



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLAS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“CUANTIFICACIÓN DE LA HORMONA ESTIMULANTE
DE LA TIROIDES EN RECIÉN NACIDOS POR INMUNOFUOROMETRÍA EN
EL ESTADO DE MICHOACÁN”**

TESIS PROFESIONAL

**Que en cumplimiento para obtener el título de
Químico Farmacobiólogo.**

PRESENTA:

Fabiola Carballo Martínez

ASESORA:

Q.F.B. Rebeca Elizabeth Coyoli Botello

Morelia, Michoacán, agosto 2012



INDICE

1.- INDICE DE TABLAS.....	4
2.- INDICE DE GRAFICAS.....	5
3.- INDICE DE FIGURAS.....	6
4.- ABREVIACIONES.....	7
5.- RESUMEN.....	8
6.- INTRODUCCION.....	9
6.1.- Fisiopatología de la Glándula Tiroides.....	10-15
6.2.- Mecanismo de Retroalimentación de la Glándula Tiroides.....	16-17
6.3.- Efectos de la TSH (de la hipófisis anterior) sobre la secreción tiroidea.....	18
7.- HISTORIA DEL TAMIZ NEONATAL.....	19-23
8.- ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO.....	24
9.- HIPOTIROIDISMO CONGENITO.....	25
9.1.- Causas del Hipotiroidismo Congénito.....	25-26
9.2.- Clasificación del Hipotiroidismo Congénito de acuerdo a su origen.....	27-29
9.3.- Síntomas de Hipotiroidismo Congénito.....	30
9.4.- Tratamiento farmacológico del Hipotiroidismo Congénito.....	31
10.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
11.- HIPOTESIS.....	33
12.- JUSTIFICACION.....	34-35



13.- OBJETIVOS.....	36
14.- IDENTIFICACION DE ESTUDIO.....	37
15.- MATERIAL Y METODOS.....	38-44
16.- RESULTADOS.....	45-50
17.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	51-52
18.- CONCLUSIONES.....	53
19.- ANEXOS.....	54-74
20.- BIBLIOGRAFIA.....	75-78



1.- INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Muestra la frecuencia y el porcentaje de cada jurisdicción 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, (Morelia, Zamora, Zitácuaro, Pátzcuaro, Uruapan, La Piedad, Apatzingán, Lázaro Cárdenas) de acuerdo a la interpretación de resultados.

TABLA 2. Porcentajes de las muestras analizadas de acuerdo a los resultados obtenidos de la jurisdicción 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 (Morelia, Zamora, Zitácuaro, Pátzcuaro, Uruapan, La Piedad, Apatzingán, Lázaro Cárdenas).

Tabla 3. Percentiles calculados

Tabla 4. Preparación de reactivo

Tabla 5. Cantidades a utilizar para la preparación del conjugado de acuerdo al número de placas que se están procesando.

Tabla 6. Cantidades a utilizar para la preparación del sustrato de acuerdo al número de placas que se están procesando.



2.- INDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1. Muestra la frecuencia y el porcentaje de los resultados obtenidos tanto normales como sospechosos para la jurisdicción 1, 2, 3, 4, (Morelia, Zamora, Zitácuaro, Pátzcuaro).

Gráfica 2. Muestra la frecuencia y el porcentaje de los resultados obtenidos tanto normales como sospechosos para la jurisdicción 5, 6, 7, 8, (Uruapan, La Piedad, Apatzingán, Lázaro Cárdenas).

Gráfica 3. . Porcentajes de las 11330 muestras analizadas en el periodo de enero a junio de 2011 de acuerdo a la interpretación de resultados correspondientes a la jurisdicción 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.

Gráfica 4. Muestra la distribución de recién nacidos tamizados en el estado de Michoacán para la hormona estimulante de la tiroides.



3.- INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Glándula tiroides.

Figura 2. Mecanismo de retroalimentación para la regulación de la función tiroidea.

Figura 3. Médico Sir Archibald Garrod.

Figura 4. Dr. Robert Guthrie

Figura 5. Dr. Antonio Velázquez.

Figura 6. . Imágenes que muestran signos de hipotiroidismo congénito.

Figura 7. . Principios básicos de inmunofluorescencia para la determinación de la concentración de una hormona.

Figura 8. . Papel filtro específico para la toma de muestra en tamiz neonatal (whatman 903).

Figura 9. Tarjeta Guthrie.

Figura 10. Lugar adecuado a puncionar para la toma de muestra en el recién nacido

Figura 11. Muestra inadecuada.

Figura 12. Muestra adecuada.



4.- ABREVIACIONES

RN Recién Nacido

TN Tamiz Neonatal

EIM Errores Innatos del Metabolismo

T4 Tiroxina

T3 Triyodotironina

TSH Hormona Estimulante de la Tiroides

TRH Hormona Liberadora de Tirotropina

TBG Globulina Fijadora de Tiroxina

TBPA Prealbúmina Fijadora de Tiroxina o Transtirretina

MID Monoyodotironina

DIT Diyodotironina

HHT Sistema Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides

HC Hipotiroidismo Congénito

SNC Sistema Nervioso Central

GCh Gonadotropina Coriónica Humana

TPO Tioperoxidasa



5.- RESUMEN

El hipotiroidismo congénito (HC) es una enfermedad endocrina que se presenta desde el nacimiento, como consecuencia de la deficiencia absoluta o relativa de hormonas tiroideas durante la etapa intrauterina o bien al momento del nacimiento⁹. En la mayoría de los casos de HC existen muy pocos síntomas y signos, por ello se ha llegado a la implementación de programas de detección oportuna de HC¹. En México, el tamiz neonatal para enfermedades metabólicas se realizó por primera vez en 1973, inicialmente estaba dirigido para la detección neonatal de fenilcetonuria, galactosemia, enfermedad de orina de jarabe de maple, homocistinuria y tirosinemia. Este programa fue cancelado en 1977, a pesar de que se demostró su factibilidad y de que tuvo como resultado el descubrimiento y tratamiento oportuno de varios niños con estas enfermedades. En 1986 se establece un nuevo programa; esta vez dirigido a la detección de hipotiroidismo congénito y fenilcetonuria. Sin embargo, a partir de 1988, la Secretaría de Salud emitió la norma técnica que estableció la prevención del retraso mental causado por hipotiroidismo congénito a través de la realización del examen de tamiz neonatal a todos los recién nacidos, y quedó incorporada con carácter obligatorio en la Norma Oficial Mexicana en 1995^{12,14}. **OBJETIVO.** Establecer un valor de referencia específico para la población de recién nacidos en el Estado de Michoacán a través del tamiz neonatal con la cuantificación de la hormona estimulante de la tiroides "TSH". **MATERIAL Y METODOS.** En el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán se recibieron 11330 muestras de sangre seca depositados en papel filtro, para la cuantificación de la hormona estimulante de la tiroides, obtenidas por punción de talón de recién nacidos provenientes de las 8 diferentes jurisdicciones del Estado de Michoacán. **METODOLOGIA ESTADISTICA.** Se realizó el estudio estadístico y la captura de datos con los programas: Microsoft Excel, Word 2010, SPSS inc Pasw 18.0, Sigmaplot 12.0, OriginLab 8.5.1. **RESULTADOS.** En el Estado de Michoacán uno de cada 2226 recién nacidos (1:2226 R/N), presenta Hipotiroidismo Congénito, con el valor de referencia establecido (9 μ U/L) para la población en edades tempranas en el Estado se logró disminuir las secuelas y los efectos secundarios de esta patología.



6.- INTRODUCCIÓN

El Hipotiroidismo Congénito es la endocrinopatía más frecuente, resulta de la disminución de la cantidad o actividad biológica de las hormonas tiroideas en los tejidos¹, detectable en forma precoz e indudablemente tratable; puede ser debido a distintas causas y produce como estado final una síntesis insuficiente de hormonas tiroideas^{2,3}. Probablemente sea consecuencia también en la mayoría de los casos de un estado de autoinmunidad frente a la glándula, pero de una inmunidad que destruye a la glándula en lugar de estimularla. En la mayoría de estos pacientes, la glándula tiroides padece en primer lugar una “tiroiditis” o inflamación tiroidea, la cual produce un deterioro progresivo, y finalmente, fibrosis de la glándula, con la consiguiente disminución o ausencia de secreción de hormona tiroidea⁴. Este es un defecto al nacimiento que constituye una urgencia pediátrica que, de no recibir tratamiento oportuno, tiene consecuencias graves entre las que destacan el retraso mental irreversible o incluso la muerte⁵.



6.1.- Fisiopatología de la glándula Tiroides

A través del tiempo, la glándula tiroides ha sido objeto de estudio y para su tratamiento ha existido toda una gama de prácticas, que van desde la utilización del pensamiento mágico hasta en las investigaciones basadas en el método científico. Así, los grupos indígenas en Latinoamérica han utilizado collares de ámbar para la cura de enfermedades tiroideas. El bocio ha sido motivo de gran preocupación. Existe evidencia de un documento chino, que data cerca de 3000 a.C., que contenía la que probablemente fue la primera descripción de la presencia de bocio. En el Papiro de Ebers del antiguo Egipto, 1500 a.C., se describen los primeros procedimientos quirúrgicos del bocio y el uso de sal yodada para su profilaxis.

En América, el bocio y el hipotiroidismo han sido endémicos y predominaron en los siglos XVIII, XIX Y XX; los sitios con mayor prevalencia eran el altiplano andino, donde incluso llegó a llamársele “el mal andino”; en México ha predominado en las sierras de Oaxaca, Guerrero, Puebla e Hidalgo. Fray Domingo de Santo Tomás, en 1560, identificó la palabra “*coto*” con el significado de abultamiento de la garganta (bocio) y fue asociada con múltiples nombres y vocablos nativos, como *Coto urco* (cerro de cotos), *Cotoyacu* (agua de coto), lo cual puede sugerir que existían factores geográficos y ecológicos relacionados con el bocio. En cuanto al cretinismo, Crotti refirió, en 1918, que los primeros exploradores de Nueva Granada quedaron anonadados al encontrar los bancos del río Magdalena habitados por una raza de salvajes que pasaban el día durmiendo.



En el aspecto curativo, José María Troya relata el vínculo entre factores geográficos, higiénicos y hereditarios en la etiología del bocio endémico y aporta, además, una clasificación anatómica. Se empezó a conocer el beneficio de la sal de “gema” o “de minas” sal de Tomabela, en las que análisis posteriores han demostrado un alto contenido en yodo. Es probable que durante la Colonia, la ausencia de medidas de control y la desaparición de ciertas costumbres nativas favorecieran el aumento de la enfermedad.

En 1867 ya se planteaba la posibilidad de alteraciones neurológicas y mentales heredadas relacionadas con el bocio endémico. Avendaño mencionaba que era más frecuente en mujeres de clase social baja, y que se combatía con yoduro y buena alimentación.

En el siglo XX, los avances en el conocimiento acerca de su etiología, fisiopatología, bioquímica e histología generaron cambios importantes; ya que en los decenios de 1920 a 1929 y 1930 a 1939 se propuso el tratamiento quirúrgico y se introdujo el metabolismo basal en el estudio de las enfermedades tiroideas. En el decenio de 1950-1959, organizaciones internacionales colaboraron para el desarrollo de estudios nacionales y encuestas epidemiológicas en los diferentes países de América (OMS, OPS, UNICEF), además, se expidieron leyes para yodación de la sal en casi todo ese continente, desde México hasta Argentina y a partir de 1940 en Perú y hasta 1983 en Bolivia.

Desde hace más de dos siglos se ha reconocido el déficit de hormona tiroidea como causa de retardo en el crecimiento y desarrollo. Curling, en 1850, describió la primera autopsia de un niño con manifestaciones de hipotiroidismo congénito y ausencia de la glándula tiroides, y Osler relaciono la deficiencia de la función tiroidea y los cambios característicos encontrados en el cretinismo esporádico.



Bruch y McCune, en 1944, describieron el desarrollo mental de niños con hipotiroidismo que recibieron tratamiento adecuado, concepto que fue ampliado por Smith *et al.* En 1957, al revisar 128 casos; Klein *et al.* establecieron que el tratamiento antes de los tres meses de edad mejora el pronóstico neurológico de los niños. En la actualidad, se reconoce que la sustitución de hormonas tiroideas debe realizarse en los primeros 28 días de nacido; Jacobsen y Brandt fundamentaron, en la falta de los síntomas y signos, la falta de diagnóstico temprano. El hipotiroidismo congénito es la causa evitable más frecuente de retraso mental en recién nacidos; desde finales del decenio de 1960-1969 y principios de 1970-79 se iniciaron los primeros intentos de tamizaje⁶.

