada por Ris-Stalpers el año 2009 <sup>(16)</sup>, hasta ese entonces se habían identificado 67 mutaciones del gen *TPO*. Posteriormente, se han reportado 15 mutaciones nuevas en *TPO*, las que sumadas a las reportadas por Ris- Stalpers y Bikker al 18 de junio del 2009, suman 82 mutaciones conocidas en el gen *TPO*. <sup>(10,15,20,25,26,27,28,29,30)</sup>.

Los exones 8 y 9 presentan la mayor densidad de mutaciones descritas. Estos exones codifican para el sitio catalítico de la enzima. Aproximadamente el 74 % de las mutaciones descritas son sustituciones y un 26 % deleciones e inserciones que conducen a la producción de una proteína trunca.

#### **7.9- Prevalencia de mutaciones en gen *TPO* en otros estudios:**

La prevalencia de mutaciones del gen *TPO* en casos de hipotiroidismo congénito por dishormonogénesis varía según la población estudiada, el método de estudio y los criterios de selección de la muestra, aunque en la mayoría de las series estudiadas, las mutaciones del

gen *TPO* serían una de las más frecuentes causas de dishormonogénesis tiroidea. A nivel internacional, especialmente aquellos países en que se realiza algún programa de tamizaje neonatal y seguimiento de los pacientes con hipotiroidismo congénito, se han publicado diversos estudios acerca de las mutaciones asociadas al hipotiroidismo por dishormonogénesis tiroidea, específicamente por mutaciones en el gen *TPO*. La frecuencia de casos con hipotiroidismo congénito por dishormonogénesis explicados por mutaciones en el gen *TPO* es variable en los distintos estudios, de 2.4% <sup>(31)</sup> a 100% <sup>(36,33)</sup>. (Ver tabla 2).

**Tabla 2.** Resumen de estudios de mutaciones del gen *TPO* en pacientes con hipotiroidismo congénito.

| País de origen de los casos<br>(n° de referencia)         | Casos estudiados  | Número pacientes con mutación del gen <i>TPO</i> | Número mutaciones detectadas en gen <i>TPO</i> | Comentarios  |
|---|---|--|--|--|
| <b>Portugal</b><br>( <sup>35</sup> )                      | 55 de 54 familias con HC por DHG                              | 13 (23%)   | 8  |  |
| <b>China</b><br>( <sup>36</sup> )                         | 5 HC con TIOD   | 5 (100%)   | 5  | Todos los pacientes fueron heterocigotos compuestos. En 2 pacientes no se detectó la segunda mutación.   |
| <b>Irán</b><br>( <sup>31</sup> )                          | 41 HC con DHG   | 1 (2.4%)   | 1  | Los autores indican que se detectaron pocos casos con mutación posiblemente por la técnica de análisis de mutaciones empleada (SSCP)   |
| <b>Europa</b><br>( <sup>32</sup> )                        | 30 HC permanente sin historia familiar y tiroides ortotópicas | 4 (13%)  | 4  | Estudiaron sólo los exones 2, 8, 10 y 14 utilizando SSCP   |
| <b>Turquía y Pakistan (UK)</b><br>( <sup>10</sup> )       | 28 HC con DHG   | 21 (75%)   | 10   |  |
| <b>Brazil</b><br>( <sup>33</sup> )                        | 7 HC con DHG y bocio  | 7 (100%)   | 3  |  |
| <b>Japón</b><br>( <sup>18</sup> )                         | 13 HC con DHG<br>2 HC sin DHG                                 | 2 (13.3%)  | 4  |  |
| <b>Eslovenia, Eslovaquia, Bosnia</b><br>( <sup>17</sup> ) | 43 con HC y tiroides ortotópicas.                             | 20 (46%)<br>1:20000                              | 7  |  |
| <b>Argentina</b><br>( <sup>34</sup> )                     | 20 con HC de 16 familias                                      | 6 (30%)  | 8  | Se utilizó método SSCP y se estudiaron los genes <i>TPO</i> , <i>DOUX</i> y <i>TG</i> . Los pacientes con mutaciones en los genes <i>TPO</i> y <i>DOUX</i> presentaron bajos niveles de Tiroglobulina. |
| <b>Brazil</b><br>( <sup>33</sup> )                        | 7 HC con DHG y bocio  | 7 (100%)   | 3  |  |

HC: hipotiroidismo congénito; *TPO*: gen enzima tiroperoxidasa; DHG: dishormonogénesis; TIOD: déficit completo de hormonas tiroideas; *TG*: gen tiroglobulina.

### **7.10- Importancia clínica del estudio de las mutaciones asociadas al hipotiroidismo congénito:**

En el recientemente publicado Consenso sobre el tamizaje, diagnóstico y manejo del hipotiroidismo congénito de la Sociedad Europea de Endocrinología Pediátrica 2014 <sup>(23)</sup> se describe la importancia de realizar consejo genético a los familiares de pacientes con hipotiroidismo congénito como parte fundamental del manejo, con el fin de determinar el modo de herencia, riesgo de recurrencia, posibles asociaciones a otras alteraciones sindromáticas y pronóstico a largo plazo. Dentro de las recomendaciones de realización de asesoría genética se señala, entre otros, a la mujer embarazada con antecedentes de tener un hijo con hipotiroidismo congénito no sindromático por dishormonogénesis, con alto nivel de evidencia (aplicable a la mayoría de los pacientes en la mayoría de las circunstancias, los beneficios superan claramente los riesgos), basándose en evidencia de alta calidad (estudios de cohorte prospectivos o ensayos controlados aleatorios, con bajo riesgo de sesgo <sup>(23)</sup>).

El propósito este trabajo es iniciar el estudio genético del hipotiroidismo congénito por dishormonogénesis en pacientes chilenos. Este es el primer estudio realizado en nuestro país al respecto y uno de los primeros en Sudamérica, lo que permitiría abrir una nueva línea de investigación en esta área en nuestro país y ofrecer asesoría genética de manera oportuna, favoreciendo el manejo en las familias de afectados.

## 8) HIPÓTESIS

Un porcentaje de los pacientes chilenos con hipotiroidismo congénito por dishormonogénesis presenta mutación en el gen *TPO*.

## 9) OBJETIVOS

Objetivo General:

- Conocer la frecuencia de mutaciones en el gen *TPO* en un grupo de pacientes con hipotiroidismo congénito por dishormonogénesis en Chile.

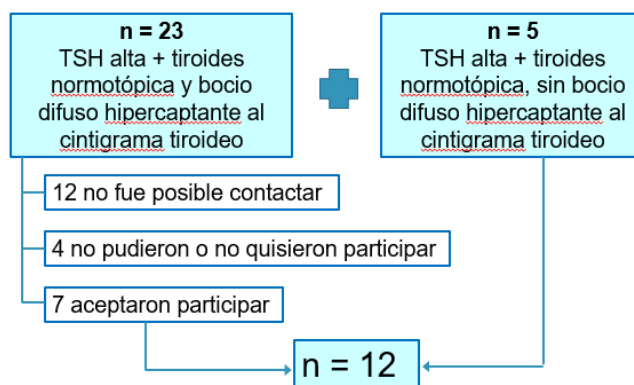
Objetivos Específicos:

- Describir las características clínicas y bioquímicas de 12 pacientes con hipotiroidismo congénito por dishormonogénesis que cumplan con los criterios de inclusión para casos con mutación del gen *TPO*
- Detectar mutaciones en el gen *TPO* en estos pacientes mediante secuenciación automática.
- Relacionar el genotipo de los pacientes con las características clínicas y bioquímicas.

