



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
"DR. ANTONIO FRAGA MOURET"

DETECCIÓN DE PORTADORES DEL PROTO-ONCOGÉN RET EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE CÁNCER MEDULAR DE TIROIDES

TESIS

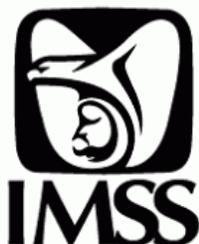
PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA
EN ENDOCRINOLOGIA

PRESENTA

DRA. SARAI SOSA CABRERA

ASESORES

DR. ALEJANDRO SOSA CABALLERO
DRA. LINSDEY ALAMILLA LUGO
DR. MAURICIO SALCEDO



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES "DR. ANTONIO FRAGA MOURET"
CENTRO MÉDICO NACIONAL "LA RAZA"
DEPARTAMENTO DE ENDOCRINOLOGÍA

DETECCIÓN DE PORTADORES DEL PROTO-ONCOGÉN RET
EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE
CÁNCER MEDULAR DE TIROIDES

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN ENDOCRINOLOGIA

PRESENTA

DRA. SARAI SOSA CABRERA

ASESOR PRINCIPAL

DR. ALEJANDRO SOSA CABALLERO

MEXICO, D.F. 2013

HOJA DE AUTORIZACION DE TESIS

DR. JESUS ARENAS OSUNA

JEFE DE LA DIVISION DE EDUCACION EN SALUD DEL HOSPITAL DE
ESPECIALIDADES CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA

DR. FRANCISCO JAVIER VELAZQUEZ CHAVEZ

TITULAR DEL CURSO DE ENDOCRINOLOGIA Y NUTRICION DEL HOSPITAL DE
ESPECIALIDADES CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA

DRA. SARAI SOSA CABRERA

RESIDENTE DE ENDOCRINOLOGIA DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA

Núm. Definitivo de Registro de Investigación: R-2013-3501-21

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que me han apoyado durante la residencia para obtener la Especialidad en Endocrinología y en la realización de ésta tesis.

A mis asesores Dr. Alejandro Sosa C, Dra. Lisndey Alamilla L, Dr. Mauricio Salcedo V, Biol Pablo Romero M.

A mi madre Sara Elizabeth Cabrera Chávez, por ser un gran ejemplo de perseverancia, lucha, dedicación, honradez, trabajo, responsabilidad y por su amor y apoyo incondicional en toda mi vida.

A Renan Emmanuel Fauvet M por el amor, por ser mi inspiración, apoyo, impulso en mi residencia y por iniciar y participar activamente en este trabajo de tesis, por ser parte de mi vida y luego quedarse aquí en mi corazón para hoy formar parte de mi. Por compartir conmigo y dejarme compartir con él los momentos más difíciles pero también los más felices de nuestras vidas.

A Guadalupe Moreno y Renan Fauvet mis segundos padres, por adoptarme como a una hija, por su apoyo durante toda mi residencia, sus cuidados y protección.

A mis hermanas Alma, Haydeé y Viridiana por no dejarme sola nunca, por ser mis confidentes y amigas.

A mis sobrinos Daniela, Kinep y Teohua por sus sonrisas, por ser motivación y por recordarme cada vez que los veo lo maravilloso que es ser niño.

A Manuela Chávez D, Manuel Cabrera J, e Ismael Chávez D por su amor y ejemplo.

A mis amigos Ana Maria, Gladis, Angel, Rokky, Yazmín, Víctor, Liliana, Nuria, Luis, Jezer, Atzintli, Edgar, Héctor, Ramiro, Citlalli, Bere, Heidi, Abraham, Sergio, Manuel, Linda M, por su ayuda, pero especialmente por el apoyo anímico que me han brindado en los momentos más difíciles. A Magali P. parte importante para que yo pudiera concluir éste proyecto.

A mis maestros en HGR 1, IMSS, Querétaro (en especial Dra Rocío Rodriguez, Dr. Ordaz, Dr Páramo, . Dr. Vega); en CMN "Siglo XXI (Dr. Guillermo Flores, Dr Nellen); en CMN "La Raza" (Dra Alamilla, Dra. Tapia, Dra Luna, Dra Jimenez, Dr. Sosa, Dr. Cortez, Dr. Muñoz, Dr Velazquez, Dr. Garnica, Dr Vadillo, Dr. Correa), por sus enseñanzas, apoyo profesional y personal y motivo de inspiración para mi profesión.

Y sobre todo a Dios por darme la vida, la oportunidad de ser Médico y por poner en mi camino a tantas personas que me aman y a las que amo con todo mi corazón.

INDICE

RESUMEN	5
INTRODUCCION	7
MATERIAL Y MÉTODOS	11
RESULTADOS	14
DISCUSION	20
CONCLUSIONES	24
BIBLIOGRAFIA	24
ANEXOS	26

RESUMEN

DETECCIÓN DE PORTADORES DEL PROTO-ONCOGÉN RET EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE CÁNCER MEDULAR DE TIROIDES

MATERIAL Y MÉTODOS. El estudio se llevó a cabo en el Departamento de Endocrinología del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional “La Raza”, en pacientes con diagnóstico de cáncer medular de tiroides (CMT) en seguimiento desde el 01 de Enero de 1983 al 01 Enero 2013. Se obtuvo una muestra de sangre periférica de donde se extrajo ADN a partir de leucocitos; se realizó PCR e identificación de mutaciones del gen RET por secuenciación directa. Se utilizó estadística descriptiva (frecuencias simples, porcentajes, media)

RESULTADOS. Se realizó el diagnóstico genético en una paciente con sospecha clínica de MEN2B identificando la presencia de la mutación M918T en el exón 16 del gen RET. Se descartó la presencia de dicha mutación en el resto de pacientes con CMT. Al realizar la búsqueda de mutación en el exón 11, los productos finales de PCR muestran secuencias no coincidentes con las registradas en el banco genómico del NCBI, esto se explica debido a la formación espontánea de estructuras secundarias.