El esbozo de la glándula tiroides se origina en los embriones de 3 mm, está localizada en la porción anterior del cuello, va desde la quinta vértebra cervical hasta la primera torácica, y se encuentra dentro del triángulo muscular del cuello; como una pequeña invaginación del endodermo situado en el piso de la faringe detrás del tubérculo lingual medio. La glándula tiroides es el primero de los derivados faríngeos en completar su diferenciación. En los embriones de cuatro semanas se origina, a partir del piso de la faringe, un divertículo medio, a nivel cefalocaudal⁶, la forma bilobular del tiroides fetal se reconoce ya a las 7 semanas de gestación y la formación característica de las células foliculares y del coloide tiroideo tiene lugar a las 10 semanas. La tiroglobulina comienza a sintetizarse a partir de la cuarta semana, el yodo queda atrapado a las 8 y 10 semanas y la síntesis y secreción de tiroxina (T_4) y, en menor medida, de triyodotironina (T_3) se inician a partir de las 12 semanas, al igual que la TSH. En la segunda mitad de gestación madura el eje hipotalámico-hipofisiario-tiroideo, pero las relaciones normales mediante retroalimentación no lo hacen hasta el 1^{er} y 2^o mes de vida posnatal⁷. Bien diferenciada, la mayor parte de su asa consiste ahora en dos lóbulos que se extienden a los lados de la línea media, con un istmo estrecho de tejido que los une⁶.



El istmo del tiroides se localiza justo por debajo del cartílago cricoides, a media distancia entre la porción saliente del cartílago tiroides (“manzana de Adán”) y la escotadura suprarrenal. Cada lóbulo tiene apariencia de pera y mide alrededor de 2.5 cm a 4 cm de longitud, 1.5 a 2cm de ancho y de 1 a 1.5cm de grosor. El peso de la glándula en el individuo sano, determinado por examen de ultrasonido, varía según la ingestión de yodo en la dieta, edad y peso corporal, pero en los adultos es aproximadamente de 10 a 20g. El crecimiento de la glándula tiroides hacia arriba está limitado por la inserción del músculo esternotiroideo al cartílago tiroides; sin embargo, el crecimiento hacia atrás y abajo no está limitado, por lo que la hipertrofia tiroidea o bocio, con frecuencia se extenderá en esa dirección o incluso será subesternal⁸ (fig. 1).

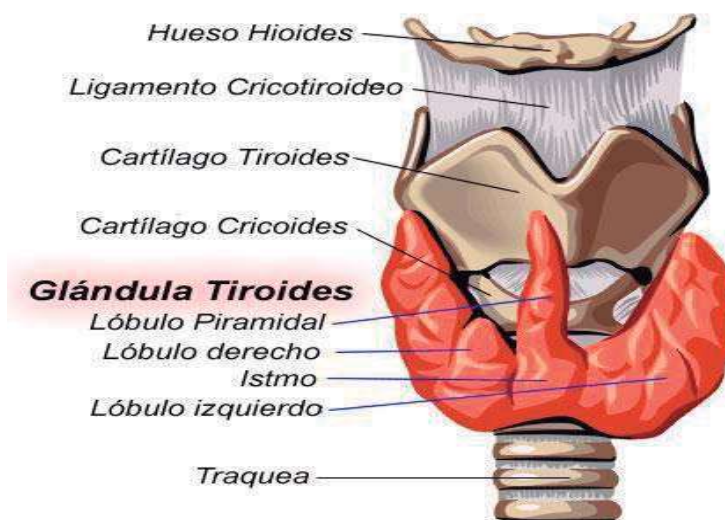


Fig.1 Glándula tiroides (www.medicinayprevencion.com/tiroides.htm)



La glándula tiroides está compuesta por un gran número de folículos cerrados (100 a 300 micrómetros de diámetro) rellenos de una sustancia secretora denominada coloide, y revestidos por células epiteliales cuboideas que secretan al interior de los folículos⁴. La unidad funcional de la glándula tiroides, es el folículo, el cual tiene forma oval o redonda.

La función normal de la glándula tiroides consiste en la secreción de L-tiroxina (T_4) que constituye alrededor del 93% de las hormonas metabólicamente activas secretadas por la glándula tiroides y 3, 5,3'-triyodo-L-tironina (T_3) el 7% restante de las hormonas tiroideas activas e influyen en múltiples procesos metabólicos^{2,4}.

La T_4 sérica del feto aumenta progresivamente desde la mitad del embarazo hasta alcanzar 11.5 $\mu\text{g/dL}$ al término del mismo. Los niveles de T_3 son reducidos antes de la semana 20, y luego se elevan poco a poco para llegar a 45 ng/dL al final del embarazo. En cambio los niveles de T_3 inversa están muy altos en el feto (250 ng/dL a las 30 semanas) y descienden hasta 150 ng/dL al llegar a término. Los valores séricos de TSH se incrementan gradualmente hasta 10 $\mu\text{U/L}$ a término. Aproximadamente un tercio de la T_4 atraviesa la placenta hasta llegar al feto. La T_4 materna puede desempeñar un papel en el desarrollo fetal, especialmente del cerebro, antes de que comience la síntesis de hormonas tiroideas fetales. El feto de una madre hipotiroidea puede sufrir lesiones neurológicas, mientras que un feto hipotiroideo puede estar parcialmente protegido por la T_4 materna hasta el momento del parto. Al nacer se produce una liberación brusca de TSH; la concentración sérica máxima llega a 60 $\mu\text{U/L}$ en 30 minutos en los lactantes nacidos a término.



El aumento brusco de TSH produce una elevación espectacular de la cifra de T_4 hasta aproximadamente $16 \mu\text{g/dL}$, y de T_3 que llega hasta cerca de 300 ng/dL en unas 4 horas. Esta T_3 deriva, al parecer del aumento de la conversión periférica de T_4 en T_3 . Los niveles de T_4 disminuyen gradualmente durante las dos primeras semanas de vida hasta $12 \mu\text{g/dL}$. Luego los niveles de T_3 descienden en la primera semana de vida y alcanzan cifras inferiores a 200 ng/dL . Las concentraciones séricas de T_3 libre se aproximan a 540 pg/dL en la lactancia y disminuyen hasta $210\text{-}440 \text{ pg/dL}$ en la infancia. Los valores de T_3 inversa se mantienen durante 2 semanas (200 ng/dL), y a las 4 semanas descienden a unos 50 ng/dL . Pequeñas cantidades de T_4 atraviesan la placenta, pero no bastan para impedir el diagnóstico de hipotiroidismo congénito en recién nacidos⁷.

Hacia el final de la vida intrauterina y durante el período neonatal, las hormonas tiroideas son esenciales para el crecimiento y desarrollo del sistema nervioso y esquelético. La falta de hormonas tiroideas en etapa intrauterina es de graves consecuencias, origina retraso de la maduración ósea, la falta de tratamiento en los primeros meses de vida de los niños afectados, ocasiona retraso mental irreversible⁹.



6.2.- Mecanismo de Retroalimentación de la Glándula Tiroides

La TRH es un tripéptido de 26kd, producido en el núcleo paraventricular y la eminencia media del hipotálamo; la producción y la liberación son favorecidas por una disminución en los valores séricos de las hormonas tiroideas, e inhibidas por un incremento de las mismas. Su efecto principal es sobre las células tirotropas de la hipófisis anterior para la liberación de TSH⁶.

La tirotropina (hormona estimulante de la tiroides, TSH) es una glicoproteína de 28 kd, con un ritmo cardíaco y pulsátil de secreción (15 a 30 $\mu\text{g/día}$), con una vida media de 50 a 80 min, secretada por las células basófilas de la hipófisis anterior, se compone de dos subunidades, α y β , unidas de modo no covalente^{10,8,6}, característica que le otorga especificidad, se produce en las células tirotróficas, que constituyen aproximadamente el 5% de las células de la hipófisis anterior; regula la biosíntesis, el almacenamiento y la liberación de las hormonas tiroideas y determina el tamaño de la glándula tiroidea y aparece inicialmente en la hipófisis fetal a las 10 semanas de gestación². La subunidad α es común a las otras dos glucoproteínas hipofisarias, FSH y LH, y también a la hormona placentaria hCG; para la subunidad β es diferente para cada hormona glucoproteica y confiere propiedades específicas de fijación y actividad biológica. La subunidad α humana tiene un núcleo apoproteínico de 92 aminoácidos y contiene dos cadenas de oligosacáridos; la subunidad β de la TSH posee un núcleo apoproteínico de 112 aminoácidos y una cadena de oligosacáridos. Las cadenas de aminoácidos de las subunidades α y β de la TSH forman tres asas que se entremezclan en una estructura similar a nudo, denominada “nudo de cistina”^{10, 8, 6}. La liberación de TSH es inducida por la hormona hipotalámica, la TRH (hormona liberadora de la tirotropina)¹. La regulación de la función tiroidea es compleja y, al igual que las glándulas endocrinas, está basada en un mecanismo de retroalimentación (fig.2), que actúa a través del hipotálamo y de la hipófisis anterior para controlar la secreción tiroidea^{1, 4}.

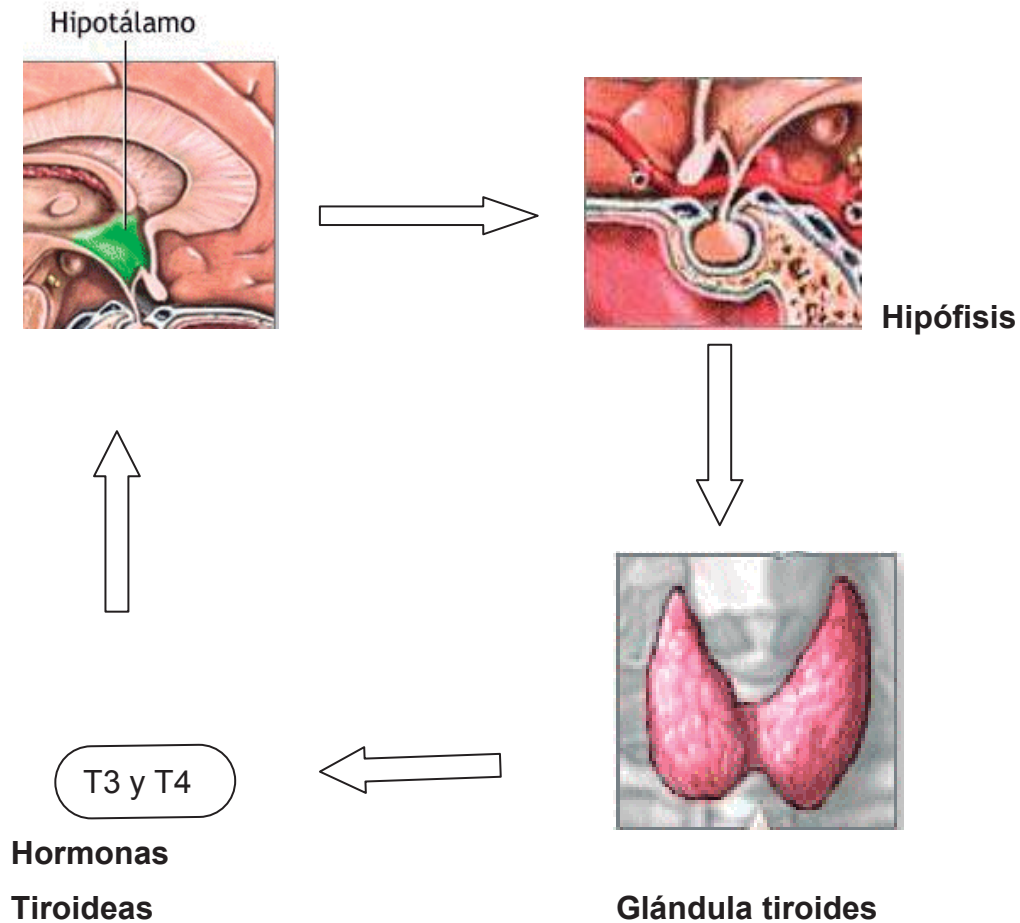


Fig. 2. Mecanismo de retroalimentación en la que T3 y T4 llega al hipotálamo para que se lleve a cabo la secreción de TRH, luego se desplaza a la glándula pituitaria o hipófisis que segrega la hormona estimulante de la tiroides (TSH), la cual estimula la glándula tiroides a que segregue hormonas tiroideas T4 y T3. (<http://www.juntadeandalucia.es/averroes/~29701428/salud/endocri.htm>)



6.3.- Efectos de la TSH (de la hipófisis anterior) sobre la secreción tiroidea

Los efectos específicos sobre dicha glándula son los siguientes:

1. Aumento de la proteólisis de la tiroglobulina ya almacenada en los folículos, con la liberación subsiguiente de hormonas tiroideas a la sangre circulante.
2. Aumento de la actividad de la bomba de yodo, que aumenta la tasa de “atrapamiento de yodo” en las células glandulares, aumentando en ocasiones la relación entre concentración de yodo intracelular y extracelular hasta ocho veces su valor normal.
3. Aumento de la yodación de tirosina y aumento del acoplamiento para formar hormonas tiroideas.
4. Aumento del tamaño y de la actividad secretora de las células tiroideas.
5. Aumento del número de células tiroideas junto con el paso de células cuboideas a cilíndricas y gran plegamiento del epitelio tiroideo hacia el interior de los folículos.
6. La secreción de TSH está regulada por un mecanismo de retroalimentación negativo, que actúa directamente sobre la hipófisis y se halla en relación principalmente con la concentración de T_3 libre en sangre, guardando con ella una reacción inversa⁴.