## 10) METODOLOGÍA

### 10.1.- Selección de la muestra:

Se seleccionaron pacientes del Programa Nacional de Hipotiroidismo Congénito nacidos en el SSMO y controlados en el Hospital San Juan de Dios. Inicialmente se seleccionaron 5 pacientes que presentaban hipotiroidismo congénito con tiroides normotópica por ecografía, sin bocio hipercaptante al cintigrama tiroideo. Posteriormente, se incluyeron 7 pacientes con hipotiroidismo congénito con tiroides normotópica y bocio difuso hipercaptante al cintigrama tiroideo. Estos pacientes fueron obtenidos a partir de una base de datos con 23 pacientes con hipotiroidismo congénito reportados en un seguimiento de 22 años desde el año 1992, realizado por el Dr. Gabriel Lobo y el Tecnólogo médico Bernardo Bruggendieck, a los pacientes del Programa de Hipotiroidismo congénito diagnosticados en el SSMO (Hospital San Juan de Dios, Hospital Felix Bulnes, Hospital de Talagante, Hospital de Peñaflo, Hospital de Curacaví y Hospital de Melipilla), a quienes se llamó telefónicamente y se les invitó voluntariamente a participar en este estudio. En 12 pacientes no se tenían actualizados los datos de contacto, por lo que se perdió el 52% del total de datos. Cabe destacar que varios pacientes de la base de datos eran adultos que actualmente no se controlaban en Hospital San Juan de Dios. De los 11 pacientes que se pudo contactar, 4 rechazaron la invitación voluntaria a participar. Se logró obtener muestras de sangre de 7 pacientes de ésta base de datos. En consecuencia, se obtuvo muestras de 12 pacientes en total, (figura 3).



**Figura 3:** Selección de los pacientes estudiados.

## **10.2.- Criterios de inclusión y exclusión:**

Los criterios de inclusión fueron:

- a) TSH screening neonatal elevada a las 72 horas de vida en papel filtro, de acuerdo a la aplicación del Programa Nacional de Screening Neonatal de Hipotiroidismo Congénito que se desarrolla en el Centro de Referencia Hospital San Juan de Dios. Hasta el año 2005 se utilizó el método radioinmunoensayo (IRMA) cuyo nivel de corte del TSH era 20 uUI/ml. Posterior a ese año se cambió la metodología del examen a inmunofluorescencia (DELFA) , siendo una TSH > 15 uUI/ ml sugerente de hipotiroidismo congénito. Aquellos sujetos que tenían TSH screening alterada se les solicitó exámenes sanguíneos confirmatorios (TSH > 10 uUI/ml en sangre venosa).
- b) Tiroides normotópica (ortotópica) por ecografía y/o cintigrama tiroideo
- c) Hipotiroidismo congénito persistente.

Los criterios de exclusión fueron: sordera (por sospecha de Síndrome de Pendred, caracterizado por sordera e hipotiroidismo congénito), Síndrome de Down, hipotiroidismo congénito central e hipotiroidismo congénito transitorio. Se seleccionaron hombres y mujeres con edad menor o igual a 20 años y provenientes de familias diferentes.

No se realizó test de perclorato, por no estar disponible en el Hospital San Juan de Dios al momento del diagnóstico. No se consideraron los niveles de tiroglobulina, ya que no se contó con dichos valores al diagnóstico en todos los pacientes evaluados.

## **10.3.- Aspectos bioéticos:**

El estudio fue aprobado por el Comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y por el abogado del Comité de Ética del Hospital San Juan de Dios. A todos los padres de los pacientes se les solicitó firmar el consentimiento informado y a los pacientes mayores de 12 años se les solicitó además firmar un asentimiento informado.

#### 10.4.- Extracción de DNA genómico

A cada participante se le extrajo 10 mL de sangre periférica mediante punción venosa en el antebrazo, los que se colectaron en un tubo vacuotainer con EDTA como anticoagulante. A partir de estas muestras se extrajo DNA genómico total utilizando la técnica de Chomczynski et al., (2006).

#### 10.5.- Secuenciación de la región codificante del gen *TPO*

Se amplificaron por la técnica de PCR los 17 exones del gen *TPO*, utilizando las secuencias de los partidores descritas por Hashemipour y cols. el 2012 (<sup>31</sup>). Los partidores abarcaron la secuencia codificante de estos exones y las secuencias intrónicas circundantes (más de 30 bases) de éstos. En la tabla 3 se describen los partidores utilizados.

**Tabla 3:** Partidores que serán utilizados para amplificar por PCR los 17 exones del gen *TPO*

| Exón | Partidor Directo (5' – 3')  | Partidor Reverso (5' - 3')  | Tamaño (bp) |
|------|-----------------------------|-----------------------------|-------------|
| 1    | GACTTCCTAGCATCTTGACG        | CACTTTACAAGTTCCAATGATG      | 220         |
| 2    | AGACAAGGACACAGCGGTTTC       | CATGGCCTTGTCAGTGCTTG        | 225         |
| 3    | AAGCAACACTGTCAGTGAATC       | TTAACAATGGCAAGCTTCAG        | 275         |
| 4    | TT AAGTACCAAAGATACCATAGAC   | CACAAAGTCAAGGTGTCTC         | 295         |
| 5    | CAAATTCAGATGCTGGAGTCAC      | TCCTTCATGATGGCATCTAGTC      | 308         |
| 6    | CTGAGAATGGTGTCTTATATCTG     | AGCATCACAGGACCCAATC         | 313         |
| 7    | GTCATCTTTCTGCTACCACG        | TTGACGTTTTAAATAGCACTTAG     | 327         |
| 8    | AGAGTCTTACAA AGG GTG CAC    | AAG TAC CTG GGA GAG AGA AGC | 678         |
| 9    | TCA CTGAGATGCTTTTCTAT C     | AAGAGTTCATGGGGACCAG         | 327         |
| 10   | GTTTCTCTAGAACTGAGCCAAG      | AGTCTCTCTAGCAGCAGGTTG       | 306         |
| 11   | AACAAAAGTTCAGTTCTGTGAGAG    | TGTGCAGAACGTGAAGGAAG        | 330         |
| 12   | CTC CAT GCA CTG TGA CCT TAC | CTTTGTTTGATGAGATGCACG       | 308         |
| 13   | CTTTTCTCGTAGTTTGACTACATG    | CTTATATCGGAAACATTCAGATG     | 271         |
| 14   | AGAGAAGCACCTCCCAGAAC        | TACAAAAACTCGCAAATGGAC       | 270         |
| 15   | CAGACTCAGGCAGGACAACC        | ATTGCAGCCATGTCCAGAG         | 244         |
| 16   | CTACCCTCCACAGTCACGGT        | CCAGATCCTGTCCAACCACT        | 250         |
| 17   | TGTGAAAAGAGCTCCTGTC         | GTGATTTTGGGAACATGAAG        | 211         |

Se realizaron reacciones de PCR en un volumen de 40uL, empleando una *Taq* polimerasa estándar. Posteriormente, se confirmó el éxito de la reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Aquellas reacciones de PCR en que la amplificación fue específica, se sometieron al procedimiento de secuenciación de Sanger (<sup>41</sup>). Este servicio fue realizado por MacroGen (Corea). Finalmente, para análisis de la secuenciación se utilizó el programa ChromasPro versión 1.7.6, usando la secuencia de referencia depositada en Ensembl.

## **10.6.- Métodos de análisis del significado funcional de los cambios nucleotídicos encontrados.**

Para analizar los cambios nucleotídicos posiblemente patogénicos encontrados se utilizaron distintos programas computacionales como aproximación al estudio funcional.

Se creó un esquema de la proteína tiroperoxidas mediante el programa SMART protein, donde se ubicaron las variantes candidatas a ser patogénicas encontradas con el fin de poder identificar la posible alteración a la función que sería afectada.

Los cambios missense fueron analizados mediante los programas Polyphen 2, SIFT y PRALINE. La aplicación Polyphen 2, (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), predice el posible impacto de una sustitución de aminoácido en la estructura y función de una proteína humana usando consideraciones físicas y comparativas directas. El programa SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>) predice si una sustitución de aminoácido afecta a la función de la proteína, basado en la homología de secuencia entre especies y las propiedades físicas de los aminoácidos. Este programa, entrega probabilidad en un rango de 0 a 1, siendo dañino si es cercano a 0. Además se creó un esquema comparativo de la conservación de aminoácidos de la estructura proteica entre distintas especies mediante el programa de análisis de alineamiento múltiple PRALINE (<http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww>), el cual integra datos de investigaciones de homología entre las especies y datos de la estructura secundaria. Esta aplicación entrega un puntaje de 1 a 10, con distintos colores, siendo cercano a 10 un aminoácido altamente conservado entre las distintas especies.

