

DETERMINACION DE PUNTOS DE CORTE PARA TSH NEONATAL
EN MUESTRAS DE SANGRE SECAS EN PAPEL DE FILTRO DE
CORDON UMBILICAL, TALÓN ENTRE LAS 12 Y 24 HORAS
Y ENTRE EL QUINTO Y OCTAVO DIA DE VIDA POR
METODOLOGÍA INMUNORADIOMETRICA

ANGELA MARIA ARRIETA TERREROS

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

para optar el titulo de

BACTERIOLOGA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS

CARRERA DE BACTERIOLOGÍA

SANTA FE DE BOGOTÁ

2.001

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de 1946:

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis de grado”.

DETERMINACION DE PUNTOS DE CORTE PARA TSH NEONATAL
EN MUESTRAS DE SANGRE SECAS EN PAPEL DE FILTRO DE
CORDON UMBILICAL, TALÓN ENTRE LAS 12 Y 24 HORAS
Y ENTRE EL QUINTO Y OCTAVO DIA DE VIDA POR
METODOLOGÍA INMUNORADIOMETRICA

APROBADO:

Dra. GLADYS LAVERDE DE A.
Director General

Dra. TERESA ORTIZ PICON
Director Científico

Dr. HUGO DIEZ ORTEGA
Codirector-Asesor

Dra. SILVIA CHAHIN
Jurado

Dra. LUZ AMPARO MALDONADO
Jurado

Dra. AURA ROSA MANASCERO
Director Carrera

Dr. CORREDOR
Decano Académico

Dedico la realización de este trabajo
a mis padres y hermanos,
a *Fabian Bernal* y a todas las personas
que colaboraron para que
este fuera posible.

AGRADECIMIENTOS

Muy especialmente a la Dra. GLADYS LAVERDE DE ARBELAEZ – Directora Laboratorio de Investigación Hormonal -, por la oportunidad y la confianza brindada.

Al Dr. WILLIAM BUITRAGO – Director Atención Médica CLÍNICA JUAN N. CORPAS - por su colaboración y apoyo.

Al Dr. ALFONSO CORREA – Director Médico CLINICA DEL COUNTRY- por su colaboración.

A VELEZ LAB. por el financiamiento del proyecto y por su colaboración.

A BECTON DICKINSON, por el financiamiento del proyecto.

MARZO DE 2.001

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. MARCO TEORICO	22
1.1. MORFOFISIOLOGIA DE LA GLÁNDULA TIROIDES	22
1.1.1. GENERALIDADES	22
1.1.2 BIOSINTESIS, SECRECIÓN Y METABOLISMO DE HORMONAS TIROIDEAS	23
1.1.2.1. Fisiología de la hormonas tiroideas	23
1.1.2.2. Metabolismo de las hormonas tiroideas	24
1.1.2.3. Regulación de la función tiroidea	27
1.2. ONTOGÉNESIS DE LA FUNCIÓN HIPOTÁLAMO- HIPÓFISIS -TIROIDES	31
1.2.1. FUNCION TIROIDEA EN EL FETO	31
1.2.1.1. Generalidades	31
1.2.1.2. Metabolismo fetal de la hormona tiroidea	31
1.2.1.3. Regulación endocrina de la glándula fetal	34
1.2.1.4. Implicación de la placenta en la función tiroidea	38
1.2.1.5. Función tiroidea durante el periodo neonatal	41
1.3. HIPOTIROIDISMO	45
1.3.1. HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO	45

1.3.1.1. Etiología y patogenia	48
1.3.1.2. Manifestaciones clínicas	51
1.3.1.3. Diagnóstico paraclínico	53
1.3.1.3.1. Tamizaje neonatal	53
1.3.1.3.1.1. Método de tamizaje	56
1.3.1.3.1.2. Muestra	59
1.3.1.3.1.3. Exámenes de detección	60
1.3.1.3.1.4. Exámenes confirmatorios	63
1.3.1.4. Estudios imagenológicos	64
1.3.1.5. Otras pruebas diagnósticas	65
1.3.1.6. Tratamiento	65
1.3.1.7. Manejo clínico del recién nacido con valores bajos de T4 y elevados de TSH	67
1.3.1.8. Seguimiento	68
1.3.1.9. Pronóstico	69
2. FORMULACION DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION	70
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	70
2.2 JUSTIFICACIÓN	71
3. FORMULACIÓN DE OBJETIVOS	75
3.1 OBJETIVO GENERAL	75
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	75

4. MATERIALES Y METODOS	77
4.1 TIPO DE ESTUDIO	77
4.2. HIPÓTESIS	77
4.3. POBLACION ESTUDIO Y MUESTRA	78
4.3.1. Población estudio	78
4.3.2. Muestra	78
4.4. EQUIPOS	80
4.5. METODOS	81
4.6. RECOLECCION DE INFORMACIÓN	94
4.7. ANALISIS DE INFORMACIÓN	95
5. RESULTADOS	96
6. DISCUSIONES	117
7. CONCLUSIONES	125
8. RECOMENDACIONES	127
9. BIBLIOGRAFÍA	129
10. ANEXOS	136

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Biosíntesis y liberación de las hormonas tiroideas.

FIGURA 2. Metabolismo de las hormonas tiroideas.

FIGURA 3. Retroalimentación negativa del eje hipotálamo–hipófisis-tiroides.

FIGURA 4. Patrones de los niveles circulantes de TSH, rT3, T4 y T3 en el feto y el recién nacido.

FIGURA 5. Evolución de los valores de TSH en sangre del recién nacido durante las primeras 48 horas de vida.

FIGURA 6. Niveles de T4, T3 y TSH durante la infancia.

INDICE DE GRAFICAS

GRAFICA 1. Distribución del total de muestras recogidas en las diferentes instituciones.

GRAFICA 2. Distribución de muestras aptas para el estudio en las diferentes instituciones.

GRAFICA 3. Distribución normal de los datos obtenidos de muestras de cordón umbilical.

GRAFICA 4. Distribución normal de los datos obtenidos de muestras de talón entre 12-24 horas de vida.

GRAFICA 5. Distribución normal de los datos obtenidos de muestras de talón entre 5to-8vo día de nacido.

GRAFICA 6. Concentraciones de TSH obtenidas de las muestras de cordón umbilical.

GRAFICA 7. Concentraciones de TSH obtenidas de las muestras de talón entre 12-24 horas de vida.

GRAFICA 8. Concentraciones de TSH obtenidas de las muestras de talón entre 5to-8vo día de nacido.

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Permeabilidad placentaria a las sustancias que afectan la función tiroidea.

TABLA 2. Resumen estadístico de la distribución normal de las muestras de cordón umbilical.

TABLA 3. Resumen estadístico de la distribución normal de las muestras de talón 12-24 horas de vida.

TABLA 4. Resumen estadístico de la distribución normal de las muestras de talón 5to-8vo día de nacido.

TABLA 5. Resumen estadístico del análisis paramétrico de muestras de cordón umbilical.

TABLA 6. Resumen estadístico del análisis paramétrico de muestras de talón 12-24 horas de vida.

TABLA 7. Resumen estadístico del análisis paramétrico de muestras de talón 5to-8vo día de nacido.

TABLA 8. Resumen estadístico de Puntos de Corte.

TABLA 9. Porcentaje de confirmaciones de acuerdo al Punto de Corte con 2DS.

TABLA 10. Porcentaje de confirmaciones de acuerdo al Punto de Corte con 3DS.

TABLA 11. Porcentaje de confirmaciones de acuerdo al Punto de Corte establecido por la Academia Americana de Pediatría.

INDICE DE ANEXOS

ANEXO A. Protocolo de toma de muestra de cordón umbilical.

ANEXO B. Protocolo de toma de muestra por punción de talón.

ANEXO C. Formato de recolección de la muestra.

ANEXO D. Criterios de clasificación de las muestras.

ANEXO E. Ficha clínica.

ANEXO F. Carta de consentimiento informado.

ANEXO G. Concentraciones de TSH en muestras de cordón umbilical.

ANEXO H. Concentraciones de TSH en muestras de talón 12-24 horas de vida.

ANEXO I. Concentraciones de TSH en muestras de talón 5to-8vo día de nacido.

INDICE DE ABREVIATURAS

TSH	:	Hormona Estimulante del Tiroides (Tirotropina)
T3	:	Triyodotironina
T4	:	Tiroxina
TRH	:	Hormona Liberadora de Tirotropina
HC	:	Hipotiroidismo Congénito
IRMA	:	Inmunoradiométrico
FCU	:	Fenilcetonuria
TBG	:	Globulina Transportadora de Tirosina
TG	:	Tiroglobulina

RESUMEN

El propósito de esta investigación fue determinar los puntos de corte para TSH Neonatal en la población estudiada, en muestras de sangre secas en papel de filtro obtenidas de cordón umbilical, por punción de talón entre las 12 y 24 horas de vida y entre el 5to y 8vo día de nacido, empleando la tecnología IRMA. Se obtuvieron simultáneamente las 3 muestras de 160 recién nacidos y posteriormente se determinaron las concentraciones de TSH en cada una de ellas. Se encontraron los puntos de corte según el tiempo de toma de la muestra así: 19 $\mu\text{UI/ml}$ y 24 $\mu\text{UI/ml}$ en cordón umbilical, 26 $\mu\text{UI/ml}$ y 33 $\mu\text{UI/ml}$ entre 12 y 24 horas, y 10 $\mu\text{UI/ml}$ y 13 $\mu\text{UI/ml}$ entre el 5to-8vo día de vida, si se agregan 2 y 3 desviaciones estándar respectivamente al valor promedio hallado para cada grupo. Los porcentajes de confirmación de los resultados obtenidos a partir de los puntos de corte encontrados a +2DS fueron 6.8%, 8.1% y 7.5% en muestras de cordón umbilical, talón entre las 12-24 horas y talón entre 5to-8vo día respectivamente, mientras que los porcentajes de confirmación para los puntos de corte hallados a +3DS fueron 3.7%, 0.6% y 0% respectivamente.

INTRODUCCIÓN

La Hormona Estimulante del Tiroides (Tirotropina, TSH) es una hormona producida en la pituitaria la cual, a través de su acción sobre la glándula tiroidea, juega un papel muy importante en el mantenimiento de niveles normales de yodotironinas, T3 (Triyodotironina) y T4 (Tiroxina). La TSH es controlada por retroalimentación negativa de T3 y T4 circulante y por la hormona hipotalamica TRH (Hormona Liberadora de Tirotropina). En el hipotiroidismo primario, donde está disminuida la producción de hormonas tiroideas, el nivel de TSH esta aumentado. En el hipotiroidismo secundario o terciario, donde la producción de hormona tiroidea se encuentra disminuida como consecuencia de una lesión de pituitaria o hipotálamo, el nivel de TSH está usualmente disminuido.

El Hipotiroidismo Congénito (HC) es una enfermedad que se presenta en todo el mundo y su prevalencia se encuentra alrededor de 1 en 2.500 a 1 en 4.700 recién nacidos vivos. Esta entidad produce retardo mental severo e irreversible, además de otras complicaciones si no es tratada oportunamente, razón por la cual su diagnostico y tratamiento precoz es una responsabilidad médica de primer orden. Se presenta como consecuencia de la producción deficiente de hormonas tiroideas, lo que va a producir una disminución del

metabolismo energético de los tejidos, con especial importancia durante la infancia. El tratamiento debe empezar muy temprano, debido a que la mitad del crecimiento cerebral humano postnatal es completado a los 6 meses de edad. Se ha demostrado que cuando los infantes hipotiroideos son tratados antes de la edad de 3 meses, aproximadamente el 85% pueden alcanzar un coeficiente intelectual por encima de 85 (normal). Sin embargo, cuando el tratamiento es iniciado entre el tercer y séptimo mes, aproximadamente el 85% puede quedar con retardo mental.

El HC está presente desde la vida intrauterina y sólo es detectable hasta después del nacimiento siendo la mayoría de los niños asintomáticos inicialmente. Por ello es importante realizar la detección en los primeros días de vida mediante el tamizaje neonatal, el cual es definido como la identificación presuntiva de una enfermedad desconocida mediante la utilización de pruebas rápidas y cuya finalidad es separar entre las personas con aparentemente buena salud, aquellas que probablemente no presentan la enfermedad de aquellas que posiblemente la tengan. El objetivo principal del programa de tamizaje neonatal es entonces, detectar a tiempo enfermedades que causan retardo mental y otras complicaciones, incluida la muerte. Una vez detectadas, se procurará tratar con la mayor premura posible a los bebés afectados, de manera que se prevenga en gran medida, tanto la aparición de alteraciones en la capacidad intelectual, como de otros padecimientos y riesgos.

En los programas de tamizaje para HC, la medición de TSH circulante ha sido usada como ensayo primario para el diagnóstico diferencial de hipotiroidismo, seguida cuando es necesario por mediciones de T4, o por otras pruebas adicionales en muestras con resultados bajos de T4. Por razones económicas, los programas de tamizaje rara vez incluyen determinaciones de TSH y T4 en cada neonato.

En Colombia no existen programas obligatorios de detección masiva para el diagnóstico precoz de HC, razón por la cual el Ministerio de Salud en uso de sus facultades, expidió la Resolución No. 00412 de febrero 25 de 2.000 que entraría en vigencia a partir del 01 de enero de 2.001. Pero la Resolución 03384 del 29 de diciembre de 2.000, modificó parcialmente la resolución anterior en lo concerniente a la fecha de inicio, siendo esta el 01 abril de 2.001 tanto para el régimen Contributivo como para el Subsidiado de salud. La Resolución establece la determinación de la TSH Neonatal en sangre de cordón umbilical, con el fin de reducir el número de recién nacidos que puedan no ser tamizados por una salida temprana del servicio de maternidad, generalmente antes de 24 horas. Basados en la experiencia de países como Estados Unidos, Europa y algunos países de América Latina que tienen implementados sus programas de tamizaje tomando las muestras de sangre de talón del recién nacido entre el 2do y 8vo día de vida, se llevó a cabo este estudio para poder determinar los puntos de corte de TSH Neonatal para cada uno de los diferentes tiempos de toma de muestra y

finalmente, establecer el protocolo mas adecuado para la toma de dicha muestra.

La naturaleza descriptiva y exploratoria de este estudio permite su realización con miras a la obtención de datos confiables con los cuales se determinarán los puntos de corte para la tecnología inmunoradiométrica COAT-A-COUNT IRMA DPC® para el ensayo de TSH Neonatal.

La Academia Americana de Pediatría en las “Guías Recomendadas de Tamizaje Neonatal para Hipotiroidismo Congénito”, sugiere la realización de estudios que permitan determinar los puntos de corte en la población destino donde finalmente se aplicará la prueba y en los diferentes tiempos de toma de muestra, ya que su realización generalmente se efectúa con reactivos de tipo comercial que en su gran mayoría, se producen en el extranjero. De manera que el punto de corte que éstos recomiendan para considerar a un paciente como positivo o negativo, se obtiene de poblaciones con diferentes características socio - ambientales respecto a la población destino. Además, los valores normales de TSH en neonatos dependen no solamente de variaciones demográficas, también de la edad gestacional, peso, o condición de prematuro o gemelo; por esta razón, es importante que cada laboratorio determine sus propios puntos de corte especificando el tipo de muestra

seleccionado (encontrándose en la literatura de 2 a 6 días desde la fecha de nacimiento).

Finalmente, antes de que se introdujeran a gran escala los programas mundiales de detección neonatal, entre el 30 y 50% de los casos eran diagnosticados hacia los 3 meses de edad, cuando ya se habían producido daños irreversibles y el desarrollo neurológico estaba gravemente afectado. Esto justifica la atención especial dedicada a la insuficiencia tiroidea en niños, sumado al hecho de que un tratamiento precoz y correcto, protege en gran medida al niño hipotiroideo de daños irreversibles.

1. MARCO TEORICO

1.1. MORFOFISIOLOGIA DE LA GLANDULA TIROIDES

1.1.1. GENERALIDADES

La glándula tiroides es un órgano con un peso total de 15 a 20 gramos. Posee dos lóbulos principales, uno a cada lado del tercio inferior de la tráquea. La glándula es ricamente irrigada por cuatro arterias tiroideas (dos superiores y dos inferiores), siendo sensiblemente mas vascularizado el lóbulo derecho lo que explica su usual mayor tamaño (Correa, 1999).

La unidad funcional básica de la tiroides es el folículo, una esfera hueca de células de 15 a 500 μm de diámetro, rodeada por una membrana basal. El interior del folículo (luz) contiene coloide, un gel viscoso que constituye mas bien un almacenamiento de TG (Tiroglobulina) secretada por las células tiroideas; esta reserva es suficiente para cubrir unos 100 días de secreción normal de hormona tiroidea (Greenspan, 1988).

1.1.2. BIOSÍNTESIS, SECRECIÓN Y METABOLISMO DE HORMONAS TIROIDEAS

1.1.2.1. Fisiología de las hormonas tiroideas - Hormogénesis intratiroidea. (Figura 1)

El yoduro plasmático circulante ingresa en las células foliculares tiroideas y se combina con la tiroxina a través de una serie de reacciones enzimáticas, para formar las hormonas tiroideas activas 3,5,3' Triyodotironina (T3) y Tiroxina (T4). Los pasos de la síntesis y liberación de hormonas tiroideas son: a) Proceso de captación o transporte activo de yodo inorgánico del plasma a la célula tiroidea; b) Oxidación y organificación del yodo atrapado como yodotirosinas; c) Síntesis de Tiroglobulina rica en tirosina, que actúa como el aceptador inmediato del yodo; d) Acoplamiento de monoyodotirosinas (MIT) y diyodotirosinas (DIT) para formar las yodotironinas, T3 y T4, con almacenamiento de yodotirosinas y yodotironinas en el coloide folicular; e) Endocitosis coloidal, proteólisis de la Tiroglobulina coloidea y liberación de Tironinas.

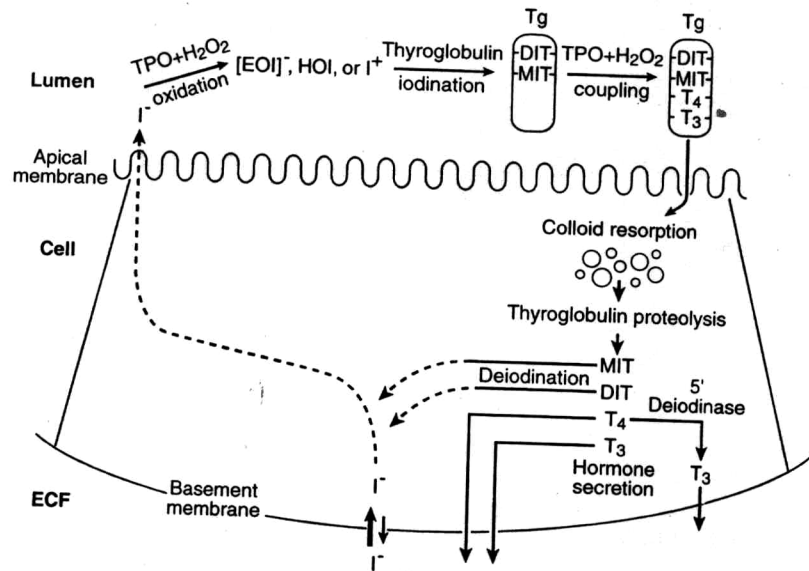


Figura 1. Diagram of the steps of thyroid hormone biosynthesis and release. TPO, thyroid peroxidase; MIT, monoiodotyrosine; DIT, diiodotyrosine; T4, thyroxine; T3, 3,5, 3'-triiodothyronine; I⁺, activated iodide; ECF, extracellular fluid. (Taurog A: *Werner and Ingbar's The Thyroid*, New York, p. 87, 1991).

1.1.2.2. Metabolismo de las hormonas tiroideas (Figura 2).

La glándula tiroides secreta diariamente 80 - 100 µg de hormonas tiroideas, preferencialmente T4 (80%). El acúmulo extratiroideo es principalmente extracelular y asciende a 800 - 1000 µg. La tasa de recambio diario es de sólo el 10% de dicho acúmulo y esto explica la presencia de la hormona en suero por varias semanas en ausencia de nueva secreción. La T4 es metabolizada especialmente por 5'o 5-deyodinación (80%), del anillo exterior

hacia T3 (40%) y del anillo interno hacia rT3 3,3',5'-T3 (37 - 40%), respectivamente; el resto da origen a compuestos de baja actividad biológica (Greenspan, 1988). El acúmulo extratiroideo es de sólo 50 µg y la mayoría se encuentra intracelular; la tasa de recambio diaria es del 75%. La fuente principal de T3 es entonces la 5'-deyodinación de la T4, ya que sólo un 20 - 24% de la secreción diaria de la glándula tiroides corresponde a esta hormona. De igual manera, en sujetos normales, el 97.5% de la rT3 es producto de la deyodinación periférica de la T4 (Brent, 1994).

La conversión de T4 a T3 representa una “potenciación” de la actividad biológica, en tanto que la conversión de T4 a rT3 tiene el efecto contrario, razón por la cual la conversión de T4 a T3 o rT3 por la desyodasa de yodotironina en anillos interno o externo, constituye una fase regulatoria capital para precisar la actividad biológica de la hormona tiroidea (Greenspan, 1988).