CONCLUSIONES: El análisis molecular del gen RET constituye una herramienta de gran impacto no solo en el diagnóstico sino también en el tratamiento, pronóstico y seguimiento del CMT. En individuos con riesgo de desarrollarlo es la prueba estándar para el diagnóstico y tratamiento preventivo.

Palabras clave: Cáncer medular de tiroides, gen RET, MEN2.

ABSTRACT**DETECTION OF RET PROTO-ONCOGEN CARRIERS IN PATIENTS WITH MEDULLARY THYROID CARCINOMA**

METHODS. This study was conducted at the Department of Endocrinology of the National Medical Center "La Raza" Specialties Hospital, in patients diagnosed with medullary thyroid cancer (MTC) from January 1st. 1983 to January 1st. 2013. A peripheral blood sample was obtained from which DNA was extracted from the leukocytes; PCR was performed and RET mutations were identified by direct sequencing. Descriptive statistics were used in this study (frequency distributions, percentages, mean)

RESULTS. Genetic diagnosis was made in a patient with clinical suspicion of MEN2B, identifying the presence of the M918T mutation in exon 16 of the RET gene. We discarded the presence of this mutation in the other CMT patients. While searching for mutations in exon 11, we realized that the final products of the PCR sequences do not match with those registered in the NCBI gene bank, this is explained by the spontaneous creation of secondary structures.

CONCLUSIONS: Molecular analysis of the RET gene is a great impact tool, not only for the diagnosis but also for the treatment, prognosis and follow-up of CMT. It is the standard test for the diagnosis and preventive treatment of patients at risk for developing this disease.

Keywords: medullary thyroid cancer, RET gene, MEN2

INTRODUCCION

El cáncer tiroideo es el más frecuente (87%) entre el cáncer de glándulas endocrinas; es uno de los tipos de cáncer con mayor tasa de curación ⁽¹⁾. Se presenta en 7/100 000 individuos por año en EU.

Cáncer medular de tiroides (CMT)

Representa el 4% de la totalidad de Cáncer de tiroides en Estados Unidos. Se origina a partir de las células C o parafoliculares (productoras de calcitonina) las cuales derivan de la cresta neural ⁽²⁾. La edad de aparición de la enfermedad suele variar entre los CMT esporádicos (pico de incidencia sexta década de la vida) y los hereditarios (20-40 años) ⁽³⁾. El CMT se clasifica en tipo esporádico (75%) y hereditario (25%), este último comprende la denominada Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2 (NEM 2) ⁽⁴⁾. El CMT presenta una mayor tasa de recurrencia de enfermedad y de mortalidad que el tipo papilar y folicular. La supervivencia a 10 años de acuerdo a la clasificación TNM para los estadios I, II, III y IV es de 100%, 93%, 71% y 21 % respectivamente. Al momento del diagnóstico cerca de la mitad de pacientes presentan estadio III o IV. La supervivencia a 5 años oscila entre 70 al 95% ⁽²⁾.

NEM 2 es un síndrome que se transmite en forma autosómica dominante, está clasificado en 3 subgrupos clínicamente diferenciados: NEM 2A, NEM 2B y carcinoma medular de tiroides familiar (CMTF). La variante NEM 2A representa el 80% de los casos hereditarios, el CMTF 5-10% de los casos y NEM 2B 5% de los casos. Todos los NEM 2 poseen un alto riesgo de desarrollo de carcinoma medular de tiroides (CMT). En los individuos con NEM 2B el CMT es considerado de mal pronóstico. NEM 2A se caracteriza por CMT, feocromocitoma e hiperparatiroidismo. NEM 2B es la asociación de CMT (de aparición mucho más precoz que en las otras formas), feocromocitoma (30-50%) y ausencia de enfermedad paratiroidea; a diferencia de las otras variedades, existen anomalías esqueléticas (hábito marfanoide), alteraciones oftalmológicas (prominencia corneal, engrosamiento palpebral, neuromas subconjuntivales), neuromas bucales y ganglioneuromatosis gastrointestinal ^(5,6). La tercera forma es el CMTF y se refiere a la aparición exclusiva de cáncer medular tiroideo en varios miembros de una

familia ⁽⁷⁾. Es considerada por la American Thyroid Association (ATA) como una variante de MEN2A. Se han establecido criterios para la inclusión de una familia dentro del grupo de CMTF: la definición más estricta es la transmisión multigeneracional de CMT en la cual no hay miembros de la familia con feocromocitoma o hiperparatiroidismo; una definición menos estricta es la presencia de CMT en cuatro miembros de la familia sin otras manifestaciones de MEN2A ⁽²⁾.

El CMT es la primera manifestación neoplásica en la mayoría de los individuos con NEM2 debido a su temprana aparición y a su alta penetrancia. Esto ha provocado que algunas familias con NEM 2ª hayan sido incluidas incorrectamente dentro del grupo de CMTF, con el consiguiente riesgo de no prevenir el desarrollo de feocromocitoma ⁽⁸⁾.

El tratamiento independientemente de si es esporádico o comprende parte de un síndrome, es la extirpación de la tiroides (tiroidectomía total) y de los nódulos linfáticos afectados ⁽⁹⁾.

El seguimiento se realiza principalmente a través de la medición de niveles de calcitonina y estudios de imagen para detectar la posible recurrencia de la enfermedad, además si el paciente presenta MEN 2A o B, la tiroidectomía no elimina la posibilidad de aparición del resto de componentes del síndrome por lo que debe realizarse un seguimiento para la detección de su posible aparición ⁽³⁾.

Proto-oncogen RET

El síndrome MEN 2 está asociado a mutaciones localizadas en un único gen, el proto-oncogen RET (**RE**arranged during **T**ransfection= reordenado durante la transfección) ⁽¹⁰⁾, localizado en el brazo largo del cromosoma 10q11.2 y comprende 21 exones ⁽²⁾.