Los cambios sinónimos fueron analizados con Human Splicing Finder versión 3.0 (HSF 3.0) (<http://www.umd.be/HSF3/>), que analiza las posibles alteraciones en los sitios de splicing producidos por las variaciones nucleotídicas.



## 11) RESULTADOS

### 11.1- Caracterización de la muestra estudiada:

Se incluyeron 12 pacientes de ambos sexos (7 mujeres y 6 hombres), de edad actual promedio 8,46 años (entre 1 y 17 años), controlados en el Servicio de Salud Metropolitano Occidente que cumplían los criterios de selección. Las características clínicas, anatómicas y bioquímicas se describen en la tabla 4.

**Tabla 4:** Características clínicas, anatómicas y bioquímicas de los pacientes incluidos.

| Paciente | Edad actual (años) | Sexo | TSH screening (μUI/mL) | TSH sangre al diagnóstico (μUI/mL) | T4 total al diagnóstico (μg/dl) | T4 libre al diagnóstico (ng/dl) | T3 al diagnóstico (ng/dl) | Ecografía tiroides | Cintigrama Tiroides   |
|----------|--------------------|------|------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------|--------------------|---|
| 1        | 3                  | F    | 35,00                  | 10,88                              | 9,30                            | 1,16                            | ND                        | Normotópica        | Menor contraste   |
| 2        | 2                  | F    | 43,50                  | 10,81                              | 13,10                           | 1,12                            | ND                        | Normotópica        | Menor contraste y captación                                       |
| 3        | 9                  | F    | 82,90                  | 112,90                             | 8,60                            | 1,40                            | ND                        | Normotópica        | Menor contraste   |
| 4        | 2                  | M    | 24,70                  | 39,63                              | 13,30                           | 1,54                            | ND                        | Normotópica        | Asimetría de contraste de ambos lóbulos tiroideos mayor a derecha |
| 5        | 1                  | M    | 37,80                  | 196,38                             | 0,10                            | 0,39                            | ND                        | Normotópica        | Bocio difuso hipercaptante  |
| 6        | 11                 | M    | 63,00                  | 20,40                              | 9,30                            | ND                              | 102,00                    | Normotópica        | Menor contraste   |
| 7        | 6                  | F    | 59,80                  | 57,60                              | 10,20                           | 1,70                            | ND                        | Normotópica        | Bocio difuso hipercaptante  |
| 8        | 12                 | F    | 210,00                 | 337,76                             | 6,90                            | 0,59                            | ND                        | Normotópica        | Bocio difuso hipercaptante  |
| 9        | 12                 | M    | 712,10                 | 148,10                             | 2,56                            | ND                              | 51,00                     | Normotópica        | Bocio difuso hipercaptante  |
| 10       | 14                 | F    | 297,90                 | 221,00                             | 2,40                            | ND                              | 114,00                    | Normotópica        | Bocio difuso hipercaptante  |
| 11       | 15                 | M    | 44,10                  | 36,50                              | ND                              | ND                              | ND                        | Normotópica        | Bocio difuso hipercaptante  |
| 12       | 17                 | M    | 90,80                  | 28,80                              | 8,30                            | ND                              | 130,00                    | Normotópica        | Bocio difuso hipercaptante  |

F: femenino, M: masculino, ND: no disponible.

Todos presentaron hipotiroidismo congénito en tratamiento al momento del estudio y tenían tiroides normotópica al estudio de imágenes. No se evaluó el desarrollo psicomotor de estos pacientes en este estudio.

## 11.2- Cambios nucleotídicos encontrados:

En la tabla 5 se describen los cambios nucleotídicos encontrados en los pacientes estudiados, si están o no registrados en la base de datos dbSNP, el exón donde se ubican en el gen *TPO* y el efecto que producen sobre la proteína tiroperoxidasa.

**Tabla 5:** Descripción de las variaciones nucleotídicas encontradas.

| Variaciones nucleotídicas | dbSNP      | Exón | Efecto sobre proteína |
|---------------------------|------------|------|-----------------------|
| c.-125G>A                 | rs2071402  | Pr   | SE                    |
| c.-80A>G                  | rs2071403  | 1    | SE                    |
| c.12C>G                   | rs9678281  | 2    | p.Leu16Leu            |
| c.69C>T                   | ND         | 3    | p.Ile23Ile            |
| c.769G>T                  | rs4927611  | 7    | p.Ala269Ser           |
| c.1103C>T                 | ND         | 8    | p.Pro368Leu           |
| c.1193G>C                 | rs2175977  | 8    | p.Ser398Thr           |
| c.1117G>T                 | rs2280132  | 8    | p.Ala373Ser           |
| c.1449C>T                 | ND         | 9    | p.Asn483Asn           |
| c.1998C>T                 | rs1126797  | 11   | p.Asp666Asp           |
| c.2145C>T                 | rs732608   | 12   | p.Pro658Pro           |
| c.2173A>C                 | rs732609   | 12   | p.Thr725Pro           |
| c.2242G>A                 | rs28991292 | 13   | p.val748Met           |
| c.2540T>C                 | rs1126799  | 15   | p.Val847Ala           |

SE: Sin efecto, ND: No descrito, Pr: Promotor

En la tabla 6 se resumen los cambios nucleotídicos encontrados en cada uno de los pacientes estudiados indicando si estos se encuentran en estado homocigoto o heterocigoto.

**Tabla 6:** Descripción de los cambios nucleotídicos encontrados en los pacientes estudiados.

| Paciente | c.-125G>A | c.-80A>G | c.12C>G | c.69C>T | c.769G>T | c.1103C>T | c.1193G>C | c.1117G>T | c.1449C>T | c.1998C>T | c.2145C>T | c.2173A>C | c.2242G>A | c.2540T>C |
|----------|-----------|----------|---------|---------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1        | ■         | ■        | ■       |         |          |           | ■         | ■         |           |           |           |           |           |           |
| 2        | ■         | ■        | ■       |         |          |           | ■         | ■         |           |           |           |           |           |           |
| 3        | ■         | ■        | ■       |         |          |           | ■         | ■         |           |           |           |           |           | ■         |
| 4        | ■         | ■        | ■       |         |          |           | ■         | ■         |           |           |           |           |           | ■         |
| 5        | ■         | ■        | ■       |         |          |           | ■         | ■         |           |           |           |           |           | ■         |
| 6        | ■         | ■        | ■       |         |          |           | ■         | ■         |           |           |           |           |           | ■         |
| 7        | ■         | ■        | ■       |         |          |           | ■         | ■         |           |           |           |           |           | ■         |
| 8        | ■         | ■        | ■       |         |          |           | ■         | ■         |           |           |           |           |           | ■         |
| 9        | ■         | ■        | ■       |         |          |           | ■         | ■         |           |           |           |           |           | ■         |
| 10       | ■         | ■        | ■       |         |          |           | ■         | ■         |           |           |           |           |           | ■         |
| 11       | ■         | ■        | ■       |         |          |           | ■         | ■         |           |           |           |           |           | ■         |
| 12       | ■         | ■        | ■       |         |          |           | ■         | ■         |           |           |           |           |           | ■         |

■ : homocigoto; □ : heterocigoto

Los cambios nucleotídicos c.69C>T, c.1103C>T y c.1449C>T no estaban descritos en la base de datos dbSNP, ni en la literatura. Cada uno de ellos fue encontrado en un paciente, por lo que se estima que su frecuencia alélica es baja y podría estimarse que estos cambios nucleotídicos no son polimorfismos. La variación c.2242G>A fue descrita en los pacientes 5 y 8. La tabla 7 presenta las frecuencias de heterocigotos para este cambio nucleotídico en porcentaje, obtenidos en el análisis de distintas poblaciones estudiadas, según los registros publicados en la base de datos dbSNP.