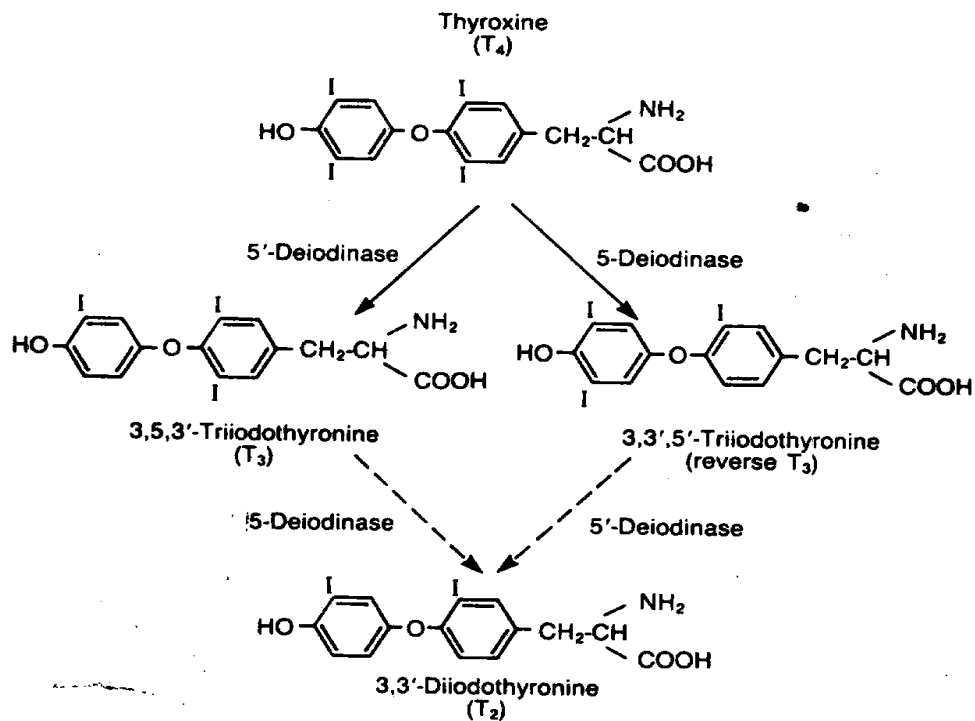


Figura 2. Structures of the principal thyroid hormones, thyroxine, and 3,5,3' triiodothyronine and part of the pathway of metabolism by deiodination. (Griffin JE: *Manual of clinical endocrinology and metabolism*, Mc Graw-Hill, New York, p. 50, 1982).

Se conocen tres tipos de 5'-deyodinasas, todas microsomiales; la tipo I es más sensible al propil-tiouracilo que la tipo II y se encuentra en tejidos periféricos como el hígado, los riñones y la misma glándula tiroides. La tipo II se ha encontrado principalmente en el cerebro y la hipófisis, y en este último órgano tiene un papel preponderante, ya que se conoce que la mayoría del T₃ nuclear en la pituitaria se origina del T₄ plasmático (50 - 60%). La tipo III

es una deiodinasa periférica del anillo interno, no sensible al propiltiouracilo, ampliamente distribuida en tejidos extrahepáticos, que parece ser activada por los glucocorticoides y cuya principal acción es la producción de la rT3, a partir de T4. La T3 se metaboliza principalmente mediante 5-deiodinación a 3,3'-diyodotironina. La rT3, parece que es deiodinada también por la 5'-deiodinasa tipo I y da origen a la 3,3'-diyodotironina, a la 3',5'-diyodotironina y a otros compuestos (Brent, 1994).

1.1.2.3. Regulación de la función tiroidea

La TSH es una glicoproteína secretada por células especializadas (Tirotopos) en la adenohipófisis. La hormona está integrada por 2 cadenas de polipéptidos: la α es casi idéntica a las α de las hormonas Luteinizante, folículo estimulante y gonadotropina coriónica. La especificidad de TSH depende de la cadena β , que es distinta y tiene enorme importancia para el reconocimiento del receptor de la TSH. La actividad biológica de TSH aparece sólo cuando se combinan las 2 cadenas (Greenspan, 1988).

Los mecanismos extratiroideos de la secreción de TSH por la hipófisis modulan la hormona tiroidea, mediante un mecanismo de retroalimentación negativa (Figura 3). Pruebas recientes sugieren que a nivel de la hipófisis sólo la Triyodotironina producida en forma local por monodesyodación de T4,

es capaz de inhibir la secreción de TSH; en consecuencia, es el único sitio en que la monodesiodación de T4 a T3 es un requisito previo para la expresión de la actividad metabólica de T4 (Greenspan, 1988).

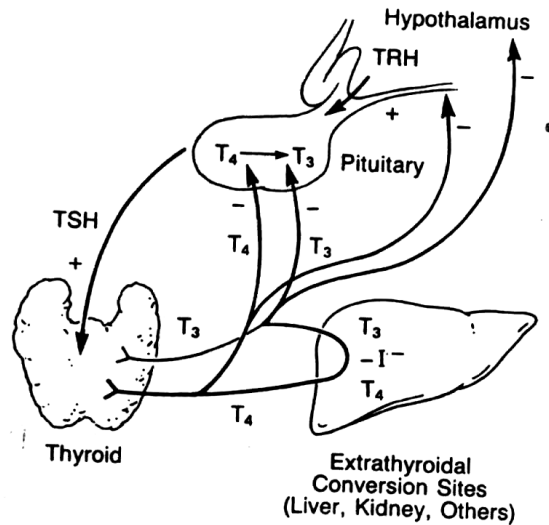


Figura 3 The regulation of thyrotropin (TSH) secretion by the anterior pituitary. Positive effects of thyrotropin-releasing hormone (TRH) from the hypothalamus and negative effects of circulating 3,5,3'-triiodothyronine (T3) and T3 from intrapituitary and hypothalamic conversion of thyroxine (T4).

El ajuste del mecanismo de retroalimentación de hormona tiroidea - TSH, es modulado por un tripéptido, hormona liberadora de TSH (TRH). Este factor está en el encéfalo, pero en mayor concentración en el hipotálamo. La TRH llega a la adenohipófisis desde el hipotálamo a través del sistema porta hipotálamo-hipofisiario. Después de unirse con receptores específicos en los

Tirotropos, TRH incrementa la síntesis y secreción de TSH, debido a la activación del sistema de la adenilato ciclasa que posiblemente induce el ingreso de calcio a las células, lo que inicia la secreción de TSH (Correa, 1999). La TRH no sólo activa este proceso de secreción de la TSH, sino también el de síntesis de ella, a través de la activación de los procesos de transcripción y traslación del gen de la subunidad β de la TSH. Finalmente, también ejerce una acción sobre los procesos postraslacionales de la TSH que la hacen biológicamente activa (Correa, 1999). Si bien el AMPc estimula la secreción de TSH por los Tirotropos, hay datos de que este agente pudiera no mediar la liberación de TSH estimulada por TRH. El concepto actual es que la TRH constituye una influencia tónica en la retroalimentación negativa de la hormona tiroidea sobre la secreción de TSH; se piensa que TRH regula la sensibilidad o el punto de "ajuste" del mecanismo de retroalimentación negativa de TSH por la hormona tiroidea. Las hormonas tiroideas a su vez, modulan la respuesta adenohipofisaria a TRH, al modificar el número de receptores para esta hormona en los Tirotropos (Greenspan, 1988).

Una vez secretada, la TSH actúa sobre los tirocitos foliculares estimulando su crecimiento (hipertrofia) y su replicación (hiperplasia), el índice de captación de yodo, la tasa de síntesis y secreción de hormonas tiroideas. Estas acciones resultan de la unión de la TSH a receptores específicos, de alta afinidad, en la superficie celular de los tirocitos; lo que conduce a la

activación del sistema de la adenilato ciclasa, que se traduce en un aumento de la 3'5'adenosina monofosfato cíclica, compuesto que es responsable de la activación de la mayoría de los efectos de la TSH en el tirocito folicular (Correa, 1999).

Para cerrar el sistema de regulación central, los dos aferentes de este sistema, la T3 y la T4, actúan en el hipotálamo y en la hipófisis, siendo el principal sitio de acción las células Tirotropos de la adenohipófisis, donde existe la deydinasa tipo II o T4 5'deydinasa insensible al propiltiouracilo, que convierte la T4 libre en T3 libre. Y es esta última hormona la que se fija a los receptores nucleares para ella, lo que conduce una disminución de la expresión de los genes de las subunidades α y β de la TSH. Finalmente, la somatostatina y la dopamina parecen ser los inhibidores fisiológicos de la secreción de la TRH hipotalámica. De otro lado, farmacológicamente, los estrógenos estimulan la respuesta a la TRH y los glucocorticoides la inhiben. Además, las vías adrenérgicas α 1 son inhibitorias y las α 2 son estimulatorias de la respuesta a la TRH (Correa, 1999).

El sistema de regulación intratiroideo es mediado por la concentración intratiroidea de yodo orgánico, se le conoce como sistema de autorregulación porque no es dependiente de la actividad de la TSH, aunque su efecto final sí se relaciona con ella. De manera tal que en presencia de exceso de yodo hay

inhibición y en estados de déficit del mismo se aumenta la respuesta a la TSH, posiblemente a través del grado de generación de AMP cíclico. Estas modificaciones en la respuesta a la TSH se expresan en las tasas de crecimiento, de captación de aminoácidos, del metabolismo de la glucosa y de síntesis de ácidos nucleicos (Correa, 1999).

1.2. ONTOGENESIS DE LA FUNCION HIPOTALAMO-HIPOFISIS-TIROIDES

1.2.1. FUNCION TIROIDEA EN EL FETO

1.2.1.1. Generalidades

Las anomalías del desarrollo de la glándula tiroides suelen representar defectos de la morfogénesis temprana, como consecuencia de la migración aberrante del tejido tiroideo. Las anomalías de la embriogénesis tiroidea (disgenesia tiroidea) comprenden agenesia o tejido ectópico en localizaciones sublingual, cervical, mediastinal e incluso intracardiaca. Aunque el tejido tiroideo ectópico puede ser en alguna medida funcionante, estos niños manifiestan habitualmente hipotiroidismo (Taeusch, 1993).

1.2.1.2. Metabolismo fetal de la hormona tiroidea

Aunque la glándula tiroides es la única fuente de T4, la mayor parte de T3 que circula en el adulto deriva de la conversión de T4 a T3 a través de la monodeyodinación en los tejidos periféricos. La deydodinación de las yodotironinas es la principal vía metabólica, y la monodeyodación puede tener lugar en el anillo externo (fenólico) o el interno (tiroilo) de la molécula de yodotironina. La monodeyodación del anillo externo de T4 produce T3, la forma activa de la hormona tiroidea con máxima afinidad por el receptor nuclear de hormona tiroidea. La monodeyodación del anillo interno de T4 produce rT3, un metabolito inactivo. En los seres humanos maduros, del 70-90% de la T3 circulante deriva de la conversión periférica de T3, y el 10-30% de la secreción glandular directa. Prácticamente toda la rT3 circulante deriva de la conversión periférica, y solo el 2-3% proviene directamente de la glándula tiroides (Taeusch, 1993).

Se han descrito dos tipos de yodotironina monodeyodinasa de anillo externo (5'MDI). La 5'MDI tipo I, segregada predominantemente por el hígado y el riñón, es una enzima inhibida por el propiltiouracilo y su actividad es estimulada por la hormona tiroidea. La 5'MDI tipo II, localizada fundamentalmente en el cerebro, hipófisis y tejido adiposo pardo, es insensible al propiltiouracilo, y su actividad es inhibida por la hormona tiroidea. Es probable que la actividad de la 5'MDI hepática, y quizá la renal y la muscular, sea responsable de la mayor parte de la deydodinación periférica de T4; la 5'MDI tipo II actúa principalmente para aumentar los niveles

intracelulares locales de T3 en el cerebro y la hipófisis, y es importante para la función del tejido adiposo pardo durante el periodo postnatal inmediato (Taeusch, 1993).

Los fetos del tercer semestre presentan 5'MDI tipo I y tipo II. Ambas responden a la hormona tiroidea. Sin embargo, la actividad hepática de 5'MDI tipo I comienza a responder a la hormona tiroidea (es decir, la actividad disminuye en el hipotiroidismo) sólo durante las últimas semanas del embarazo. En cambio, la actividad tipo II cerebral responde (aumenta con el hipotiroidismo) durante todo el último trimestre de la gestación. Así, la deyodinasas tipo II probablemente desempeña un papel importante para brindar una fuente de T3 intracelular a los tejidos (por ejemplo, hipófisis y en algunas especies, tejido adiposo pardo y cerebro) dependientes de T3 durante la vida fetal, mientras que la ontogenia de la enzima tipo I (para aumentar los niveles séricos de T3) sólo aumenta durante las últimas semanas de embarazo y la vida extrauterina (Taeusch, 1993).

La mayor parte de los tejidos fetales, incluida la placenta, presentan una yodotironina monodeyodinasas de anillo interno (tirosilo) (5'MDI tipo III). Este sistema enzimático cataliza la conversión de T4 a rT3 y T3 a T2. El metabolismo fetal de la hormona tiroidea se caracteriza por un predominio de la actividad de la enzima tipo III, sobretodo en hígado, riñón y placenta, y esto explica en parte el aumento de los niveles circulantes de rT3 observados

en el feto. La deiodinasa tipo III placentaria contribuye a los niveles de rT3 del líquido amniótico y, presumiblemente también a la rT3 circulante. Sin embargo, la persistencia de altos valores circulantes de rT3 durante varias semanas en el recién nacido indican que las actividades de la 5'MDI tipo III expresadas en tejidos no placentarios también son importantes para mantener altos niveles de rT3 circulante (Taeusch, 1993).

Tanto la T3 como la T4 sanguíneas están asociadas con diversas proteínas plasmáticas incluida globulina transportadora de tiroxina (TBG), prealbumina transportadora de tiroxina (TBPA) y albúmina. La TBG sirve como la proteína de transporte primario de T3 y T4; alrededor del 70% de la T4 total y el 40–60% de la T3 total están ligadas a TBG. El resto de las hormonas tiroideas están distribuidas casi por igual entre TBPA y albúmina. La TBG, la TBPA y la globulina son producidas por el hígado, y la producción aumenta progresivamente durante la segunda mitad de la gestación. La producción hepática de TBG es estimulada por los estrógenos, y los niveles estrogénicos crecientes durante el embarazo explican, por lo menos en parte, la concentración plasmática total de T4 que asciende paulatinamente desde mediados del embarazo hasta las 34 – 35 semanas de gestación (Taeusch, 1993).

1.2.1.3. Regulación endocrina de la glándula fetal

En el patrón de secreción perinatal de hormona tiroidea (Figura 4), se pueden considerar 3 fases en la maduración del control del sistema tiroideo: hipotalámica, hipofisiaria y tiroidea. Los cambios en estos sistemas son complejos y se sobreagregan al aumento de producción y concentración sérica de globulina transportadora de hormona tiroidea (TGB), así como al patrón cambiante de desyodación fetal de yodotironina tisular durante la gestación (Taeusch, 1993).

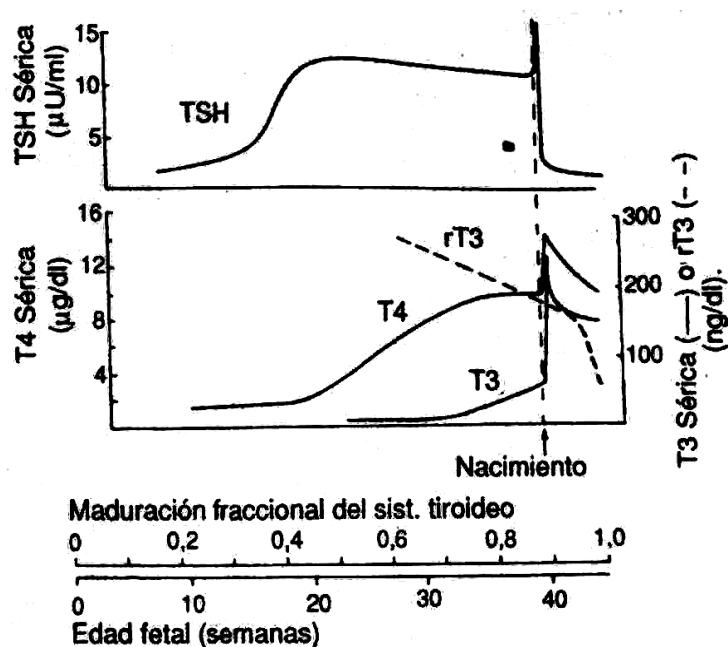


Figura 4. Patrones de los niveles circulantes de TSH, rT3, T4 y T3 en el feto y recién nacido. (*Enfermedades del recién nacido*, Editorial Medica Panamericana, Argentina, 1993, p. 1003).

La glándula tiroides fetal es capaz de concentrar yoduro y sintetizar TG a los 70-80 días de gestación, pero la síntesis de hormona tiroidea es escasa hasta alrededor de las 18 semanas de embarazo. En este momento, la captación de yodo por la célula folicular tiroidea aumenta y la T4 sérica se torna mensurable. Tanto las concentraciones de T4 total y libre aumentan entonces sostenidamente hasta las semanas finales de la gestación. Este patrón difiere del desarrollo de los niveles séricos de T3 en el feto. La concentración sérica fetal de T3 es baja ($<15 \mu\text{g/dL}$) hasta las 30 semanas de gestación y después aumenta lentamente después de las 30 semanas de gestación hasta alcanzar un nivel de aproximadamente $50 \mu\text{g/dL}$ en el suero de cordón en el término (Taeusch, 1993).

El aumento prenatal de T3 sérica parece obedecer en gran medida a la maduración progresiva de la actividad de yodotironina de yodinasas del anillo externo (fenólico) hepática tipo I y la mayor conversión hepática de T4 a T3, aunque pueden participar otras fuentes tisulares de de yodinasas, como la grasa parda y el riñón (Taeusch, 1993).

La TSH sérica fetal aumenta rápidamente desde un nivel bajo a las 18 semanas de gestación hasta un valor pico a las 24 -28 semanas de gestación para declinar después gradualmente hasta el término (Taeusch, 1993).

La función de la glándula tiroides fetal se desarrolla bajo la influencia de un nivel de TSH moderadamente elevado durante la última mitad de la gestación. El aumento de la T4 sérica durante el último trimestre se acompaña de una disminución progresiva de la TSH sérica, lo que sugiere que durante este periodo sobrevienen los cambios de sensibilidad de las células foliculares tiroideas a la TSH y de sensibilidad tirotrófica hipofisiaria al efecto de retroalimentación negativa de las hormonas tiroideas. La hipófisis contiene una yodotironina deiodinasa de anillo externo tipo II que convierte la T4 en T3 activa, que a su vez modula la producción de TSH. En la mayoría de los casos, la T4 circulante es la más importante en el control de TSH. Así, cuando el nivel de T3 circulante es bajo (como en la mitad de la gestación), puede haber un control significativo de realimentación negativa (por T4) de la secreción hipofisiaria de TSH (Taeusch, 1993).

La inmunoreactividad TRH se detecta en el hipotálamo en la mitad de la gestación y aumenta marcadamente durante el tercer trimestre después que se observa el pico de actividad sérica de TSH. El recién nacido prematuro (antes de las 30 - 32 semanas) se caracteriza por presentar bajos niveles de T4 y T4 libre, un nivel normal o bajo de TSH y una respuesta normal o prolongada de TSH al TRH, lo que indica un estado de deficiencia fisiológica de TRH. El feto humano de término responde a las dosis farmacológicas maternas de TRH con un aumento algo prolongado de TSH, lo que sugiere un grado de hipotiroidismo hipotalámico (terciario) relativo. Las fuentes

fetales de TRH no hipotalámico (placenta y páncreas) contribuyen probablemente al aumento de los niveles circulantes de TRH fetales y de sangre de cordón, y presumiblemente son responsables de los altos niveles circulantes de TSH característicos del feto al promediar la gestación (Taeusch, 1993).

1.2.1.4. Implicación de la placenta en la función tiroidea

Varias observaciones clínicas sugieren la independencia relativa de los sistemas hormonales hipotálamo - hipofisiario - tiroideo materno y fetal. La placenta es impermeable a la Tirotropina (TSH) y, en gran medida es impermeable a las hormonas tiroideas. Estos datos fueron revisados recientemente por Roti (1988) y se resumen en el Cuadro 1. Estudios con diversos análogos de hormona tiroidea y marcadores brindan evidencia directa de transferencia placentaria de hormonas tiroideas. Las grandes dosis de T4 administradas a mujeres provocaron sólo cambios menores de las concentraciones séricas de cordón de yodo hormonal. Las dosis suprafisiológicas de T3 administradas en forma crónica a embarazadas varias semanas antes del parto indujeron un aumento significativo de los niveles séricos materno de T3, pero sólo un descenso mínimo de los niveles fetales de T4. Por lo tanto, es evidente que el pasaje transplacentario de hormonas tiroideas es bastante limitado. Esta limitación obedece en parte a la presencia en el tejido placentario de una yodotironina desyodinasa del anillo

interno (tiroilo), que convierte la T4 a rT3 inactiva, y la T3 a diyodotironina inactiva o T2 (Taeusch, 1993).

SUSTANCIA	PERMEABILIDAD PLACENTARIA
I	++++
TRH	+++
Antitiroideos	+++
Anticuerpos IgG	+++
T3	0
T4	+
TSH	0

Cuadro 1. Permeabilidad placentaria a las sustancias que afectan la función tiroidea (Datos de Roti, E. :*Regulation of thyroid-stimulating hormone (TSH) secretion in the fetus and neonate*. J. Endocrinol Invest 11:145-150. 1988).

Las inmunoglobulinas maternas de la subclase IgG son selectivamente transportadas a través de la placenta, sobre todo en etapas gestacionales tardías. Se ha comunicado hipertiroidismo o hipotiroidismo en respuesta a los anticuerpos estimulantes del receptor de TSH o bloqueantes del receptor de TSH. Las anomalías clínicas desaparecen con la degradación de los anticuerpos maternos. La vida media de los anticuerpos IgG derivados de la madre en sangre del recién nacido es de alrededor de 20 días (Dussault, 1980).

La placenta es libremente permeable al yoduro y la tiroides fetal es particularmente sensible a los efectos inhibidores del yodo sobre su función. La exposición a cantidades relativamente pequeñas de yodo materno se han asociado con hipotiroidismo neonatal transitorio. La fuente puede ser sustancia de contraste radiopaca usada para procedimientos radiológicos y medicaciones maternas, incluidos lociones tópicas con yodo que pueden ser absorbidas a través de las mucosas (Taeusch, 1993).

Los fármacos Antitiroideos con grupo activo tiourelino atraviesan la placenta y pueden comprometer la función tiroidea fetal y neonatal. La placenta también es permeable a ciertos análogos sintéticos de la hormona tiroidea como el 3',5'-dimetil, 5'-isopropil tironina (DIMIT). Finalmente, la placenta es permeable al factor peptídico hipotalámico liberador de hormona tiroidea (TRH). Tanto los fetos de primates como los humanos responden a principios del tercer trimestre a las dosis farmacológicas de TRH con aumento de la TSH sérica. Sin embargo, normalmente se detecta escaso TRH endógeno en humanos adultos, por la presencia de sistemas enzimáticos sanguíneos que degradan el TRH. Aunque el suero de embarazadas contiene niveles algo mas bajos de estas enzimas que los sueros de mujeres no gestantes, los niveles prácticamente no mensurables de TRH de la circulación materna ejercen escasos efectos sobre la función tiroidea (Dussault, 1980).