El gen RET codifica una proteína de la familia de los receptores de membrana. Como la mayoría de estas proteínas, presenta tres dominios diferenciados; un dominio extracelular altamente conservado que es rico en cisteínas (codificado en los exones 10 y 11), un dominio transmembranal y un dominio intracelular con actividad cinasa de tirosina (codificado en los exones 13,14,15 y 16) ⁽¹¹⁾. La proteína interacciona a través de su dominio extracelular con factores externos provocando la respuesta celular a

dichos factores. Entre las respuestas celulares se encuentran la división celular, la diferenciación de las células para llevar a cabo funciones especializadas como la apoptosis ⁽²⁾. La proteína codificada por el gen RET es esencial para la diferenciación neuronal, incluyendo la diferenciación de las células nerviosas del intestino (neuronas entéricas) y de las células nerviosas del sistema nervioso autónomo que controlan funciones involuntarias del cuerpo como la frecuencia cardíaca ⁽¹²⁾.

En más del 95% de pacientes con NEM 2A y CMTF, se han identificado mutaciones de línea germinal del proto-oncogen RET, las cuales afectan una de las tantas cisteínas ubicadas en la porción extracelular, codificadas por los exones 10 (codones 609, 611, 618, 620) y 11 (codones 630 y 634) En el caso de NEM 2B la mutación afecta a la región catalítica (exón 16, codón 918) en el 95% y con menos frecuencia en el exón 15 ⁽³⁾. Además se han descrito otras 4 mutaciones de muy baja frecuencia (<1%) ubicadas en los exones 13 (codones 768, 790, 791), exón 14 (codón 804) y exón 15 (codón 891) especialmente en CMT familiar; el 88% de las familias con CMTF presentan mutaciones germinales identificables en el gen RET, principalmente en uno de los cinco codones que codifican los residuos de cisteína de los exones 10 y 11. Otras mutaciones identificadas en pacientes NEM2 se han descrito en codones que afectan al dominio intracelular de la proteína ⁽⁶⁾.

Se ha correlacionado el genotipo (mutación en RET) y la expresión fenotípica del síndrome NEM. Por lo que dependiendo de la mutación encontrada se ha establecido cierto grado de riesgo que corresponde con diferente grado de agresividad ⁽¹³⁾. La Seventh International Workshop on MEN, clasifica a los portadores de mutaciones en RET, dentro de tres grupos de riesgo (nivel 1 a 3) ⁽⁵⁾:

Nivel 1 o de alto riesgo: aquellos portadores de mutaciones en los codones 609, 768, 790, 791, 804 y 891.

Nivel 2 o de mayor riesgo: se incluyen en este grupo los portadores de mutaciones en los codones 611, 618, 620 y 634.

Nivel 3 o de máximo riesgo: incluye a los portadores de mutaciones en los codones 883 y 918 del gen.

La ATA los clasifica en cuatro grupos A, B, C, D , donde se consideran dentro del nivel A a aquellos con mutaciones relacionadas a menor riesgo y el nivel D a los de más alto riesgo ⁽²⁾ .

Diagnóstico bioquímico y genético del CMT

Para el diagnóstico bioquímico se realizan determinación de niveles basales de calcitonina así como determinación de niveles tras la estimulación con pentagastrina. Antes de la identificación de las mutaciones del proto-oncogen *RET* asociadas al CMT, la única herramienta o método disponible para realizar un seguimiento de estas personas con riesgo era la medida de los niveles de calcitonina en el plasma sanguíneo ⁽¹⁴⁾ .

El análisis molecular del gen *RET* en aquellos individuos con riesgo de CMT se ha convertido en la prueba estándar para el diagnóstico preventivo de esta enfermedad ^(11,15) . La medición de los niveles de calcitonina séricos sigue siendo el método utilizado para el seguimiento de pacientes posterior al tratamiento quirúrgico

Se recomienda el análisis genético de los individuos con antecedentes familiares de cáncer medular de tiroides y la realización de tiroidectomías profilácticas en individuos con NEM2B en el primer año de vida o en el momento del diagnóstico y en individuos MEN2A la recomendación es realizar la intervención antes de los 3 o 5 años de vida de acuerdo al tipo de mutación encontrada y grado de riesgo asignado o cuando se identifique la mutación. Ver Tabla 1 ^(2,16, 17) .

MATERIAL Y MÉTODOS

OBJETIVOS

Identificar a los portadores de las principales mutaciones del proto-oncogén RET en el grupo de pacientes con diagnóstico de Cáncer Medular de tiroides.

Realizar el diagnóstico genético de los pacientes con diagnóstico de cáncer medular de tiroides hereditario.

Identificar dentro del grupo clasificado como cáncer medular de tiroides esporádico a aquellos con mutaciones correspondientes a cáncer medular hereditario.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio abierto, observacional, ambispectivo y transversal. El estudio se llevó a cabo en el Departamento de Endocrinología de la Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional “La Raza”, en pacientes con diagnóstico de cáncer medular de tiroides del 01 de Enero de 1983 al 01 Enero 2013.

CRITERIOS DE INCLUSION

Paciente mayores de 16 años

Afiliados al Instituto Mexicano del Seguro Social

Con reporte histopatológico confirmado de cáncer medular de tiroides del 01 de Enero de 1983 al 01 Enero 2013

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Pacientes que fueron detectados del 01 de Enero de 1983 al 01 de enero 2013 que fallecieron o perdieron seguimiento.

Pacientes cuya muestra sanguínea aporte ADN insuficiente para la prueba.

DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO

- 1) Se informó a los pacientes sobre el estudio y posteriormente se solicitó al paciente o representante legal la firma del consentimiento informado.
- 2) Los médicos investigadores recolectaron los datos necesarios del expediente clínico y datos generales de los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión.
- 3) Se citaron a los pacientes candidatos a toma de muestra sanguínea, la cual será realizada por el médico residente, se extrajeron 5 ml de sangre periférica.
- 4) El procesamiento de las muestras consistió en : a) la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN), b) amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), c) identificación de mutaciones del gen RET en leucocitos por secuenciación directa del ADN.
 - a) Extracción de ADN. Esto fue realizado a partir de leucocitos cuya separación se realizó mediante centrifugación, sometiendo la muestra de sangre a 5,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos. Posteriormente los glóbulos blancos fueron separados mediante pipeteo para después purificarlos con buffer de lisis de glóbulos rojos en agitación a 100 rpm durante 10 min, ulteriormente se llevó a cabo su centrifugación a 10,000 rpm por un min en tres ocasiones. Posteriormente al botón de glóbulos blancos o pellet se le añadió solución de buffer de lisis nuclear con 20 microlitros (ul) de proteínasa K y se dejó a 60 grados centígrados hasta que el pellet fue digerido por completo; seguidamente a ésto se agregó 200 ul de acetato de amonio y se incubó a menos 20 °C durante 20 min. Las muestras se llevaron a centrifugación a 14,000 rpm durante 10 min y el sobrenadante fue transferido a un tubo, al cual se le añadieron 600 ul de isopropanol frio, manteniéndose en incubación a menos 20 °C durante 12 hrs, para después centrifugar a 14,000 rpm durante 15 min y desechar el sobrenadante. El pellet correspondiente al DNA fue lavado con 500 ul de etanol al 70 % y se centrifugó a 14,000 durante 5 min. Se desechò el sobrenadante y se puso a secar la muestra en termoblock a 65 grados centígrados . Una vez totalmente seco el DNA se resuspende con 25 ul de agua esteril libre de nucleasas para

finalmente ser cuantificado por medio de espectrofotometría con el equipo Nanodrop 1000.

- b) Amplificación de ADN genómico mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizadas se muestran en la Tabla 4. Las condiciones de amplificación de oligonucleótidos de RET fueron las siguientes: 10 min a 95 °C, cuarenta ciclos de 95 °C durante 30 seg; 65 °C durante 35 segundos; 72 °C durante 35 seg; y una última fase de elongación a 72 °C por 10 min. La PCR se realizó en un equipo PERKIN ELMER Thermal cycler 480 y fue a un volumen final de reacción de 20 ul.

Para determinar que los productos de PCR eran los esperados se realizó electroforesis del producto en gel de agarosa al 1.5 % (Figuras 1 y 2).

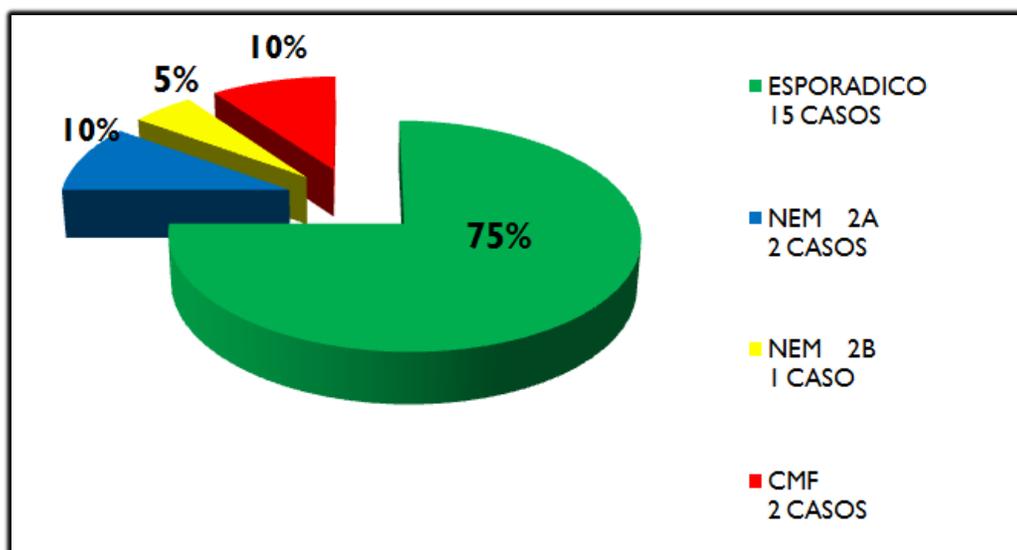
- c) Secuenciación: El marcaje de la secuenciación se llevó a cabo mediante el Kit BIG DYE de Applied Biosystems con el oligonucleótido directo siguiendo las condiciones de amplificación anteriormente marcadas. Los productos de la PCR de los exones del gen RET se sometieron a la secuenciación directa para identificar las mutaciones, usando los oligonucleótidos directo e inverso en reacciones de secuenciación independientes para cada exón. Las secuencias finales se confirmaron y compararon con el banco genómico disponible en la herramienta WEB BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para detectar mutaciones del gen RET.