7. - HISTORIA DEL TAMIZ NEONATAL

Resulta maravilloso, y al mismo tiempo impresionante, que la casi totalidad de las células de los seres vivos comparten los mismos tipos de reacciones químicas (bioquímicas). La selección natural ha conservado a través de la evolución biológica las vías metabólicas que en forma más eficiente permiten a los seres vivos adaptarse al entorno que les rodea. La historia del escrutinio de los recién nacidos para identificar errores del metabolismo inició con las ideas del Médico Inglés Sir Archibald Garrod en 1902 (fig.3), quien señaló la posibilidad de la herencia de defectos químicos específicos en el metabolismo^{6,12}. La fenilcetonuria, anomalía descrita en 1934, fue la primera enfermedad que se buscó identificar en forma temprana durante la infancia, inicialmente a través de tamizaje de la orina, utilizando cloruro férrico¹².



Fig.3 Médico Inglés Sir Archibald Garrod



En 1961, el Dr. Robert Guthrie (fig. 4), desarrolló la prueba de tamiz mediante la recolección de gotas de sangre en papel filtro para la detección de fenilcetonuria. La prueba se basa en un ensayo de inhibición bacteriana, utilizando un antimetabolito análogo de la fenilalanina. Posteriormente, el mismo principio fue empleado para identificar otras anomalías del metabolismo de histidina y aminoácidos como: metionina, lecitina y tirosina^{12, 13}. En el año de 1963, Guthrie y Susi reportaron los resultados del diagnóstico de errores congénitos del metabolismo en la etapa perinatal con el uso de un método rápido, que se podría utilizar como prueba de escrutinio. A raíz de estos hallazgos, tomó interés la implementación de las pruebas de tamizaje neonatal. La prueba de tamiz neonatal se inició en los Estados Unidos de Norteamérica ese mismo año¹².

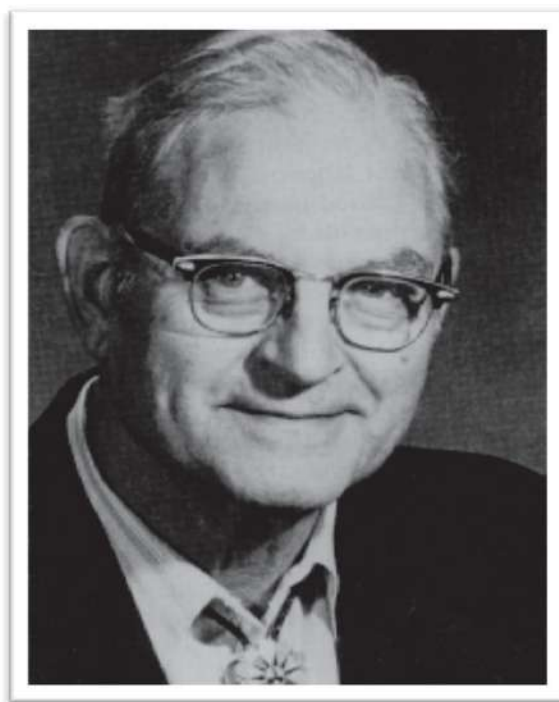


Fig. 4 Dr. Robert Guthrie



En 1963, el Dr. Antonio Velázquez (fig. 5) inició un programa de Tamiz Neonatal en México, el primero en América Latina, para Hipotiroidismo Congénito. En nuestro país el Tamiz Neonatal se inició formalmente en 1988 con la expedición de la Norma Técnica 321, y actualmente su realización es una acción obligatoria para todos los centros que brindan atención materno infantil, según lo establece la Norma Oficial Mexicana 007-SSA2-1993¹⁴.

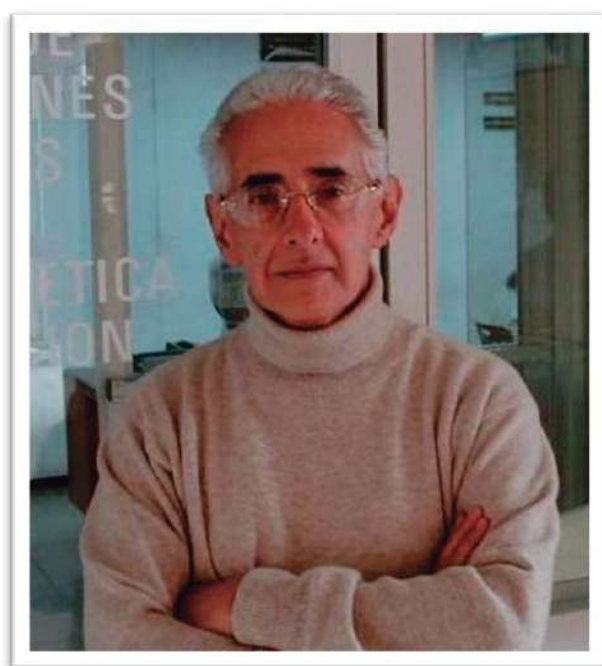


Fig.5 Dr. Antonio Velázquez



En 1973 se estableció el primer Programa de Tamiz para Hipotiroidismo Congénito, siendo Canadá el primer país en implementarlo, seguido por los Estados Unidos en 1975¹². En México, el tamiz neonatal para enfermedades metabólicas se realizó por primera vez en 1973. Inicialmente estaba dirigido para la detección neonatal de fenilcetonuria, galactosemia, enfermedad de orina de jarabe de maple, homocistinuria y tirosinemia. Este programa fue cancelado en 1977, a pesar de que se demostró su factibilidad y de que tuvo como resultado el descubrimiento y tratamiento oportuno de varios niños con estas enfermedades. Se establece un nuevo programa en 1986, esta vez dirigido a la detección de hipotiroidismo congénito y fenilcetonuria. A partir de 1988, la Secretaría de Salud emitió la norma técnica que estableció la prevención del retardo mental causado por hipotiroidismo congénito a través de la realización del examen de tamiz a todos los recién nacidos, y quedó incorporada con carácter de obligatoriedad en la Norma Oficial Mexicana en 1995^{12, 14}.

Sin duda alguna uno de los avances más importantes en el manejo del hipotiroidismo congénito ha sido la puesta en marcha de los programas de cribaje neonatal del hipotiroidismo primario, ya que está permitiendo instaurar el tratamiento precozmente y evitar el retraso mental de los niños detectados¹⁵. El Tamiz Neonatal para la detección de Errores Innatos del Metabolismo (EIM) es una medida de salud pública dirigida a identificar de manera temprana los trastornos en el recién nacido aparentemente sano, antes de que se manifieste una enfermedad y establecer el diagnostico oportuno de enfermedades graves e irreversibles^{16,17,18}. Tamiz significa “colar” o “filtrar” en una población con el objeto de separar a los individuos que presentan alguna característica distinta a los demás¹⁵. Se practica en gotas de sangre capilar, usualmente obtenidas del talón y colectadas en papel filtro específico llamado “Tarjeta de Guthrie”. Ha sido efectivo para el diagnostico precoz de enfermedades que cursan con retraso mental y otras manifestaciones graves como: Hipotiroidismo Congénito, Fenilcetonuria, Galactosemia e Hiperplasia Suprarrenal Congénita¹⁷.



Dada la importancia del diagnóstico oportuno de los EIM, para reducir la morbilidad y prevenir la presencia de retraso mental, en la mayoría de los países desarrollados lleva a cabo programas de Tamizaje Neonatal¹⁶.

Los métodos analíticos, adaptados al estudio de sangre impregnada en papel filtro, son susceptibles de ser afectados por factores externos que alteran los resultados. Los problemas que ocurren con mayor frecuencia en la realización de las pruebas de laboratorio se relacionan con; obtención y conservación de las muestras, e interferencias analíticas ocasionadas por los fármacos. Las muestras de los pacientes que permanecen en tratamiento afectan los resultados (el laboratorio debe conocer el tratamiento que recibe cada individuo). Es importante la conservación, el transporte y la distribución de las muestras; las variantes en este proceso son de gran valor en la calidad del ensayo analítico¹⁸.



8.- ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO

Los errores congénitos del metabolismo se definen como alteraciones bioquímicas de origen genético debidas a errores innatos de la estructura o función de las moléculas proteicas. Muchos de los errores congénitos comportan consecuencias clínicas y patológicas que son consecuencia directa de una alteración bioquímica específica, pero la importancia de estos procesos en el estudio de la biología humana trasciende considerablemente su impacto clínico. El estudio de determinados errores congénitos del metabolismo ha sido imprescindible para definir las vías y mecanismos bioquímicos normales²¹.



9.- HIPOTIROIDISMO CONGENITO

El hipotiroidismo congénito es una enfermedad endocrina que se presenta desde el nacimiento, como consecuencia de la deficiencia absoluta o relativa de hormonas tiroideas durante la etapa intrauterina o bien al momento del nacimiento. Ocasiona retraso mental, discapacidad intelectual y motriz severa, en los casos no tratados puede llevar a la muerte⁹. Se considera que existe hipotiroidismo congénito cuando las hormonas tiroideas ejercen una acción deficiente sobre las distintas células del organismo¹¹. Las causas congénitas de hipotiroidismo pueden ser esporádicas o familiares. En muchos casos, el déficit de hormona tiroidea es intenso y los síntomas aparecen en las primeras semanas de la vida. Entre otros el déficit es menos intenso y las manifestaciones se retrasan meses o años⁷.

9.1.- Causas de Hipotiroidismo Congénito

Déficit-hipotálamo-hipofisario

Todas las malformaciones congénitas que afectan al área hipotálamo-hipofisaria pueden ocasionar, entre otros déficit, carencia de TRH o de TSH y, secundariamente, un hipotiroidismo. Existen también trastornos congénitos, familiares o esporádicos de la secreción de TRH o de TSH, que pueden presentarse como déficit aislados o formando parte de una deficiencia combinada de hormonas hipofisarias.



Disgenesia tiroidea

Comprende diversas alteraciones en el desarrollo embrionario de la glándula tiroides: agenesia, hipoplasia, disgenesia y ectopia. En términos generales se emplea el término “disgenesia tiroidea” para referirse tanto a las agenesias, como a las hipoplasias y disgenesias propiamente dichas. Es la causa de hipotiroidismo congénito (80-90% de los hipotiroidismos primarios permanentes). Es más frecuente en niñas que en niños (2/1). Su forma de presentación más habitual es la esporádica. La etiopatogenia de esta anomalía, como ocurre en muchos síndromes malformativos, es desconocida; se ha sugerido una causa autoinmune, donde un proceso autoinmune materno con transmisión pasiva de anticuerpos al feto, conduciría a la inducción de un hipotiroidismo congénito, permanente o transitorio, no existiendo correlación entre la existencia de tiroiditis autoinmune materna, o presencia de anticuerpos anti-tiroglobulina o antimicrosomales y la aparición de disgenesia de tiroides. En algunos casos, se han encontrado en la madre anticuerpos antirreceptor de TSH, pero el papel de estas inmunoglobulinas en la patogenia de la disgenesia tiroidea no ha sido bien establecido. Otras teorías serían: infecciosas, embriopatías y genéticas⁷.



9.2.- Clasificación del hipotiroidismo congénito de acuerdo a su origen puede ser:

- **Hipotiroidismo congénito primario.** Es la insuficiencia para la síntesis de hormonas tiroideas por alteración primaria de la glándula tiroides, con un eje hipotálamo-hipófisis íntegro y constituye la mayoría de los casos de HC.
- **Hipotiroidismo congénito secundario.** En el que la alteración se localiza a nivel de la hipófisis y una secreción deficiente de tirotropina (TSH) impide la adecuada estimulación de la biosíntesis y secreción de las hormonas tiroideas de una glándula tiroidea normal.
- **Hipotiroidismo congénito terciario.** Cuando el defecto se encuentra en el hipotálamo y la falta de producción y secreción de TRH impide el funcionamiento de eje hipotálamo-hipofisario-tiroideo.



El hipotiroidismo primario puede ser de dos tipos:

- Permanente por disgenesia tiroidea (agenesia, hipoplasia y ectopia) o por alteración bioquímica (dishormogénesis)
- Transitorio (iatrogenia, deficiencia de yodo)

Causas de hipotiroidismo congénito primario permanente

- Agenesia, es la ausencia de tejido tiroideo funcional, es la más frecuente se presenta en el 40% de los casos.
- Hipoplasia, es un deficiente desarrollo de la glándula tiroides, el tejido existente es pequeño llamado “nódulo tiroideo”.
- Ectopia, el tejido tiroideo funcional de localización extracervical, se asocia con hipoplasia, la más frecuente es el “nódulo sublingual”, el 50-60 % de HCP se deben a esta alteración.
- Dishormogénesis: Existe tejido tiroideo, presenta defecto parcial o total en los procesos bioquímicos de síntesis y secreción de hormonas tiroideas. Se presenta en el 5 % de los casos⁹.