***Tabla 7: Frecuencia de heterocigotos de c.2242G>A en distintas poblaciones según dbSNP.***

| Población    | Etnia          | Sujetos | Frecuencia de heterocigotos (%) |
|--------------|----------------|---------|---------------------------------|
| Cohorte ESP  | Norteamericana | 2276    | 0,44                            |
| Cohorte JPT  | Asiática       | 83      | 1,20                            |
| Cohorte CEU  | Europea        | 111     | 1,80                            |
| Cohorte HISP | Hispanica      | 22      | 4,55                            |

CEU: Residentes de Utah con ancestría del Norte y Oeste de Europa. HISP: registros de muestras de ADN del Coriell Cell Repository. ESP: muestras de ADN del NHLBI GO Exome Sequencing Project. JPT: Japoneses de Tokio.

Según los registros de la base de datos dbSNP, en la muestra EGP HISP panel correspondiente a población hispanica, el resto de los cambios nucleotídicos encontrados en los pacientes están descritos con frecuencias alélicas mayores a 0,34 (Tabla 8), por lo que se consideran como cambios polimórficos.

**Tabla 8:** Frecuencias alélicas de las variaciones nucleotídicas encontradas en la muestra.

| Variaciones nucleotídicas | dbSNP      | Frecuencia alélica |
|---------------------------|------------|--------------------|
| c.69C>T                   | ND         | ND                 |
| c.1103C>T                 | ND         | ND                 |
| c.1449C>T                 | ND         | ND                 |
| c.2242G>A                 | rs28991292 | 0,02               |
| c.1998C>T                 | rs1126797  | 0,34               |
| c.769G>T                  | rs4927611  | 0,34               |
| c.2145C>T                 | rs732608   | 0,40               |
| c.2173A>C                 | rs732609   | 0,40               |
| c.12C>G                   | rs9678281  | 0,43               |
| c.1117G>T                 | rs2280132  | 0,52               |
| c.-125G>A                 | rs2071402  | 0,56               |
| c.1193G>C                 | rs2175977  | 0,66               |
| c.2540T>C                 | rs1126799  | 0,68               |
| c.-80A>G                  | rs2071403  | 0,75               |

ND: No descrito

Por lo tanto, se proponen los cambios c.69C>T, c.1103C>T, c.1449C>T y c.2242G>A, como candidatos a ser patogénicos. En la tabla 9 se resumen las características de dichos cambios nucleotídicos y los pacientes en los que se encontraron.

**Tabla 9:** Cambios nucleotídicos no polimórficos en el gen TPO candidatos a ser patogénicos

| Cambio no polimórfico | dbSNP      | Exón | Efecto sobre proteína | Frecuencia alélica | Paciente |
|-----------------------|------------|------|-----------------------|--------------------|----------|
| c.69C>T               | ND         | 3    | p.Ile23Ile            | ND                 | 5        |
| c.1103C>T             | ND         | 8    | p.Pro368Leu           | ND                 | 5        |
| c.1449C>T             | ND         | 9    | p.Asn483Asn           | ND                 | 10       |
| c.2242G>A             | rs28991292 | 13   | p.Val748Met           | 0,02               | 5 y 8    |

### 11.3- Cambios no polimórficos candidatos a ser patogénicos, encontrados en los pacientes estudiados

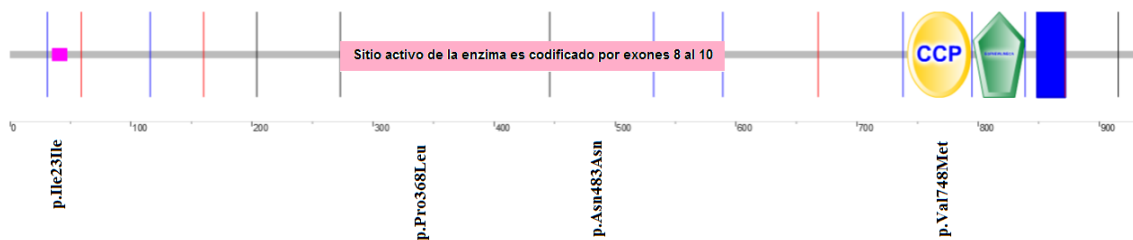
Tal como se muestra en las tablas 6 y 9, en el paciente 5 se detectaron 3 variaciones posiblemente patogénicas. La variación nucleotídica c.1103C>T, heterocigota, que produce el cambio del aminoácido prolina por leucina en la posición 368. Este cambio nucleotídico no se encontró en la base de datos dbSNP, ni ha sido descrita en otras publicaciones. En este mismo paciente también se detectó la variación c.2242G>A, heterocigota, que produce el cambio del aminoácido valina por metionina en la posición 748. Está registrada en la base de datos dbSNP con el número rs28991292. También se detectó en este paciente la variación c.69C>T, heterocigota, sinónima. En el paciente 8 también se encontró el cambio no polimórfico c.2242G>A, en estado heterocigoto. En los pacientes 10 y 5 se encontraron las variaciones sinónimas c.1449C>T heterocigota y c.69C>T heterocigota, respectivamente.

#### 11.4- Criterios de patogenicidad analizados en las variaciones nucleotídicas encontradas:

**A) Análisis de patogenicidad de la variación c.2242G>A:** Este cambio nucleotídico ha sido descrito en la base de datos dbSNP con el registro rs28991292. De acuerdo a la base de datos ClinVar, la significancia clínica de esta variación no está disponible. Es una variación de sentido erróneo que produce el cambio de valina por metionina.

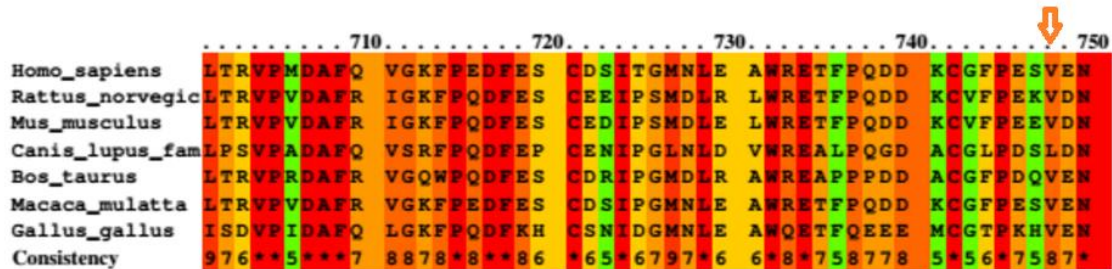
Los criterios de patogenicidad analizados para esta variación fueron:

- Ubicación de la variación en la proteína: La mutación p.val748Met afecta el exón 13, que codifica el dominio CCP, de la región extracelular de la proteína (Figura 4).



**Figura 4:** Ubicación de las mutaciones encontradas en los dominios de la proteína TPO. Esquema obtenido por el programa SMART protein, modificado por los autores.

- Conservación interespecies: El aminoácido valina en la posición 748 es altamente conservado entre diferentes especies según el análisis de alineamiento múltiple realizado con PRALINE, obteniendo un puntaje de 8 de 10. (Figura 5).



**Figura 5:** Conservación entre distintas especies para el cambio aminoacídico valina por metionina en la posición 748. La flecha indica la posición del aminoácido.

- Predicción computacional de patogenicidad del cambio: El cambio del aminoácido valina por metionina en la posición 748 se analizó con el software Polyphen 2, el cual demostró para que es posiblemente patogénico en un 99%, con 70% de sensibilidad y 97% de especificidad. El programa SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>) predice si una sustitución de aminoácido afecta a la función de la proteína, basado en la homología de secuencia entre especies y las propiedades físicas de los aminoácidos. De acuerdo a este programa, este cambio de aminoácido es dañino con un índice de 0.03, en un rango de 0 a 1, siendo dañino si es cercano a 0.