ANALISIS ESTADÍSTICO. Se utilizó estadística descriptiva

RESULTADOS

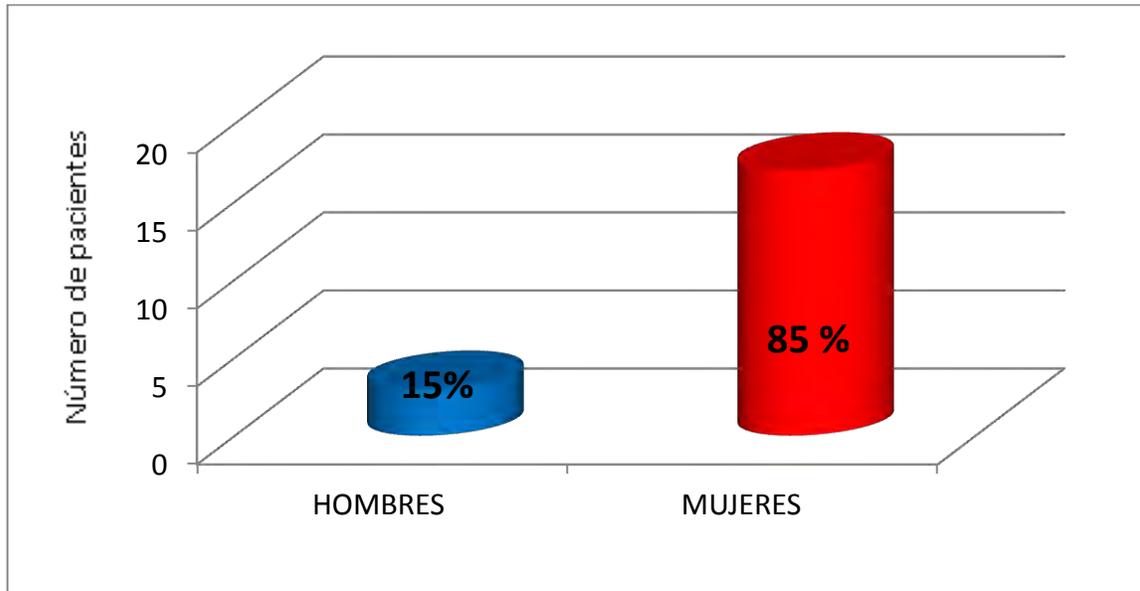
De los 1013 pacientes con Cáncer de Tiroides que se encuentran en seguimiento en el departamento de endocrinología del Centro Médico Nacional “La Raza”; entre enero de 1983 y enero de 2013, se identificaron 20 pacientes (1.9%) con diagnóstico histopatológico de cáncer medular de tiroides (CMT); 5 (25%) con diagnóstico clínico de CMT tipo hereditario y 15 (75%) tipo esporádico. Los 5 casos clasificados como hereditarios se encuentran distribuidos de la siguiente forma: 1 con probable MEN2B, 2 con probable MEN2A, 2 con sospecha de CMF) (Figura 1).

Figura 1. DISTRIBUCIÓN DEL CÁNCER MEDULAR DE TIROIDES DE ACUERDO A SU PRESENTACIÓN CLÍNICA



Al análisis del grupo de pacientes con CMT se observa que existe mayor afectación de la población del sexo femenino, con una relación Mujeres:Hombres de 6:1 (Figura 2);

FIGURA 2. PACIENTES CON CMT EN SEGUIMIENTO EN LA CLINICA DE TIROIDES, DEPARTAMENTO DE ENDOCRINOLOGÍA CENTRO MÉDICO NACIONAL "LA RAZA". DISTRIBUCIÓN POR SEXO



afectando predominantemente a las mujeres entre la 4ª y 6ª décadas de la vida, el promedio de edad al momento del diagnóstico es de 46 años (con una edad mínima de afectación de 10 años y máxima de 74). Las características generales de los pacientes se exponen con mayor detalle en la Tabla1.

Tabla 1. Características generales de los pacientes con CMT en seguimiento (1983-2013) en la Clínica de Tiroides, Departamento de Endocrinología Centro Médico Nacional “La Raza”

PACIENTE	SEXO	EDAD AL DIAGNOSTICO	DIAGNOSTICO CLINICO
1	F	48	ESPORADICO
2	F	60	ESPORADICO
3	F	19	NEM 2B
4	F	56	ESPORADICO
5	M	28	CMF
6	F	30	ESPORADICO
7	F	58	ESPORADICO
8	M	69	ESPORADICO
9	F	47	ESPORADICO
10	F	39	NEM 2A
11	F	10	CMF
12	F	74	ESPORADICO
13	F	44	ESPORADICO
14	F	67	ESPORADICO
15	F	54	ESPORADICO
16	M	44	ESPORADICO
17	F	59	ESPORADICO
18	F	26	NEM 2A
19	F	46	ESPORADICO
20	F	43	ESPORADICO
F: femenino M: masculino			

En nuestro grupo de pacientes hasta 15% (3) presentaron metástasis ganglionares al momento del diagnóstico, ninguno metástasis a distancia. El estadio TNM más frecuentemente encontrado es el I (hasta en un 30% de los pacientes) , se identificaron al momento del diagnóstico 15 % de los pacientes en estadio IV y 20% en estadio III , que en conjunto comprenden el 35% de pacientes en estadios avanzados de enfermedad. Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación y estadio TNM de los pacientes con Cáncer Medular de Tiroides al momento de su diagnóstico.

PACIENTE	CLASIFICACION TNM			ESTADIO TNM
	T: tumor	N:nódulos o ganglios	M: metastasis	
1	3	1 a	0	II
2	2	X	0	II
3	1	0	0	I
4	4a	1 a	0	IVa
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	2	0	0	II
8	3	0	0	III
9	4a	1	0	IVa
10	4a	1b	0	IVa
11	1	0	0	I
12	3	0	0	III
13	3	0	0	III
14	1	0	0	I
15	3	1 a	0	III
16	1	0	0	I
17	2	0	0	II
18	1	0	0	I
19	1	0	0	I
20	2	0	0	II

De las 13 muestras sanguíneas analizadas para la búsqueda de la mutación germinal en el exón 16, codón 918; el ADN genómico de las muestras obtenidas demostró específica amplificación de dicho exón RET como se observa por el tamaño de los fragmentos en la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Figura 3 y 4).. Los 2 pacientes con CMF y los considerados como esporádicos resultaron negativos a la presencia de mutación ; el ADN genómico de la paciente con sospecha clínica de síndrome MEN2B resultó positiva para la presencia de mutación M918T (ATG—ACG), confirmando así genéticamente el CMF hereditario tipo MEN2B, caracterizado fenotípicamente en esta paciente por CMT, feocromocitoma, habitus marfanoide , presencia de neuromas en labios y lengua. Se muestra a continuación la secuencia