Además del TRH, la placenta produce actividad tipo Tirotropina. La subunidad α de la TSH es idéntica a la de la gonadotropina coriónica humana (hCG), y la subunidad β de hCG presenta una característica estructural homóloga con la subunidad β de la TSH; por ende, la hCG tiene cierta bioactividad tipo TSH. De todos modos, la potencia biológica de la hCG es sólo alrededor del 0.01% de la de la TSH, y la hCG normalmente ejerce poca influencia sobre el desarrollo o la función del sistema tiroideo fetal (Taeusch, 1993).

La permeabilidad placentaria a las moléculas maternas podría representar un factor que afecte la función tiroidea fetal como resultado de estados fisiopatológicos maternos (administración aguda de yoduro, patología tiroidea autoinmune o farmacoterapia por tirotoxicosis). No obstante, el eje hipófiso-tiroideo se desarrolla con normalidad, independientemente de la influencia del eje tiroideo materno (Taeusch, 1993).

1.2.1.5. Función tiroidea durante el periodo neonatal

Por lo general, gran parte del desarrollo tiroideo fetal es preparatorio, y aporta la cantidad relativamente grande de hormonas tiroideas necesarias para el desarrollo postnatal normal. La producción de hormonas tiroideas activas está marcadamente aumentada en asociación con los efectos del

parto. Al nacimiento y al parecer debido a la disminución en la temperatura corporal en el medio extrauterino, se produce una marcada secreción de TSH alcanzando concentraciones hasta de 80 - 90 $\mu\text{UI/ml}$ a los 30 minutos del nacimiento (Figuras 5 y 5 A). Estos altos niveles sericos declinan en los 3 días siguientes a cifras menores de 20 $\mu\text{UI/ml}$ (Fisher, 1981).

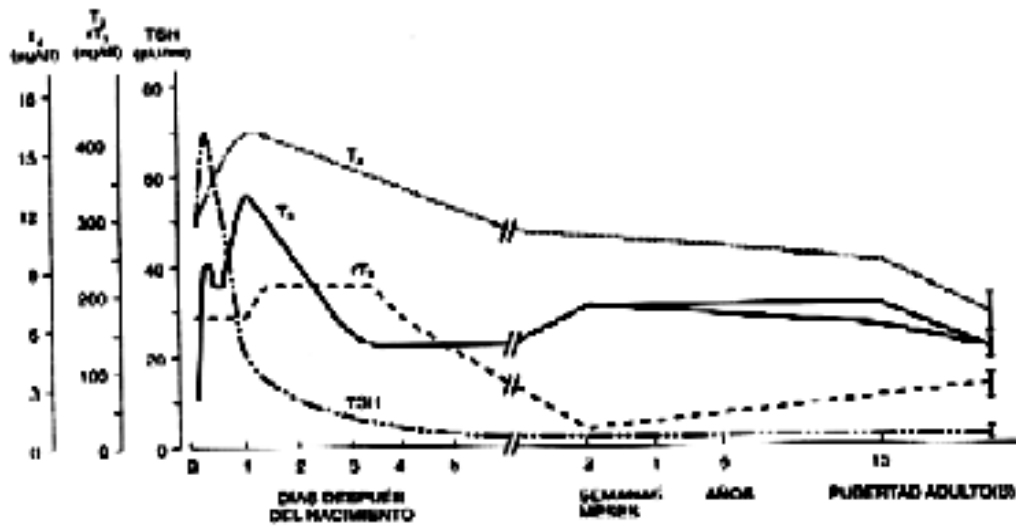


Figura 5. Niveles de T₄, T₃ y TSH durante la infancia. (*Tratado de endocrinología pediátrica*, Madrid, Editorial Espaxs; 1995; p. 537).

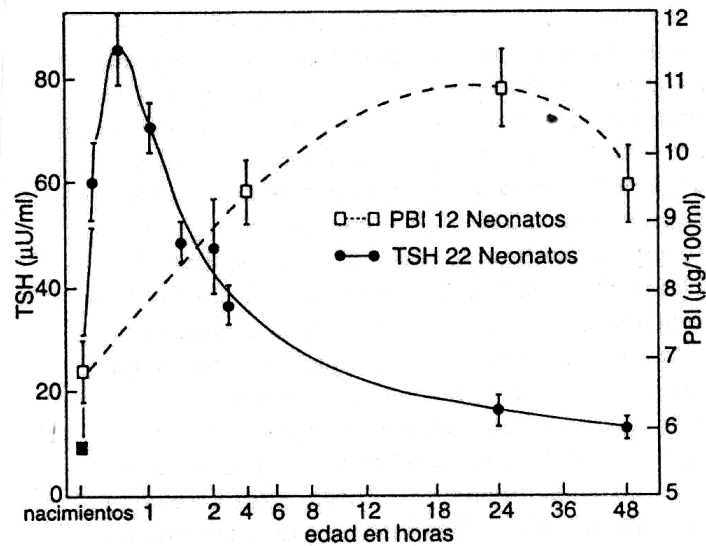


Figura 5A. Evolución de los valores de TSH en sangre de recién nacidos durante las primeras 48 horas de vida. (*Tratado de endocrinología pediátrica*, Madrid, Editorial Espaxs; 1995; p. 1228).

In útero, la T4 es metabolizada preferencialmente a una hormona inactiva, la rT3. La liberación de TSH durante el parto incrementa la concentración total y libre de T4 y la T3 llega aproximadamente a 300 ng/dL en unas 4 horas. Luego, los niveles de T3 descienden durante la primera semana de la vida y llegan a niveles inferiores a 200 ng/mL. Los niveles de rT3 se mantienen durante 2 semanas (200 ng/mL) y, a las 4 semanas, descienden a unos 50 ng/dL. Hay pequeñas cantidades de T4 que atraviesan la placenta, pero no son suficientes para producir interferencias en el diagnóstico de hipotiroidismo congénito del recién nacido (Nelson, 1992). Los niveles de TG son más altos durante la edad pediátrica declinando a valores del adulto

durante la adolescencia. Esto explica en parte la disminución progresiva en los niveles séricos de hormonas tiroideas que normalmente ocurre con la edad (Correa, 1999).

La T4 sérica del feto aumenta progresivamente desde la mitad del embarazo hasta 11.5 $\mu\text{g/dL}$ al término del mismo. Los niveles de T3 son indetectables antes de la 30 semana y desde ese momento aumentan poco a poco para llegar a 50 ng/dL al final del embarazo. En cambio, los niveles de T3 reversa son muy altos en el feto (250 ng/dL a las 30 semanas) y descienden hasta 150 ng/dL al llegar a término. Los niveles máximos de TSH de unas 15 $\mu\text{U/mL}$ se alcanzan en el feto a las 20-24 semanas y luego disminuyen gradualmente a 10 $\mu\text{U/mL}$ al final del embarazo (Nelson, 1992).

Las hormonas tiroideas afectan importantes procesos posnatales, incluyendo crecimiento, termogénesis y desarrollo neurológico. La transición en gran medida exitosa de los recién nacidos con atireosis a la vida extrauterina habla a favor de la limitada importancia de la tiroides fetal durante todo el embarazo, excepto en las últimas semanas. El cerebro fetal puede representar la excepción, dado que es un sitio importante de actividad de la yodotironina monodeyodinasas tipo II. La presencia de este sistema enzimático en el cerebro en etapas tempranas del desarrollo, así como su demostrada respuesta al hipotiroidismo fetal en la rata y la oveja, sugiere que

la conversión intracelular de T4 a T3 en el cerebro es importante en estas especies para el desarrollo y la diferenciación normales del sistema nervioso central. Se desconoce el periodo crítico de este efecto en el feto humano, pero el tratamiento precoz del hipotiroidismo congénito en el recién nacido previene el retardo mental, lo que sugiere que el periodo de dependencia tiroidea del cerebro humano se extiende a la vida posnatal (Taeusch, 1993).

1.3. HIPOTIROIDISMO

Se define como hipotiroidismo al estado clínico y bioquímico resultante de múltiples anormalidades estructurales y funcionales que conducen a una deficiente producción de hormonas tiroideas y por consiguiente a una concentración sérica y tisular subnormal de ellas, que se corrige con el tratamiento con hormona tiroidea (Correa, 1999).

El proceso puede manifestarse al comienzo de la vida. Si los síntomas aparecen después de un período de función tiroidea aparentemente normal, el proceso puede ser verdaderamente “adquirido” o parecerlo solamente y deberse a uno de los distintos déficit congénitos cuyas manifestaciones aparecen tardíamente (Nelson, 1994).

1.3.1. HIPOTIROIDISMO CONGENITO (HC)

El hipotiroidismo es la alteración funcional mas común de la glándula tiroides, ocurre en todas las edades y la incidencia por sexo es 2 hombres a 1 mujer. El examen de detección del HC es confiable para identificar los lactantes afectados, ya sea que el examen detecte un nivel bajo de T4 o una concentración elevada de TSH (Taeusch, 1993). Desde la creación de las campañas nacionales para detectar selectivamente el HC en los recién nacidos, muchos millones de niños se han sometido a esas pruebas. Se ha comprobado una prevalencia de 1 en 4.000 lactantes en todo el mundo, algo menor en Japón (1 en 5.500) y menor aún en los africanos que residen en EE. UU. (1 en 32.000) (Nelson, 1992).

El HC representa una de las mas comunes causas prevenibles de retardo mental. El eje fetal hipotálamo – pituitaria - tiroides comienza a funcionar hacia la mitad de la gestación y es maduro en los neonatos a término al nacer. Si el hipotiroidismo fetal se desarrolla, pueden demostrarse algunos efectos en ciertos sistemas de órganos, como el Sistema Nervioso Central y esqueleto. Sin embargo, la mayoría de los infantes parecen normales al nacer. Datos recientes sugieren que el feto hipotiroideo es protegido hasta cierto punto por la transferencia placentaria de hormona tiroidea; niveles sericos de T4 de sangre de cordón de fetos atiroideos son aproximadamente una la tercera parte de los niveles maternos. Además, estudios de hipotiroidismo hechos en modelos animales demuestran un incremento de los niveles cerebrales de yodotironina de yodinasas, la enzima que convierte

T4 a T3. En los fetos hipotiroideos, esta enzima aumentada actúa en la T4 de origen materno lo suficiente para producir concentraciones normales de T3 cerebral fetal. Entonces, parece que la detección y tratamiento temprano de HC debe tener el potencial para revertir completamente los efectos del hipotiroidismo fetal en todos los casos excepto en los más severos, por ejemplo, lactantes atiroideos nacidos de madres con problemas tiroideos que resultan en transferencia placentaria inadecuada de hormona tiroidea (AAP, 1993).

Los programas de tamizaje neonatal para HC están destinados a detectar niveles séricos elevados de TSH en muestras de sangre recolectadas en papel de filtro. Algunos programas dosan directamente TSH, y otros dosan TSH en caso de concentraciones bajas o normales bajas de T4. La mayor parte de los programas de Estados Unidos efectúan una determinación inicial de T4, y dosan TSH en las muestras con el 10% mínimo de valores de T4. Un nivel elevado de TSH ($> 20 \mu\text{U/mL}$) sugiere hipotiroidismo primario. Casi todos los programas de tamizaje consisten simplemente en esto, y algunos casos no son detectados. Por ende, no se debe descartar la investigación de ningún recién nacido que debute con signos o síntomas sugestivos de disfunción tiroidea sobre la base de los resultados del tamizaje previo (Taeusch, 1993).

Los resultados falsos positivos son frecuentes. Hasta 3% de los neonatos examinados tienen T4 baja no debida a HC. La mayoría de ellos son recién nacidos prematuros con una concentración normal de TSH en bs cuales la T4 baja es transitoria. Los recién nacidos con un examen de detección positivo no deben ser calificados como hipotiroideos ni tratados por este trastorno, como mínimo hasta que esté en marcha el examen de confirmación. Si la muestra de sangre del recién nacido contiene una concentración elevada de TSH y un bajo nivel de T4, se puede iniciar el tratamiento antes de conocer los resultados de las pruebas confirmatorias (Taeusch, 1993). Por tanto, el HC es una emergencia endocrinológica porque de no instaurarse una terapia adecuada en los primeros días de vida, se produce invariablemente daño neurológico y retardo mental (Correa, 1999).

1.3.1.1. Etiología y patogenia

El hipotiroidismo se puede clasificar en diferentes formas. Puede ser primario (insuficiencia de la tiroides); secundario (por deficiencia de TSH de la hipófisis); o terciario (por deficiencia hipotalámica de TRH), o puede haber una anomalía en los receptores de T4 en la célula, que induzca resistencia periférica a la acción de las hormonas tiroideas (LaFranchi, 1985).

a. Disgenesias tiroideas

El término disgenesia tiroidea hace referencia a recién nacidos con glándula tiroidea ectópica o hipoplásica (o ambas), así como a aquellos con agenesia tiroidea, y constituyen la principal causa de HC (Taeusch, 1993). De acuerdo a la presencia o no de tejido tiroideo se clasifican como : aplasias (50%), hipoplasias (25%) y ectopias tiroideas (25%). La etiología es desconocida aunque se especula sobre la existencia de anticuerpos bloqueadores del crecimiento tiroideo (Correa, 1999).

La mayoría de los recién nacidos con disgenesia tiroidea son asintomáticos, y pocos presentan signos de hipotiroidismo durante las primeras semanas de vida (Taeusch, 1993). Esto se atribuye al paso a través de la placenta de cantidades moderadas de la T4 de la madre, que proporcionan al feto niveles de un 25 - 50% de lo normal, al nacer (Nelson, 1992). La mayoría de los recién nacidos afectados tienen concentraciones bajas de T4 sérica y altas de TSH en sangre de cordón o en gotas de sangre recolectadas sobre papel de filtro entre los 2 - 5 días de vida. Del 10 - 20% de los recién nacidos hipotiroideos tienen niveles de T4 en el límite inferior normal con aumento de los valores de TSH (Taeusch, 1993).

b. Dishormogénesis tiroideas o anomalías de la biosíntesis hormonal

Representan la segunda causa de HC en regiones no deficientes de yodo.

Generalmente su transmisión es autosómica recesiva y usualmente se

acompaña de bocio (Correa, 1999). Estas se deben a: a) una disminución de la respuesta a TSH; b) a una alteración en el atrapamiento de yodo; c) a defectos en la organificación de yodo; d) a defectos en la síntesis y organificación de Tiroglobulina; e) a una alteración en el acoplamiento de yodotirosinas; f) a una alteración en la desyodación de las yodotirosinas.

c. Defectos hipotálamo-pituitarios

En HC de origen hipotalámico (secundario) y pituitario (terciario), la deficiencia de TSH puede ocurrir como un evento aislado o hacer parte de un cuadro de panhipopituitarismo (Correa, 1999).

El HC secundario a la estimulación inefectiva de la TSH de la secreción de hormona tiroidea puede obedecer a diversas anormalidades de la síntesis y el metabolismo de la TSH. Estas comprenden desarrollo hipotalámico o hipofisiario anormal, deficiencias aisladas o familiares de secreción de TRH o TSH, y deficiencia de TSH asociada con otras deficiencias de hormonas hipofisarias (Taeusch, 1993).

d. Hipotiroidismo primario transitorio

Este proceso es transitorio y no debe confundirse con las demás formas descritas de hipotiroidismo. Se produce por el paso transplacentario de

drogas antitiroideas o por una excesiva exposición a yodo, bien sea durante la vida fetal (medios de contraste) o en el periodo neonatal (antisépticos). Respecto al hipotiroidismo neonatal transitorio por paso de anticuerpos maternos bloqueadores dirigidos contra el receptor de la TSH (TRAb), se ha determinado recientemente que su incidencia corresponde a un 20% del total de los casos de hipotiroidismo neonatal transitorio (Matsurra, 1980).

1.3.1.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El estado clínico del hipotiroidismo se manifiesta en todos los órganos y sistemas. Los síntomas y signos se presentan de acuerdo a la edad del paciente, a la velocidad con que se desarrolla el proceso y a la patología asociada. Sin embargo, amerita resaltar en ellos y en los adolescentes, la estatura corta, los trastornos en el desarrollo sexual (incluyendo el retardo puberal en ambos sexos y la pubertad precoz verdadera sin aumento en la maduración ósea en mujeres), y el retardo mental que acompaña al cretinismo (Grant, 1992).

Prácticamente todos los recién nacidos con HC son asintomáticos al nacimiento. Existen algunas manifestaciones clínicas de aparición temprana que deben alertar al médico a descartar esta entidad: presencia de fontanelas amplias, especialmente la fontanela posterior, ictericia “fisiológica” prolongada anormalmente, inactividad y la falta de llanto. A medida que

transcurren los días, el niño se torna más sintomático. Presenta constipación y distensión abdominal, succiona sin fuerza y es necesario despertarlo para alimentarlo. Para los 3-6 meses de vida ya el cuadro clínico se manifiesta totalmente. El niño presenta acrocianosis, piel seca, cabello escaso, edema de genitales, extremidades y periorbitario, hernia umbilical, bradicardia, cardiomegalia, anemia y carotinemias. La dentición se retrasa al igual que el desarrollo neurosicomotor (Correa, 1999).

Por sistemas se pueden resumir así:

Manifestaciones Neurológicas: Hipotonía infantil, ausencia de llanto, retardo psicomotor, somnolencia.

Manifestaciones Respiratorias: apnea, asfixia, respiración ruidosa.

Manifestaciones Cardiovasculares: cardiomegalia, soplos.

Manifestaciones Gastrointestinales: constipación, dificultad al comer, aumento de peso al nacer, abdomen grande, macroglosia, anorexia, ictericia prolongada, hernia umbilical.

Manifestaciones músculo esqueléticas: pseudo hipertrofia, miembros cortos.

Manifestaciones Cutáneas: carotinemias, cabello escaso, grueso y quebradizo, hipotermia, piel moteada, seca y escamosa, voz ronca, edema en genitales y extremidades, mixedema.

Manifestaciones endocrinas: bocio (con error del metabolismo tiroideo)

1.3.1.3. DIAGNOSTICO PARACLÍNICO

El diagnóstico precoz del HC es fundamental, pues el Sistema Nervioso Central (SNC) del niño es dependiente de las hormonas tiroideas para su desarrollo durante los 3 primeros años de vida. La carencia de hormonas tiroideas durante este lapso produce invariablemente un marcado retraso en el crecimiento, vascularización y mielinización del SNC. Con un diagnóstico precoz e instaurando un tratamiento adecuado se puede prevenir el daño neurológico y su trágica secuela: el retardo mental (LaFranci, 1985).

1.3.1.3.1. Tamizaje neonatal

En la mayoría de los trastornos metabólicos, las consecuencias clínicas se desarrollan en la vida postnatal. Son el resultado de anomalías bioquímicas que aparecen cuando el recién nacido ya no está protegido por el intercambio materno-fetal intrauterino. La fenilcetonuria (FCU) fue el primero de los trastornos metabólicos que se supo que se beneficiaba con un

tratamiento temprano con la dieta. Este hecho se estableció a finales de la década de 1950. Luego, el desafío se convirtió en detectar la FCU en todos los lactantes antes de que ocurriera un daño encefálico irreversible. Es decir, conducir un examen de detección neonatal para un marcador bioquímico de la enfermedad (Glorieux, 1986).

Desde el desarrollo de un programa piloto para tamizaje de HC en Québec y Pittsburg en 1974, el tamizaje neonatal para HC se ha convertido en rutina en todos los países desarrollados del mundo y se está llevando a cabo en el este de Europa, Suramérica, Asia y África. Los programas de tamizaje han beneficiado a los pacientes y sus familias y han producido nueva información sobre la epidemiología, fisiopatología, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad tiroidea en lactantes y en la infancia (Willi, 1991)

Las muestras de sangre se toman bien sea del cordón umbilical en el momento del parto o de sangre capilar de talón, luego de los 3 primeros días de vida . Las muestras se colectan en papel de filtro y se conservan a -70°C hasta su procesamiento (Correa, 1999).

En Europa y Japón se determina la concentración de TSH y en los Estados Unidos y Canadá, la concentración de T4. Ambos test tienen ventajas y desventajas. En el hipotiroidismo primario (tiroideo) la concentración de TSH es alta en tanto que en el secundario y terciario es baja o indetectable.

De este modo, determinando solamente la concentración de TSH, no se detectarían casos de hipotiroidismo secundario o terciario, ni tampoco alteraciones de la globulina transportadora de tiroxina (TBG). Por otro lado, midiendo sólo la T4 no se detectarían algunos casos de ectopias tiroideas, las cuales eventualmente pueden cursar con valores de T4 normales o ligeramente bajos (Willi, 1991) .

Con el fin de mejorar la sensibilidad del programa usando mediciones de T4 se ha implementado la determinación de TSH cuando los valores de T4 están por debajo del percentil 10 (menor de 10 $\mu\text{g/dL}$). Es importante recordar que muestras tomadas en las primeras 48 horas de vida arrojan frecuentemente falsos positivos debido al incremento fisiológico de la TSH (Correa, 1999).

Como regla general, se debe sospechar la entidad cuando la concentración de T4 es menor de 10 $\mu\text{g/dL}$ y/o la TSH es mayor de 20 $\mu\text{U/mL}$. En estos casos se deben repetir las determinaciones de hormonas tiroideas tomando la muestra de una vena periférica y midiendo las concentraciones de T4 total, T3 total y TSH. Cuando se sospechan anomalías de las proteínas transportadoras de hormonas tiroideas, se debe medir la concentración de T4 libre y de ser posible TBG (Willi, 1991). Ante la sospecha clínica de HC y pese a que los resultados iniciales reportados hayan sido normales, se deberán medir nuevamente las hormonas tiroideas, ya que hasta un 5-10%

de los casos de HC no son diagnosticados con los programas masivos debido a error humano en la recolección y/o en el procesamiento de las muestras (Correa, 1999).