**B) Análisis de patogenicidad de la variación c.1103C>T:** Es una mutación nueva, no ha sido descrita previamente en dbSNP, ni en la literatura. Los criterios evaluados para considerar esta nueva mutación encontrada como patogénica fueron:

- Ubicación de la variación en la proteína: tal como se aprecia en la figura 4, esta variación se ubica en el exón 8, el cual codifica para el sitio activo de la enzima peroxidasa, por lo que podría afectar una función fundamental de la actividad de la proteína. El sitio catalítico de la enzima es codificado por los exones 8 al 10.
- Conservación interespecies: Según el programa PRALINE, la posición 368 no es conservada entre las distintas especies, por lo que éste no sería un criterio que avale su patogenicidad.

|                   | 360.       | 370.       | 380. | 390.       | 400        |            |
|-------------------|------------|------------|------|------------|------------|------------|
| Homo_sapiens      | RVHARLRD   | SG RAYLPF  | VEPR | APAACAPEPG | IPGETRGPCF | LAGDGRASEV |
| Rattus_norvegicus | RVNTLHLD   | SG RAYLPF  | ---- | ASAACAPEPG | APHANRTPCF | LAGDGRASEV |
| Mus_musculus      | RVNTLHLD   | DAG RAYLPF | ---- | ATAACAPEPG | TPRTNRTPCF | LAGDGRASEV |
| Canis_lupus_fam   | RVNTRHWD   | DAG RAHLPF | MRPP | APLACVPEPG | TRGTAGAPCF | LAGDSRASEV |
| Bos_taurus        | RVNARYRD   | DAG RAFLPF | APPS | APPACAPQPG | APGA-RAPCF | LAGDGRASEV |
| Macaca_mulatta    | RVHARLRD   | SG RAYLPF  | APPR | APAACAPEPG | IPGETRGPCF | LAGDGRASEV |
| Gallus_gallus     | RVNSKHND   | NG QEYLPF  | T-DR | VPSPCAQDSN | ASEDERIECF | MAGDSRSSEV |
| Consistency       | **76553*6* | 887***     | 2132 | 8658*88888 | 56443748** | 9***7*8*** |

**Figura 6:** Conservación entre distintas especies para el cambio aminoacídico prolina por leucina en la posición 368. La flecha indica la posición del aminoácido.

- Predicción computacional: Según el análisis con el programa Polyphen 2, para este cambio de aminoácidos concluyó que es posiblemente patogénico, con un porcentaje de 91% con sensibilidad de 81% y especificidad de 94%. Según SIFT, este cambio nucleotídico es tolerado con un índice de 0,26.

**C) Análisis de patogenicidad de la variación c.1449C>T:** Es una variación sinónima. No ha sido descrita en dbSNP, ni en la literatura y se desconoce su frecuencia alélica en la población.

- Predicción computacional: Actualmente se sabe que variaciones sinónimas si pueden ser patogénicas. Uno de los mecanismos descritos es que estos cambios nucleotídicos pueden generar un transcrito primario diferente, con nuevos sitios de splicing, lo cual podría modificar la edición del RNA mensajero <sup>(42)</sup>. Para evaluar lo anterior, se analizó esta variante con el programa HSF 3.0. Según el análisis con este programa, este cambio no crea nuevos sitios de splicing.

**D) Análisis de patogenicidad de la variación c.69C>T:** Es una variación sinónima. No ha sido descrita en dbSNP, ni en la literatura y se desconoce su frecuencia alélica en la población.

- Predicción computacional: Según el programa HSF 3.0, este cambio nucleotídico no crea nuevos sitios de splicing.

Como se resume en la tabla 9, se analizaron los criterios de patogenicidad de estos cuatro cambios nucleotídicos en *TPO* que consideramos no polimorfismos por su baja frecuencia.

El cambio c.69C>T no cumple ningún criterio, por lo que se descartó su patogenicidad. El cambio c.1449C>T es una variación sinónima. Se analizó si este cambio podría producir una alteración en el splicing mediante el programa HSF 3.0 concluyéndose que no lo alteraba, por lo que también se descartó que este cambio nucleotídico sea patogénico.

Las variaciones nucleotídicas c.1449C>T y c.2242G>A, sí cumplieron criterios para ser consideradas como patogénicas. El cambio c.1103C>T produce un cambio de prolina por leucina en la posición 368, la cual no es conservada entre las distintas especies estudiadas. Por esta razón, probablemente al ser analizada por el programa SIFT, que considera, entre otras cosas, la conservación de los aminoácidos de la proteína entre las distintas especies, da como resultado no ser dañina. Sin embargo, al analizar este cambio por el programa Polyphen 2, que considera fundamentalmente el posible impacto de una sustitución de aminoácido en la estructura y función de la proteína, se concluye que este cambio es posiblemente patogénico, con un alto índice de probabilidad. Por lo anterior podría considerarse que este cambio es patogénico. En la literatura se ha publicado el caso de un paciente con hipotiroidismo congénito que presentó la mutación A5T, que al ser analizada por los programas Polyphen 2 y SIFT no resultaba patogénica, sin embargo al realizar el estudio funcional de la tiroperoxidasa, se demostró que producía una pérdida parcial de la función de la enzima, lo cual estaba relacionado a casos de hipotiroidismo congénito, no encontrando esta variación en pacientes sin hipotiroidismo congénito estudiados (<sup>43</sup>).

La variación nucleotídica c.2242G>A produce un cambio de valina por metionina en la posición 748, la cual es altamente conservada entre las distintas especies. Al analizar este cambio con los programas Polyphen 2 y SIFT, en ambos se concluye que sería posiblemente patogénico con alta probabilidad, por lo que podría considerarse este cambio como patogénico.

Faltan estudios funcionales para evaluar los efectos de estas dos variaciones nucleotídicas (c.1103C>T y c.2242G>A), sobre la proteína tiroperoxidasa que avalen la patogenicidad de dichos cambios no polimorfismos encontrados, sin embargo es altamente probable que lo sean, dado los resultados encontrados.



**Tabla 10:** resumen del análisis de los criterios de patogenicidad de las variaciones en *TPO* no polimorfismos encontrados.

| Cambio nucleotídico | Frecuencia Alélica | Efecto sobre la Proteína | Exón | Conservación (0-10) | Análisis computacional  |
|---------------------|--------------------|--------------------------|------|---------------------|---|
| c.69C>T             | ND                 | p.Ile23Ile               | 3    | NE                  | • HSF 3: No crea nuevo sitio de splicing                              |
| c.1449C>T           | ND                 | p.Asn483Asn              | 9    | NE                  | • HSF 3: No crea nuevo sitio de splicing                              |
| c.1103C>T           | ND                 | p.Pro368Leu              | 8    | Baja                | • Polyphen2: posiblemente patogénico (91%)<br>• SIFT: tolerado (0.26) |
| c.2242G>A           | 0.02               | p.Val748Met              | 13   | Alta                | • Polyphen2: Posiblemente patogénico (99%)<br>• SIFT: dañino (0.03)   |

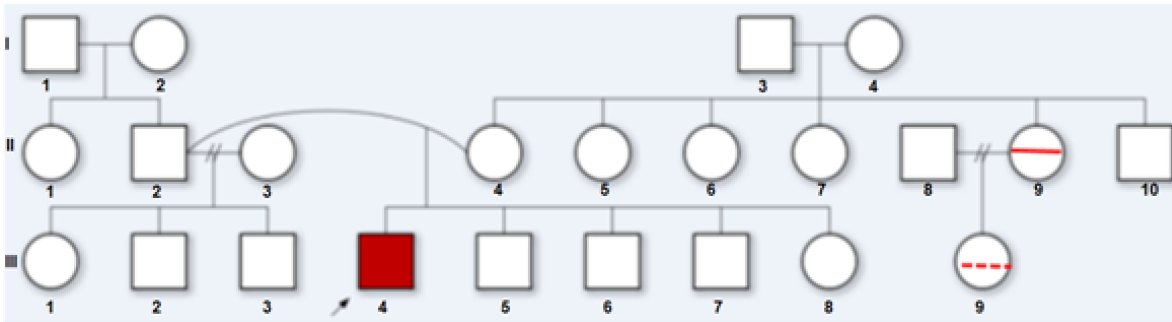
NE: no evaluado, ND: no descrito

### 11.5- Características clínicas y bioquímicas de los pacientes con mutaciones posiblemente patogénicas en *TPO*:

Tal como se aprecia en la tabla 4, los pacientes 5 y 8, que presentaron cambios nucleotídicos posiblemente patogénicas en el gen *TPO*, ambos presentaron hipotiroidismo congénito severo con bocio difuso hipercaptante al cintigrama tiroideo y niveles elevados de TSH en sangre venosa en el examen de confirmación diagnóstica (> 190 uUI/mL). Sin embargo, estas características no serían particulares de ambos, puesto que los pacientes 7, 9, 10,11 y 12 también presentan bocio difuso hipercaptante al cintigrama tiroideo. El paciente 10 también presenta niveles > 190 de TSH en sangre venosa en el estudio de confirmación.