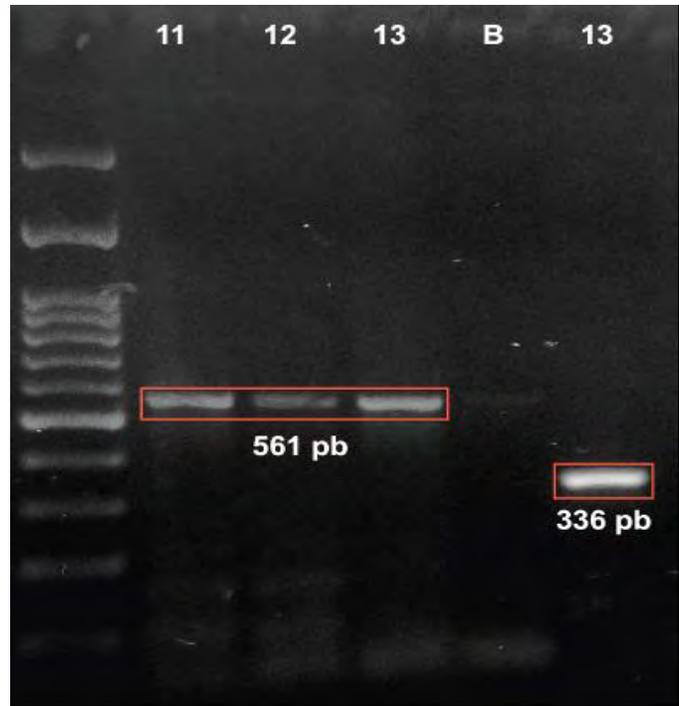
obtenida, resaltando la presencia del nucleótido mutado ACG (codificante para treonina) en el lugar del nucleótido normal ATG (codificante para metionina).

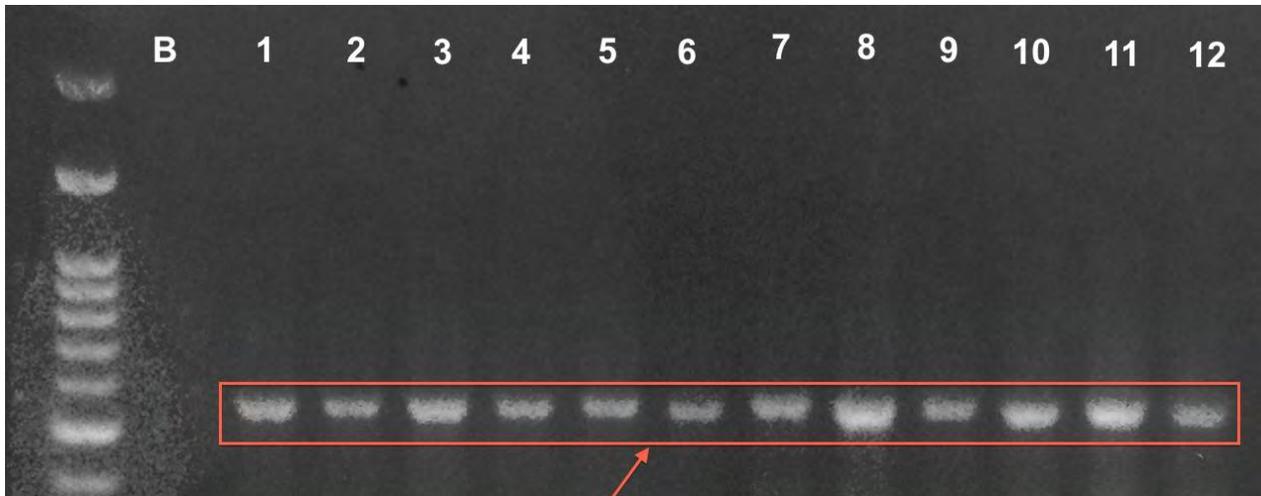
```
AACTGAGAGTGAGTACTTCATGTCTTTATTCCATCTTCTCTTTAGGGTCGGATTCCAGTTAAATGGACGGC
AATTGAATCCCTTTTTGATCATATCTACACCACGCAAAGTGATGTGTAAGTGTGGGTGTTGCTCTCTTGGG
GTGGAGGTTACAGAAACAACCCCTTATACATGTAGTGGGGCCACGACGCCCGTTCTGTGCAGCTTTGGCC
CAGGGAATTGCACTGGGCCCTGAGCACCTGTCATGCAGTGCTTAGTTTTCTGCAATGACCCCTCACTGG
AGGTCCTTCATGATGGTGTCCGTGAGCCAAATGGCTGTTTGTCTGCTCAAAATCTA}
```

De las 13 muestras analizadas para la búsqueda de mutaciones características para la mutación germinal en el exón 11, codón 634; el ADN genómico demostró específica amplificación de dicho exón RET, tal como se muestra en la electroforesis en gel de agarosa (figura 3 y 4).

Figura 3 (izquierda):
Electroforesis de los productos de PCR del exón 11 (561 pb); exón 16 (336 pb) del gen RET en gel de Agarosa al 1.5%.

Figura 4 (abajo):
Electroforesis de los productos de PCR del del exón 11 (561 pb)





Al realizar el análisis BLAST de la secuencia obtenida en la herramienta WEB, no obtuvimos coincidencias con las secuencias del banco genómico del National Center for Biotechnology Information (NCBI), por lo que no podemos confirmar la presencia de la mutación en el codón 634 en los pacientes clasificados clínicamente como tipo NEM 2A y CMF; ni descartarla en el grupo con CMT esporádico .

DISCUSION

Desde las últimas décadas se ha producido un mayor interés en el estudio de las bases moleculares y genéticas del cáncer. Fué en la década de los 80s cuando se confirmó la alteración del proto-oncogén RET en los pacientes con presencia de CMT. ⁽²⁾ El CMT es de mal pronóstico comparado con el tipo papilar y folicular; se han descrito diversos factores que afectan la sobrevida y pronóstico del paciente con CMT, considerando entre los de mayor importancia la edad y el grado de invasión al momento del diagnóstico ^(18,19); tomando en cuenta que se ha reportado que cerca del 50% de pacientes con CMT se encuentran en estadio III o IV al momento del diagnóstico ⁽²⁾ es de gran relevancia la detección oportuna de mutaciones del protooncogén RET en familias con CMT hereditario y su búsqueda intencionada en los considerados como tipo esporádico ya que hasta el 5% de éstos son reclasificados como hereditarios en base al estudio genético. ⁽²⁰⁾