1.3.1.3.1.1. Método de tamizaje

1.3.1.3.1.1.1. Medición primaria de T4 con medición posterior de TSH

La mayoría de los programas de Norteamérica una medición inicial de T4 en manchas de sangre en papel de filtro seguida por la medición de TSH en las muestras con valores bajos de T4. Este método puede detectar infantes con hipotiroidismo primario (T4 disminuido o normal bajo con TSH aumentada), con una prevalencia de 1 en 4.000 neonatos. Además, si el resultado de T4 es reportado, este método puede también identificar infantes con deficiencia de Globulina ligadora de Tiroxina (TBG) o con hipotiroidismo hipotálamo-pituitario (T4 disminuido o normal bajo y TSH normal; prevalencia 1 en 5.000 a 10.000 y 1 en 50.000 neonatos, respectivamente) (Willi, 1991). Para asegurar la identificación de infantes con HC que tienen niveles de T4 normal bajos, la concentración de punto corte de T4 debe ser incrementada a los rangos normales (del percentil 10 al 20). Con un percentil bajo de punto de corte, este tamizaje puede perder pacientes que tienen niveles normales de T4 pero niveles de TSH aumentados. En una comparación de un tamizaje con T4 primario vs. TSH primario realizado en Québec midiendo

simultáneamente T4 y TSH en una muestra de tamizaje, un caso de 93.000 infantes tamizados se había perdido por la medición primaria de T4 pero hubiera sido detectado por el tamizaje de TSH primario (AAP, 1993).

Todos los programas de tamizaje que emplean T4 primario seguidos por el de TSH se seguirán en pacientes con resultados de T4 disminuidos y TSH aumentados. El porcentaje de rellamado (notificación del médico para contactar la familia del neonato para acordar las pruebas séricas) en estos programas de tamizaje es de 0.05% aproximadamente, similar al de los programas de tamizaje primario de TSH. Sin embargo, algunos programas primarios de T4 reportan también resultados de T4 bajos en infantes con una T4 en papel de filtro por debajo del punto de corte absoluto, o con concentraciones de T4 bajas en papel de filtro repetidamente (en programas de rutina con 2 recolecciones de muestra en 2 periodos de tiempo). El porcentaje de rellamado (y por tanto el porcentaje de falsos positivos) será mayor con esta práctica, 0.305 aproximadamente (Rotti, 1981).

1.3.1.3.1.1.2. Medición primaria de TSH

La gran mayoría de los programas Europeos y Japoneses favorecen el tamizaje por medición primaria de TSH complementada con determinación de T4 a aquellos niños con valores aumentados de TSH. Con este método, se perderían los infantes con deficiencia de TBG e hipotiroidismo hipotálamo-

pituitario. En el estudio de Québec antes mencionado, comparando los resultados de las pruebas simultaneas de T4 primario seguido de los de TSH primario, 2 casos de HC que se hubieran perdido de 93.000 tamizados por el método primario de TSH fueron detectados por el método primario de T4. El porcentaje de rellamado con método de tamizaje con TSH primario es aproximadamente 0.05%. Con este porcentaje, 2 infantes deberían ser rellamados por cada caso detectado (AAP, 1993).

El 25% o mas de los recién nacidos son ahora dados de alta del servicio de maternidad en las primeras 24 horas y el 40% en las segundas 24 horas de vida y la primera muestra para el tamizaje es obtenida antes de las 48 horas de edad, cuando el nivel normal de TSH puede exceder el punto de corte de los 20 mU/L. Esto resulta en un alto porcentaje de rellamado para este grupo de neonatos a menos que el punto de corte para TSH sea ajustado por edad (Willi, 1991).

1.3.1.3.1.1.3. Mediciones combinadas de T4 primaria y TSH

El método ideal de tamizaje es la medición simultánea de T4 y TSH, aunque la elección del método debe estar basada en la experiencia del programa, necesidades de la población, y disponibilidad de recursos. Hasta que las determinaciones de T4 y TSH puedan hacerse prácticamente en todos los neonatos, los médicos deben estar enterados de las potenciales limitaciones

de cada método de tamizaje para HC. Aún en ausencia de errores humanos y técnicos, estudios sugieren que 5 - 10% de recién nacidos con HC pueden tener concentración normal de la hormona independientemente del método usado y puede ser omitidos por los programas de tamizaje (AAP, 1993).

1.3.1.3.1.2. Muestra

La muestra sanguínea se obtiene del talón del lactante. Esta muestra sencilla, concebida e introducida por Guthrie, ha tenido un impacto enorme sobre el examen de detección de enfermedades inaparentes en el recién nacido. La muestra no sólo es de fácil obtención sino también se envía con facilidad y con pocos gastos a una institución central para su examen. No existen complicaciones para obtener esta muestra del recién nacido, a pesar de que inicialmente hubo temores de que produjeran problemas como infección o hemorragia excesiva. Las principales recomendaciones son que la muestra se obtenga de todo recién nacido antes del alta de maternidad o hacia el cuarto día de vida (Becker, 1993).

Es importante obtener una muestra de sangre para examen de rutina de todos los recién nacidos antes de la salida del hospital, sin tener en cuenta lo rápido que ésta ocurra después del nacimiento (Taeusch, 1993). Sin embargo, el tamizaje antes de la salida es preferible a perder el diagnóstico de hipotiroidismo por la falta de políticas claramente definidas con respecto a

la responsabilidad para la recolección de sangre de niños dados de alta tempranamente (Willi, 1991).

Las muestras de sangre deben ser idealmente recolectadas cuando el niño esta entre 2 y 6 días de edad, pero habrán situaciones en las cuales sea virtualmente imposible. Las muestras de sangre deben ser obtenidas antes de la salida del servicio de maternidad, aunque esta sea antes de las 48 horas de edad. En casos como nacimientos en casa, o en caso de enfermedad grave o neonato prematuro, la sangre debe ser obtenida dentro de los 7 días después del nacimiento (Becker, 1993).

1.3.1.3.1.3. Exámenes de detección

1.3.1.4.1.3.1. Valores de T4 bajos y de TSH elevados

Cualquier niño con nivel bajo de T4 y concentración de TSH mayor a 40 mU/L es considerado hipotiroidismo primario hasta que se pruebe lo contrario. Estos niños deben ser examinados inmediatamente y tener una prueba confirmatoria en suero para verificar el diagnostico. El tratamiento de reemplazo con L-tiroxina debe ser iniciado antes de tener los resultados de las pruebas confirmatorias. En casos en los cuales la concentración de TSH está levemente elevada, por encima de 20 mU/L pero menos de 40 mU/L,

otra muestra en papel de filtro debe ser obtenida para una nueva prueba de tamizaje (Willi, 1991).

Un pequeño número de niños con valores anormales de tamizaje puede tener hipotiroidismo transitorio demostrado por concentraciones normales de T4 y TSH en las pruebas confirmatorias de laboratorio. El hipotiroidismo transitorio aparece raramente en Norteamérica (estimado de 1 en 50.000); la mayoría de los casos resultan del paso transplacentario de anticuerpos bloqueadores del receptor de la Tirotropina. El hipotiroidismo transitorio ocurre más comúnmente en Europa (1 en 200 a 1 en 8.000), asociado con exposición postnatal a yodo en niños nacidos en áreas de Europa con ambiente bajo en yodo. El hipotiroidismo transitorio idiopático en casos asociados con exposición postnatal a yodo es 30 veces más común en neonatos prematuros (Takashima, 1995).

1.3.1.4.1.3.2. Valores de T4 bajos y de TSH normales

Niños con valores bajos de T4 pero valores normales de TSH rara vez tienen insuficiencia tiroidea. El T4 bajo, el perfil de TSH normal, visto en 3 – 5% de neonatos, es a menudo el resultado de un estado benigno de inmadurez hipotalámica (particularmente en niños prematuros quienes representan el 5% de todos los recién nacidos. También son asociados a desórdenes de proteína de unión como la deficiencia de TBG (1 en 5.000) e hipotiroidismo

hipotalámico pituitario (1 en 25.000 a 1 en 50.000), o con hipotiroidismo primario en infantes con elevación de TSH demorada (1 en 100.000) (Willi, 1991). En los programas que reportan resultados de T4 bajos y normales de TSH, no es claro el consenso en cuanto al seguimiento. Estos programas han elegido 1. no tomar acciones futuras, 2. hacer un seguimiento serial con pruebas de tamizaje en papel de filtro hasta que los niveles de T4 se vuelvan normales, o 3. petición de una segunda muestra de sangre para medición de las concentraciones de T4 y TSH, junto con algunas valoraciones de niveles de TBG, así como de T3 UP, T4 libre (AAP, 1993).

1.3.1.4.1.3.3. T4 baja e incremento demorado de TSH

Existe una amplia evidencia que niños con HC pueden nacer con concentraciones de T4 bajas y valores de TSH en el rango normal (1 en 100.000). Los valores de TSH en suero en estos niños aumenta durante las primeras semanas de vida a niveles característicos de hipotiroidismo primario. No es claro si los niños con esta elevación demorada de TSH tienen una anomalía en la regulación negativa pituitaria-tiroides, o si algunos pueden tener una forma adquirida temprana de hipotiroidismo. Es importante, que el tamizaje sea repetido en niños con concentraciones de T4 bajas o en cualquier niño con signos sugestivos de hipotiroidismo (AAP, 1993).

1.3.1.3.1.4. Exámenes confirmatorios

Un hallazgo anormal en un examen de detección en un recién nacido no es diagnóstico de un trastorno. Solamente indica que el neonato podría tener el trastorno. Cuando se identifica alguna anomalía se deben realizar otros exámenes para confirmar o descartar un trastorno (Fisher, 1983).

1.3.1.4.1.4.1. Hormonas tiroideas en suero

La TG es un dímero glicoproteínico que se segrega a través del polo superficial del tirocito en la sustancia coloide. Una pequeña cantidad de la misma se escapa a la circulación y puede medirse en el suero. Los niveles de TG aumentan bajo el estímulo de la TSH y disminuyen al descender la TSH. Sus niveles son altos en los recién nacidos, en los pacientes de enfermedad de Graves y en el bocio endémico. La elevación más intensa de la TG se observa en los enfermos con carcinoma diferenciado del tiroides. En los lactantes sin tiroides puede haber TG sérica indetectable (Nelson, 1992).

Los niveles séricos de TSH son un índice muy sensible del hipotiroidismo primario. Para determinar la TSH en suero, los métodos de RIA han sido sustituidos por análisis inmunométricos, que son capaces de medir igualmente los límites inferiores de lo normal de los niveles elevados.

Actualmente existe una 3a generación de análisis (por quimioluminiscencia) que permiten medir la supresión completa de la TSH (Nelson, 1992).

1.3.1.4. Estudios imagenológicos

1.3.1.4.1. Gamagrafia de tiroides

Es una prueba de captación de yodo y de su distribución topográfica. La gamagrafia de la tiroides con ^{99m}Tc y con ^{131}I tiene muy poca utilidad en el estudio de un paciente con hipotiroidismo, aun en las formas con bocio. La excepción es cuándo se realiza como parte de la prueba de supresión con triyodotironina en el síndrome de resistencia generalizada a las hormonas tiroideas (Correa, 1999).

El hallazgo de tejido tiroideo ectópico es diagnóstico de disgenesia tiroideo y confirma la necesidad de un tratamiento con T4, durante toda la vida. Si no se descubre ningún tejido tiroideo hay que sospechar agenesia de tiroides, pero esto también ocurre en los recién nacidos con inmunoglobulina inhibidora unida a la TSH y en los lactantes con un defecto de captación de los yoduros. Una glándula tiroides situada normalmente con una captación normal o exagerada del radioisótopo indica un fallo en la biosíntesis de la hormona tiroidea (Dammacco, 1985).

1.3.1.4.2. Ecografías de la tiroides

Su utilidad radica en la capacidad que tiene este procedimiento para evaluar de manera segura el tamaño, la ecogenicidad, los contornos y la homogeneidad de la glándula tiroides. Además, se utiliza para detectar la presencia de nódulos y su aspecto (sólidos, quísticos y mixtos) y de adenopatías cervicales (Correa, 1999).

1.3.1.5. Otras pruebas diagnosticas

1.3.1.5.1. Citología de la tiroides por aspiración biopsia con aguja fina

Es de utilidad sólo para definir la etiología de hipotiroidismos con bocio, como son la tiroiditis linfocítica crónica de Hashimoto, neoplasias malignas, amiloidosis, etc, advirtiendo que este método no diferencia desde el punto de vista citológico un linfoma de una tiroiditis linfocítica crónica de Hashimoto y que solo es una ayuda diagnostica que debe correlacionarse estrechamente con los hallazgos clínicos del paciente (Correa, 1999).

1.3.1.6. TRATAMIENTO

El objetivo básico es prevenir el daño neurológico normalizando rápidamente los niveles de hormonas tiroideas. Idealmente se debe usar levotiroxina

sódica (T4) ya que esta es la forma que fisiológicamente secreta la glándula tiroidea y a partir de ella el organismo obtiene por deiodinasas periféricas (tipo I) la forma metabólicamente activa de la hormona (T3 libre) (Rovert, 1995). Como el 80% de la T3 circulante se forma por monodesyodación de la T4, los niveles séricos de la T4 y de la T3 se normalizan en los lactantes tratados. Esto mismo ocurre también en el cerebro, donde un 80% de la T3 necesaria se origina localmente a partir de la T4 (Nelson, 1992).

Concentraciones de TSH por encima de 20 μ U/ml luego de seis semanas de tratamiento, no necesariamente reflejan una falla en el tratamiento, ya que en algunos recién nacidos la TSH tarda en declinar a niveles normales varios meses (Correa, 1999).

El tratamiento de los hipotiroidismos centrales se realiza también con levotiroxina, usualmente se requiere una menor dosis que la utilizada en hipotiroidismos de origen tiroideo y el control bioquímico se realiza mediante la normalización de los niveles séricos de la T4 (Rovert, 1995). En los síndromes de resistencia a la hormona tiroidea, como norma general se tratan también con levotiroxina, advirtiendo que la resistencia o insensibilidad tiroidea a la TSH usualmente no mejora. Los hipotiroidismos transitorios, dependiendo de la intensidad de los síntomas, pueden tratarse con levotiroxina o simplemente se observan (Correa, 1999).

1.3.1.7. MANEJO CLÍNICO DEL RN CON VALORES BAJOS DE T4 Y ELEVADOS DE TSH (AAP, 1993)

1. El niño debe ser examinado por el médico sin demora. La consulta con el endocrinólogo pediatra es recomendada para facilitar la evaluación diagnóstica y el manejo óptimo.
2. Una historia completa, incluido el estado tiroideo prenatal (drogas y medicaciones) debe ser obtenida, y un examen físico realizado.
3. Mediciones confirmatorias en suero de concentraciones de T4 y TSH deben ser obtenidas. Se debe tener cuidado al comparar los resultados en suero con la concentración normal de hormona tiroidea para la edad. En casos en los cuales una anomalía de TBG es sospechada, alguna valoración de proteínas de unión. Cuando hay una historia de trastornos tiroideos auto inmunes maternos, medición de anticuerpos Antitiroideos (anticuerpos bloqueadores del receptor de Tirotropina así como inmunoglobulina inhibidora de unión a la Tirotropina en el niño y/o madre) ayuda a identificar una forma transitoria de hipotiroidismo neonatal.
4. Estudios diagnósticos opcionales pueden incluir ^{123}I -radioyodo o TC $^{99\text{m}}$ UP y/o exploración para identificar tejido tiroideo funcional.

5. Estudios auxiliares como maduración ósea por patrones intermedios o por mediciones de superficie ósea.

6. Educación a los parientes por personal capacitado, que incluye:

a) Etiología del HC; b) La falta de correlación del estilo de vida parenteral durante el embarazo con causas en la enfermedad; c) El impacto del diagnóstico temprano en la prevención del retardo mental; d) La importancia del seguimiento periódico.

1.3.1.8. SEGUIMIENTO

Examen clínico de rutina, incluyendo la evaluación del crecimiento y desarrollo, debe ser realizado en intervalos regulares durante los 3 primeros años de vida.

Los niños necesitan evaluaciones más frecuentes del laboratorio de función tiroidea para asegurar la dosis óptima de tiroxina. Mediciones de T4 y TSH deben ser realizadas: a las 2 – 4 semanas después de iniciado el tratamiento con L-tiroxina, cada 1 o 2 meses durante el primer año de vida, cada 2 o 3 meses entre 1 y 3 años de edad y cada 3 a 12 meses después hasta completar el crecimiento.

1.3.1.9. PRONOSTICO

El diagnóstico precoz y un tratamiento adecuado desde las primeras semanas de la vida logran un crecimiento longitudinal y un desarrollo neurológico normal comparables al de niños no afectados. No se han encontrado problemas de aprendizaje independientes de la inteligencia en un grupo de niños tratados y vigilados estrechamente durante los 10 primeros años de la vida. Si no se tratan los recién nacidos afectados evolucionan a niños con severo retardo mental. La hormona tiroidea es esencial para el desarrollo cerebral normal en los primeros meses que siguen al nacimiento; el diagnóstico bioquímico debe hacerse lo más pronto posible después del nacimiento, y el tratamiento eficaz debe iniciarse rápidamente para evitar daños cerebrales irreversibles (Nelson, 1992).

Con anterioridad al establecimiento de los programas masivos para la detección precoz de HC, mas del 65% de los niños afectados tenían coeficientes intelectuales por debajo de 85 y hasta 19% por debajo de 15. Estudios hechos en niños con HC que recibieron terapia con hormonas tiroideas durante el primer mes de vida, han mostrado que el 100% tienen coeficientes intelectuales por encima de 74 (Correa, 1999).

2. FORMULACION DEL PROBLEMA A INVESTIGAR Y JUSTIFICACION

2.1. FORMULACION DEL PROBLEMA

Con la Resolución 00412 de 25 de febrero de 2.000 se espera adoptar las medidas necesarias para la detección temprana de HC a fin de mejorar la calidad y expectativa de vida de los recién nacidos. En miras de prepararnos para la aplicación de esta reglamentación, se evaluaron cada uno de los diferentes tiempos de toma de la muestra con el fin de determinar sus ventajas y desventajas y así establecer el protocolo mas adecuado de toma de muestra, y además, se obtuvieron los puntos de corte para la técnica de laboratorio por medio de la cual se realizó la medición de TSH Neonatal.

La importancia de la realización de este estudio esta dada por la adecuación de unos parámetros previamente establecidos a una tecnología específica y a un grupo poblacional determinado.

El propósito fundamental de esta investigación fue determinar los puntos de corte para cada uno de los diferentes tiempos de toma de muestra que sirvan de guía para diferenciar los positivos de los negativos en nuestra población. El punto de corte establecido por la Academia Americana de

Pediatría servirá como guía para considerar a un paciente como enfermo o sano, puesto que este es obtenido a partir de una población con diferentes características ambientales, sociales y culturales respecto a la población de estudio, recomendando que cada laboratorio determine sus propios puntos de corte de acuerdo a la edad del recién nacido en la cual se deben aplicar, así como el momento de obtención de la muestra (AAP, 1993).

2.2. JUSTIFICACION

El HC es la endocrinopatía mas frecuente dentro del periodo neonatal, y constituye una de las principales causas de retardo mental en la infancia. Si se tiene en cuenta que en Colombia hay aproximadamente 1.000.000 de nacimientos anuales y que la incidencia promedio de hipotiroidismo congénito es 1 en 2.500 a 1 en 4.700 recién nacidos vivos, cada año nacerían aproximadamente en nuestro país unos 400 niños con la enfermedad (Higuera, 1996). Los avances en la Ciencia permiten aprovechar la tecnología existente en el medio para diagnosticar precozmente la entidad e iniciar oportunamente el tratamiento a fin de evitar el retardo mental y demás complicaciones en el recién nacido, prolongando los años de vida útil del niño hipotiroideo y a la vez, la esperanza de vida al nacer. Además, la medición de los niveles de TSH por medio del tamizaje neonatal constituye la forma mas practica para recolección, envío y análisis de muestras de sangre del recién nacido impregnadas en un papel de filtro.

Las experiencias ya desarrolladas por diferentes entidades en el país con respecto al establecimiento de los puntos de corte para las diferentes técnicas aplicables al tamizaje de TSH Neonatal y detección precoz de HC, han sido diferentes en cuanto al diseño metodológico: examen inicial practicado, tiempo de toma de muestra y exámenes de confirmación del diagnostico, pero todas capaces de detectar HC. A continuación se presentan los resultados de estos trabajos, obtenidos a partir del Consenso Colombiano para el Diagnostico y Manejo de las Enfermedades Tiroideas:

En Colombia a partir del año de 1.979 un grupo de trabajo de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, inicio la experiencia de detección neonatal de HC en el Instituto Materno Infantil encontrándose 4 casos en una población de 10.202 recién nacidos, para una frecuencia de 1 en 2.550. Entre 1.990 y 1.992 el Instituto Materno Infantil realizó un programa piloto de detección de TSH en sangre de talón obtenida entre el quinto y noveno día postnatal por el método DELFIA, encontrándose 1 caso de HC en una población de 4.863 recién nacidos, para una frecuencia de 1 en 4.863. Entre 1.994 y 1.995 se inició la ejecución del proyecto “Análisis Piloto del Diagnóstico Temprano de Hipotiroidismo Congénito” auspiciado por el Organismo Internacional de Energía Atómica y con la coordinación del Instituto de Ciencias Nucleares y Energías Alternativas (INEA) encontrándose 6 casos de HC en una población de 11.303 niños, para una frecuencia de 1 en 1.844. Entre 1.995 y 1.998 en el Instituto Materno Infantil

se ha venido realizando el tamizaje para hipotiroidismo por el método DELFIA en muestras de sangre seca en papel de filtro obtenidas entre las 24 y 48 horas de vida, encontrándose 7 casos de HC en una población de 27.600 niños, para una frecuencia de 1 en 3.943. El programa PREGEN realizó entre 1.988 y 1.993 un estudio de HC y otros errores congénitos del metabolismo en clínicas privadas de varias ciudades de Colombia encontrándose 7 casos de HC en una población de 17.000 niños, para una frecuencia de 1 en 2.430. El Instituto de los Seguros Sociales entre 1.997 y 1.998 en un estudio que realizó encontró 5 casos de HC en una población de 45.000 recién nacidos, para una frecuencia de 1 en 9.000. Actualmente funcionan otros programas de tamizaje en instituciones públicas y privadas, como es el caso del Laboratorio de Investigación Hormonal (LIH): Genetics, Colsanitas y Hospital Trinidad Galán.