En la mayoría de los casos de hipotiroidismo congénito existen muy pocos síntomas y signos de carencia de hormonas tiroideas, motivo por el que el diagnóstico clínico se suelen retrasar. En grandes series clínicas analizadas retrospectivamente, se comprueba que apenas un 5% de los hipotiroidismos en esta época de la vida presentan el cuadro clínico característico. Los síntomas y signos que con más frecuencia suelen encontrarse en los primeros meses son: somnolencia, dificultades en la alimentación, estreñimiento, ruido nasal, ictericia neonatal prolongada y llanto ronco; además en la exploración se pueden encontrar diversos signos, como hipotermia, bradicardia, alteraciones del tono muscular, fontanela, piel y pelo seco, macroglosia, hernia umbilical y aspecto general tosco¹ (fig. 6).



Fig.6 Imágenes que muestran signos de Hipotiroidismo Congénito. Departamento de Tamiz Neonatal, Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP), Morelia Michoacán.

Por ello se ha llegado a la implementación de los programas de detección oportuna de Hipotiroidismo Congénito permitiendo analizar primero a la tiroxina (T_4), y, posteriormente, la hormona estimulante del tiroides (TSH)¹ de gotas de sangre seca en papel filtro.



9.3.- Síntomas de Hipotiroidismo Congénito

En los bebés hay diferentes síntomas de hipotiroidismo congénito, los más evidentes son:

- ❖ Piel: algunos bebés con hipotiroidismo congénito presentan la ictericia (color amarillento) del recién nacido durante más tiempo que el usual. Su piel puede verse pálida o con manchas.
- ❖ Apetito o digestión: es posible que los bebés con hipotiroidismo congénito no deseen alimentarse. Puede ser difícil mantenerlos despiertos mientras se les alimenta. Pueden estreñirse mucho.
- ❖ Crecimiento: los recién nacidos con hipotiroidismo congénito a menudo son grandes y, si no se les trata, generalmente muestran un retraso en el crecimiento y poco aumento de peso.
- ❖ Circulación: los bebés con hipotiroidismo pueden tener un ritmo cardíaco lento y presión sanguínea baja. Sus manos y pies pueden sentirse fríos. Esto se debe a una circulación deficiente.
- ❖ Actividad y desarrollo: los bebés con hipotiroidismo congénito a menudo son tranquilos y no lloran mucho. Es posible que no les interese ver o escuchar lo que les rodea. Pueden dormir durante largo tiempo, por lo que hay que despertarlos para alimentarlos. Al levantarlos se les puede sentir flácidos o “flojos”.



9.4.- Tratamiento farmacológico para el Hipotiroidismo Congénito

El medicamento de elección es la Levo-tiroxina sódica, la dosis recomendada es de 12 a 15 µg/kilo de peso/día⁹.

- Se administra por vía oral, en una sola dosis, en la mañana en ayuno, la tableta se hace polvo y se mezcla con agua en una cucharita, se administra sujetando la mandíbula y vaciar el contenido para que el niño/a lo trague, ésta debe ser ingerida.
- No se debe administrar con jeringa, ni en biberón, ni en vaso.
- Debe administrarse en ayuno, en niños o niñas que reciben lactancia materna puede ser incluso 10 minutos antes de la siguiente toma, cuando reciben otros alimentos o sucedáneos de la leche deben cumplir ayuno de 30 minutos antes del siguiente alimento.
- En casos especiales como niños o niñas con compromiso cardiopulmonar la dosis de L-tiroxina se debe de instalar paulatinamente.
- No se debe suspender.
- El médico que realiza el seguimiento deberá ajustar la dosis de acuerdo a los resultados del perfil tiroideo. En casos excepcionales, que no se cuente con resultados de perfil tiroideo, se podrán utilizar las dosis ponderales de la tabla.
- El perfil tiroideo deberá realizarse al paciente en ayuno, sin haber recibido la dosis de ese día, misma que debe administrar una vez extraída la muestra de sangre.
- Deberá enviar al niño o niña a un programa básico de estimulación temprana y a medicina física y rehabilitación a aquellos que tengan un riesgo mayor de daño neurológico⁹.



10.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel mundial el hipotiroidismo congénito es un problema importante de salud, ya que es la primera causa de discapacidad prevenible en recién nacidos, en la que las hormonas tiroideas son de importancia crítica para el crecimiento físico y el desarrollo mental en los niños. Existen en el mercado diferentes metodologías con valores de referencia ya establecidos a nivel mundial para todo tipo de población, que en muchas de las ocasiones los rangos no corresponden a una compatibilidad clínica en poblaciones de Latinoamérica. Por ello es transcendental la investigación de un valor de referencia específico para el Estado de Michoacán.



11.- HIPÓTESIS

Con el valor de referencia de 9 $\mu\text{U/L}$ establecido, se logró contribuir a la disminución de las graves consecuencias de la discapacidad secundaria a hipotiroidismo congénito en recién nacidos.



12.- JUSTIFICACION

Por la demanda y necesidad del sistema sanitario, implicado con los programas de prevención de la discapacidad causada por los errores innatos del metabolismo (EIM), de proponer un valor de referencia para su población para la detección precoz de hipotiroidismo congénito en edades tempranas.

El valor de referencia límite sugerido por el fabricante y a las indicaciones del CDC es de 10 $\mu\text{U/L}$.

Debido a la inexistencia de un valor de referencia establecido y exclusivo para la población mexicana, pero en este caso a la población de recién nacidos en el Estado de Michoacán, y con apoyo de estudios médicos realizados en los recién nacidos nos vemos en la necesidad disminuir el valor de referencia a 9 $\mu\text{U/L}$, para evitar que recién nacidos se queden sin la atención medica a tiempo y que en días posteriores podrían presentar signos de esta patología, como bien sabemos esta es una enfermedad que en muchas ocasiones los recién nacidos no presentan signos y síntomas de Hipotiroidismo Congénito.

Puesto que los estudios son realizados en una población distinta a la nuestra el fabricante del reactivo y el CDC recomienda firmemente que cada laboratorio establezca su valor de referencia considerando los diferentes factores genéticos y ambientales que actúan sobre cada población²².

Lo anterior repercute en un costo económico importante para las diferentes instituciones de salud y para el país en general por lo que representa a nivel social, familiar e individual.

El costo de un caso identificado equivale a la cuarta parte del gasto del cuidado institucionalizado de un individuo afectado con retraso mental no diagnosticado a tiempo, además del invaluable impacto familiar y social que se presenta en la convivencia y el manejo diario de un niño con retraso psicomotor²².



Con esta intervención se espera la eliminación de los costos multifactoriales de la discapacidad y los gastos que genera en las familias y en los servicios de salud los conceptos por estancia hospitalaria, atención de las secuelas y la rehabilitación; coadyuvando también de forma directa en la disminución de la morbilidad y la mortalidad neonatal en el Estado de Michoacán⁹.



13.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Establecer un valor de referencia específico para la población de recién nacidos en el Estado de Michoacán a través del tamiz neonatal con la cuantificación de la hormona estimulante de la tiroides “TSH”.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Cuantificar la hormona estimulante de la tiroides en recién nacidos
- Detección de casos en pacientes de edad temprana
- Evitar el daño y la gravedad de la discapacidad



14.- IDENTIFICACION DE ESTUDIO

El presente es un estudio longitudinal, experimental y retrospectivo que fue realizado en la ciudad de Morelia Michoacán, el universo de trabajo fue de 11330 muestras de sangre seca impregnadas en papel filtro (Tarjeta Guthrie). En el periodo de enero de 2011 a junio de 2011.

Criterios de inclusión: muestras de recién nacidos provenientes de las 8 diferentes jurisdicciones de Estado de Michoacán.

Criterios de exclusión: muestras inadecuadas

Criterios de eliminación: muestra insuficiente, maltratada o desgastada, saturada, contaminada, coagulada, deshidratada, mala absorción, doble gota.

Fuentes de información utilizada:

- Bitácora del Departamento de Tamiz Neonatal del Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP), del periodo de enero a junio de 2011.

METODOLOGIA ESTADISTICA

Se realizó el estudio estadístico y la captura de datos con los programas:

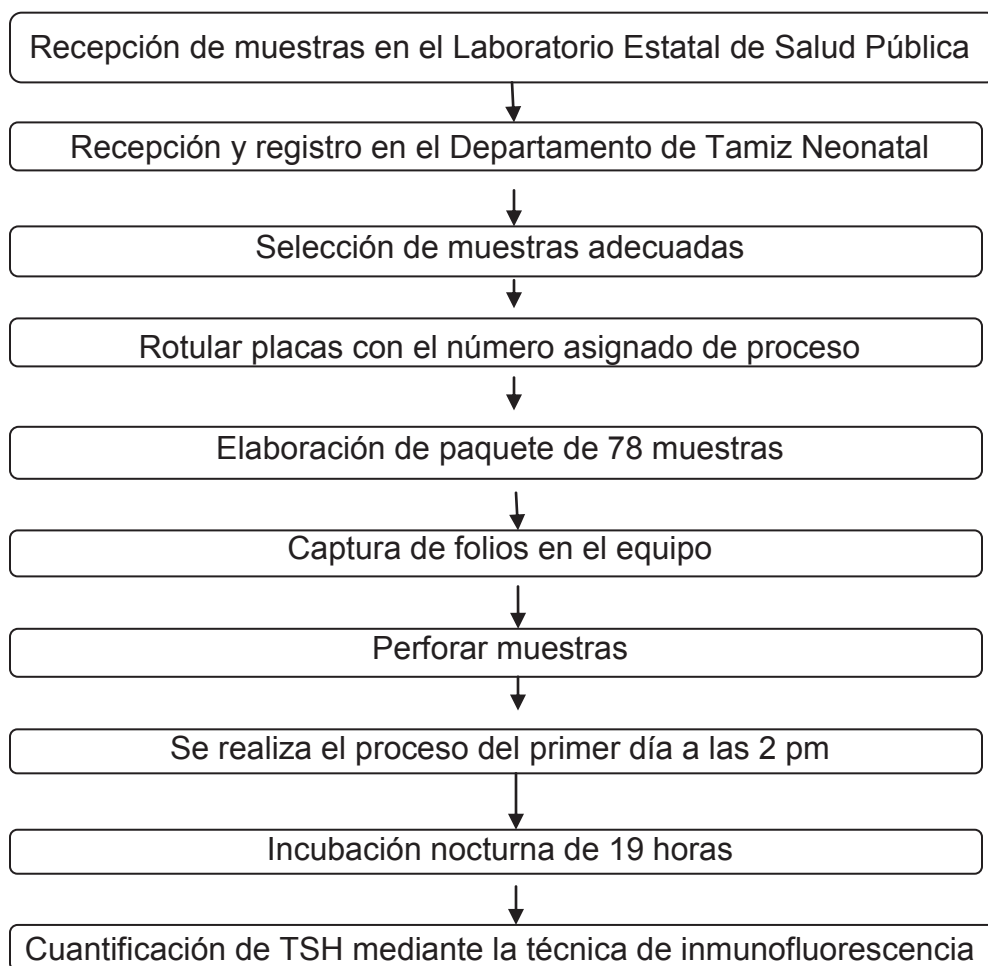
- Microsoft Excel
- Word 2010
- SPSS inc Pasw 18.0
- Sigmaplot 12.0
- OriginLab 8.5.1



15.- MATERIAL Y METODOS

En el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán se recibieron 11330 muestras de sangre seca depositados en papel filtro, para la cuantificación de la hormona estimulante de la tiroides, obtenidas por punción de talón de recién nacidos provenientes de las 8 diferentes jurisdicciones del Estado de Michoacán.

DIAGRAMA DE ACTIVIDADES:





Caracterización de las muestras

Selección de muestras

A la llegada de las muestras al departamento de tamiz neonatal se realiza la revisión de las mismas en adecuadas e inadecuadas. Las muestras adecuadas se revisan y procesan, todas ellas provenientes de los centros de salud de las 8 diferentes jurisdicciones del Estado de Michoacán.

Toma de la muestra

Muestra obtenida por punción de talón de recién nacido, realizado por el personal correspondiente y capacitado para este procedimiento.

Procedimiento

Se debe tomar a partir de la porción media ó lateral de la superficie de la planta del talón. No se debe utilizar sitios previos de punción ó la curvatura del talón¹⁹.

Transporte de muestras

Las muestras no deben colocarse en contenedores herméticamente sellados (ejemplo: bolsas de plástico o de aluminio), debido a que la carencia de intercambio de aire en el medio ambiente interno de un contenedor sellado causa incremento de calor y acumulación de la humedad. El calor, la luz directa, la humedad y la condensación son dañinos para estabilizar las manchas de sangre seca y recuperar el analito¹⁹.