En nuestro grupo de pacientes con respecto a la búsqueda de mutaciones en el codón 634 del exón 11, aunque se demuestra la específica amplificación de dicho exón RET en el gel de agarosa 1.5%, al realizar el análisis BLAST de la secuencia obtenida no obtuvimos coincidencias con las secuencias del banco genómico del NCBI, al revisar las estructuras derivadas de dichas secuencias observamos la formación de estructuras secundarias, lo que no permite el adecuado marcaje de la secuencia, siendo además ilegible para la Taq polimerasa, obteniendo así la lectura solo de los nucleótidos expuestos, lo que nos otorga finalmente falsas secuencias que no fueron compatibles con el exón 11 de RET ampliado. Un ejemplo de éstas estructuras secundarias se muestra en la figura 5. Como se puede observar en la figura se reporta $G = -4$ (energía libre de Gibbs = -4), recordemos que la condición de equilibrio es $G = 0$, por lo que la negatividad reportada se traduce en la formación espontánea de las estructuras secundarias antes mencionadas, aún en condiciones de estabilidad (1 atm y 25°C).

Con respecto a la búsqueda de mutaciones en el exón 16, ; se confirmó el diagnóstico de MEN 2B en la paciente que había sido clasificada clínicamente dentro de éste síndrome, encontrando la mutación esperada en el codón 918 del exón 16, hecho trascendental, ya que permitirá un abordaje diagnóstico y de ser necesario terapéutico

en el hijo de la paciente próximo a nacer; es importante mencionar que la mutación encontrada es clasificada como riesgo D de acuerdo a la ATA y riesgo 3 por la Seventh International Workshop on MEN, es decir el mayor riesgo asignado para CMT, por lo que el abordaje diagnóstico y terapéutico debe iniciarse lo más pronto posible antes de concluir el primer año de vida de acuerdo a las recomendaciones de la ATA. Tabla 3.

Por otra parte el análisis del gen RET para la búsqueda de mutaciones permitió además descartar la presencia de la mutación en el codón 918 del exón 16, en el resto de pacientes considerados con CMT de tipo esporádico y CMF.

Los familiares en primer grado de los individuos afectados con CMT hereditario, presentan un 50% de riesgo de heredar la mutación del gen y por lo tanto de desarrollar este tipo de cáncer ^(2, 5)

El diagnóstico genético en el CMT hereditario, es de utilidad para asignar de acuerdo a la mutación encontrada un grado de riesgo, lo que permite el diagnóstico y tratamiento precoz de los familiares del caso índice, ⁽⁵⁾ teniendo así la posibilidad de ofrecer verdaderamente un tratamiento preventivo con la realización de la intervención quirúrgica incluso antes de que aparezca hiperplasia en las células, se desarrolle el CMT y aparezcan metástasis en los nódulos linfáticos. Éste también permite excluir de los programas de seguimiento y de una posible intervención, a los familiares de individuos no portadores de la mutación, con la disminución de costos que esto implica, sin olvidar el impacto psíquico que esto tiene en el paciente y su familia.

El CMT hereditario y el de tipo esporádico pueden tener una presentación clínica indistinguible al inicio; incluso un paciente con CMT hereditario puede ser considerado erróneamente como caso esporádico debido a una historia familiar desconocida, por la aparición de mutaciones de novo o por ser una enfermedad de curso leve. El estudio genético permite diferenciar ambas entidades, por lo que es recomendable el estudio del gen RET en todos los casos con CMT con el objeto de descartar la aparición de nuevas familias con CMT hereditarios. ^(5,10,11).

Es pues en la actualidad el análisis mutacional del gen RET una herramienta de gran importancia para el médico tratante, para el paciente y para los servicios de salud; un avance científico con gran impacto en diversos aspectos del diagnóstico, tratamiento,

pronóstico y seguimiento de la enfermedad; por lo que a treinta años de su descubrimiento es necesaria su aplicación en todos los pacientes con diagnóstico de CMT , realizando no solo el análisis del exón 16 y 11 sino del resto de codones donde se han identificado mutaciones germinales en el gen RET, que permitan además de los beneficios mencionados, comprender y analizar su impacto en población mexicana.

CONCLUSIONES

EL CMT es un cáncer que aunque tiene una baja frecuencia es de mal pronóstico comparado con las variantes de cáncer de tiroides diferenciado ya presenta una mayor tasa de recurrencia de enfermedad y de mortalidad que el tipo papilar y folicular

La población mayormente afectada son las mujeres entre la 4ª y 6ª década de la vida.

Al momento del diagnóstico más de la tercera parte es encontrado en estadios TNM II y III. El pronóstico de la enfermedad se ha asociado con diversos factores, entre los de mayor importancia se mencionan la edad y el grado de invasión al momento del diagnóstico.

Las técnicas de biología molecular han permitido la identificación de los genes responsables de las NEM 1 y 2; esto desde el punto de vista clínico ha significado un avance en el diagnóstico precoz y el tratamiento oportuno de estas patologías..

Es importante también que en los pacientes con CMT considerados clínicamente como esporádicos se realice la búsqueda intencionada de mutaciones germinales, para descartar la presencia de una enfermedad hereditaria, ya que de acuerdo a lo reportado en la literatura hasta el 6% de estos pacientes han sido reclasificados como esporádicos al realizar el análisis mutacional del gen RET.

La búsqueda de mutaciones en el gen RET es de gran importancia en los pacientes con diagnóstico de CMT , ya que el tipo de mutación encontrada tiene trascendencia diagnóstica, terapéutica y pronóstica.

También es trascendente en los familiares del caso índice ya que de corroborar la presencia de CMT hereditario, los descendientes directos son individuos con riesgo de desarrollar la enfermedad, por lo que el análisis mutacional del gen RET es la prueba estándar para el diagnóstico y tratamiento preventivo ya que es la prueba que ha demostrado mayor fiabilidad para la toma de decisiones terapéuticas en individuos con riesgo, sin evidencia clínica de la enfermedad.