Por tanto, la revisión de estos estudios deja ver que aunque se han desarrollado estudios para cuantificar TSH Neonatal por distintas tecnologías y con distintos objetivos, no se han realizado estudios de determinación de puntos de corte para TSH Neonatal por tecnología inmunoradiométrica COAT-A-COUNT IRMA DPC® comparando del mismo recién nacido los tres tipos de muestra: cordón umbilical, sangre de talón entre las 12-24 horas de vida y entre el 5to y 8vo día de nacidos, esto con el fin de poder determinar el momento ideal para la toma de la muestra.

El impacto científico y tecnológico de este estudio está dado por los resultados obtenidos, los cuales proporcionaran información sobre los puntos de corte para TSH Neonatal de acuerdo al tiempo de toma de muestra que se podrán usar en la implementación de los futuros programas de tamizaje para TSH Neonatal que utilicen la tecnología inmunoradiométrica COAT-A-COUNT IRMA DPC® permitiendo aplicar los valores previamente establecidos a nuestras necesidades.

El impacto social y económico de este estudio está determinado por el beneficio a los pacientes y a sus familias, en caso de encontrar pacientes con HC, con relación al costo / beneficio del tratamiento, además de fomentar la conciencia sobre la importancia de realizar el Tamizaje Neonatal a nivel nacional.

3. FORMULACIÓN DE OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los puntos de corte para TSH Neonatal en muestras de sangre secas en papel de filtro S&S # 903 obtenidas de cordón umbilical, por punción de talón entre las 12 y 24 horas de vida y entre el 5to y 8vo día de nacido, empleando reactivos comerciales de tecnología IRMA para establecer la aplicabilidad de la categorización de la Academia Americana de Pediatría para valores neonatales de TSH.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Cuantificar la TSH Neonatal en las muestras de sangre total obtenidas en papel de filtro empleando la técnica inmunoradiométrica COAT-A-COUNT IRMA DPC®.

Obtener los puntos de corte de cada uno de los diferentes tiempos de toma de la muestra para la prueba de TSH Neonatal por medio del estudio estadístico pertinente de los datos obtenidos.

Analizar, a partir de los puntos de corte establecidos en este estudio, el porcentaje de resultados que deben ser sometidos a confirmación.

Realizar el análisis horizontal de los datos obtenidos de las 3 muestras con el fin de observar el comportamiento de la hormona a través de éstas.

Evaluar cada uno de los momentos de toma de la muestra, a fin de determinar sus ventajas y desventajas y establecer el protocolo adecuado de cada toma de muestra.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 TIPO DE ESTUDIO

El presente estudio es de tipo descriptivo y exploratorio (TAMAYO, 1996), porque además de comprender la descripción, registro, análisis e interpretación de la situación actual del tamizaje neonatal para HC en relación con las tecnologías aplicadas para su determinación, el estudio se realiza con el fin de obtener de datos confiables con los cuales se determinarán los puntos de corte para la tecnología inmunoradiométrica IRMA y para su aplicación en futuros estudios.

4.2 HIPOTESIS

1. El porcentaje de resultados a confirmar, es igual al 5% si el punto de corte para TSH neonatal es $\geq 31 \mu\text{UI/mL}$.

$$H_0: P_{\text{rell}} = 5 \qquad H_i: P_{\text{rell}} \neq 5$$

2. Los promedios de las concentraciones de TSH en los 3 tiempos de toma de muestra son iguales.

$$H_0: X_{CU} = X_{T1} = X_{T2} \quad H_1: X_{CU} \neq X_{T1} \neq X_{T2}$$

4.3 POBLACION DE ESTUDIO Y MUESTRA

4.3.1 Población de estudio

La población de estudio está dada por el total de la población neonatal Colombiana susceptible de padecer la enfermedad.

4.3.2 Muestra

Como la idea del estudio no es determinar la incidencia del hipotiroidismo en la población neonatal colombiana, no es necesario referirse a un extenso número de población. Por tanto, la muestra poblacional que será objeto de la medición directa de los niveles de TSH Neonatal en los diferentes tiempos de toma de muestra, está conformada por población neonatal circunscrita a las entidades hospitalarias vinculadas al proyecto. Los criterios de inclusión y de participación al estudio, de los recién nacidos son: ser hijos de madres sanas sin antecedentes de problemas de tiroides y que no hayan presentado

ninguna complicación durante el embarazo, bebés a término al momento del nacimiento, bebés sanos al momento del nacimiento sin complicaciones ni transfusiones.

Se ha decidido realizar un muestreo aleatorio simple para la determinación del número mínimo de muestras necesarias para validar satisfactoriamente los resultados del estudio con los siguientes valores:

$N = 1.000.000$ de nacimientos anuales.

Error máximo admisible: $e = 0.05$

Coeficiente de confianza: $k = 2$ (para una seguridad de 95.45%)

Varianza: $\sigma^2 = 0.10$

Y según la fórmula: $n = N K^2 \sigma^2 / (N - 1) e^2 + K^2 \sigma^2$

se tiene que:

$$n = 1.000.000 \times 4 \times 0.10 / 999.999 \times 0.0025 + (4 \times 0.10)$$

$$n = 400.000 / 2499.9975 + 0.4$$

$$n = 400.000 / 2500.3975$$

$$n = 159.97 \approx 160$$

Se deberán recolectar muestras de un total de 160 recién nacidos entre las distintas entidades hospitalarias participantes en el estudio.

4.4. EQUIPOS

En el ensayo inmunométrico empleado para la determinación de TSH neonatal, se empleará un RACK de agitación (Shaker) de marca DPC(Diagnostic Products Corporation) que permitirá la completa agitación de los tubos procesados a 200 revoluciones por minuto (rpm) por un tiempo de 2 horas, tiempo en el cual se desarrollará la reacción Antígeno– Anticuerpo.

El equipo empleado para la medición de la TSH presente en las muestras, es un Contador de rayos gamma de centelleo sólido ANSR semiautomatizado de Laboratorios Abbott, el cual construye una curva de calibración con los datos de las cuentas por minuto (cpm) obtenidas a partir de las concentraciones conocidas de los 7 calibradores, y sobre la cual se

interpolan las cpm tanto de los 3 controles (alto, medio y bajo) como de las muestras procesadas para obtener la concentración de TSH en cada una.

4.5. METODOS

A continuación se detallan los procedimientos que en el estudio realizado comprenden investigaciones de laboratorio. Estas incluyen la toma de las muestras, su manejo y conservación, así como su manipulación previa y posterior a la determinación de los niveles de TSH. Además se exponen los procedimientos técnicos de la medición de la hormona en las muestras de sangre y la posterior medida de radiación para la obtención de los resultados.

4.5.1 Toma de muestra

4.5.1.1. Materiales

- Formatos de recolección de las muestras. Incluye formato de recolección de información y soporte de papel de filtro para la muestra (Ver Anexo C).
- Lancetas Microtainer[®] Becton Dickinson de 2.2 mm de profundidad y 1.0 mm de longitud.

- Gasa estéril.

- Alcohol.

- Guantes desechables.

- Recipiente con agua tibia ($40 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

- Termómetro.

- Papel absorbente.

4.5.1.2. Procedimiento

Inmediatamente después del parto, se toma la muestra de sangre del extremo placentario del cordón umbilical. Posteriormente se toma a los recién nacidos la muestra de sangre por punción de talón entre las 12 y 24 horas de vida antes de la salida del servicio de maternidad, y por último, se toma la muestra de sangre por punción de talón entre el 5to y 8vo día de vida.

Se deben tener en cuenta los aspectos que se enuncian a continuación (NCCLS, 1981 y Meites, 1988), así como el Protocolo de Toma de Muestra de Cordón Umbilical (Ver Anexo A) y el Protocolo de Toma de Muestra por punción de Talón (Ver Anexo B):

Una saturación incompleta del papel de filtro con la muestra puede resultar en una sobreestimación del contenido de TSH de la muestra, obteniéndose un resultado con una concentración de TSH falsamente elevada. Es por tanto esencial que la gota de sangre sea lo suficientemente grande y que penetre el papel filtro de un lado al otro. También es importante que la muestra de sangre sea recolectada por la aplicación de una sola gota de sangre por un solo lado del papel de filtro. Capas de gotas sucesivas que se pueden reconocer por la formación de una pasta de sangre en el papel filtro, pueden producir resultados falsamente aumentados.

Para la obtención de una muestra de sangre adecuada por punción del talón, es necesario aumentar el flujo de sangre al sitio de la punción, para lo cual el talón puede ser cubierto durante tres minutos con una toalla caliente o introducirlo en agua tibia a una temperatura de 40 ± 2 grados durante 2 minutos como mínimo.

Para realizar la punción, se debe emplear una lanceta con una punta no mas larga de 2.5 mm para producir una punción de 2.0 a 2.4 mm de profundidad

máxima en la piel de la superficie externa del talón, con el fin de minimizar el riesgo de daño al hueso.

Limpiar la primera gota de sangre con una gasa estéril y fomentar la formación de subsecuentes gotas por aplicación de ligera presión, mientras mantiene el pie en una posición manejable. Se debe evitar excesiva presión, porque se puede ocasionar hemólisis o dilución de la muestra con fluido tisular.

Una vez que se forme una gota de volumen adecuado, dejar que esta caiga libremente sobre el papel de filtro y tener cuidado de no tocar el área destinada para la muestra. La muestra debe secarse a temperatura ambiente en posición horizontal por un tiempo no inferior a 3 horas. El secado vertical favorece la separación de los componentes de la sangre, y daña la muestra.

Las muestras deben ser colocadas dentro de un contenedor de papel, nunca de plástico, y almacenadas a una temperatura entre 2-8°C hasta su procesamiento y para confirmaciones posteriores.

Una muestra de un diámetro determinado corresponde a una cantidad de sangre determinada (disco de papel de 6 mm de diámetro = 10 µL; diámetro

de 3 mm = 2.7 μ L), en consecuencia una mala cantidad (poca o demasiada sangre) amenaza con llevar a un resultado parcialmente falso, pudiendo ser el origen de falsos positivos y falsos negativos.

4.5.1.3. Criterios de clasificación de las muestras

Los criterios de clasificación de las muestras recogidas para el estudio están dados por el adecuado procedimiento en el momento de la toma de las muestras (ver Anexos A y B). Dicho procedimiento excluye las muestras donde: (ver Anexo D)

- La cantidad de muestra es insuficiente para la prueba.
- La muestra aparenta estar rayada o desgastada.
- La muestra aparenta estar sobresaturada.
- La muestra aparenta estar diluida, desteñida o contaminada.
- La muestra exhibe anillo de suero.
- La muestra tiene coágulos o capas sucesivas de sangre.

4.5.1.4. Logística de la recolección de las muestras

La recolección de las muestras se inició el 4 Agosto de 2.000 y fue ininterrumpida hasta el 31 de Enero de 2.001, con una frecuencia de 7 días a la semana, distribuyéndose las visitas a las Entidades a lo largo del día.

4.5.1.4.1. Muestras de Cordón Umbilical

Para la recolección de las muestras de cordón umbilical, se procedió a entrenar al personal en las salas de partos de cada una de las instituciones colaboradoras en el estudio. Para ello se realizaron charlas de entrenamiento en cada uno de los turnos existentes (turno de la mañana, la tarde y la noche), en las cuales se explicó claramente el objetivo del estudio así como el procedimiento a seguir durante éste; se hizo entrega del Protocolo de Toma de Muestra de Cordón Umbilical a las personas responsables del turno respectivo, así como del material necesario para dicha toma, el cual incluye formatos de toma de muestra y racks de secado de las muestras. Estos últimos fueron colocados a la salida de las salas de partos y cirugía a fin de evitar el desorden con las muestras y a la vez facilitar su secado. En cuanto al diligenciamiento del formato de toma de muestra, se hizo especial énfasis en el marcado de la muestra con el nombre completo de la madre, así como de su número de historia clínica. Una vez recogidas las muestras en su correspondiente formato marcado, éstas deben

permanecer en los racks de secado hasta que la Bacterióloga a cargo del estudio pase a recogerlas diariamente en el horario establecido previamente.

4.5.1.4.2. Muestras por punción de talón entre 12-24 horas de vida

Una vez recogidas las muestras de cordón umbilical de las salas de partos por la Bacterióloga a cargo del estudio, se procedió al desplazamiento hasta los pisos de maternidad para ubicar a las maternas en sus respectivos cuartos. Para esto, se remitió al kardex o libro de registro de pacientes. Una vez ubicadas por cuartos, entonces fueron visitadas individualmente con el fin de hacerlas participes del estudio que se realizaba, y solicitar el respectivo CONSENTIMIENTO (ver Anexo E) para su participación. La charla explicativa abarcaba el porqué, la finalidad, el procedimiento, las ventajas y desventajas su participación. En caso de que la madre aceptara, se tomaban los datos correspondientes a la FICHA CLINICA (ver Anexo F) y se procedía a hacer entrega del CONSENTIMIENTO el cual debía ser leído y firmado antes de iniciarse la toma de la muestra.

Finalmente, se procedía tomar la muestra de sangre del bebé, tal y como se explica en el Protocolo de Toma de Muestra por punción de Talón, y se concertaba la cita para la toma de la muestra entre el 5to y 8vo día de nacido el bebé.

4.5.1.4.2. Muestras por punción de talón entre 5to y 8vo día de nacido

La logística para esta última muestra debió ser adaptada a las posibilidades ofrecidas por la Institución en cuanto al motivo de regreso de la madre con su bebé entre estos días.

En la Clínica Juan N. Corpas por ejemplo, la madre debía regresar a la clínica para cumplir 2 citas: la primera con neonatología a los 3 días de nacido el bebé, y la segunda con postparto al 8vo día. Esta última fue aprovechada para tomar la muestra de sangre del bebé, tal y como se explica en el Protocolo de Toma de Muestra por punción de Talón.

En el Hospital Militar Central, la madre debía regresar con su bebé para la vacunación el día JUEVES siguiente a la fecha de parto. Esta fecha fue aprovechada para tomar la muestra de sangre al bebé. Se dispuso de un consultorio vecino al de vacunación para dicho efecto.

En estas 2 instituciones, finalmente se explicaba a la madre la metodología a seguir: una vez procesadas las 3 muestras de sangre del bebé, se dejaría una copia escrita del resultado en la Historia Clínica, el cual sería conocido en la próxima cita de Pediatría.

En la Clínica del Country, por el contrario, las madres no regresan con su bebé a la Institución, debido a que estas pertenecen al plan de medicina prepagada y tan sólo van a la clínica para la atención del parto. Los controles posteriores con Pediatría son de carácter particular en la EPS respectiva. Así que la única opción posible para la toma de la tercera muestra, es el domicilio. Telefónicamente se acordaba con la madre el día y la hora de la toma de la muestra. Una vez tomada la muestra, se explicaba a la madre la metodología a seguir: una vez procesadas las 3 muestras de sangre del bebé, se haría llegar una copia escrita del resultado al domicilio o residencia para ser llevado a la cita de Pediatría.

4.5.2 Medición de TSH

Se empleó la metodología inmunoradiométrica – IRMA - para determinar la TSH neonatal en muestras de sangre recolectadas en papel filtro, empleando reactivos COAT-A-COUNT Neonatal TSH IRMA DPC®.

4.5.2.1. Materiales

- El Kit comercial incluye:

Tubos de poliestireno recubiertos con anticuerpo monoclonal para TSH.

Radiotrazador: anticuerpo anti-TSH policlonal radiomarcado con I^{125} .

Papel filtro Schleicher & Schuell #903 con manchas de sangre humana ajustadas a hematocrito de 55%, con Calibradores de TSH, marcadas de A a F, y tres niveles de Controles de TSH, marcados C1, C2 y C3. Estos elementos han sido estandarizados en términos del segundo estándar de referencia de la OMS (WHO # 80/558) y son estables de 2-8°C por 6 meses.

Solución Buffer de lavado concentrado

- Pipeta repetidora de volumen fijo Nichiryo.
- Jeringa dispensadora de 6 ml Nichiryo.
- Agua desionizada.
- Frasco lavador.
- Espumas de decantación.
- Tubos de polipropileno de dimensiones 12 x 75 mm.
- Pliego de papel filtro.
- Punch 3/16" DPC (Catálogo No. NNHP6)

4.5.2.2. Fundamento de la prueba

Es un ensayo inmunoradiométrico – IRMA – en fase sólida, de saturación tipo sándwich, en el cual la TSH presente en la muestra es capturada entre dos anticuerpos, uno monoclonal anti-TSH inmovilizado en la pared del tubo de poliestireno y otro policlonal anti-TSH marcado con I^{125} en fase líquida. Posteriormente se realiza un periodo de incubación en el cual se logran las constantes de equilibrio entre las uniones Antígeno–Anticuerpo, seguido por un paso de separación de las fracciones libres y ligadas por decantación sobre papel absorbente y una etapa final de lavado para retirar el exceso de Anticuerpo marcado.

El estuche incluye 3 controles: alto, medio y bajo, y 6 estándares de calibración de TSH en papel de filtro S&S 903, y un radiotrazador de anticuerpo monoclonal anti-TSH- I^{125} . Los estándares y controles son preparados de sangre humana con un valor hematocrito de 55%. Para cada serie de corridas se realiza una curva de calibración en rango aproximado de 5 a 225 μ UI/mL de suero. Para poder reportar en μ UI/mL de sangre, dividir por 2 los resultados obtenidos. (Ver las concentraciones específicas para cada lote de reactivos) con los tres controles.

4.5.2.3. Procedimiento

1. Obtener discos de la muestra de sangre de 4.76 mm (3/16 pulgadas) de diámetro, al igual que de los estándares y controles y colocarlos en los tubos que contienen el anticuerpo anti-TSH previamente marcados y por duplicado. Adicionalmente marcar 2 tubos de poliestireno libres de anticuerpo para ser utilizados como cuentas totales.
2. Adicionar 200 μ L a cada tubo de anticuerpo anti-TSH marcado con I^{125} .
3. Colocar los tubos en una plataforma de agitación a 200 rpm e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente (15-28°C).
4. Retirar del agitador, e incubar por 18 ± 2 horas a temperatura ambiente (15-28°C).
5. Decantar o aspirar el contenido de los tubos teniendo cuidado de retirar todos los discos del papel de filtro y la solución del trazador. No se deben decantar los tubos de las cuentas totales.
6. Adicionar 2 ml de Solución Buffer de lavado a cada tubo, esperar 1 a 2 minutos y luego decantar; repetir esta etapa nuevamente.

7. Mantener los tubos sobre papel absorbente durante 2 o 3 minutos con el fin de eliminar los residuos líquidos por completo.
8. El proceso de lectura se realiza colocando los tubos en un contador de rayos gamma para obtener las cuentas por minuto (cpm).

4.5.2.4. Interpretación

La concentración de TSH en la muestra del paciente es determinada por interpolación de las cuentas por minuto (cpm) de la muestra sobre la curva de calibración que se obtiene a partir de los estándares de concentración conocida y es DIRECTAMENTE proporcional a la radiactividad presente en el tubo.

4.5.2.5. Valores esperados

Los valores guía recomendados para el tamizaje neonatal de hipotiroidismo congénito publicadas por la Academia Americana de Pediatría categorizan la concentración de TSH como “normal” ($<20\mu\text{UI/mL}$), “ligeramente elevada” ($20\text{-}40\mu\text{UI/mL}$) o “elevada” ($>40\mu\text{UI/mL}$) para niños entre 2 y 6 días de edad. Estos valores son aceptados y recomendados por la técnica quien en un estudio para determinar la aplicabilidad de estos rangos al kit COAT-A-

COUNT Neonatal TSH IRMA, realizó un estudio de valores de referencia en 240 muestras de niños entre 0 y 5 días, obteniendo una media de 7.9 μ UI/mL y un rango absoluto de 0-6 a 31 μ UI/mL, y donde solo 229 niños tuvieron concentraciones < 20 μ UI/mL. Por lo anterior se concluyó que los resultados son consistentes con la categorización de la AAP para valores de TSH.

4.6. RECOLECCION DE INFORMACIÓN

Se redactó un formato de CONSENTIMIENTO INFORMADO en el cual las madres aceptarán hacer parte de este estudio, permitiendo la recolección de las diferentes muestras a sus bebés, a fin de ir ordenando la información recogida en las entidades hospitalarias (Ver Anexo E).

Para recolectar la información pertinente al desarrollo de este estudio, y a fin de establecer algunos datos que sirvan de información a la hora de aceptar o rechazar la participación en este estudio, se diligenció una FICHA CLÍNICA que incluye los datos de la madre (nombres y apellidos, edad, complicaciones durante el embarazo y en el parto, medicación recibida durante el embarazo, edad gestacional), datos del recién nacido (nombres y apellidos, sexo, peso al nacer, fecha y hora de nacimiento, fecha y hora de recolección de la muestra) y los datos correspondientes al número y tipo de muestra. (Ver Anexo F).