Material a utilizar en el procedimiento de la técnica

- Agua destilada o desionizada, preferentemente estéril
- 2 probetas graduadas 50 mL. Cada una
- Frascos para almacenar los reactivos (sobrantes)
- Pipetas de precisión (50-300µL multicanal)
- Toallas de papel o papel absorbente
- Cronómetro
- Agitador/incubadora de microplacas
- Lavador de microplacas
- Perforador de discos con un diámetro de 3 mm para cortar discos de papel de los controles de sangre seca, calibradores y muestras (ponchador DBS)
- Microplaca (96 pocillos cada una)
- Matraz erlenmeyer
- Cubiertas de plástico
- Guantes desechables
- Cubre bocas

Reactivos utilizados en el proceso:

- Conjugado anti-TSH-HRP (peroxidasa de rábano picante, libera la hormona al lisar los eritrocitos)
- Diluyente conjugado (solución búfer de sal anti-TSH)
- Fluorógeno HPPA
- Diluyente para HPPA-Fluorógeno
- Solución de parada (estabiliza la reacción)
- Solución de lavado



Procedimiento

1. Rotular placas (96 pocillos cada una) con el número asignado de proceso
2. Selección de muestras adecuadas
3. Elaboración de paquetes de 78 muestras
4. Capturar folios en el software del equipo
5. Perforar controles y calibradores en el ponchador DBS
6. Perforar muestras en el ponchador DBS en su placa correspondiente

El proceso de inmunofluorescencia se realiza en dos días:

Primer día:

- Perforar controles, calibradores y muestras
- Añadir 200 μL de anti-TSH-HRP conjugado, para liberar la hormona del papel filtro. Y cubrir la placa para evitar la contaminación.
- Agitar a 650 rpm durante 15 minutos en el agitador de placas
- Incubar durante 18 horas sin agitación en el refrigerador a 4°C

Segundo día:

- Retirar los discos de papel filtro y el líquido en el lavador de placas
- Lavar 4 veces con 300 μL de solución de lavado
- Agregar 200 μL de sustrato e incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente
- Agregar 100 μL de solución de parada (detener la reacción)
- Medir inmediatamente la fluorescencia a una excitación de onda de 320 y una emisión de 405 nanómetros
- Impresión de resultados
- Registro y selección de muestras normales y casos sospechosos
- Sellar fichas con la fecha del análisis y responsable del laboratorio, agregar observaciones, poner resultados.



Emisión de resultados

- Los resultados del LESP (Laboratorio Estatal de Salud Pública) normales se envían junto con las muestras a la unidad en que fue tomada la muestra por paquetes dentro de un sobre bolsa con su oficio correspondiente.
- Reporte de resultados probables y/o sospechosos se corrobora el resultado por duplicado y se reporta por correo electrónico, fax, teléfono y oficio al responsable estatal y a la jurisdicción o unidad correspondiente para su seguimiento.
- Reporte de muestras inadecuadas, se reportan por correo y fax al responsable estatal y a la jurisdicción o centro de salud correspondiente para una segunda toma de muestra.



Fundamento del ensayo

Es un inmunoensayo enzimático para la determinación inmunofluorométrica de Tirotropina Humana a partir de muestras de sangre seca en papel filtro tomada del talón del bebe como prueba principal para la detección de hipotiroidismo congénito en recién nacidos. La figura 7 muestra los compuestos básicos del método, que suele hacerse en placas de plástico, cada una de las cuales tiene 96 pocillos. Cada pocillo está revestido por un anticuerpo anti- α -TSH específico de la hormona a estudiar. En cada pocillo se colocan muestras o referencias, tras lo que se añade un segundo anticuerpo Anti-TSH-HRP conjugado, también específico de la hormona pero que se une a un lugar distinto de su molécula ahora en la subunidad β . A continuación se añade un tercer anticuerpo HPPA que reconoce a Anti-TSH-HRP conjugado y es capaz de fijarse a una enzima que convierte un sustrato adecuado en un producto fácil de detectar con métodos colorimétricos o de fluorescencia. La reacción es detenida añadiendo búfer de glicina y se mide la fluorescencia en cada uno de los pocillos con fluorómetro de microplaca (Excitación. 320 nm. Emisión. 405 nm)²⁰.

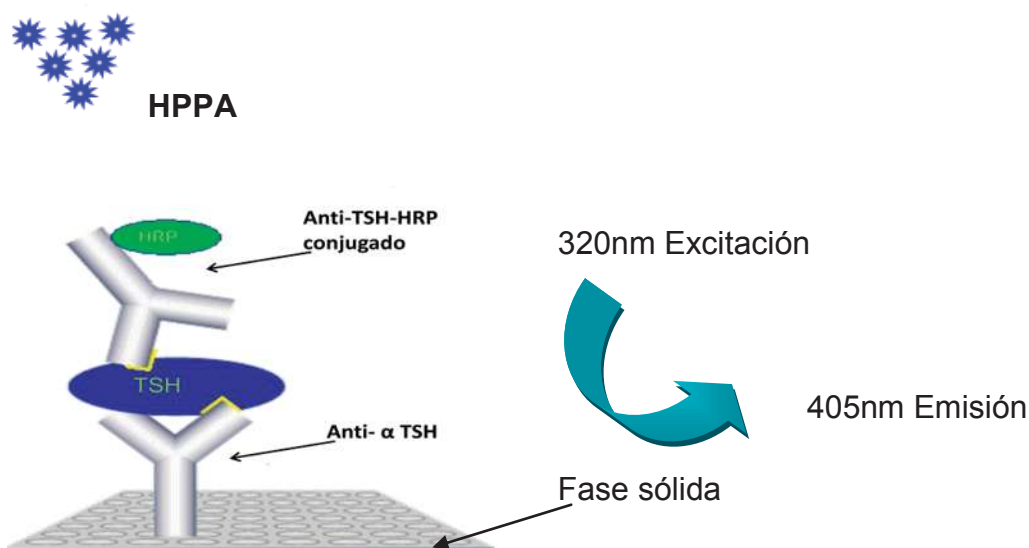


Fig.7 principios básicos de inmunofluorescencia para la determinación de la concentración de una hormona. Anti- α TSH y Anti-TSH-HRP conjugado son anticuerpos que reconocen la hormona en distintos lugares de unión (α y β) y HPPA es un anticuerpo que cataliza la formación de un producto fluorescente coloreado, que se forma a partir de un sustrato. La cantidad de producto se mide con métodos ópticos y es proporcional a la cantidad de hormona existente en el pocillo, siempre que en éste se haya puesto un exceso de anticuerpo²⁰.

Cada molécula de enzima cataliza la formación de muchos miles de moléculas del producto, este método permite detectar cantidades muy pequeñas de moléculas de la hormona en cuestión. Por tanto, la cantidad de hormona existente en la muestra o en la referencia será proporcional a la cantidad del producto formado.

El uso del método de inmunofluorescencia se ha generalizado en los laboratorios clínicos, porque presenta las siguientes características²⁰:

- No utiliza isótopos radiactivos
- Gran parte del análisis puede automatizarse usando placas de 96 pocillos
- Su relación coste-efectividad y su exactitud son muy buenas en la valoración de las concentraciones hormonales.



16.- RESULTADOS

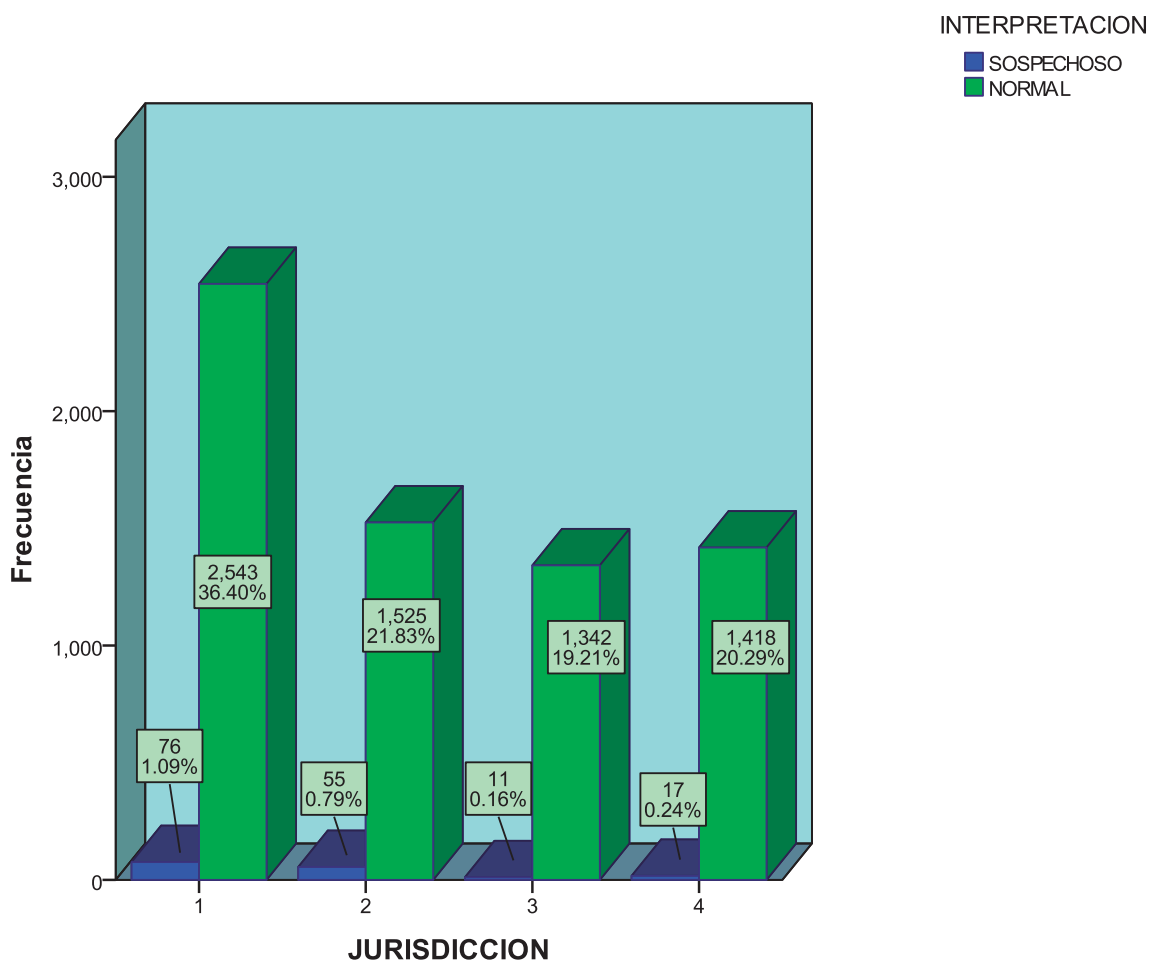
De Enero a Junio de 2011 se realizó el análisis de 11330 muestras de sangre seca impregnadas en papel filtro (whatman 903), obtenidas por punción de talón para realizar la cuantificación de la Hormona Estimulante de la Tiroides, lo que nos permitió establecer el valor de referencia para casos probables a hipotiroidismo congénito, realizando así una detección oportuna en el estado de Michoacán.

Tabla 1. Muestra la frecuencia y el porcentaje de cada jurisdicción (Morelia, Zamora, Zitácuaro, Pátzcuaro, Uruapan, La Piedad, Apatzingán, Lázaro Cárdenas) de acuerdo a la interpretación de resultados.

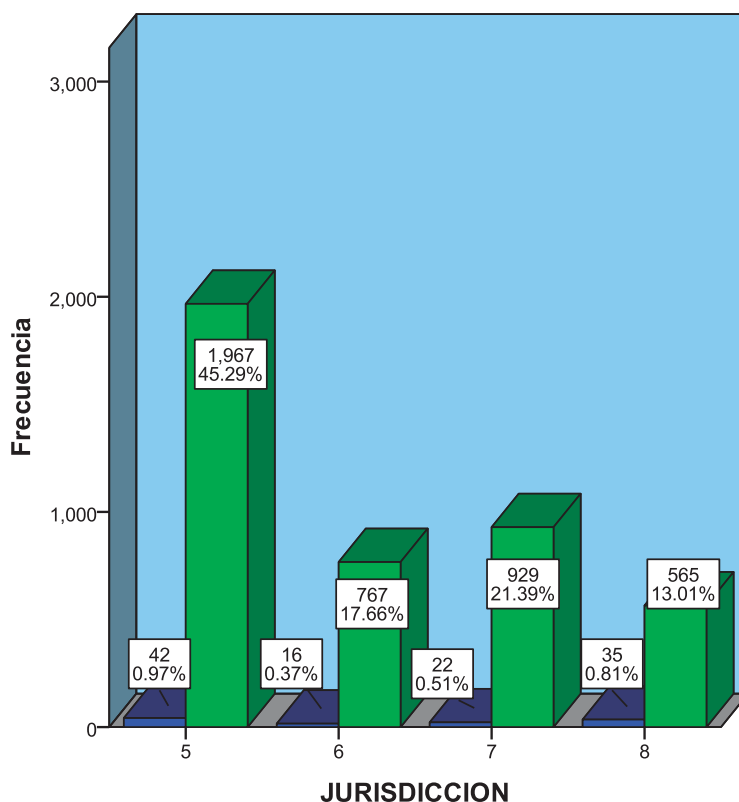
			INTERPRETACION		Total
			SOSPECHOSO	NORMAL	
JURISDICCION	1	Frecuencia	76	2543	2619
		% del total	.67%	22.4%	23.1%
	2	Frecuencia	55	1525	1580
		% del total	.49%	13.5%	13.9%
	3	Frecuencia	11	1342	1353
		% del total	.10%	11.8%	11.9%
	4	Frecuencia	17	1418	1435
		% del total	.15%	12.5%	12.7%
	5	Frecuencia	42	1967	2009
		% del total	.37%	17.4%	17.7%
	6	Frecuencia	16	767	783
		% del total	.14%	6.8%	6.9%
	7	Frecuencia	22	929	951
		% del total	.19%	8.2%	8.4%
	8	Frecuencia	35	565	600
		% del total	.31%	5.0%	5.3%
Total		Frecuencia	274	11056	11330
		% del total	2.42%	97.6%	100.0%



En la grafica 1 se observa el porcentaje de las muestras analizadas de enero a junio de 2011 por jurisdicción en el estado de Michoacán.