El análisis del gen, en busca de mutaciones germinales se puede realizar en ADN de leucocitos obtenidos a través de una muestra de sangre periférica, por lo que sin métodos altamente invasivos o de riesgo, es posible diagnosticar los casos hereditarios de CMT.

BIBLIOGRAFÍA

1. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer Principles and Practice of Oncology. 3 ed. Philadelphia-New York. Lippincott-Raven Publishers, 1997: 404-16
2. Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib, et al. Medullar Thyroid Cancer: Management Guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid* 2009; 19 (6):565-609
3. Scott N., and Et al. Medullary thyroid carcinoma: Targeted therapies an future directions. *J Oncol.* 2009; 18: 30-31
4. Shannon R. Bales, Inder J. Chopra *J Thyroid Res.* 2011; 2011: 102636. Published online 2011 August 2. doi: 10.4061/2011/102636
5. Hubner RA, Houlston RS. Molecular advances in medullary thyroid cancer diagnostics. *Clinica Chimica Acta* 2006; 370:2-6.
6. Wiesner GL, Snow-Bailey K Multiple Endocrine Neoplasia Type 2. In: GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2006. Available at <http://www.genetests.org>.
7. Farndon JR, Leight S, Dilley WG, Baylin SB, Smallridge RC, Harrison TS et al. Familial medullary thyroid carcinoma without associated endocrinopathies: a distinct clinical entity. *Br J Surg.* 1986; 73: 278-81.
8. Hubner RA, Houlston RS. Molecular advances in medullary thyroid cancer diagnostics. *Clinica Chimica Acta.* 2006; 370:2-6.
9. Quayle FJ, Moley, JF. Medullary thyroid carcinoma: Including MEN2A and MEN2B syndromes. *J. Surg. Oncol.* 2005; 89 (3):122-9.
10. Mulligan LM, Kwok JBJ, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature.* 1993; 363 (6428):458-60..
11. De Grot JWB, Links TP, Plukker JTM, Lips CJM, Hofstra RMW. RET as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocrine Reviews.* 2006; 27(5): 535-60.

12. Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Vecchio G, Fusco A. Minireview:RET: Normal and Abnormal Functions. *Endocrinology*. 2004; 145 (12):5448-51
13. Girelli ME, Nacamulli D, Pelizzo MR, De Vido D, Mian C et al. Medullary thyroid carcinoma: clinical features and long-term follow-up of seventy-eight patients treated between 1969 and 1986. *Thyroid* 1998; 8:517–523
14. Elisei R, Bottici V, Luchetti F, Di Coscio G, Romei C et al. Impact of routine measurement of serum calcitonin on the diagnosis and outcome of medullary thyroid cancer: experience in 10,864 patients with nodular thyroid disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:163–168
15. Machens A, Niccoli-Sire P, Hoegel J, Frank-Raue K, Van Vroonhoven TJ, Roehrer HD et al. Early Malignant Progression of Hereditary Medullary Thyroid Cancer. *N Engl J Med*. 2003; 349 (16):1517-25.
16. Nacional Cancer Institute. Physician Data Query (PDQ).Thyroid Cancer Treatment. .2012. Available at <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/thyroid>
17. Zedenius J, Larsson C, Bergholm U, Bovee J, Svensson A, Hallengren B et al. Mutations of codon 918 in the RET proto-oncogene correlate to poor prognosis in sporadic medullary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:3088–3090
18. Dottorini ME, Assi A, Sironi M, et al. Multivariate analysis of patients with medullary thyroid carcinoma. Prognostic significance and impact on treatment of clinical and pathologic variables. *Cancer* 1996; 77(8):1556-65
19. Kebebew E. Ituarte PH, Siperstein AE, et al. Medullary thyroid carcinoma clinical characteristics treatment, prognostic factors, and a comparison of staging systems. *Cancer* 2000;88(5):1139-48
20. Leboulleux S, Baudin E. Travagli JP, Schlumberger M. Medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol*. 2004; 61,299-310.

ANEXOS

Tabla 4: Secuencias de oligonucleótidos RET

EXON	OLIGONUCLEÓTIDO
11	F: 5' - GGT CTA GGA GGG GGC AGT AAA TGG -3' R: 5'- CAG CGT TGC CAG CCC CTC ACA G-3'
16	F: 5'- GGC CTT CTC CTT TAC CCC TCC TT -3' R: 5'- CAG CCA TTT GCC TCA CGA ACA C-3 F: Forward , R: Reverse

Tabla 5: Recomendaciones para estudio y tratamiento con cirugía profiláctica para pacientes con CMT de acuerdo al nivel de riesgo asignado por la ATA (Asociación americana de Tiroides).

NIVEL DE RIESGO ATA	EDAD PARA ANALISIS DEL RET	EDAD PARA PRIMER ULTRASONIDO	EDAD PARA LA PRIMERA DETERMINACION DE CALCITONINA	EDAD PARA LA CIRUGIA PROFILACTICA
D	TPSP y antes del primer año de vida	TPSP y antes del primer año de vida	6 meses si la cirugía aun no se ha realizado	TPSP y antes del primer año de vida
C	< 3-5 años	3- 5 años	3- 5 años	Antes de 5 años
B	< 3-5 años	3- 5 años	3- 5 años	Considerar cirugía antes de 5 años. Puede retardarse la cirugía después de los 5 años si no cuenta con criterios estrictos que la indiquen. ^a
A	< 3-5 años	3- 5 años	3- 5 años	Puede retardarse la cirugía después de los 5 años si no cuenta con criterios estrictos que la indiquen. ^a

^a Calcitonina sérica basal y/o estimulada anual normal, ultrasonido de cuello anual normal, historia familiar de CMT poco agresivo y preferencia familiar.

TPSP: Tan pronto sea posible

Obtenido de: Management Guidelines of the American Thyroid Association. Thyroid 2009

Figura 5. Estructura de la secuencia de nucleótidos obtenida de ADN genómico para el exón 11 del gen RET