4.7. ANÁLISIS DE INFORMACIÓN

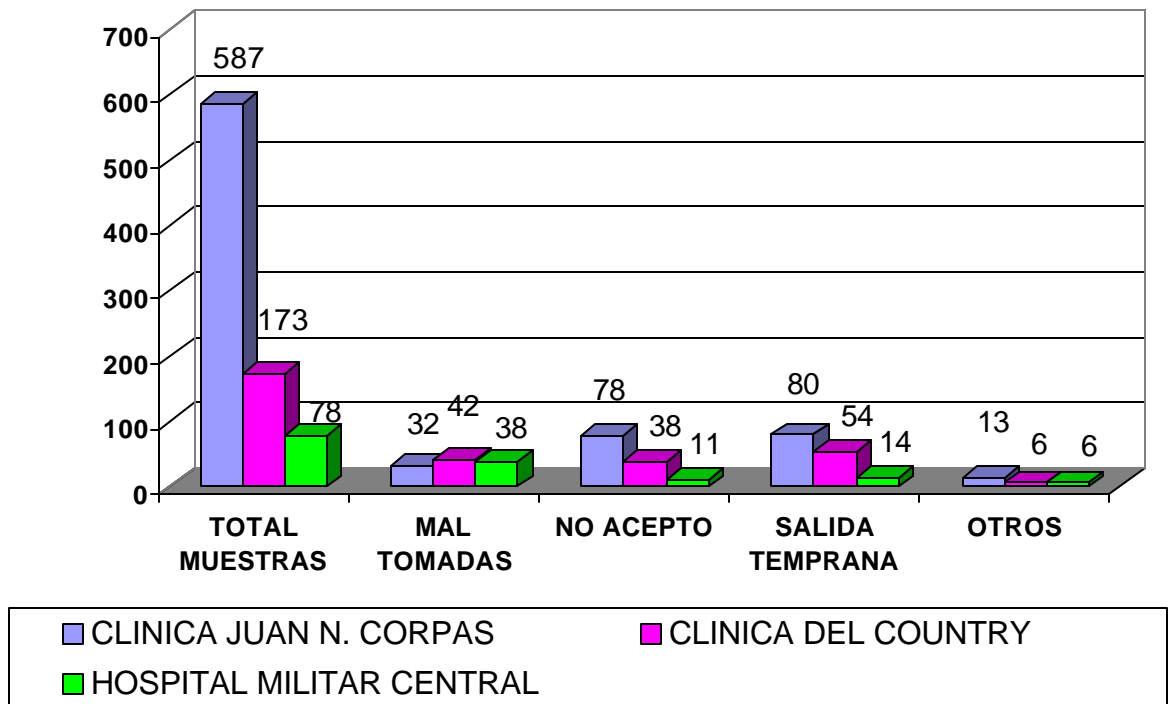
Para el estudio de los resultados a partir de la medición de la TSH Neonatal en las muestras, se realizó un análisis de distribución por frecuencias de los datos obtenidos para determinar si los datos presentan una distribución normal (Gausiana) o una distribución no normal. Se obtuvo una distribución normal, y los datos fueron sometidos a análisis por METODO PARAMETRICO el cual incluye medidas de tendencia central como los son la media, la mediana y la moda; medidas de variación como la varianza, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Para la determinación de los puntos de corte para cada una de las muestras, se mejoró la especificidad de la prueba incluyendo en teoría al 95 o 99% de la población, sumando 2 o 3DS respectivamente a la media aritmética hallada.

5. RESULTADOS

5.1. Recolección de muestras

Grafica 1. Distribución total de las muestras recogidas

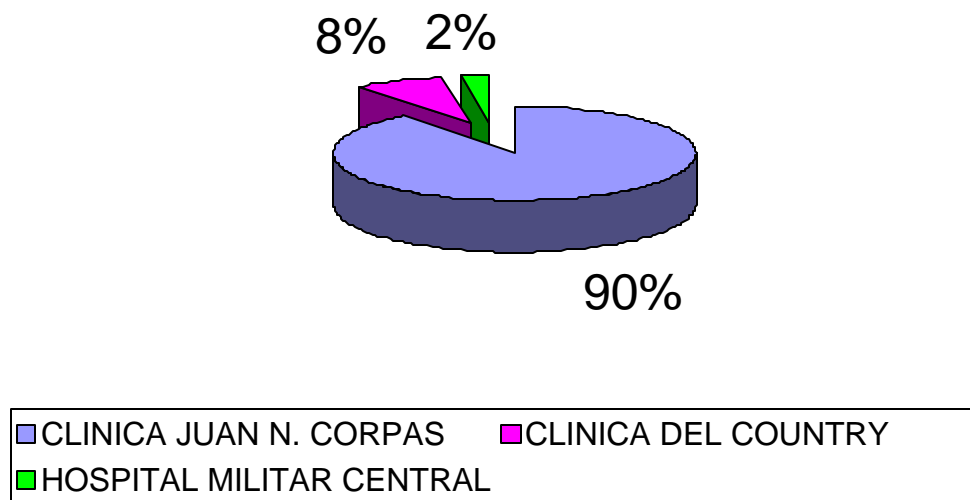


Fuente: esta investigación, febrero de 2001.

Se recogieron un total de 838 muestras y de las cuales debieron descartarse 412 muestras de Cordón Umbilical debido a : errores en la toma de la

muestra (112), por la no aceptación de la madre para participar en el estudio (127), por la salida temprana de la clínica (148) y por otros factores (25).

Figura 2. Distribución de las muestras aptas para el estudio



Fuente: esta investigación, febrero de 2001.

De las 838 muestras recogidas, sólo fueron aptas para el estudio un total de 426 muestras, de las cuales la Clínica Juan N. Corpas aportó 384 (90%), la Clínica del Country aportó 33 (8%) y el Hospital Militar Central aportó 9 (2%). (Muestras cordón umbilical : n = 160; Muestras talón 12-24 horas : n = 160; Muestras talón 5to-8vo día : n = 106).

5.2. Análisis de distribución por frecuencias de los datos obtenidos de la medición de TSH en las muestras recolectadas de cordón umbilical, talón

entre las 12 - 24 horas y entre el 5to - 8vo día de vida (ver Anexos G, H, I respectivamente).

Se determinó que estos presentan una distribución normal (Gausiana) y por tanto fueron sometidos a análisis por METODO PARAMETRICO el cual incluye medidas de tendencia central como los son la media, la mediana y la moda; medidas de variación como la varianza, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

5.2.1. Resumen estadístico de la distribución normal

Tabla 3. Resumen estadístico de la distribución normal de las muestras de CORDÓN UMBILICAL

X	$x=X-x$	$z=x/DE$	f(z)	Yx
-5,1	-14,4	-3	0,00443	0,1
-2,7	-12	-2,5	0,01753	0,6
-0,3	-9,2	-2	0,05399	1,8
2,1	-7,2	-1,5	0,12952	4,3
4,4	-4,8	-1	0,24197	8,0
6,8	-2,4	-0,5	0,35207	11,6
9,2	0	0	0,39894	13,2

11,6	2,4	0,5	0,35207	11,6
14,0	4,8	1	0,24197	8,0
16,3	7,2	1,5	0,12952	4,3
18,7	9,6	2	0,05399	1,8
21,1	12	2,5	0,01753	0,6
23,5	14,4	3	0,00443	0,1

Fuente: esta investigación, febrero de 2001.

Tabla 4. Resumen estadístico de la distribución normal de las muestras de TALON ENTRE 12-24 HORAS DE VIDA

X	$x=X-x$	$z=x/DE$	f(z)	Yx
-7,50	-21	-3	0,00443	0,1
-4,10	-17,5	-2,5	0,01753	0,4
-0,70	-14	-2	0,05399	1,2
2,70	-10,5	-1,5	0,12952	3,0
6,10	-7	-1	0,24197	5,6
9,50	-3,5	-0,5	0,35207	8,1
12,90	0	0	0,39894	9,2
16,30	3,5	0,5	0,35207	8,1
19,70	7,0	1	0,24197	5,6
23,10	10,5	1,5	0,12952	3,0

26,50	14	2	0,05399	1,2
29,90	17,5	2,5	0,01753	0,4
33,30	21	3	0,00443	0,1

Fuente: esta investigación, febrero de 2001.

Tabla 5. Resumen estadístico de la distribución normal de las muestras de TALON ENTRE 5TO-8VO DIA DE NACIDO

x	$x=X-x$	$z=x/DE$	f(x)	Yx
-3,8	-8,4	-3,00	0,00443	0,17
-2,4	-7	-2,50	0,01753	0,66
-1	-5,6	-2,00	0,05399	2,04
0,4	-4,2	-1,50	0,12952	4,90
1,8	-2,8	-1,00	0,24197	9,15
3,2	-1,4	-0,50	0,35207	13,31
4,6	0	0	0,39894	15,08
6	1,4	0,50	0,35207	13,31
7,4	2,8	1,00	0,24197	9,15
8,8	4,2	1,50	0,12952	4,90
10,2	5,6	2,00	0,05399	2,04
11,6	7	2,50	0,01753	0,66
13	8,4	3,00	0,00443	0,17

Fuente: esta investigación, febrero de 2001.

5.2.2. Distribución normal de los datos obtenidos

La distribución normal, también llamada distribución de probabilidad normal, es considerada como el tipo más importante entre las diferentes distribuciones de probabilidad. Como la distribución normal es simétrica, el punto medio bajo la curva es la media de la distribución representado con x .

Básicamente las curvas normales fueron construidas en este trabajo mediante la siguiente formula:

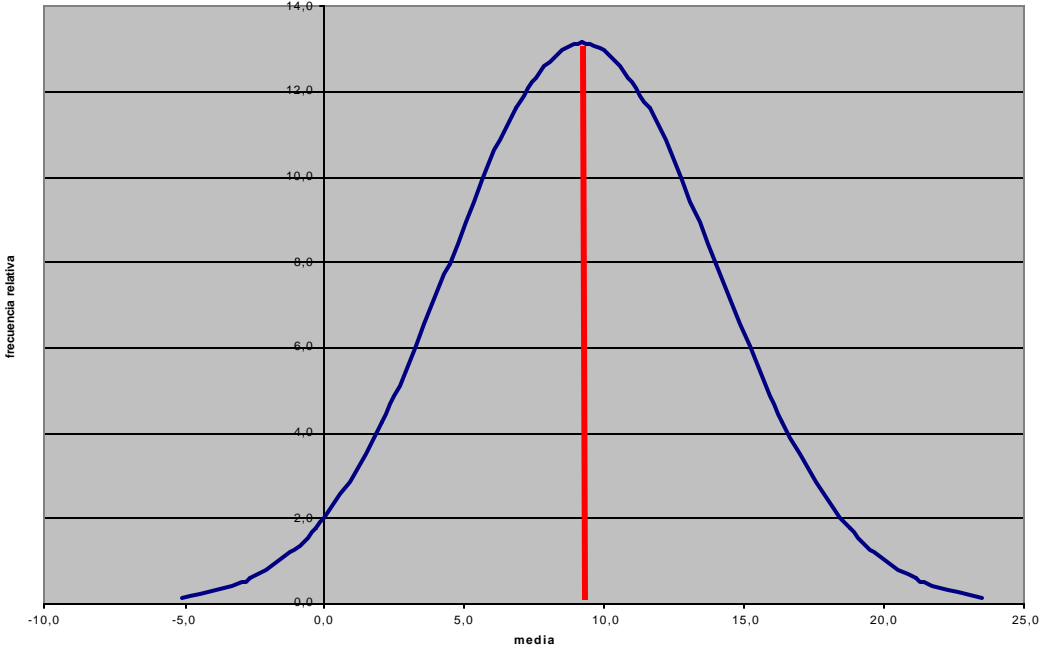
$$Y_x = \frac{N}{DS} f(z)$$

Donde :

- Y_x = la altura de la ordenada Y en el punto x sobre el eje de las X
- N = número de elementos o casos en la población
- DS = la desviación estándar de la población.
- $f(z)$ = función de z (no f veces z). El valor de $f(z)$ depende de los valores de z y es obtenido de la tabla estadística correspondiente a las ordenadas de la curva normal.
- $z = x/DS$ la distancia x expresada en unidades de DS .

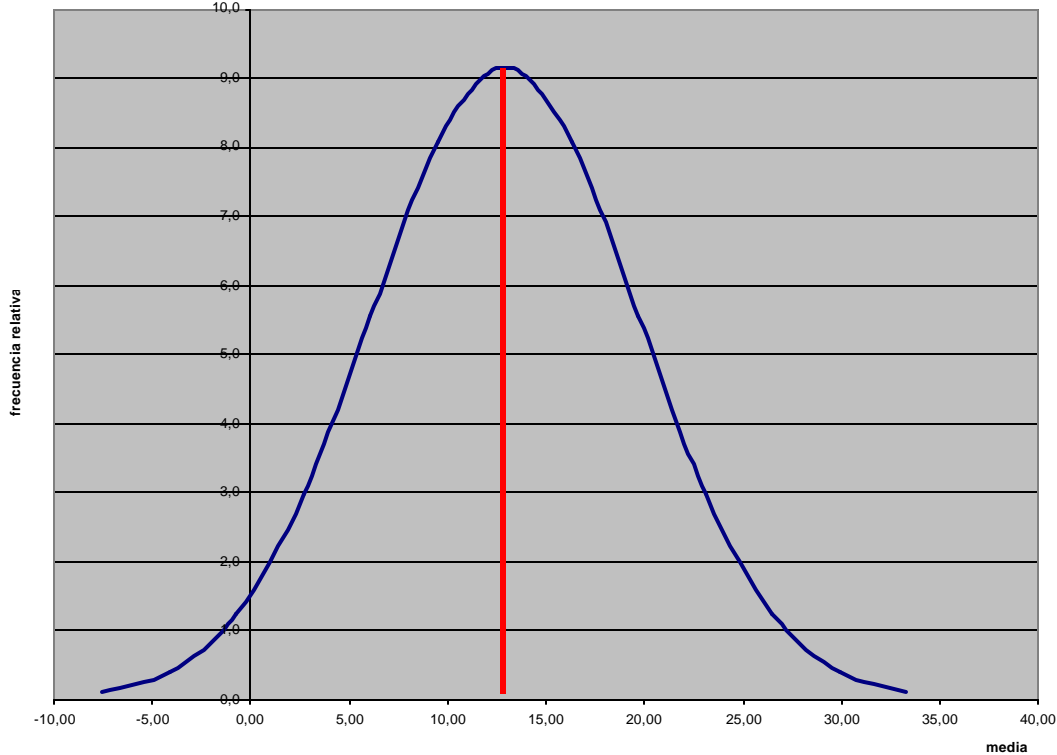
De esta manera se deja claro el funcionamiento y la estructura de la formula y las tablas para determinar y graficar la curva normal, la cual permite hacer inferencias estadísticas con relación a la población basados en la muestra tomada que para el caso es de $n=160$.

Grafica 3. Distribución normal de los datos obtenidos de muestras de CORDÓN UMBILICAL



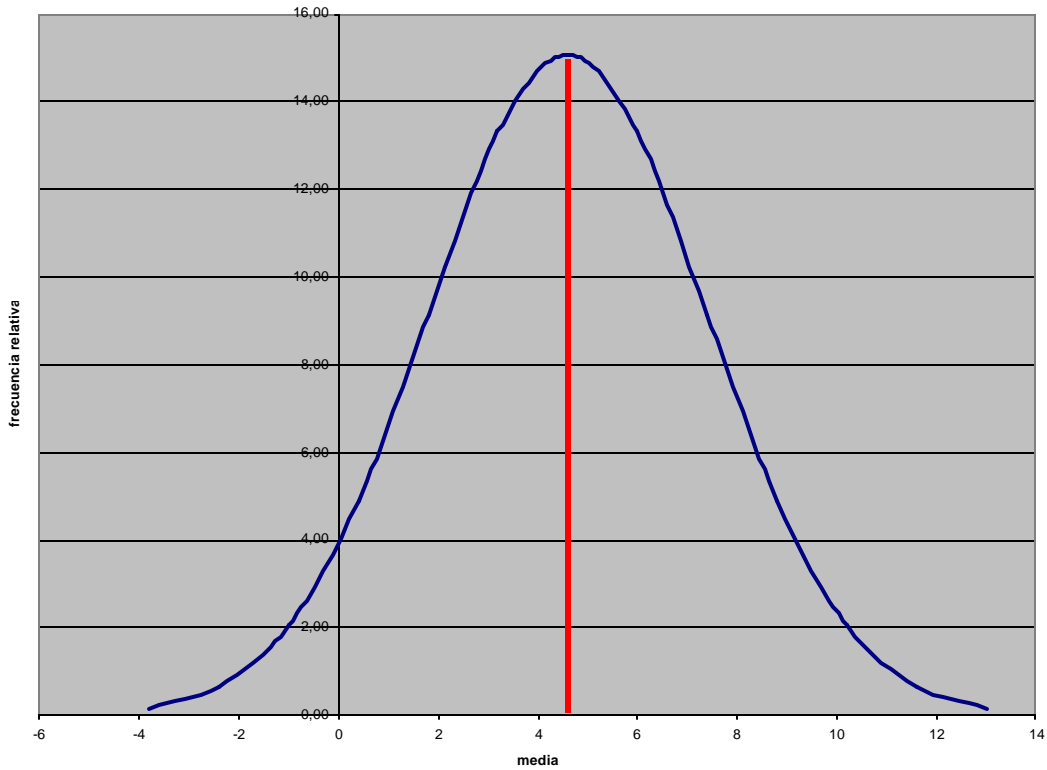
Fuente: esta investigación, febrero de 2001.

Grafica 4. Distribución normal de los datos obtenidos de muestras de TALON ENTRE 12-24 HORAS DE VIDA



Fuente: esta investigación, febrero de 2001

Grafica 5. Distribución normal de los datos obtenidos de muestras de TALON ENTRE 5to-8vo DIA DE NACIDO



Fuente: esta investigación, febrero de 2001.

5.2.3. Análisis paramétrico

Como los datos se ajustan a una distribución normal, la medida para expresar la estimación puntual de la tendencia central es la media, y para expresar la dispersión de los datos es la Desviación Estándar, datos que

varían en los tres tipos de muestra debido a las diferencias de amplitud de los rangos obtenidos.

Tabla 6. Resumen estadístico del análisis paramétrico de las concentraciones de TSH ($\mu\text{UI}/\text{mL}$) para muestras de CORDÓN UMBILICAL

PARÁMETRO	VALOR
Media	9,2
Desviación estándar	4,8
Moda	6,1
Mediana	8,4
Varianza	22,7
Coefficiente de variación	1,4
Amplitud o intervalo	1,6 - 38,5

Fuente: esta investigación, febrero de 2001.

Para obtener los datos en la tabla anterior, fue necesario excluir las 3 concentraciones de TSH que se encontraron por encima de $30\mu\text{UI}/\text{ml}$ (35.6, 36.1, $38.5\mu\text{UI}/\text{ml}$), puesto que fueron muestras no satisfactorias para el estudio que al incluirlas dentro del análisis estadístico, alterarían la distribución real de los datos.

Tabla 7. Resumen estadístico del análisis paramétrico de las concentraciones de TSH ($\mu\text{UI}/\text{mL}$) para muestras de TALON ENTRE 12-24 HORAS DE VIDA

PARÁMETRO	VALOR
Media	12,9
Desviación estándar	6,8
Moda	9,9
Mediana	11,5
Varianza	47,3
Coefficiente de variación	0,7
Amplitud o intervalo	<0,5 - 34,5

Fuente: esta investigación, febrero de 2001.

Para obtener los datos en la tabla anterior, fue necesario excluir las 2 concentraciones de TSH que se encontraron por encima de $30\mu\text{UI}/\text{ml}$ (32.1 , $34.5\mu\text{UI}/\text{ml}$), puesto que fueron muestras no satisfactorias para el estudio que al incluirlas dentro del análisis estadístico, alterarían la distribución real de los datos.

Tabla 8. Resumen estadístico del análisis paramétrico de las concentraciones de TSH ($\mu\text{UI/mL}$) para muestras de TALON ENTRE 5to - 8vo DIA DE NACIDO

PARAMETRO	VALOR
Media	4,6
Desviación estándar	2,8
Moda	2,7
Mediana	3,9
Varianza	7,8
Coeficiente de variación	1,0
Amplitud o intervalo	<0,5 - 12,7

Fuente: esta investigación, febrero de 2001.

Para obtener los datos en la tabla anterior, no fue necesario excluir ninguna de las concentraciones de TSH puesto que todas se encontraron por debajo de $30\mu\text{UI/ml}$.

5.3. Aplicabilidad de la categorización de valores de TSH neonatal estandarizados por la Academia Americana de Pediatría.

En orden de determinar la aplicabilidad de estos rangos al kit COAT-A-COUNT Neonatal TSH IRMA, se realizó este estudio usando un disco de 3/16 pulgadas por tubo, en 426 muestras de sangre en papel S&S grado #903.

EDAD	MEDIA	RANGO ABSOLUTO	NUMERO (y %)	
	$\mu\text{UI/mL}$	$\mu\text{UI/mL}$	<20 $\mu\text{UI/mL}$	n
0 horas	9.2	1.6 - 38.5	150 (93.7)	160
12-24 horas	12.9	<0.5 - 34.5	133 (82.1)	160
5-8 días	4.6	<0.5 - 12.7	106 (100)	106

No se observaron valores de TSH mayores de 40 $\mu\text{UI/mL}$ en este estudio. Las concentraciones de TSH en las muestras tanto de cordón umbilical como de talón entre 12-24 horas de vida que excedieron los 30 $\mu\text{UI/mL}$, fueron confirmadas internamente en el estudio con los resultados de las muestras tomadas entre el 5to-8vo día de nacido. En esta última muestra, se observó que las concentraciones de TSH no excedieron el punto de corte de 20 $\mu\text{UI/mL}$, por tanto los resultados son consistentes con la categorización de la AAP para valores de TSH para niños entre 2 y 6 días de edad con concentraciones de TSH como “normal” (<20 $\mu\text{UI/mL}$), “ligeramente elevada” (20-40 $\mu\text{UI/mL}$) o “elevada” (>40 $\mu\text{UI/mL}$).

Los resultados del estudio sugieren que la edad es un factor significativo: el grupo de edad entre las 12-24 horas de vida muestra un incremento en la frecuencia de valores de TSH ligeramente aumentados. Estos son consistentes con la publicación de la AAP, la cual indica que en muestras “obtenidas antes de 48 horas de edad,... el valor normal de TSH puede exceder el valor del punto de corte de 20 μ UI/mL”.

5.4. Determinación de los puntos de corte para cada uno de los tiempos de toma de muestra. Se mejoró la especificidad de la prueba incluyendo en teoría al 95 o 99% de la población, sumando 2 o 3DS respectivamente a la media aritmética hallada para cada grupo.