Grafica 1. Muestra la frecuencia y el porcentaje de los resultados obtenidos tanto normales como sospechosos para la jurisdicción 1, 2, 3, 4, (Morelia, Zamora, Zitácuaro, Pátzcuaro).



Grafica 2. Muestra la frecuencia y el porcentaje de los resultados obtenidos tanto normales como sospechosos para la jurisdicción 5, 6, 7, 8, (Uruapan, La Piedad, Apatzingán, Lázaro Cárdenas).

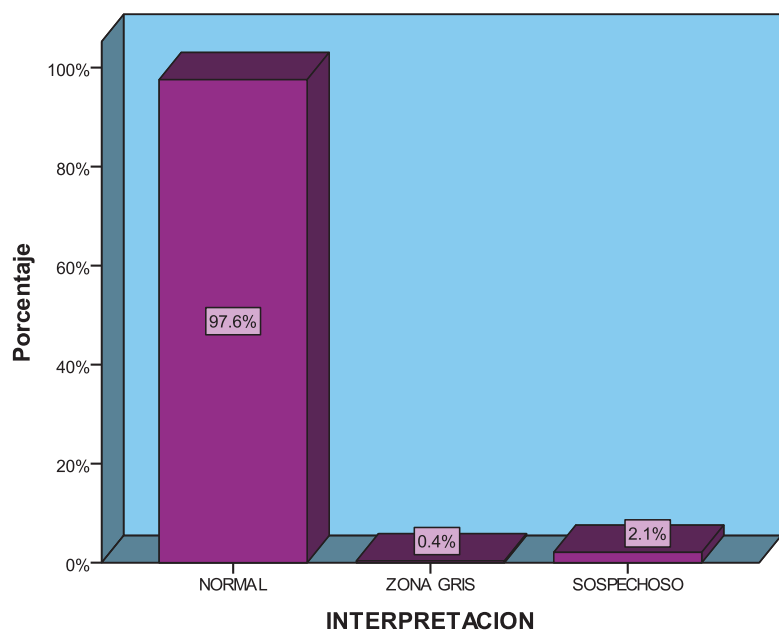
Al ser analizadas se establece un valor de referencia menor de 7,5 como normal y de 7,6 a 8,9 para casos que arrojan resultados en zona de ambigüedad (zona gris) y un valor de 9,0 para los casos sospechosos, obteniendo los siguientes resultados:

- De las muestras procesadas 11053 equivalen al 97.6% de la población los cuales resultaron normales,
- 41 muestras se obtuvieron dentro de la zona gris con un porcentaje del 0.4%
- 236 que corresponde al 2.1% las cuales fueron reportadas como casos probables y/o sospechosos.



TABLA 2. Porcentajes de las muestras analizadas de acuerdo a los resultados obtenidos de la jurisdicción 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 (Morelia, Zamora, Zitácuaro, Pátzcuaro, Uruapan, La Piedad, Apatzingán, Lázaro Cárdenas).

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
Válidos	NORMAL	11053	97.56	97.56
	ZONA GRIS	41	0.36	97.9
	SOSPECHOSO	236	2.08	100.0
	Total	11330	100	



Gráfica 3. Porcentajes de las 11330 muestras analizadas en el periodo de enero a junio de 2011 de acuerdo a la interpretación de resultados correspondientes a la jurisdicción 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.



Realizado el análisis de las 11330 muestras recolectadas como parte del programa de Tamiz Neonatal se establece un valor de referencia de 9 $\mu\text{U/L}$ para el percentil 98, en el Estado de Michoacán. Así, cuando en el laboratorio de Tamiz Neonatal se obtenía resultados de TSH mayor o igual 9 $\mu\text{U/L}$ se daba aviso al endocrinólogo, quién realiza la evaluación clínica del paciente.

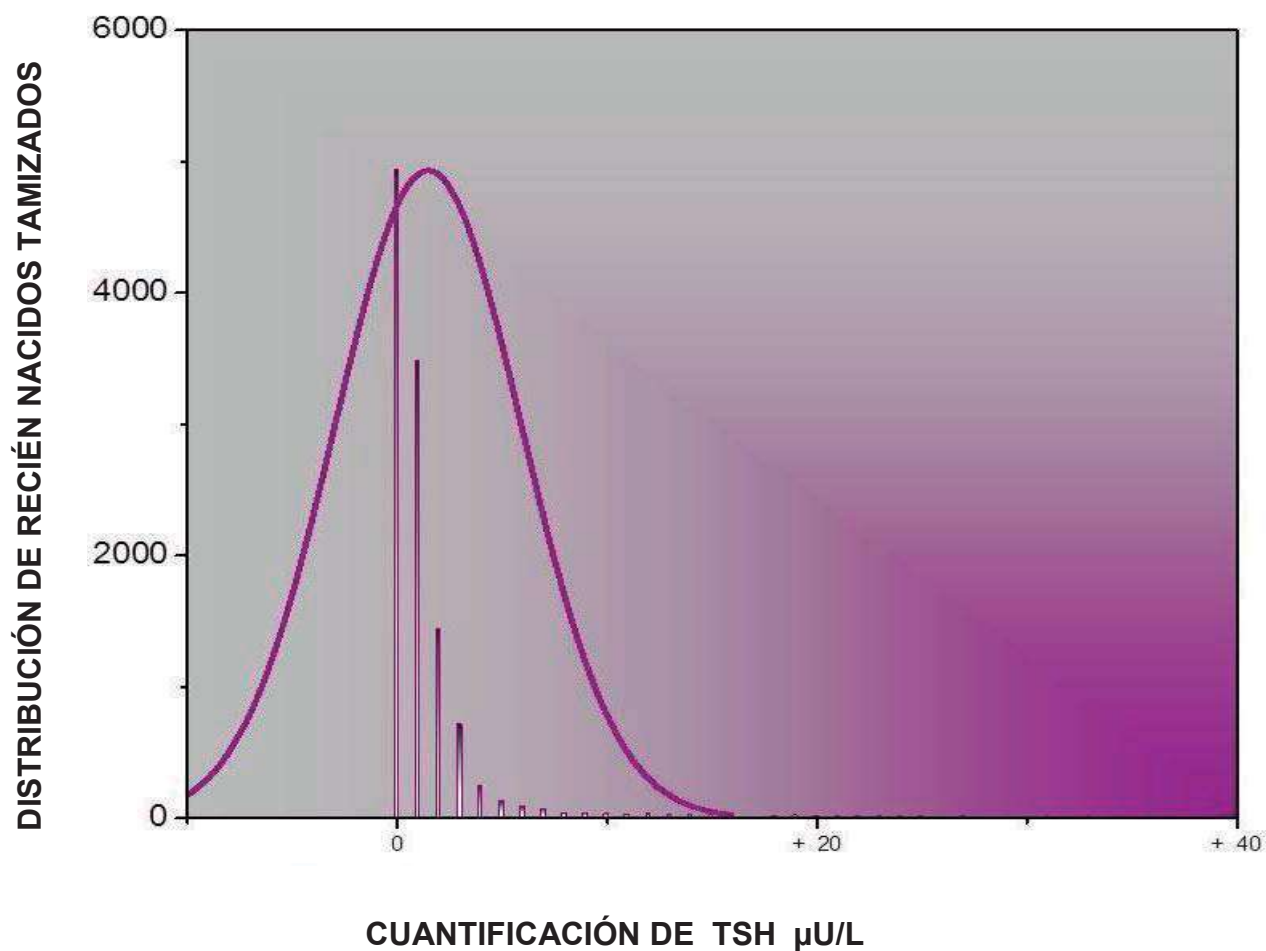
Estadísticos

Tabla 3. Percentiles calculados

N	Válidos	11330
	Perdidos	0
Percentiles	98	9.246426
	99	15.343441
	99.5	24.049514
	99.8	38.615962
	99.9	52.257625
	99.96	110.346408



HISTOGRAMA POBLACIONAL DE TSH NEONATAL EN MICHOACÁN



Gráfica 4. Muestra la distribución poblacional de recién nacidos tamizados en el Estado de Michoacán para la hormona estimulante de la tiroides (TSH).



17.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La prevalencia mundial de Hipotiroidismo congénito es de dos a tres casos por cada 10 000 (1:2 000 a 1:3 000) Recién nacidos²⁴.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta una incidencia de hipotiroidismo congénito en el Norte de América 1:3,600, en Europa 1:6,000 a 1:7,000, y en México 1:2,800²⁵.

La incidencia mundial del Hipotiroidismo congénito va de 1:3,000 a 1:4,000 recién nacidos, siendo más frecuente en hispanos y nativos americanos que en negros²⁶.

En Estados Unidos de América en la población de origen “hispano” se llegan a presentar hasta 5.28 casos por cada 10 000 en recién nacidos (1:1 894)²⁷.

En México, en un estudio transversal retrospectivo (2001-2002), se encontró una prevalencia del 4.12 casos por cada 10,000 recién nacidos²⁸.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos para TSH en la que se incluyen 11330 muestras en papel filtro de recién nacidos, en el Estado de Michoacán, pertenecientes a la jurisdicción 1 de Morelia, 2 de Zamora, 3 de Zitácuaro, 4 de Pátzcuaro, 5 de Uruapan, 6 la Piedad, 7 de Apatzingán y 8 de Lázaro Cárdenas. En el periodo de enero a junio del 2011, las cuales fueron procesadas en el departamento de Tamiz Neonatal del Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán.

En el departamento de tamiz neonatal se establecieron 3 rangos de referencia en primer lugar los valores obtenidos para la concentración de TSH menores a 7.5 $\mu\text{U/L}$ se consideraron como normales, en segundo lugar se encontraban las concentraciones de 7.6 a 8.9 $\mu\text{U/L}$ a las muestras con resultados dentro de estos valores se consideran que se encuentran dentro de una zona de ambigüedad lo que significa que son casos probables a que el recién nacido pueda presentar la patología, y en tercer lugar los resultados obtenidos con concentraciones de TSH mayores a iguales a 9 $\mu\text{U/L}$ ya eran consideradas como sospechosas.



De las 11330 muestras procesadas 11053 son normales lo que corresponde al 97.56%, 41 dentro de la zona de ambigüedad que es el .36%, y para casos sospechosos 236 lo que equivale al 2.1% de la población. Encontrando que en el Estado de Michoacán 1 de cada 2226 recién nacidos pueden desarrollar hipotiroidismo congénito.

Las muestras con resultados dentro de la zona de ambigüedad y sospechosos, se procesan nuevamente por duplicado y aquellas con valores consistentemente altos (mayores o iguales a 9,0 $\mu\text{U/L}$) se re reportan como sospechosos. Y son canalizados con las autoridades sanitarias para su seguimiento. Solo 3 resultaron como casos positivos a ellos se les realizó un perfil tiroideo como prueba confirmatoria, en la que se determina tirotropina (TSH), tiroxina total (T4t) y tiroxina libre (T4L). Se trata de un caso de HC cuando los resultados indican: TSH mayor de 4,0 $\mu\text{U/ml}$, Tiroxina libre (T4I) menor de 0,8 ng/dl, Tiroxina total (T4t) menor de 4 $\mu\text{g/dl}$.

Establecido el valor de referencia de 9,0 $\mu\text{U/L}$ junto con el perfil tiroideo indicado y recomendado en estos casos nos permitió la detección temprana e intervención oportuna de los casos positivos. Para asegurarle al recién nacido un neurodesarrollo óptimo, crecimiento, desarrollo puberal y favorecer la adquisición de habilidades y destrezas, para fortalecer los vínculos afectivos e intelectuales del binomio madre-hijo⁹.



18.- CONCLUSIONES

1. Se establece un valor de referencia en pacientes recién nacidos en el Estado de Michoacán.
2. El valor de referencia propuesto en la investigación es de $9\mu\text{U/L}$.
3. Con el valor de $9\mu\text{U/L}$ contribuimos a la disminución de las consecuencias de la discapacidad secundaria a Hipotiroidismo Congénito.
4. Los pacientes con resultados de $9\mu\text{U/L}$ son canalizados con las autoridades sanitarias para su seguimiento.