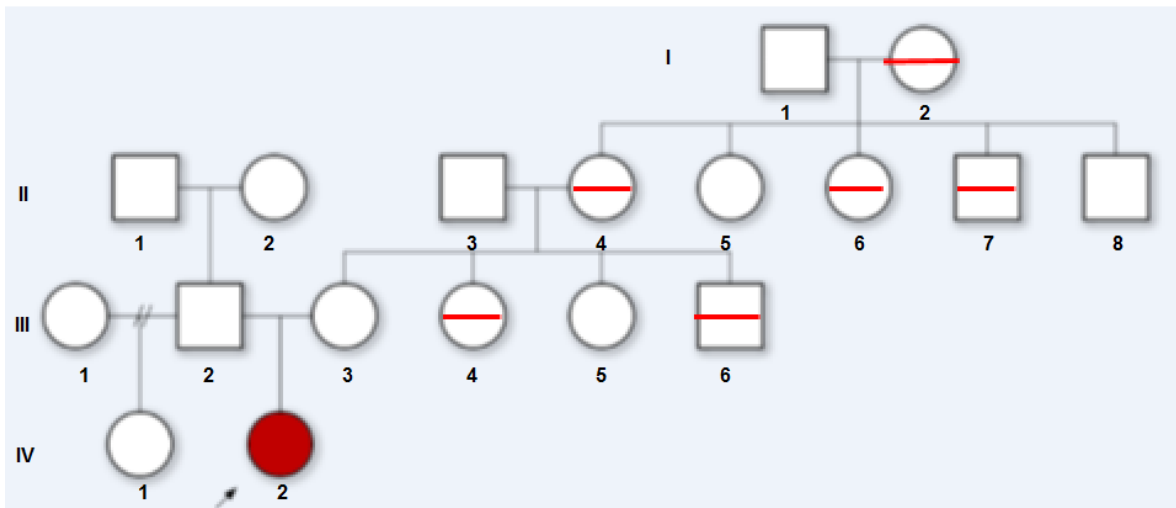
### 11.6- Genealogías de los pacientes con mutaciones en *TPO* encontradas:

En las figuras 7 y 8 se muestran las genealogías de los pacientes, 5 y 8, con mutaciones probablemente patogénicas en *TPO*. Los datos fueron obtenidos mediante una entrevista personal a las madres de los pacientes. Según lo referido por la madre del paciente 5 (Figura 7), el paciente no tiene antecedentes de hipotiroidismo congénito conocido, sin embargo, actualmente un primo hermano (III9) recién nacido del paciente está en estudio por un posible hipotiroidismo congénito. La madre de este niño (II9) presenta hipotiroidismo diagnosticado a los 30 años. La madre refiere no presentar familiares con retardo mental, sin embargo desconoce antecedentes mórbidos por parte de la familia del padre del paciente 5, con quien no tiene contacto.



**Figura 7:** Genealogía Paciente 5

Respecto al paciente 8, la madre refiere no tener antecedentes familiares con hipotiroidismo congénito por línea materna, ni paterna. Sin embargo, varios familiares por línea materna (I2, II4, II6, II7, III4, III6) han sido diagnosticados de hipotiroidismo adquirido en los últimos años. La madre refiere no presentar síntomas de hipotiroidismo (intolerancia al frío, constipación, somnolencia, cansancio, aumento de caída de pelo) y nunca se ha realizado exámenes de hormonas tiroideas. El paciente 8 tampoco tiene antecedentes familiares de retardo mental (figura 8).



- hipotiroidismo congénito persistente
- hipotiroidismo adquirido
- en estudio de posible hipotiroidismo congénito

**Figura 8:** Genealogía paciente 8

## 12) DISCUSIÓN

Se encontraron dos cambios nucleotídicos en *TPO*, candidatos a ser patogénicos para hipotiroidismo congénito por dishormonogénesis. c.1103C>T produce un cambio de prolina por leucina en la posición 368 y la variación nucleotídica c.2242G>A que produce un cambio de valina por metionina en la posición 748. Estos cambios nucleotídicos posiblemente patogénicos fueron encontrados en dos pacientes: El paciente 5, quien es heterocigoto compuesto para las mutaciones c.1103C>T, y c.2242G>A y el paciente 8 quien es heterocigoto simple para c.2242G>A.

Según estudios internacionales, la presencia de pacientes con hipotiroidismo congénito por dishormonogénesis heterocigotos simples para mutación en *TPO* no es infrecuente. Al ser ésta una patología de herencia autosómica recesiva, esto podría explicarse debido a la presencia de una segunda mutación no detectada con el método de amplificación por PCR y secuenciación directa utilizado en este estudio como sería el caso de la presencia de grandes deleciones e inserciones, o mutaciones en el promotor y sitios intrónicos que formen un sitio de splicing alterado.

Un 17% de los pacientes con fenotipo típico y características similares tienen sólo un alelo del gen *TPO* mutado. El primero en estudiar el mecanismo de este fenómeno fueron Fugazzola et al. <sup>(37)</sup> en el año 2003 <sup>(37)</sup>. Ellos reportaron una familia de ambos padres sanos, no consanguíneos, con 3 hijos con hipotiroidismo congénito por dishormonogénesis severo, con déficit total de organificación de iodo (TIOD) y una hija sana. Ambos padres descendían de familias de un pequeño pueblo de Italia. En muestras de DNA de leucocitos, fibroblastos y células del tejido tiroideo del padre sano y los 3 hijos afectados, se encontró la mutación p.R693W, en estado heterocigoto simple. El estudio de mRNA en tejido tiroideo de los pacientes afectados demostró ausencia de transcritos de mRNA del alelo materno normal en los 3 hijos afectados. El análisis realizado descartó la posibilidad de que estos pacientes presentaran grandes deleciones o inserciones en la región 2p25 del cromosoma materno, y la presencia de mutaciones al promotor del gen *TPO*. Se realizó además un estudio de metilación de la región regulatoria del gen *TPO*, que descartó una posible alteración del imprinting materno. Finalmente ellos proponen como explicación a este fenómeno la posible presencia de mutaciones en regiones distantes del gen *TPO*, tales como regiones intrónicas,

que lleven a degradación acelerada del RNAm. En un estudio <sup>(38)</sup> realizado en Argentina en 4 pacientes heterocigotos simples para mutación en *TPO*, se descartó la presencia de una segunda mutación en alguna otra región del mismo gen y se planteó que probablemente presenten una expresión monoalélica del gen mutado. En Brasil <sup>(20)</sup> se ha reportado el caso de un paciente con hipotiroidismo congénito por dishormonogénesis, con test de perclorato positivo, que resultó ser heterocigoto simple para una mutación del gen *TPO*. El paciente no presentó ninguna otra mutación tanto en la región promotora de este gen, como en los genes *DUOX2* o *DUOXA2*. Los autores sugieren una posible expresión monoalélica del gen *TPO* mutado. Recientemente se ha publicado el hallazgo de una delección de 5 exones en el gen *TPO* en pacientes con hipotiroidismo congénito en una familia paquistaní, donde se realizó secuenciación paralela masiva, metodología que permite analizar todas las regiones exónicas codificantes y no codificantes, incluyendo las regiones cercanas involucradas en sitios de splicing y no traduccionales <sup>(44)</sup>.