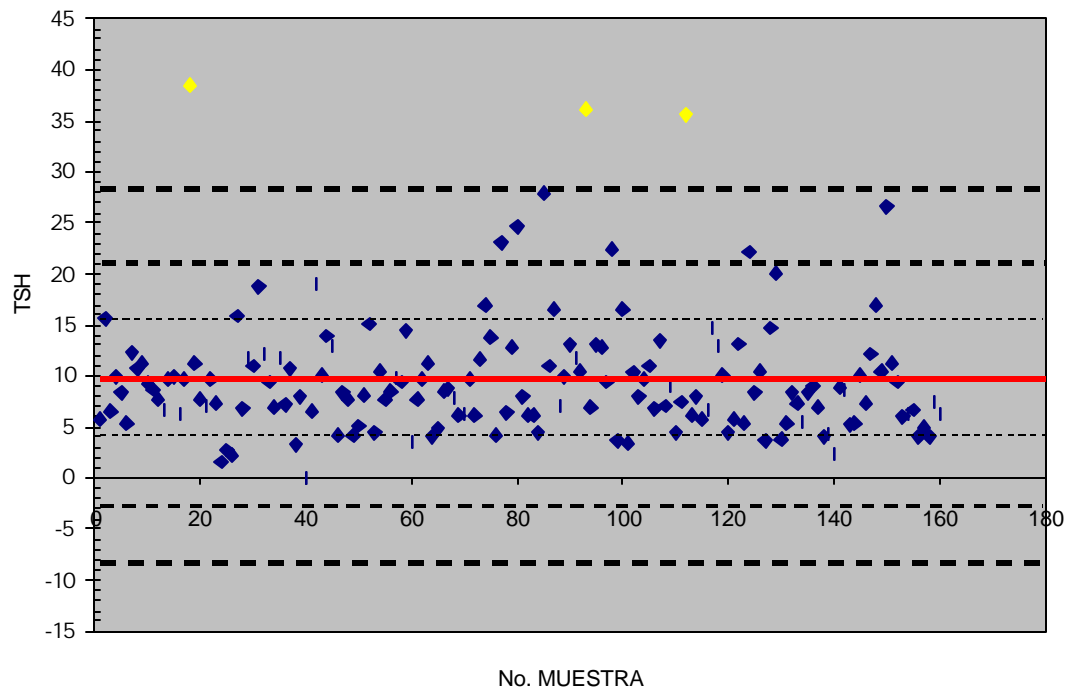
Tabla 9. Resumen estadístico de Puntos de Corte para TSH (μ UI/mL)

	CORDÓN UMBILICAL (μ UI/mL)	TALON 12-24 HORAS (μ UI/mL)	TALON 5TO-8VO DIA VIDA (μ UI/mL)
X+1DS	14	20	7
X+2DS	19	26	10
X+3DS	24	33	13

Fuente: esta investigación, febrero de 2001.

Con el fin de incluir teóricamente al 99% de la población, se tomarán los puntos de corte hallados +3DS con respecto a la media aritmética, ya que con los puntos de corte hallados +2DS y +1DS sólo se incluiría al 95% y 65% de la población respectivamente.

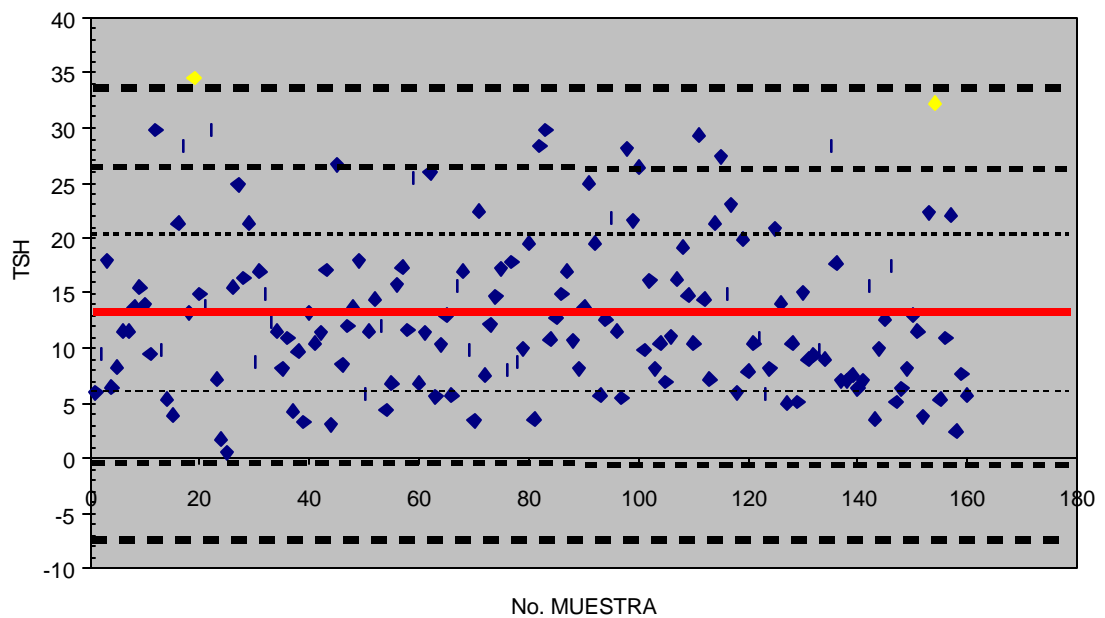
Grafica 6. Concentración de TSH en muestras de sangre de Cordón Umbilical.



Fuente: esta investigación, febrero de 2001.

Nota: los puntos en color amarillo sobre la tercera desviación estándar corresponden a las concentraciones de TSH que no fueron satisfactorias para el estudio.

Grafica 7. Concentración de TSH en muestras de sangre de talón entre 12-24 horas de vida.

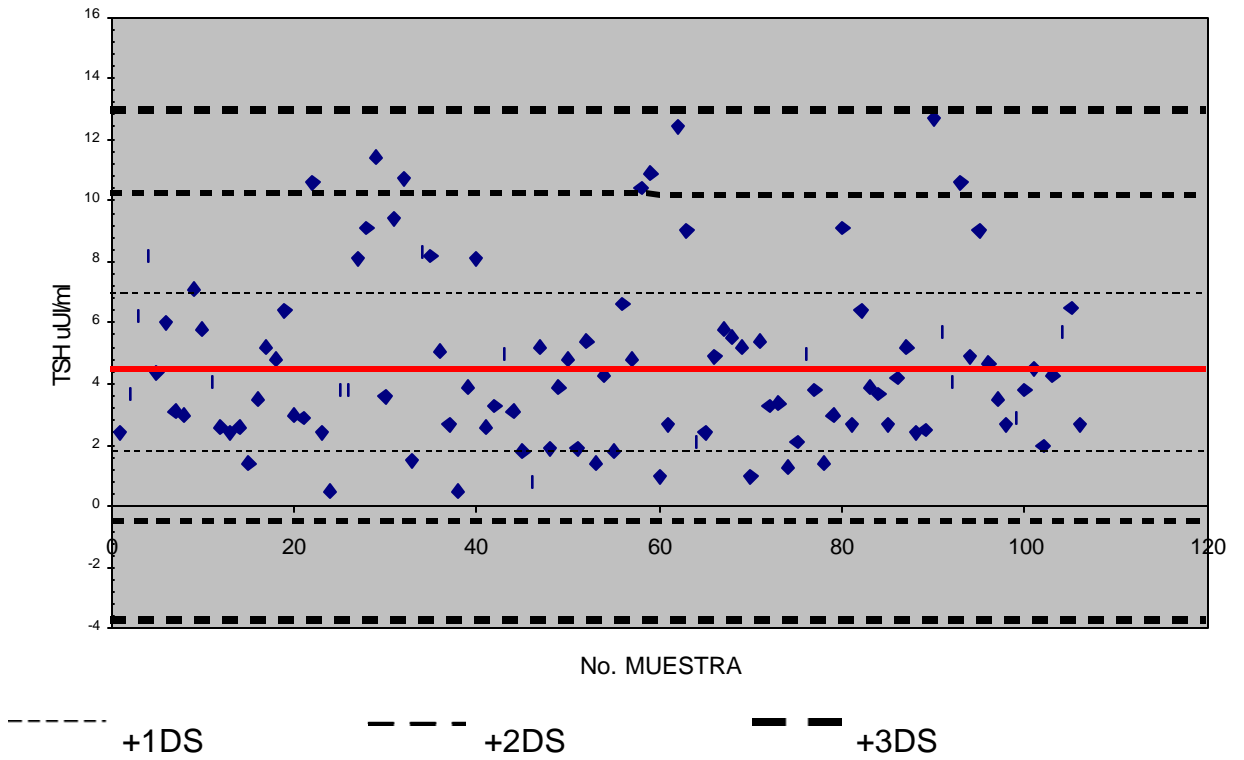


----- +1 DS - - - +2DS - - - - +3DS

Fuente: esta investigación, febrero de 2001.

Nota: los puntos de color amarillo, corresponden a las concentraciones de TSH que no fueron satisfactorias para el estudio.

Grafica 8. Concentración de TSH en muestras de sangre de talón entre 5to-8vo día de nacido.



Fuente: esta investigación, febrero de 2001.

5.5. Porcentaje de resultados a confirmar de acuerdo al Punto de Corte

Tabla 10. Porcentaje de resultados a confirmar de acuerdo al Punto de Corte hallado a +2DS.

TIPO DE MUESTRA	PUNTO DE CORTE CON 2DS (μ UI/ml)	PORCENTAJE DE CONFIRMACION %
CORDÓN UMBILICAL	19	6.8
TALON 12-24 HORAS	26	8.1
TALON 5TO-8VO DIA	10	7.5

Fuente: esta investigación, febrero de 2001.

Tabla 11. Porcentaje de resultados a confirmar de acuerdo al Punto de Corte hallado a +3DS.

TIPO DE MUESTRA	PUNTO DE CORTE CON 3DS (μ UI/ml)	PORCENTAJE DE CONFIRMACION %
CORDÓN UMBILICAL	24	3.7
TALON 12-24 HORAS	33	0.6
TALON 5TO-8VO DIA	13	0.0

Fuente: esta investigación, febrero de 2001.

Se observa que los porcentajes de confirmación con los puntos de corte hallados a +2DS son mayores que los hallados con +3DS, debido a la diferencia porcentual de población incluida (95% y 99% respectivamente).

Tabla 12. Porcentaje de resultados a confirmar de acuerdo al Punto de Corte establecido por la Academia Americana de Pediatría.

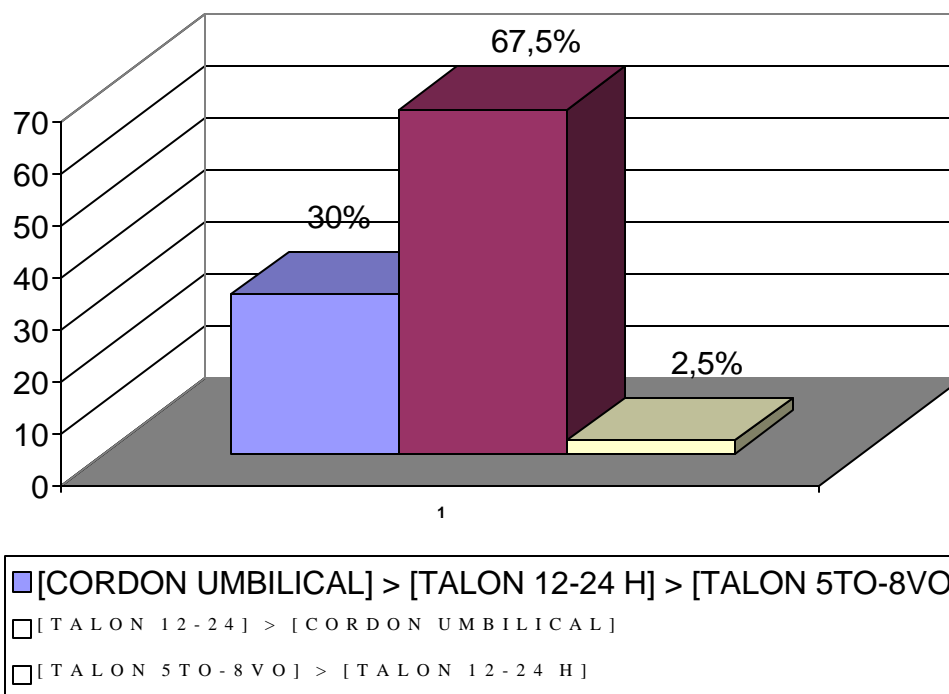
TIPO DE MUESTRA	PUNTO DE CORTE (μ UI/ml)	PORCENTAJE DE CONFIRMACION %
TALÓN 5TO-8VO DÍA	20	0.0

Fuente: esta investigación, febrero de 2001.

El porcentaje de confirmación de acuerdo al Punto de Corte establecido por la Academia Americana de Pediatría solamente es aplicable para las muestras de talón entre el 5to-8vo día de vida, debido a que los valores guía recomendados para el tamizaje neonatal de hipotiroidismo congénito categorizan la concentración de TSH para niños entre 2 y 6 días de edad.

Los porcentajes de confirmación empleando la técnica IRMA de TSH neonatal son de 3.7% para muestras de cordón umbilical, 0.6% para muestras de talón entre las 12-24 horas y 0% para muestras de talón entre el 5to y 8vo día, con Puntos de Corte de 24μ UI/ml, 33μ UI/ml y 13μ UI/ml respectivamente.

5.6. Análisis horizontal de las concentraciones de TSH



Al analizar horizontalmente los datos obtenidos, es decir, al comparar los resultados de las concentraciones de TSH presentes en las muestras (n = 160), se encontró que en 108 muestras (67.5%) la concentración de TSH presente en la muestra de talón entre 12-24 horas de vida es MAYOR que la concentración en sangre de cordón umbilical; en 48 muestras (30%) la concentración de TSH presente en la muestra de sangre de cordón umbilical es MAYOR que la concentración en sangre de talón entre 12-24 horas de vida, y a la vez, la concentración en sangre de talón entre 12-24 horas de vida es MAYOR la concentración en sangre de talón entre 5to-8vo de vida; y solamente en 4 muestras (2.5%) la concentración en sangre de talón entre 5to-8vo de vida es MAYOR que la concentración en sangre de talón entre 12-24 horas de vida.

5.7. Prueba de hipótesis

1. El porcentaje de resultados a confirmar en muestras de cordón umbilical es IGUAL a 5 ($p= 0.077$, IC = 0.0044 – 0.055).

El porcentaje de resultados a confirmar en muestras de talón 12-24 horas es DIFERENTE de 5 ($p= 0.0243$, IC = 0.00082 – 0.040).

El porcentaje de resultados a confirmar en muestras de talón 5to-8vo día es DIFERENTE de 5 ($p= 0.0087$, IC = - 0.025 – 0.034).

2. Existen diferencias estadísticamente significativas entre el promedio de cordón umbilical y el promedio de talón 12-24 horas ($p= 3.97 \times 10^{-7}$, IC = - 5.10 – (-2.19)).

Existen diferencias estadísticamente significativas entre el promedio de talón 12-24 horas y el promedio de talón 5to – 8vo día ($p= 1.46 \times 10^{-14}$, IC = 6.92- 9.67).

Existen diferencias estadísticamente significativas entre el promedio de cordón umbilical y el promedio de talón 5to – 8vo día ($p= 3.13 \times 10^{-14}$, IC = 3.58-5.61).

6. DISCUSIÓN

6.1. Recolección de las muestras

Los principales inconvenientes presentados en el proceso de recolección de las muestras, y por los cuales fue IMPOSIBLE completar la tercera muestra (talón entre 5to-8vo día), fueron:

El primer inconveniente encontrado fue la consecución de la autorización necesaria por parte de las instituciones a quienes se les solicito la colaboración para el estudio. En algunas de ellas el comité de Ética Medica coloco tantas objeciones que finalmente se decidió por no insistir más en el asunto y en concluir la no aceptación desde un principio.

Una vez aceptada la participación, el segundo inconveniente se presento con la toma de la muestra de cordón umbilical los problemas se debieron a la poca o nula experiencia en la toma de este tipo de muestras, por lo cual la calidad de la muestra recogida no cumplía los requisitos para ser admitida en el estudio, siendo muchas las muestras que dejaron de ser “potencialmente incluidas” además del gasto incrementado de formatos de toma de muestra y papel de filtro.

Una vez obtenida la correcta primera muestra (cordón umbilical), el tercer inconveniente se presentó con el consentimiento de participación en el estudio, debido a que al no ser una medida obligatoria la madre se rehusa a dejar pinchar el bebé con el fin de evitarle el "dolor" que esta ocasiona. El factor motivacional en este caso, es la ignorancia de los padres sobre la existencia y objetivo de los programas de tamizaje, y aunque se les explicó claramente todo el contexto, aún así prefirieron no participar. Desde luego que al no aceptar participar, la muestra obtenida de cordón umbilical debía ser eliminada del estudio lo que incurre en más gasto de formatos y papel de filtro.

Una vez recogida la segunda muestra (talón entre 12-24 horas), el cuarto inconveniente se presentó en la toma de la tercera muestra (talón entre 5to-8vo día), ya que al no existir un mecanismo obligatorio definitivamente la madre no vuelve al hospital antes de 8 días. Y aún existiéndolo, el porcentaje de deserción es muy alto. Los principales motivos fueron: falta de consentimiento por parte del padre, arrepentimiento de la madre, estado de salud delicado de la madre, falta del recurso económico para el desplazamiento hasta la clínica, lejanía del lugar de residencia con respecto a la clínica sobretodo en pacientes remitidos y hospitalización del bebé por otras causas.

La idea inicial del estudio fue la de recoger 160 muestras completas, es decir, que incluyeran los tres tipos de muestra , así que las muestras de las cuales ya se tenía el cordón y el primer talón fueron descartadas inicialmente del estudio, pero ante la dificultad para obtener tercera muestra, se decidió incluirlas como parte del estudio.

6.2. Análisis paramétrico

En el análisis paramétrico de las muestras recogidas (cordón umbilical: n=160, talón 12-24 horas: n=160, talón 5to-8vo día: n= 106), los resultados variaron de acuerdo a la amplitud de los datos obtenidos. Se obtuvo que la tendencia central de los datos en las muestras de cordón umbilical fue de 9.2 con respecto a las de las muestras de talón entre 12-24 horas y entre el 5to y 8vo día, las cuales fueron de 12.9 y 4.6 respectivamente.

6.3. Puntos de corte

Para obtener el mejor punto de corte en la estimación de la frecuencia de negativos, cuando se emplea la metodología IRMA, se debe mejorar la especificidad de la misma, ya que una especificidad baja puede subestimar la prevalencia de susceptibles. Por esta razón se optó por escoger los datos correspondientes a +3DS ya que con éstos se aumenta la sensibilidad de la prueba al abarcar al 99% de la población estudio. El emplear la metodología

señalada deja ver que al aplicar la prueba en la población destino se está estimando la prevalencia real de negativos, aspecto que no se hubiera tenido al desconocer como se comportaría la prueba en dicha población.

En el estudio realizado, se encontró que el Punto de Corte para indicar la positividad de la población en las muestras tomadas a partir de sangre de talón entre 5to-8vo día de nacido, difiere del Punto de Corte sugerido por la Academia Americana de Pediatría debido principalmente al tiempo de toma de muestra, la variabilidad poblacional y la selección de grupos de referencia.

Además en el “Análisis piloto del diagnóstico temprano de hipotiroidismo congénito” desarrollado por el Instituto de Ciencias Nucleares y energías alternativas, se establecieron 3 puntos de corte con el percentil 95% según el tiempo de toma de la muestra y con un IRMA estandarizado por este grupo de trabajo, así: 28 $\mu\text{UI/ml}$ si la toma se hace antes de las 24 horas, 22 $\mu\text{UI/ml}$ si la toma se realiza entre 24 y 48 horas y 15 $\mu\text{UI/ml}$ cuando la toma de muestra se hace después de los 2 días de vida del neonato. En este estudio, los 3 puntos de corte con el percentil 95% según el tiempo de toma de la muestra, son: 28 $\mu\text{UI/ml}$ si la toma se hace de cordón umbilical, 35 $\mu\text{UI/ml}$ si la toma se realiza entre 12 y 24 horas y 13 $\mu\text{UI/ml}$ cuando la toma de muestra se hace entre el 5to y 8vo día de vida del neonato.

6.4. Porcentaje de confirmación

Se observó que los porcentajes de confirmación con los puntos de corte hallados a +2DS son mayores que los hallados con +3DS, debido a la diferencia porcentual de población incluida (95% y 99% respectivamente). Además el porcentaje de confirmación del punto de corte para muestras de talón entre 5to-8vo día de nacido hallado a +3DS, es igual al porcentaje de confirmación obtenido con el punto de corte sugerido por la Academia Americana de Pediatría.

6.5. Análisis horizontal de los datos obtenidos

Al comparar los resultados de las concentraciones de TSH presentes en cada una de las 3 muestras (n=160), se encontró que solamente el 30.6% de las muestras (n=160) presentó una respuesta “esperada” en donde la concentración de TSH en sangre de cordón umbilical es MAYOR a la concentración de TSH presente en sangre de talón entre 12-24 horas de vida, y a la vez, la concentración en sangre de talón entre 12-24 horas de vida es MAYOR la concentración en sangre de talón entre 5to-8vo de vida.

También se encontró que en el 66.2%, la concentración de TSH presente en la muestra de talón entre 12-24 horas de vida es MAYOR que la concentración en sangre de cordón umbilical.

Y finalmente, sólo en un 2.5% de las muestras la concentración de TSH de sangre de talón entre el 5to y 8vo día de nacido es MAYOR que la concentración en sangre de talón entre 12-24 horas.

La literatura dice al respecto que el periodo neonatal se va a caracterizar, en los niños con función tiroidea normal, por un incremento de TSH que se produce como respuesta al frío “enfriamiento extrauterino” a los 30 minutos del parto con un pico máximo de secreción hacia las 24 horas de vida (niveles de hasta 50-60 $\mu\text{UI/ml}$) y con descenso posterior hasta la normalización hacia el quinto o séptimo día de vida (niveles inferiores a 5 $\mu\text{UI/ml}$, pudiéndose decir, que el recién nacido vive durante los primeros días de vida en una situación de hipertiroidismo fisiológico, lo que hay que tener en cuenta a la hora de seleccionar el momento adecuado para la obtención de muestras para determinación de las hormonas tiroideas (T3 y T4) (CASADO, 1995). Razón por la cual se explica el aumento de las concentraciones de TSH en las muestras de talón entre las 12-24 horas con respecto a las muestras de cordón umbilical.