19.- ANEXOS

Contenido del kit

1. 10 microplacas recubiertas con anticuerpo
2. Conjugado anti-hTSH-HRP 2.5mL concentrado 100x, peroxidasa de rábano picante conjugada anti-TSH que contiene Kathon como conservador.
3. Diluyente conjugado, 250mL solución búfer de sal anti- TSH
4. Fluorógeno HPPA 4x 500mL
5. Diluyente para HPPA fluorógeno 45mL
6. Solución de parada 150mL búfer de glicina concentrado
7. Solución de lavado 220mL concentrado 10x que contiene Bronidox como conservador
8. Calibradores de la A – F papel filtro de grado 903 1 hoja, calibradores listos para su uso, 5 conjuntos.
9. Controles C1 – C2 papel filtro de grado 903 1 hoja listo para su uso.
10. Cubiertas de incubación de plástico para microplaca 10 piezas.
11. Hojas con valores para controles y calibradores 10 piezas.



Tabla 4. Preparación de reactivo

REACTIVO	PREPARACION	ESTABILIDAD DE REACTIVOS
1 microplacas cubiertas	Listas para su uso	
2 Anti TSH-HRP		
3 Diluyente conjugado		
*Solución conjugada	Ver tabla 4	Desechar solución conjugada no utilizada
4a Fluorógeno HPPA		
4b Diluyente para fluorógeno HPPA		
*Solución sustrato	Ver tabla 4	Desechar solución de sustrato no utilizada
*solución de lavado	Diluir 1:10 con agua destilada	
Calibradores de hTSH	Listos para su uso	
Controles de hTSH		
Solución de parada	Diluir la solución de parada 1:2 con agua destilada	Desechar solución de parada no utilizada



Tabla 5. Cantidades a utilizar para la preparación del conjugado de acuerdo al número de placas que se están procesando.

No de placa	Conjugado anti-hTSH HRP (2 mL)	Diluyente conjugado (3mL)
1	0.24	24
2	0.42	42
3	0.62	62
4	0.82	82
5	1.00	100
6	1.20	120
7	1.38	138
8	1.58	158
9	1.76	176
10	2.0	200



Tabla 6. Cantidades a utilizar para la preparación del sustrato de acuerdo al número de placas que se están procesando.

No de placa	Fluorógeno de HPPA (4a) mL	Diluyente (4b)mL
1	20	4
2	37.5	7.5
3	55	11
4	70	14
5	85	17
6	100	20
7	117.5	23.5
8	135	27
9	150	30
10	170	34



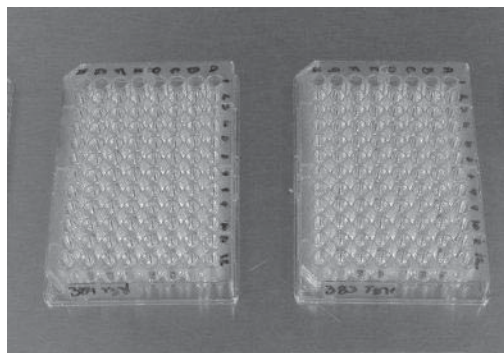
Procedimiento de la prueba

Preparaciones preliminares

- Llevar los reactivos a temperatura ambiente ($+20^{\circ}\text{C}$ a $+25^{\circ}\text{C}$) antes de iniciar el ensayo



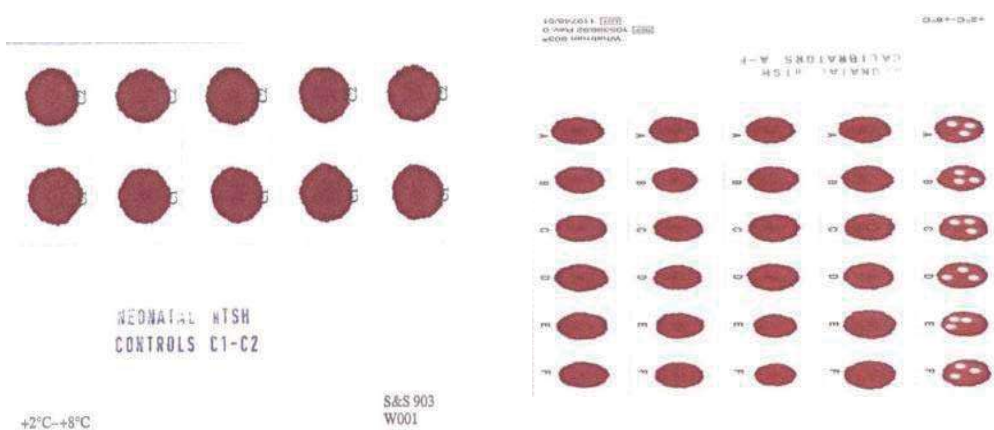
- Rotular placas con el numero asignado del proceso





PASO I

- Perfore los discos de 3mm que contengan controles y calibradores de sangre en la placa.
- Perfore los discos de 3 mm de las muestras de los pacientes en los pocillos de la microplaca.





PASO II

- Agregue 200 μ L de anti-TSH-HRP conjugado.

Observación: Asegúrese de que los discos estén empapados apropiadamente.



- Cubrir la placa e incubar.



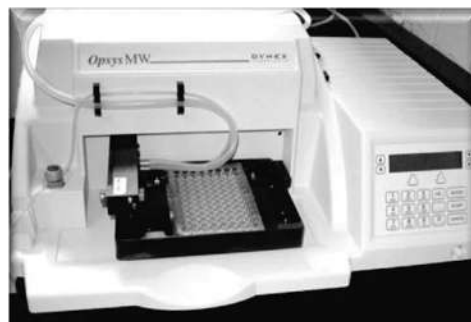


- 3 horas (+/- 5 min) a RT en la obscuridad con velocidad de agitación de 650rpm o 15 min (+/- 5 min) a RT en la obscuridad con velocidad de agitación de 650 rpm y después dejar pasar la noche (18+/-2hr) a + 4 °C sin agitación.



PASO III

- Retire los discos y el líquido, después lave 4 x 300µl



PASO IV

- Agregue 200 µl de solución de sustrato
- Incube 60 min a RT en la obscuridad agitando a 650 rpm





PASO V

- Agregue 100 μ l de solución de parada



- Mida inmediatamente la fluorescencia en el Fluoroskan Ascent





Los resultados se presentan como valores cuantitativos. Los calibradores se preparan a partir de sangre humana con un valor de hematocrito de 50% a 55% y calibrados por ejemplo de la siguiente manera²⁹:

Calibradores Valores en sangre

A	0,2
B	6,2
C	13,6
D	40,1
E	58,6
F	76,5

Valores de control de calidad

Los valores esperados para los controles son:

Controles	Valores en sangre	Rangos en sangre
C1	5,9	<8,5
C2	16,5	9,1 – 24,0

Los resultados de las pruebas solo se aceptarán si se alcanzan los valores esperados para los controles.

Valores esperados e interpretación de resultados

La discriminación entre sujetos normales y presuntos positivos para hipotiroidismo congénito se basa en un valor límite para TSH 9 μ U/L.



Material a utilizar para la toma de la muestra en tamiz neonatal

- Alcohol etílico al 70%
- Guantes
- Lanceta estéril
- Algodón estéril
- Papel filtro whatman 903

Procedimiento

- Inmovilizar el pie
- Limpiar el área a puncionar (se selecciona el área lateral ya que es una zona con numerosos capilares que aporta buena cantidad de sangre, además se evita lesionar el hueso calcáneo).
- Introducir la punta de la lanceta con un sólo movimiento rápido y seguro
- La gota de sangre debe ser suficiente, uniforme e impregne la cara posterior de la tarjeta de papel filtro
- Colocar la gota de sangre en el círculo del papel filtro, evitando el contacto con el talón del bebe
- Esperara que caigan las nuevas gotas de sangre para llenar los círculos faltantes
- Al término, levantar el pie del bebe por arriba del nivel del corazón y presionar el área de la punción con un algodón limpio y seco.
- Dejar secar la muestra por 3 horas a temperatura ambiente, no exponer a calor directo ni utilizar medios físicos.
- Evitar tocar con las manos las gotas de sangre para evitar contaminar el papel y la muestra.
- Envolver las muestras en papel destaza y/o papel cebolla.
- Utilizar desecantes para proteger las muestras de la humedad.
- Empacarlas en un sobre bien identificado para su envío al laboratorio.



Características del papel filtro

Desde los primeros estudios del Dr. Guthrie en 1963 y durante las últimas tres décadas, el papel filtro es 100% algodón puro de calidad controlada para absorción (peso básico 185 g/m², grosor 0.545 mm., absorción en agua 4.7 mL/100cm², cenizas 0.06%), utilizado para recolección uniforme de las muestras de gotas de sangre, ha sido seleccionado en casi todos los países como el medio ideal para este fin. El papel debe cumplir con estas características y estar registrado en la SSA ¹⁹, figura 8.



Fig. 10. Papel filtro específico para la toma de muestra (whatman 903). Departamento de Tamiz Neonatal, Laboratorio Estatal de Salud Pública, Morelia Michoacán.



Ficha de identificación

La figura 9 muestra los datos que la madre debe proporcionar para el llenado de la ficha de identificación del recién nacido al que se le tomaran las muestra de sangre en la Tarjeta Guthrie²⁹.

SECRETARIA DE SALUD | **PROGRAMA PARA LA DETECCIÓN DE ERRORES METABÓLICOS AL NACIMIENTO** | **2009 SSA 0000000**

Nombre de la unidad donde se toma la muestra: _____ Jurisdicción: _____ Estado: _____

Datos del recién nacido

Fecha y hora de nacimiento: ____/____/____ (Hrs) Sexo: ☐ 1. Masculino ☐ 2. Femenino ☐ 3. Ambigüedad de genitales

Fecha y hora de toma de muestra: ____/____/____ (Hrs) Edad Gestacional: ☐ 1. Pre-termino < 37 SGG ☐ 2. Término 37-41.9 SGG ☐ 3. Post-termino > 42 SGG

Producto: ☐ 1. Único ☐ 2. No de gemelo

Peso (kg): _____ Talla (cm): _____

Malformaciones congénitas: ☐ 1. No ☐ 2. Si Cual: _____

Condiciones del RN al momento de la toma: ☐ 1. Sano ☐ 2. Enfermo ☐ 3. Cuidados intensivos

Alimentación del RN: ☐ 1. Leche Materna ☐ 2. Fórmula Láctea ☐ 3. Uña ☐ 4. Ayuno

Datos de la Madre

Nombre completo de la madre: _____ Edad: _____ Enfermedad Tiroides o Metabólica: ☐ 1. No ☐ 2. Si Cual: _____

Apellido paterno: _____ Apellido materno: _____ Nombre(s): _____

Domicilio (u otra dirección para su localización): _____

Calle: _____ No. int Ext: _____ Colonia o Localidad: _____ Municipio o Delegación: _____

Estado (Federal o Libre): _____ Código Postal: _____ Teléfono (con tlla): _____

Datos de la Muestra

Técnica de toma: ☐ 1. Talón ☐ 2. Cordón

Nombre del responsable de la toma: _____

Reporte de Laboratorio

Calidad de la muestra: ☐ 1. Adecuada ☐ 2. Inadecuada

	TSH	17-OH	Gal	PKU
☐ Normal	☐ Normal	☐ Normal	☐ Normal	☐ Normal
☐ Sospechoso	☐ Sospechoso	☐ Sospechoso	☐ Sospechoso	☐ Sospechoso
Valor	Valor	Valor	Valor	Valor

Responsable del Laboratorio que avala el resultado: _____

Fig.9 Tarjeta Guthrie. Departamento de Tamiz Neonatal, Laboratorio Estatal de Salud Pública, Morelia Michoacán.



Toma de muestra

Se utilizan muestras de sangre seca (gotas) obtenidas de la punción de talón (fig. 10), que son colocadas en papel filtro para su transporte al laboratorio, la toma de la muestra debe realizarse en un periodo de 72 horas después del nacimiento ya que en este lapso de tiempo el recién nacido a obtenido una alimentación completa y esto nos va a ayudar a la identificación de analitos presentes en la muestra una muestra tomada prematuramente antes de las 72 horas podría dar resultados incorrectos debido a la alimentación incompleta, y es posible que el metabolismo no funcione correctamente²⁹.



Fig. 10 Lugar adecuado a puncionar para la toma de la muestra en el recién nacido. www.renapred.org.mx



Muestras inadecuadas

- Son aquellas muestras que no cumplen con los estándares de calidad y por consiguiente no es apropiada para analizarla (fig.11), una muestra inadecuada puede causar retraso en la detección y tratamiento de los niños afectados. Las razones porque se puede considerar que la muestra es inadecuada son²⁹:

- ✓ Muestra insuficiente
- ✓ Muestra maltratada o desgastada
- ✓ Muestra con apariencia de recién tomada
- ✓ Muestra saturada
- ✓ Muestra diluida o contaminada
- ✓ Muestras con anillos de suero
- ✓ Muestra coagulada
- ✓ Muestras deshidratadas que no eluyen
- ✓ Muestras con mala absorción
- ✓ Muestras con doble gota

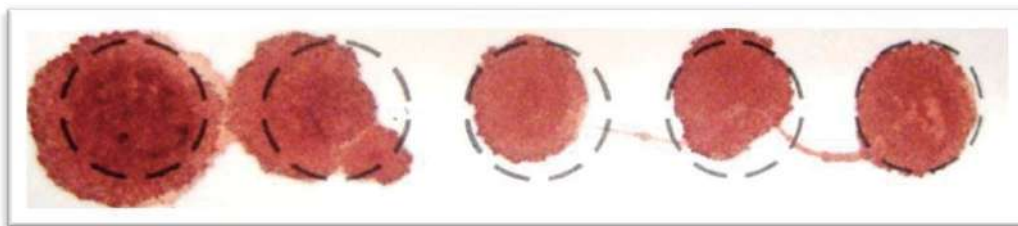


Fig.11 Muestra inadecuada. Departamento de Tamiz Neonatal, Laboratorio Estatal de Salud Pública, Morelia Michoacán.