En nuestro estudio encontramos una frecuencia de 16,6% (2/12) pacientes con cambios nucleotídicos no polimorfismos en *TPO*, lo cual es menor a lo reportado por Rodrigues y cols., 23% <sup>(35)</sup> y Belforte F. y cols., 30% <sup>(15)</sup>, quienes utilizaron similar metodología a la utilizada por nosotros, (amplificación por PCR y secuenciación de Sanger). En dichos estudios, se incluyó a pacientes con antecedentes familiares de hipotiroidismo congénito, no siendo éste un criterio de selección en nuestro estudio, (ver tabla 2). Llama la atención la diferencia con la prevalencia encontrada en los estudios de Wu JY. et cols. 2002 <sup>(36)</sup>, Santos y cols. 1999 <sup>(33)</sup> y Cangül y cols. 2013 <sup>(10)</sup>, cercana al 100%. Esto podría deberse a que estos autores utilizaron criterios de selección más restrictivos, como la presencia de bocio al cintigrama tiroideo y test de perclorato compatible con defecto de la organificación, lo que aumentaría la probabilidad de encontrar pacientes con mutación del gen *TPO* en la muestra seleccionada. Por otro lado, algunos estudios reportan prevalencias menores a las encontradas en el presente estudio (2,4% Hashemipour M et cols., 2012 <sup>(31)</sup> y 13% en Ambrugger et al. 2001 <sup>(32)</sup>). Esto podría explicarse por las distintas metodologías empleadas en el estudio molecular. Es así como, en el estudio de Hashemipour M et cols., 2012 <sup>(31)</sup>, los autores indican que se detectaron pocos casos con mutación posiblemente por la técnica de

análisis de mutaciones empleada (SSCP) cuya sensibilidad es menor a la secuenciación directa. Por otro lado, en el estudio de Ambrugger et al. 2001 <sup>(32)</sup> se analizaron sólo algunos exones del gen *TPO* y no el gen completo, como es el caso de nuestro estudio.

Del punto de vista clínico, el fenotipo de los pacientes con hipotiroidismo congénito por dishormonogénesis con cambios posiblemente patogénicos del gen *TPO* encontrados, presenta mayores niveles de TSH en sangre venosa al momento del diagnóstico en comparación con otros pacientes que no presentaron estas variaciones nucleotídicas. Esto es concordante con el fenotipo esperable, ya que la enzima tiroperoxidasa cumple un rol esencial en la hormonogénesis tiroidea, al realizar las reacciones de oxidación, organificación y acoplamiento, etapas fundamentales para la síntesis de las hormonas tiroideas, T3 y T4.

Fisiológicamente, en recién nacidos sanos de término, inmediatamente posterior al nacimiento se produce un alza de los niveles de TSH en respuesta a la hipotermia relativa al cambio a un ambiente extrauterino, lo cual lleva a un aumento de los niveles de T3 y T4 que permanece hasta aproximadamente el séptimo día de vida, decreciendo posteriormente. Por lo tanto, lo esperable es que un defecto en la acción de ésta enzima tiroperoxidasa se traduzca en un déficit severo y permanente de hormonas tiroideas, presentándose clínicamente con bajos niveles plasmáticos de estas hormonas y, en respuesta, mayores niveles de TSH.

Este mismo hallazgo lo encontró Narumi et al. <sup>(18)</sup> en un grupo de 14 pacientes japoneses con hipotiroidismo congénito por dishormonogénesis. En estos casos se les estudió 7 genes causales de dishormonogénesis tiroidea, entre ellos *TPO*. Se demostró que los pacientes con mutaciones en el gen *TPO* presentaron mayores niveles de TSH en muestra venosa al diagnóstico en comparación a los pacientes con mutaciones en los otros genes estudiados en los que no necesariamente se produce un déficit severo de la síntesis de las hormonas tiroideas.

Además, en nuestro estudio todos los pacientes que presentaban mutaciones posiblemente patogénicas en el gen *TPO* presentaban bocio difuso hipercaptante al cintigrama tiroideo. Esto podría explicarse ya que el defecto producido por una mutación en *TPO* afectaría las etapas posteriores al ingreso al tirocito del radioisótopo tecnecio 99 utilizado en el cintigrama, el cual tiene una estructura similar al yoduro, siendo captado por el tirocito, sin ser

organificado. Lo anterior, permite diferenciar este tipo de dishormonogénesis de las producidas por una mutación del gen que codifica para el receptor de TSH o del cotransportador NIS, en las que hay hipocaptación del radioisótopo al cintigrama tiroideo. (23,39,40). Por otro lado, al tener elevados niveles de TSH, se favorece una rápida captación del radioyodo. (16). Sin embargo, los pacientes 7, 9, 10, 11 y 12 también presentaron bocio difuso hipercaptante. Esto podría explicarse posiblemente porque estos pacientes podrían tener mutaciones en otros genes que afecten la organificación, como por ejemplo *DUOX2*, *TG*, *DUOXA2*, *SLC26A4*.

En este estudio no se realizó test de perclorato a los pacientes, por no estar incluido en el Programa Nacional. De haberse realizado, posiblemente hubiera permitido definir mejor los pacientes candidatos a presentar mutación en el gen *TPO*, ya que este examen permite determinar mejor los pacientes con dishormonogénesis por defectos en la organificación, siendo esto característico de los pacientes con defectos en la enzima tiroperoxidasa, aunque no específico de ello, pues también hay otros genes, distintos de *TPO*, involucrados en esta etapa de la síntesis de hormonas tiroideas, como *DUOX2*, *TG*, *DUOXA2*, *SLC26A4*.

### 13) PRODUCTOS

- **Estudio ganador del 1º lugar, categoría becados, en el 55º Congreso Chileno de Pediatría, Puerto Varas, 2015.**

## 14) CONCLUSIONES

1.- La frecuencia de pacientes con hipotiroidismo congénito con mutaciones en *TPO* en éste estudio fue de 16,6%.

2.- Se encontraron 2 pacientes con mutaciones probablemente patogénicas, un heterocigoto compuesto y un heterocigoto, éste último probablemente presente una expresión monoalélica del gen mutado.

3.- Los pacientes con mutaciones a *TPO* presentan tiroides normotópica con niveles altos de TSH (> 190 uUI/mL) en sangre venosa en el estudio de confirmación y bocio difuso hipercaptante al cintigrama tiroideo, al diagnóstico.

## 15) REFERENCIAS

1. Rastogi MV, La Franchi SH. (2010). Congenital hypothyroidism. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 5:17.
2. Murray MA. (2009). Congenital Hypothyroidism Overview. Utah Department of Health - Newborn Screening Program 1(2).
3. Bernal J. (2005). Thyroid Hormones and Brain Development. *Vitamins & Hormones*. 71: 95–122
4. Cornejo V., Raimann E., Cabello JF., Valiente A., Becerra C., Opazo M., Colombo M. (2010). Past, present and future of newborn screening in Chile. *J Inherit Metab Dis* 33 (3):301–306.
5. Kayode-Adedeji BO, Adetunji AE. (2015). Screening for congenital hypothyroidism: A review of current practices and recommendations for developing countries. *Indian Journal of Basic and Applied Medical Research*. 4(2):204-212.
6. Ministerio de Salud, República de Chile, División de Prevención y Control de Enfermedades (2007). Normas para el óptimo desarrollo de programas de búsqueda masiva de Fenilquetonuria (PKU) e Hipotiroidismo Congénito (HC) y otros errores innatos del metabolismo (EIM).
7. Becerra C. (2008). *Rev Chil Pediatr* 79(1):96-102. Hipotiroidismo Congénito y Fenilcetonuria en el niño.
8. Pombo M. y cols. (2014). *Tratado de Endocrinología Pediátrica*, 4º Edición, Editorial Mc Graw Hill, España.
9. Szinnai G. (2014). Clinical genetics of congenital hypothyroidism. *Endocr Dev Basel, Karger*, 26:60-78.
10. Cangül H., Aycan Z., Olivera-Nappa A., Saglam H., Schoenmakers N., Boelaert K., Cetinkaya S., Tarim O., Bober E., Darendeliler F., Bas V., Demir K., Aydin B., Kendall M., Cole T., Högler W, K. Chatterjee, Barrett T.G., Maher ER (2013).