6.6. Prueba de hipótesis

En el procedimiento para verificar si la hipótesis se acepta o no se acepta con base en la información procedente de la muestra aleatoria, NO SE

ACEPTA la hipótesis que los porcentajes de confirmación son iguales al 5% si los puntos de corte para TSH neonatal son $\geq 30 \mu\text{UI/mL}$, debido a que estos son menores al 5% en todos los casos puesto que el 95% de población es incluida dentro del rango de normalidad al aumentar la sensibilidad de la prueba.

Realmente, esta hipótesis se cumple para cualquier punto de corte a medida que éste vaya aumentando en relación al anterior.

Tampoco es Aceptada la hipótesis donde los promedios de las concentraciones de TSH en los 3 tipos de muestra son iguales, debido a la amplitud de los datos obtenidos para cada grupo.

7. CONCLUSIONES

Para TSH neonatal se pueden establecer 3 puntos de corte con el percentil 95% según el tiempo de toma de muestra así: 24 $\mu\text{UI/ml}$ en sangre de cordón umbilical, 33 $\mu\text{UI/ml}$ para muestras de talón entre 12-24 horas y 13 $\mu\text{UI/ml}$ para muestras de talón entre 5to-8vo día de nacido.

El porcentaje de confirmación empleando la metodología COAT-A-COUNT IRMA DPC para TSH neonatal con el percentil 95% según el tiempo de toma de la muestra, es de 3.7% para la toma de cordón umbilical, 0.6% para la toma entre 12 y 24 horas y de 0% cuando la toma de muestra se hace entre el 5to y 8vo día de vida del neonato.

Los resultados son consistentes con la categorización de valores de TSH de la AAP para niños entre 2 y 6 días de edad con concentraciones de TSH normales ($<20\mu\text{UI/mL}$), ligeramente elevadas ($20-40\mu\text{UI/mL}$) o elevadas ($>40\mu\text{UI/mL}$).

Con el fin de aumentar la cobertura de los programas de tamizaje neonatal y de reducir el número de recién nacidos que puedan no ser tamizados por una

salida temprana del servicio de maternidad, generalmente antes de 24 horas, la determinación de la TSH Neonatal debe realizarse a partir de sangre de cordón umbilical.

Los resultados mas confiables en la medición de la TSH dentro de los programas de tamizaje neonatal, son obtenidos de muestras de sangre por punción del talón entre el 5to y 8vo día de nacido, en donde la concentración de la hormona ha disminuido a sus valores normales.

Es deber del centro hospitalario crear un mecanismo de obligatoriedad que permita asegurar el retorno de la madre con su bebé a la entidad.

8. RECOMENDACIONES

El tamizaje de hipotiroidismo congénito se debe realizar a todos los recién nacidos de Colombia, como medida preventiva de salud pública.

El éxito de un programa de tamizaje de hipotiroidismo congénito depende de la infraestructura del centro hospitalario para hacer la localización de los pacientes de rellamado, con el fin de tomar una muestra de sangre venosa para la confirmación del diagnóstico.

Los puntos de corte propuestos en los reactivos comerciales de diagnóstico deben ser aceptados con reserva, y de ser posible se realizará la determinación del punto de corte para la población en la cual se aplicará la prueba.

Los resultados de este estudio serán la base para el desarrollo de programas masivos de detección de hipotiroidismo congénito que empleen la tecnología COAT-A-COUNT IRMA DPC para TSH neonatal.

Este documento se presentará a las entidades nacionales competentes como el soporte en el logro de una ley o decreto nacional que instituya la obligatoriedad del diagnóstico precoz de hipotiroidismo congénito.

9. BIBLIOGRAFIA

Ahlbom, B., Sidenvall, R., Anneren, G. *Deletion of chromosome 21 in girl with congenital hypothyroidism and mild mental retardation*. American Journal of Medical Genetics. Vol. 64 (3): 501-505.

American Academy of Pediatrics and American Thyroid Association. *Newborn Screening for Congenital Hypothyroidism: Recommended Guidelines*. 1993. Pediatrics; Vol. 91 (6):1203-1209.

Aponte, A. *Hipotiroidismo en la edad pediátrica*. Bogotá, 1997.

Arango, P. *Manual para la toma de muestras del programa de Tamizaje neonatal "Genetics"*. 1996.

Asociación Colombiana de Endocrinología. *Consenso Colombiano para el diagnóstico y manejo de las enfermedades tiroideas*. Acta Médica Colombiana. 1999. Vol. 24(4).

Becker, D., Bigos, S., Gaiton, E., et al. *Optimal use of blood test for assessment of thyroid function*. JAMA. 1993; 269:2736-2737.

Brent, G. *The molecular basis of thyroid hormone action*. New England Journal of Medicine. 1994; 331:847-853.

Casado, F., Bueno, L., Reverté, B. *Tratado de endocrinología pediátrica*,. Madrid; Editorial Espaxs; 1995; Cap. 32 y 79.

Casado, F. *Pediatría*. Tomo I. Tercera edición. Madrid; 1991. Cap: Patología tiroidea: hipotiroidismo.

Committee on Genetics. American Academy of Pediatrics. *Newborn Screening Fact Sheets*. Pediatrics; 1993. Vol. 98 (36):473-501.

Correa, J., Gomez, J. *Fundamentos de pediatría*. Tomo 3. 2ª edición. Medellin, Colombia, 1999; 36-42 ; 1483-1498.

Dammacco, F., Dammacco, A., Cavallo, T., et al. *Serum thyroglobuline and thyroid ultrasaund studies in infants with congenital hypotiroidism*. 1985; J pediatr. 106: 451-453.

Departmente of healt y human services. *Guidelines for the shipment of dried blood sapot specimens*. May, 1992.

Diagnostic Products Corporation® . Coat-A-Count Neonatal TSH IRMA.
1997.

Dussault, J., Morrissette, J. *Higher sensivity of primary thyrotropin in screening for congenital hypothyroidism: a mith?*. J. Clin. Endocrinal metab. 1983; 56:849-852.

Dussault, J., Letarte, J., Guyda, H., et al. *Lack of influence of thyroid antibodies of thyroid función in the newborn infant and on a mass screening program for congenital hypothyroidism*. Journal of Pediatrics. 1980; 96: 385-387.

Fisher, D. *Second international conference on neonatal thyroid screening: progres report*. Journal of Pediatrics. 1983; 102: 653-654.

Fisher, D., Klein, A. *Thyroid development and disorders of thyroid function in the newborn*. New England Journal of Medicine. 1981; 304: 702-708.

Flecher, R., Flecher, S. *Diagnostic test*. Clinical epidemiology. Baltimore: Williams y Wilkins; 1982; 41-58.

Glorieux, J., Dussault, J., Morissette, J., et al. *Follow up at ages 5 and 7 years on mental development in children with hypothyroidism detected by Quebec screening program.* Journal of pediatrics. 1986; 107(6): 913-918.

Grant, D., Smith, I., Fuggle, W., Tokar, S., Chapple, J. *Congenital hypothyroidism detected by neonatal screening: relationship between biochemical severity and early clinical features.* Archives of Disease in childhood. 1992; 67:87-90.

Higuera, B., Torres, J. Instituto de Ciencias Nucleares y Energías Alternativas; *Análisis Piloto del Diagnostico temprano de Hipotiroidismo Congénito.* Bogotá, INEA; 1996.

Instituto Materno Infantil, Unidad de Biología de la procreación. *Constitución de un Centro Piloto de Referencia para la Detección Temprana del Hipotiroidismo Congénito en el Instituto materno Infantil.* Bogotá; 1999.

LaFranchi, S., Hanna, C., Krainz, P., et al. *Screening for congenital hypothyroidism with specimen collection at two time periods: results of the Northwest Regional Screening Program.* Pediatrics. 1985; 76: 734-740.

Matsurra, N., Yamamoto, Y., Nohara, Y., et al. *Familial neonatal transient hypothyroidism due to maternal TSH- binding inhibitor immunoglobulins*. New England Journal of Medicine. 1980; 303: 733-741.

Meites, S. *Skin-puncture and blood-collecting technique for infants: update and problems*. Clinical Chemistry. 1988; Vol 34(9).

Mejía, N. *Algunos conceptos de muestreo*. Caracas; 1966.

Ministerio de Salud. *Resolución No. 00412*; Febrero 25 de 2.000.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS. *Aproved estandar LA4-A2. Blood collection on filter paper for neonatal screening programs*. Second edition. Villanova, PA: national committee for laboratory standards. June, 1992; vol. 12 (13).

Naylor, E. W. *Recent Developments in Neonatal Screening; Seminars in perinatología*. 1995; 9(3): 232-249.

Nelson, W., Vaughan, V. *Tratado de pediatria*. Volumen II. 14ª edición. Editorial McGraw Hill. España, 1992; 1718-1736.

Pacaud, D., Huot, C., Gattereau, A., et al. J. Pacaud, D., Huot, C., Gattereau, A., et al. *Outcome in three siblings with antibody-mediated transient congenital hypothyroidism*. Journal of Pediatrics. 1995; 127: 275-277.

Roti, E., Gnudi, A., Braverman, L., et al. *Human cord blood concentrations of thyrotropin, thyroglobulin and iodothyronines after maternal administration of thyrotropin-releasing hormone*. Journal Clinical Endocrinology Metabolism. 1981; 53: 813-817.

Robert J, Ehrlich R. *Long-term effects of l-thyroxine therapy for congenital hypothyroidism*. Journal of Pediatrics. 1995; 126:380-386.

Smith, D., Blizzard, R., Wilkins, I. *Pediatrics*. 1957; 19: 1011-1122.

Surks, M., Chopra, I. Mariash, C., Nicoloff, J., Salomon, D. *American thyroid association guidelines for use of laboratory test in thyroid disorders*. JAMA. 1990; 263: 1529-1532.

Taeusch, W., Ballard, R., Avery, M. *Enfermedades del recién nacido*. 6a edición. Editorial medica panamericana. Argentina, 1993; 133-141; 1001-1011.

Takashima, S., Nomura, N., Tanaka, H., et al. *Congenital hypothyroidism: assessment with ultrasound*. Am. J. Neuroradiol. 1995; 16:1117-1123.

Tamayo y Tamayo. *El proceso de la investigación científica*. México; Editorial Limusa; 1996.

Texas Department of Health. *Newborn screening programs. Summary of newborn screening for 1986*. Document 8/87. Austin, Texas.

The Hyatt Regency Washington D.C. *A current review of pediatric endocrinology*. Published by Serono Symposia, USA. April 28 may 2. 1993.

Willi, S., Moshang, T. *Results of screening test for congenital hypothyroidism.: Diagnostic dilemmas*. Pediatric Clinic of North América. 1991; Vol 38 (3).

Zarama, S. *Tamizaje neonatal: manual para médicos y enfermeras*. Bogotá; 1996.

10. ANEXOS

ANEXO A. PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRA DE CORDÓN UMBILICAL PARA TSH NEONATAL.

1. Diligenciar correctamente el formulario a mano y con letra legible antes de recoger las muestras de sangre. El papel de filtro donde van las muestras no puede ser tocado en ningún momento, ya que la grasa de la piel o el talco de los guantes puede contaminar las muestras y alterar los resultados de las pruebas.
2. El cordón umbilical es pinzado con dos pinzas y cortado en medio de estas; luego la pinza cercana al extremo placentario es liberada y las gotas de sangre son colectadas en los papeles de filtro.
3. Permitir que la sangre penetre el papel de filtro, teniendo cuidado de no sobreponer las gotas de sangre, porque se pueden producir concentraciones de sangre variables.
4. Secado de las muestras. La muestra debe secarse a temperatura ambiente en posición horizontal por un tiempo no inferior a 3 horas.

ANEXO B. PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRA POR PUNCION DE TALÓN PARA TSH NEONATAL.

1. Preparación de los elementos. Ordenar los materiales a emplear antes de dar inicio al procedimiento: lanceta estéril Microtainer[®] Becton Dickinson de 2.2 mm de profundidad y 1.0 mm de longitud, alcohol, guantes estériles, gasa estéril, paños suaves, agua tibia y formato de recolección de las muestras de sangre que incluye el papel de filtro S&S 903.
2. Diligenciar correctamente el formulario a mano y con letra legible antes de recoger las muestras de sangre. El papel de filtro donde van las muestras no puede ser tocado en ningún momento, ya que la grasa de la piel o el talco de los guantes puede contaminar las muestras y alterar los resultados de las pruebas.
3. Identificar el sitio de la punción. Los sitios indicados son las áreas laterales mediales de la superficie plantar del talón. No puncionar en la curvatura posterior del talón, porque allí el hueso está muy cerca de la piel. Evitar puncionar el arco plantar, sitios previamente puncionados, áreas edematosas o inflamadas.

Los sitios mas adecuados de punción son mediales a una línea que se traza en la planta del pie, desde la mitad del dedo gordo hasta el talón, o laterales a una línea que se traza entre el punto intermedio entre el cuarto y quinto dedo y el talón.

4. Preparar el sitio de la punción. Calentar el talón del bebé usando agua tibia a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por al menos un minuto. El calor aumenta el flujo sanguíneo en forma significativa en dicha área. Colocar la pierna del bebé en posición mas baja respecto a su cabeza. Esto aumenta la presión venosa y mejora el flujo sanguíneo. Frotar vigorosamente el sitio de la punción con una gasa estéril humedecida con alcohol antiséptico. El exceso de alcohol debe ser limpiado con una gasa estéril seca y dejar secar la piel.

5. Realizar la punción del talón empleando una lanceta y con un solo movimiento continuo.

6. Descartar la primera gota de sangre limpiando con una gasa estéril seca, ya que usualmente esta gota contiene líquidos tisulares. Dejar que se forme una segunda gota de sangre grande, presionando y soltando suavemente alrededor del sitio de la punción.

7. Colocar la sangre en el papel filtro. Dejar caer libremente la gota de sangre sobre el papel de filtro, sin presionarlo con el sitio de punción o el talón. No sobreponer las gotas de sangre, porque se pueden producir concentraciones de sangre variables.

8. Cuidado de la herida. Elevar el pie sobre el cuerpo y presionar el sitio de la punción con una gasa seca hasta que cese el sangrado.

9. Secado de las muestras. La muestra debe secarse a temperatura ambiente en posición horizontal por un tiempo no inferior a 3 horas. El secado vertical favorece la separación de los componentes de la sangre, y daña la muestra.

ANEXO C. FORMATO DE RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

ANEXO D. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DE LAS MUESTRAS

ANEXO E. FICHA CLINICA DEL ESTUDIO "DETERMINACION DE PUNTOS DE CORTE PARA TSH NEONATAL EN MUESTRAS DE SANGRE SECAS EN PAPEL DE FILTRO DE CORDON UMBILICAL, TALÓN ENTRE LAS 12-24 HORAS Y ENTRE EL 5TO-8VO DIA DE VIDA POR METODOLOGÍA INMUNORADIOMETRICA".

MUESTRA NUMERO: () 1. CORDÓN UMBILICAL
 () 2. TALÓN 12-24 HORAS
 () 3. TALON 5 – 8 DIA

FECHA DE RECOLECCIÓN DE MUESTRAS:

(1) _____ HORA: _____
(2) _____ HORA: _____
(3) _____ HORA: _____

INFORMACIÓN DE LA MADRE

APELLIDOS Y NOMBRES: _____
DIRECCIÓN: _____ BARRIO: _____
TELEFONO: _____ EDAD: _____
COMPLICACIONES DURANTE EL EMBARAZO SI NO _____
MEDICACIÓN DURANTE EL EMBARAZO SI NO _____
EDAD GESTACIONAL: _____ semanas

INFORMACIÓN DEL RECIEN NACIDO

APELLIDOS Y NOMBRES: _____
FECHA DE NACIMIENTO: _____ HORA: _____
PESO: _____ gramos TALLA: _____ centímetros SEXO (F) (M)

RESULTADO EN CORDÓN: _____
RESULTADO EN TALON 12-24 HORAS: _____
RESULTADO EN TALON 5-8 DIA: _____

ANEXO F. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PARTICIPACION EN EL ESTUDIO

Estimada paciente:

El hipotiroidismo congénito es una de las enfermedades mas comunes dentro del periodo neonatal y constituye una de las causas mas frecuentes de retardo mental en la infancia.

Nos proponemos medir la TSH, hormona que ayuda a diagnosticar esta enfermedad. El procedimiento que se empleará incluye la toma de sangre del extremo placentario del cordón umbilical, así como de sangre por punción del talón entre las 12 y 24 horas de vida y entre el quinto y octavo día de nacido. Ninguna de estas muestras representa riesgo adicional para su bebé y sólo se les dará la destinación aquí consignada, además de que no le generará ningún costo. El beneficio que obtendrá el recién nacido al participar en el estudio, está dado por la importancia de un diagnóstico temprano de hipotiroidismo congénito.

Para ello necesitamos de su AYUDA y AUTORIZACIÓN, sin las cuales no podremos realizar el trabajo. En caso que usted acepte voluntariamente participar en el estudio, está en libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar, manteniéndose la confidencialidad de la información obtenida.

Yo, _____ (nombre de la madre) consiento la participación de mi hijo _____ (nombre del recién nacido) en el estudio de DETERMINACION DE PUNTOS DE CORTE PARA TSH NEONATAL EN MUESTRAS SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL Y SANGRE TOTAL POR PUNCION DE TALON. Conozco de antemano el procedimiento de la toma de muestra y me comprometo a colaborar durante la recolección de los tres (3) tipos de muestras a mi hijo.

Se me han explicado claramente los beneficios y riesgos del procedimiento y el Laboratorio de Investigación Hormonal proporcionará la atención médica que se pudiera derivar de alguna complicación relacionada con este. (Artículo 13, Resolución 8430 de 1993, MSP).

FIRMA DE LA MADRE - CEDULA

ANEXO G. CONCENTRACIONES DE TSH EN MUESTRAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL.

1,6	5,7	7,4	9,7	12,8
2,2	5,8	7,7	9,7	12,8
2,4	5,8	7,7	9,7	12,9
2,7	6,0	7,7	9,7	12,9
3,3	6,1	7,7	9,8	13,0
3,4	6,1	7,7	9,9	13,1
3,5	6,1	7,8	9,9	13,2
3,7	6,1	7,9	9,9	13,5
3,7	6,1	8,0	10,0	13,8
3,8	6,2	8,0	10,0	13,9
3,9	6,2	8,0	10,1	14,5
4,0	6,3	8,1	10,3	14,7
4,1	6,3	8,3	10,4	14,8
4,1	6,4	8,4	10,4	15,1
4,1	6,5	8,4	10,4	15,7
4,2	6,5	8,4	10,5	15,9
4,2	6,6	8,4	10,7	16,6
4,2	6,6	8,5	10,7	16,6
4,3	6,7	8,5	10,9	16,9
4,4	6,8	8,6	10,9	17,0
4,4	6,8	8,6	11,0	18,8
4,5	6,9	8,8	11,2	19,1
4,5	6,9	8,9	11,2	20,1
4,8	6,9	9,0	11,2	22,2
5,0	7,0	9,0	11,2	22,4
5,1	7,0	9,2	11,6	23,1
5,2	7,0	9,4	11,7	24,6
5,3	7,2	9,4	11,8	26,6
5,3	7,3	9,4	11,8	27,9
5,3	7,3	9,4	12,1	35,6
5,4	7,3	9,6	12,1	36,1
5,5	7,4	9,7	12,2	38,5

n = 160

ANEXO H. CONCENTRACIÓN DE TSH EN MUESTRAS DE SANGRE POR PUNCIÓN DE TALÓN ENTRE 12-24 HORAS DE VIDA.

<0,5	7,1	10,4	13,7	18,0
1,7	7,1	10,5	13,7	19,2
2,5	7,1	10,5	13,9	19,5
3,1	7,2	10,5	14,0	19,6
3,3	7,2	10,5	14,1	19,9
3,4	7,6	10,7	14,4	20,9
3,6	7,6	10,8	14,4	21,3
3,6	7,7	10,9	14,7	21,3
3,8	7,9	11,0	14,8	21,4
3,9	8,0	11,0	14,9	21,6
4,3	8,1	11,1	14,9	21,9
4,4	8,1	11,4	15,0	22,1
5,0	8,2	11,4	15,0	22,3
5,1	8,2	11,5	15,1	22,4
5,1	8,2	11,5	15,6	23,0
5,4	8,3	11,6	15,6	24,9
5,4	8,5	11,6	15,7	25,0
5,5	8,8	11,6	15,7	25,5
5,6	8,8	11,6	15,8	25,9
5,7	9,0	11,7	16,1	26,5
5,7	9,0	12,0	16,3	26,7
5,7	9,4	12,0	16,4	27,4
5,8	9,5	12,2	17,0	28,1
5,9	9,5	12,4	17,0	28,4
6,0	9,7	12,6	17,0	28,4
6,0	9,9	12,6	17,1	28,4
6,3	9,9	12,7	17,2	29,4
6,3	9,9	13,0	17,4	29,8
6,5	9,9	13,0	17,5	29,8
6,8	10,0	13,3	17,7	29,8
6,8	10,0	13,3	17,9	32,1
6,9	10,3	13,7	18,0	34,5

n = 160

ANEXO I. CONCENTRACIÓN DE TSH EN MUESTRAS DE SANGRE POR PUNCIÓN DE TALÓN ENTRE 5TO-8VO DÍA DE NACIDO.

<0,5	2,5	3,5	4,8	6,5
<0,5	2,6	3,6	4,9	6,6
0,8	2,6	3,7	4,9	7,1
1,0	2,6	3,7	5,0	8,1
1,0	2,7	3,8	5,0	8,1
1,3	2,7	3,8	5,1	8,2
1,4	2,7	3,8	5,2	8,2
1,4	2,7	3,8	5,2	8,3
1,4	2,7	3,9	5,2	9,0
1,5	2,7	3,9	5,2	9,0
1,8	2,9	3,9	5,4	9,1
1,8	2,9	4,1	5,4	9,1
1,9	3,0	4,1	5,5	9,4
1,9	3,0	4,2	5,7	10,4
2,0	3,0	4,3	5,7	10,6
2,1	3,1	4,3	5,8	10,6
2,1	3,1	4,4	5,8	10,7
2,4	3,3	4,5	6,0	10,9
2,4	3,3	4,7	6,2	11,4
2,4	3,4	4,8	6,4	12,4
2,4	3,5	4,8	6,4	12,7
2,4				

n = 106