



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR
ZUBIRÁN

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DR. RUBÉN LISKER

**“ESTUDIO CLÍNICO Y MOLECULAR EN PACIENTES CON
NEOPLASIA ENDÓCRINA MÚLTIPLE TIPO 1”**

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN
GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA:
Samantha Solís Vidal

Tutor de tesis:
Dr. Osvaldo M. Mutchinick B.

Asesor técnico:
QFB. Yevgeniya Svyryd

Ciudad de México. Enero 2019.



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.

A la memoria de:

Olga María de los Santos Castros y Esperanza Brito Yañez.

Mis amadas abuelitas.

“Antes pensábamos que el futuro estaba en las estrellas,
ahora sabemos que está en los genes.”

James Watson.

Agradecimientos

A mis padres, hermana y toda la familia Vidal por su constante aliento, fortaleza y amor durante estos años de residencia, en especial Rosa y Cinthia.

Al Dr. Osvaldo M Mutchinick, asesor de tesis, maestro de especialidad y lecciones de vida, gracias por las enseñanzas y consejos recibidos en esta nueva aventura que emprendí hace 3 llamada genética, por otorgarme un lugar en su departamento y brindarme todas las facilidades para desenvolverme.

Mi asesora técnica la QFB. Yevgeniya Svyryd por su paciencia, sugerencia y recomendaciones para lograr este bonito trabajo final.

A la Dra. Tusie y a la M en C. M. Yayoi Segura del departamento de Medicina Genómica del INCMNSZ, por la secuenciación del gen *MEN1* y colaboración con nuestro departamento.

A mis hermanos en la genética Jhonatan e Isaac por hacer de esta residencia un bello lugar, lleno de risas y alegrías; al Dr. Morales por su carácter inusual que hace amena la consulta y sesiones del departamento.

A mis demás compañeros y amigos de residencia Genaro, Valeria, Adriana, Isay, Yunuem, Vania, Jorge, Edmar, Andrea, Yuki e Iván; la Dra. Arteaga por el apoyo constante; las químicas del departamento de biología molecular y citogenética, la TS. Leonora Luna por su disposición en todo momento y secretarias Vero y Miri.

Al Dr. Carlos A. Tovilla por inducirme al mundo de la investigación durante mis años universitarios. A Imelda, Laura, Carolina y Stephany mis queridas amigas de universidad.

A mi nueva pequeña familia (Diego y mi futuro bebé) por su amor constante y darme el último empujón en estos días.

Todo lo que soy y lo que espero ser lo debo solo a Dios.

RESUMEN

Introducción. La Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 1 (NEM1) es una enfermedad genética caracterizada por la presencia de dos o más tumores neuroendocrinos en hipófisis, paratiroides y tracto gastrointestinal. Tiene una prevalencia de 1 en cada 30,000 individuos. Las mutaciones en línea germinal en el gen supresor de tumor *MEN1* y posterior pérdida de heterocigosidad a nivel somático llevan al desarrollo de tumores característicos de NEM1. Hasta un 90% de los casos presentan antecedentes familiares y un 10% son casos *de novo*. En el diagnóstico molecular, la técnica de primera elección es la secuenciación directa del gen *MEN1*, que detecta en general hasta un 90% de mutaciones en los casos familiares y un 65% en los esporádicos. En los pacientes con secuenciación negativa se recomienda realizar la búsqueda de deleciones grandes mediante la técnica de Amplificación de Sondas Múltiple dependiente de Ligación (MLPA).

Objetivo. Determinar las alteraciones moleculares del gen *MEN1* mediante secuenciación directa y MLPA y describir las características clínicas en una serie de pacientes de la consulta del Instituto nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) con diagnóstico clínico de NEM1.

Materiales y Métodos. Se realizó la búsqueda e identificación de pacientes con el diagnóstico clínico de NEM1 en el archivo histórico del INCMNSZ en el periodo del 1998 a 2018. Se colectaron datos sobre la edad, sexo, edad al diagnóstico, antecedentes heredo-familiares, el tipo de manifestaciones clínicas de NEM1 y características clínicas adicionales. La búsqueda de mutaciones en el *MEN1* se realizó mediante la secuenciación directa del ADN genómico de sangre periférica. En el caso de no detectar mutaciones se procedió con la búsqueda de deleciones grandes del gen mediante MLPA

Resultados. Se identificaron 23 pacientes con el diagnóstico clínico de NEM1. En 10 (43%) casos se confirmó el antecedente heredo-familiar de la enfermedad. Las alteraciones génicas en el gen *MEN1* se encontraron en 14 (60%) pacientes, siendo las mutaciones puntuales las más frecuentes (9/14), seguidas por deleciones, duplicaciones o inserciones de 1-2 pb (5/14). No se detectaron rearrreglos grandes. La edad al diagnóstico de la primera manifestación clínica fue significativamente menor en pacientes con mutaciones en *MEN1* (34.5 ± 8.9 vs 45.0 ± 14.4 años; $p_{t\text{ Student}} < 0.05$). Las tres manifestaciones clínicas clásicas de NEM1 juntas fueron encontradas con mayor frecuencia en pacientes con mutaciones a diferencia de los que tienen la variante silvestre el gen ($\chi^2=5.53$, $p < 0.05$). El hiperparatiroidismo primario aislado, adenoma hipofisiario o tumor neuroendocrino del tracto gastro-entero-pancreático fueron diagnosticadas a edades menores en pacientes con mutaciones en *MEN1* que en los pacientes sin alteraciones detectadas en este gen, aunque sólo para la primera fue estadísticamente significativo (34.9 ± 9.2 vs 45.3 ± 15.3 , $p < 0.05$; 38.1 ± 14.1 vs 42.7 ± 13.6 , $p = 0.486$; y 37.7 ± 12.9 vs 50.8 ± 8.3 , $p = 0.072$, respectivamente).