Thyroid dyshormonogenesis is mainly caused by TPO mutations in consanguineous community. *Clinical Endocrinology* 79:275–281.

11. Grasberger H, Refetoff S. Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dyshormonogenesis. *Current Opinion in Pediatrics*. 2011;23(4):421-428.
12. Moreno JC. Fundamentos Moleculares del Hipotiroidismo Congénito. *An Pediatr* 2004; 60(2):36-41.
13. Mangkalbruks A, Correa B., Wajchenberg B, Knobel M, Cox NJ, DeGroot LJ, Medeiros-Neto G, (1991). Genetic linkage studies of thyroid peroxiase (*TPO*) gene in families with *TPO* deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:471–476.
14. Park SM., Chatterjee VK, (2005). Genetics of Congenital Hypothyroidism. *J Med Genet* 42:379–389.
15. Belforte FS. et cols, (2012). Congenital goitrous hypothyroidism: mutation analysis in the thyroid peroxidase gene. *Clinical Endocrinology* 76, 568–576.
16. Ris-Stalpers C., Bikker H., (2010) Genetics and Phenomics of Hypothyroidism and Goiter due to *TPO* mutations. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 322, 38–43.
17. Avbelij M, Tahirovic H, Debeljak M et al. (2007) High prevalence of thyroid peroxidase gene mutations in patients with thyroid dyshormonogenesis. *European Journal of Endocrinology* 155: 511-519.
18. Narumi S., Muroya K., Asakura Y., Aachi M., Hasegawa T. (2011). Molecular Basis of Thyroid Dyshormonogenesis: Genetic Screening in Population-Based Japanese Patients. *J Clin Endocrinol Metab* 96: 1838–1842.
19. Bakker B., Bikker H., Vulsma T., De randamie J., Wiedijk B. De Vijlder JM. (2000) Two Decades of Screening for Congenital Hypothyroidism in the Netherlands: *TPO* Gene Mutations in Total Iodide Organification Defects (An Update) *J Clin Endocrinol Metab* 85: 3708–3712.
20. Neves SC, Mezalira PR, Dias VM, Chagas AJ, Viana M, Targovnik H, Knobel M, Medeiros-Neto G, Rubio IG. (2010). Monoallelic thyroid peroxidase gene mutation

in a patient with congenital hypothyroidism with total iodide organification defect. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 54(8): 732-737.

21. Abramowicz, MJ et al., (1992). Identification of a Mutation in the Coding Sequence of the Human Thyroid Peroxidase Gene Causing Congenital Goiter. *J. Clin. Invest.* 90:1200-1204.
22. We R, Refetoff S., (2010). Genetic diagnosis of endocrine disorders. 1 Edición, Cap. 8. Pag. 87-93.
23. European Society for Paediatric Endocrinology Consensus Guidelines on Screening, Diagnosis, and Management of Congenital Hypothyroidism (2014), *J Clin Endocrinol Metab* 99:363–384.
24. Kimura S et al. (1987). Human Thyroid Peroxidase: Complete cDNA and protein sequence, chromosome mapping and identification of two alternately spliced mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:5555-5559.
25. Ozbeck MN., (2009). Thyroid peroxidase gene mutations causing congenital hypothyroidism in three Turkish families. *J Pediatr Endocrinol Metab* 22(11):1033-1039.
26. Turkkahraman D., (2010). Analysis of *TPO* gene in Turkish children with iodide organification defect: identification of a novel mutation. *Endocrine* 37(1):124-128.
27. Li HF., (2011). Mutation of thyroid peroxidase gene in 35 patients with congenital hypothyroidism. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 49(8):626-630.
28. Altmann K., (2013). Congenital goitrous primary hypothyroidism in two German families caused by novel thyroid peroxidase (*TPO*) gene mutations. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 121(6):343-346.
29. Lee CC. et cols, (2013). A Novel, Homozygous c.1502T>G (p.Val501Gly) Mutation in the Thyroid peroxidase Gene in Malaysian Sisters with Congenital Hypothyroidism and Multinodular Goiter. *Int J Endocrinol* 2013:987186.

30. Lee CC., (2015). Prevalence of c.2268dup and detection of two novel alterations, c.670\_672del and c.1186C>T, in the *TPO* gene in a cohort of Malaysian-Chinese with thyroid dysmorphogenesis. *BMJ Open*. 5(1): e006121.
31. Hashemipour M., Soheilipour F. (2012). Thyroid Peroxidase Gene Mutation in Patients with Congenital Hypothyroidism in Isfahan, Iran. *International Journal of Endocrinology* 2012;717283.
32. Ambrugger P., Stoeva I., Biebermann H., et al. (2001). Novel mutations of the thyroid peroxidase gene in patients with permanent congenital hypothyroidism. *European Journal of Endocrinology* 145: 19 – 24.
33. Santos CLC, Bikker H, Rego KGM, et al. (1999). A novel mutation in the *TPO* gene in goitrous hypothyroid patients with iodide organification defect. *Clinical Endocrinology* 51: 165–172.
34. Chiesa A., Rivolta C., Targovnik H. Gruñeiro-Papendieck L. Clinical, biochemical, and molecular findings in Argentinean patients with goitrous congenital hypothyroidism. *Endocrine* 38(3):377-385.
35. Rodrigues J, Soares, et al. (2005) Mutation screening of the thyroid peroxidase gene in a cohort of 55 Portuguese patients with congenital hypothyroidism. *European Journal of Endocrinology* 152: 193–19.
36. Wu JY, Shu SG, Yang CF, Lee CC, Tsai FJ. (2002) Mutation analysis of thyroid peroxidase gene in Chinese patients with total iodide organification defect: identification of five novel mutations. *Journal of Endocrinology* 172: 627–635.
37. Fugazzola L, Cerutti N, Mannavola D, Vannucchi G, Fallini C, Persani L, et al. (2003). Monoallelic expression of mutant thyroid peroxidase allele causing total iodide organification defect. *J Clin Endocrinol Metab*. 88: 3264-71.
38. Rivolta CM., Louis-Tisserand M., Varela V., Gruñeiro-Papendieck L., Chiesa A., González-Sarmiento R., Targovnik HM., (2007). Two compound heterozygous mutations (c.215delA/c.2422T-->C and c.387delC/c.1159G-->A) in the thyroid

- peroxidase gene responsible for congenital goitre and iodide organification defect. Clin Endocrinol 67(2): 238-46.
39. Grasberger H (2010). Review Defects of thyroidal hydrogen peroxide generation in congenital hypothyroidism. Molecular and Cellular Endocrinology 322: 99–106
40. Lobo G, Ladrón de Guevara D, Arnello F, Pérez A., Vivanco X, Bruggendieck B., Bustos ME., Jiménez C, Donoso G., Brantes J., Becerra C. (2003). Cintigrafía tiroidea con Tc99m-pertecnectato en recién nacidos con hipotiroidismo congénito. Rev Méd Chile 131 (3): 283-289.
41. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1997). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 1977; 74: 5463-7.
42. Sauna Z., Kimchi-Sarfaty Ch. (2011). Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. Nature Reviews Genetics 12, 683-691
43. Cagül H. et cols. (2015). The Missense Alteration A5T of the Thyroid Peroxidase Gene is Pathogenic and Associated with Mild Congenital Hypothyroidism. J Clin Res Pediatr Endocrinol 7(3):238-241.
44. Zafar Iqbal et cols. (2012). Targeted Next Generation Sequencing Reveals a Novel Intragenic Deletion of the *TPO* Gene in a Family with Intellectual Disability. Archives of Medical Research 43;312-316