Muestra insuficiente

Causas:

- Se quitó el papel filtro antes de que la sangre llenara por completo el círculo o antes de que se absorbiera hasta el segundo lado.
- Se aplicó la sangre con un tubo capilar.
- Antes o después de la obtención de la muestra de sangre, el papel filtro entró en contacto con las manos o con sustancias tales como loción para las manos o talco.





Muestra maltratada o desgastada

- Manejo deficiente.



Muestra complementada
con corrector de textos



Muestra reconstruida
con cinta micropore



Muestra batida

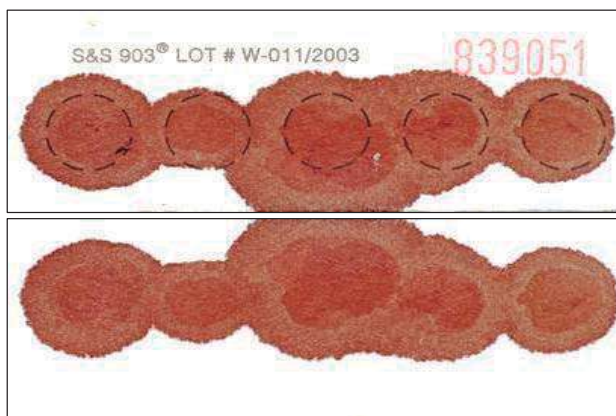


Muestra con apariencia de recién tomada



- Se envió la muestra por correo antes de dejarla secar durante un mínimo de 4 horas.

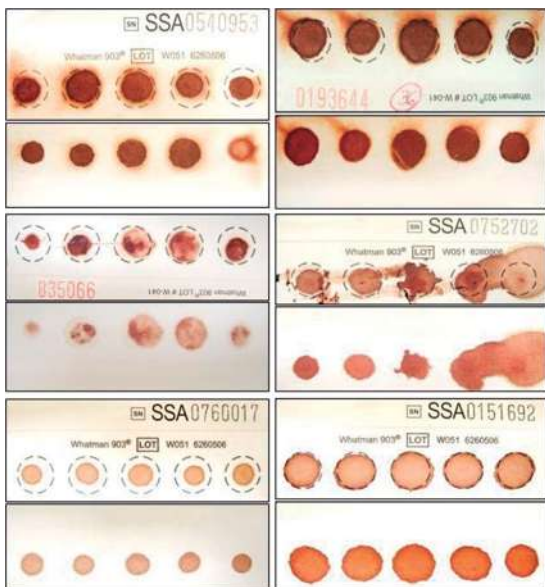
Muestra saturada



- El mismo círculo del papel filtro entró en contacto con gotas de sangre más de una vez.
- Se aplicó sangre a ambos lados del papel filtro.



Muestra contaminada o diluida



- Se apretó la zona que rodea el área de punción.
- Antes o después de la obtención de la muestra, el papel entró en contacto con las manos o sustancias tales como alcohol, soluciones antisépticas, agua, loción para las manos, talco, etc.
- Las manchas de sangre se expusieron al calor directo.

Muestras con anillos de suero

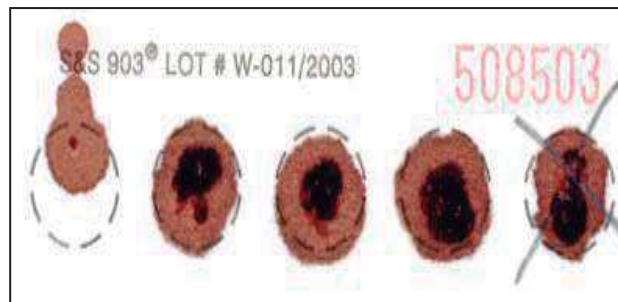
- No se secó el alcohol del área de punción antes de la punción.
- El papel filtro entró en contacto con alcohol, loción, etc.
- Se apretó excesivamente la zona que rodea el área de punción.

- La muestra no se secó correctamente.
- Se utilizó un tubo capilar para aplicar la sangre al papel filtro.



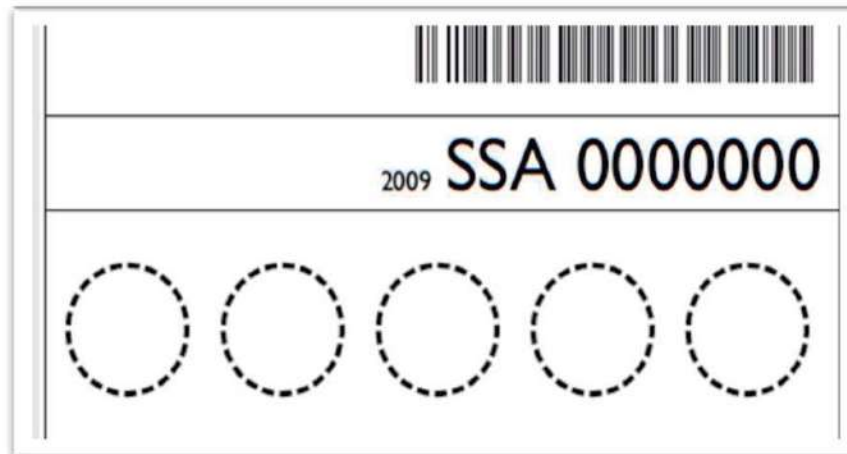
Muestras con coágulos

- Se aplicó sangre al papel filtro, probablemente con un dispositivo (jeringa o tubo capilar).



Sin muestra

- Cuando no se logra obtener una muestra de sangre.



Muestras adecuadas

Son aquellas muestras que tiene iguales características y composición que la sangre del recién nacido, es representativa, reúne todos los aspectos para su análisis correspondiente y q nos garantiza la obtención de resultados precisos (fig.12)²⁹.





Fig.12 Muestra adecuada. Departamento de Tamiz Neonatal, Laboratorio Estatal de Salud Pública, Morelia Michoacán.

La correcta aplicación de los procedimientos de toma de muestra asegura la obtención de resultados confiables en los métodos de laboratorio, (la finalidad es reducir el número de muestras rechazadas por mala calidad)¹⁸.

20.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- J. Argente, M.T. Muñoz, J.A. Molina Font, F. Rodríguez Hierro, Manuel Cruz Hernández Tratado de Pediatría, 8^o Edición Vol. I, Editorial Ergon.
- 2.- Paula Álvarez Castro¹, M^a Luisa Isidro San Juan¹, Fernando Cordido Carballido^{1,2}, 1. Complejo Hospitalario Universitario "Juan Canalejo"-Marítimo de Oza SERGAS-España. 2. Departamento de Medicina, Universidad de A Coruña-España. Guía Clínica Hipotiroidismo.
- 3.- Oswaldo Núñez Almache, Temas de Revisión Congenital Hipotiroidism.
- 4.- Arthur C. Guyton M.D. John E. Hall, Ph.D. Tratado de Fisiología Medica Décima Edición, Editorial McGraw-Hill Interamericana.



5.- Marcela Vela-Amieva / Salvador Gamboa-Cardiel / Martha

E Pérez-Andrade / Joel Ortiz-Cortés / Claudia R Gonzales-Contreras / Venancio Ortega-Velázquez EPIDEMIOLOGIA DEL HIPOTIROIDISMO CONGENITO EN MEXICO Salud Publica de México, marzo-abril 2004/vol. 46, numero 002 Instituto Nacional de Salud Publica Cuernavaca, México pp. 141-148.

6.- Dra. Alicia Yolanda Dorantes Cuéllar, Endocrinología Clínica 2da Edición, Editorial El Manual Moderno.

7.- Nelson, Richard E. Behrman, MD, Tratado de Pediatría 16ª Edición Vol. II, Editorial McGraw-Hill Interamericana.

8.- Francis Greenspan, David G. Gardner, Endocrinología Clínica y Básica 6ª Edición, Traducida de la séptima edición en inglés por Dr. Germán Arias Rebatet, Editorial El Manual Moderno.

9.- Secretaria de Salud. 2010 Tamiz Neonatal. Detección, Diagnostico, Tratamiento y Seguimiento de los Errores Innatos del Metabolismo, Lineamiento Técnico. Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva.

10.- Leonard Wartofsky, Harrison, Principios de Medicina Interna 13º Edición Volumen II, Editorial Interamericana McGraw-Hill.

11.- P. Martul, I. Rica y A. Vela, Antonio Jara Albarrán, Endocrinología Editorial Panamericana Primera Edición.

12.- Dámaso-Ortiz B et al. Examen de tamiz neonatal para el diagnóstico de hipotiroidismo congénito.

13.- Banta SA et al. Tandem mass spectrometry in newborn screening: A primer for neonatal and perinatal nurses. *J Perinat Neonat Nurs* 2004; 18 (1): 41-59.



- 14.- Velázquez A et al. Tamiz neonatal para hipotiroidismo congénito y fenilcetonuria. *Sal Pub Mex.* 249-256.
- 15.- E. Mayayo, B. Puga¹, J.I. Labarta, A. Ferrández Longás Unidad de Endocrinología Pediátrica. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza. ¹Centro Andrea Prader. Zaragoza. Hipotiroidismo Congénito.
- 16.- María del Rosario Torres-Sepúlveda, QCB, Laura E Martínez-de Villareal, MC, Carmen Esmer, MC, Rogerio González-Alanís, Consuelo Ruiz Herrera, QCB, Alejandra Sánchez-Peña, Lic. en Nutr, José Alberto Mendoza-Cruz, MC, Jesús Z Villareal-Pérez, MC. Tamiz Metabólico Neonatal por Espectrometría de Masas en Tándem: dos años de experiencia en Nuevo León México. *Salud Pública Mex* 2008;50:200-206.
- 17.- Antonio Velázquez, Marcela Vela-Amieva, Edwin w Naylor, Donald H Chace, *Revista Mexicana de Pediatría Volumen 67, numero 5. Resultados de tamiz neonatal ampliado, como nueva estrategia para la prevención de los defectos al nacimiento.*
- 18.- Beatriz Cedillo Carvallo, Roberto A. Estrada Gómez, Vanesa Jonguitud Díaz, Israel Parra Ortega, *Revista médica Mexicana Factores que afectan algunas de las pruebas del tamiz neonatal.*
- 19.- W. Harry Hannon, Ph.D., Ronald J. Whitley, PhD, Brad David, Paul Ferhoff, MD, FAAP, FACMG, Tuija Halonen, MSc, Marcia Lavochnik, RN, BSN, Julie Miller, BS, Jelili Ojodu, MPH, Bradford L. Therrell, Jr., Ph.D. instituto de Estandarización de Clínicos y Laboratorios (CLSI). Colección de Sangre en Papel Filtro para Programas de Tamiz Neonatal – Quinta Edición. Documento CLSI LA4-A5 (ISBN 1.56238.644.1). Instituto de Estandarización de Laboratorios y Clínicos 940 West Valley Road, Suite 1400 Wayne, Pennsylvania 19807-1898 USA, 2007.
-



20.- Arthur C. Guyton, John E. Hall, Ph.D. Tratado de Fisiología Medica, Décimo primera Edición, Editorial Elsevier.

21.- Philip K. Bondy, MD., Duncan, Enfermedades del Metabolismo Tomo I. Genética y Metabolismo.

22.- Prevención, Diagnóstico y Tratamiento del Hipotiroidismo Congénito Neonatal en el Primer Nivel de Atención. México: Secretaria de Salud; 2008.

23.- Grupo de trabajo de la guía de práctica clínica de hipotiroidismo congénito. Guía de Práctica Clínica de Hipotiroidismo Congénito. Santiago de Compostela: Consellería de Sanidad, Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Galicia, avalia-t; 2008. Serie de Guías de Práctica Clínica: GPC2008/01.

24. - Toublanc JE. Comparison of epidemiological data on congenital hypothyroidism in Europe with those of other parts in the World. Horm res. 1992;38 (5-6): 230-5.

25.- Secretaría de Salud. 2007 Tamiz Neonatal. Detección y Tratamiento Oportuno e Integral del Hipotiroidismo Congénito. Lineamiento Técnico. Centro nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva.

26. - Amer Acad Pediatr, Am Thyroid Ass. Lw Pediatr Endo Soc: Update of newborn Screening and Teraphy for Congenital Hypothyroidism Pediatrics 2006; 117:2290-2303.

27.- Avalia-t 2008 Guía de práctica clínica Hipotiroidismo congénito



28.- Vela-Amieva, MC, et al. Epidemiología del hipotiroidismo en México .Salud pública de México, marzo-abril de 2004, vol.46, no.2.

29.- Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP), Departamento de Tamiz Neonatal, Morelia Michoacán.