Conclusiones. Este trabajo es el primer registro de alteraciones genéticas asociadas a NEM1 en una serie de pacientes mexicanos. La presentación de alteraciones en el gen *MEN1* se relaciona en general con el inicio más temprano de los síntomas. Por lo cual es importante la realización del diagnóstico molecular de NEM1 para la identificación oportuna de los familiares en riesgo.

Palabras claves: *Neoplasia Endocrina Multiple tipo 1, mutaciones en gen MEN1, menina*

ABSTRACT

Introduction. Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN1) is a genetic disease characterized by the presence of two or more neuroendocrine tumors in the pituitary gland, parathyroid gland, and gastrointestinal tract. It has a prevalence of 1 in every 30,000 individuals. Germline mutations in the *MEN1* tumor suppressor gene and subsequent loss of heterozygosity at the somatic level lead to the development of tumors characteristic of MEN1. Up to 90% of cases have a family history, and 10% are *de novo* cases. For molecular diagnosis, the technique of the first choice is the direct sequencing of the *MEN1* gene, which detects up to 90% of mutations in familial cases and 65% in sporadic ones. In patients with negative sequencing, the search for large deletions is performed using the MLPA technique.

Objective: The main goal of this study is determine the molecular alterations of the *MEN1* gene through direct sequencing and MLPA and to describe the clinical characteristics in a series of INCMNSZ patients with a clinical diagnosis of MEN1.

Materials and methods: The search and identification of patients with the clinical diagnosis of MEN1 were carried out in the historical archive of the INCMNSZ covering the period from 1998 to 2018. Clinical and demographic variables were included: age, sex, age at diagnosis, family history, diagnostic characteristics for MEN1 and additional clinical characteristics. Direct sequencing and MLPA were used for mutation and deletions scanning of *MEN1* gene.

Results: We identified 23 patients with the clinical diagnosis of MEN1. The family history of the disease was confirmed in 10 (43%) cases. Gene alterations in the *MEN1* gene were found in 14 (60%) patients, with point mutations being the most frequent (9/14), followed by deletions, duplications or insertions of 1-2 bp (5/14). No large rearrangements were detected. The age at diagnosis of the first clinical manifestation was significantly lower in patients with mutations in *MEN1* (34.5 ± 8.9 vs 45.0 ± 14.4 years; Student $p < 0.05$). The three classic clinical manifestations of MEN1 were found together more frequently in patients with mutations than in patients without genetic alterations in *MEN1* ($\chi^2 = 5.53$, $p = < 0.05$). Hyperparathyroidism, pituitary tumors or gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors were diagnosed at younger ages in patients with mutations in *MEN1* than in patients without alterations detected in this gene. Although, only for the first one it was statistically significant: 34.9 ± 9.2 vs 45.3 ± 15.3 years, $p < 0.05$; 38.1 ± 14.1 vs 42.7 ± 13.6 years, $p = 0.486$; and 37.7 ± 12.9 vs 50.8 ± 8.3 years, $p = 0.072$; respectively).

Conclusions. This work is the first record of genetic alterations associated with MEN1 in a series of Mexican patients. The presentation of alterations in the *MEN1* gene is generally related to the earlier onset of symptoms. It is important to carry out the molecular diagnosis of MEN1 for the timely identification of family members at risk.

Keywords: *Multiple Endocrine Neoplasia type 1, MEN1 gene mutations, menin.*

Abreviaturas

ACTH: hormona adrenocorticotrópica.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNg: ácido desoxirribonucleico genómico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

CIE10: clasificación internacional de enfermedades 10.

HC: hormona de crecimiento.

HPTP: hiperparatiroidismo primario.

HPTPA: hiperparatiroidismo primario aislado.

INCMNSZ: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

MiRNA/ miR: micro ARN en sus siglas en inglés.

MLPA: amplificación de sonda dependiente de ligandos múltiples, por sus siglas en inglés.

NE: no especificado.

NEM1: Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 1.

PRL: prolactina.

SLN: señales de localización nuclear.

TC: tumores carcinoides.

TNE: tumores neuroendocrino.

TNEP: tumores neuroendocrinos de páncreas.

TSH: hormona estimulante de tiroides, en sus siglas en inglés.

T-TGEP: tumores del Tracto Gastro-Entero-Pancreático.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. MARCO TEÓRICO | 1 |
| 1.1. Antecedentes históricos | 1 |
| 1.2. Definición | 2 |
| 1.3. Epidemiología | 2 |
| 1.4. Gen <i>MEN1</i> , menina, funciones y vías de regulación | 2 |
| 1.4.1. Características generales del gen <i>MEN1</i> | 2 |
| 1.4.2. Características de la proteína menina, localización, expresión y funciones | 3 |
| 1.4.3. Interacción de menina con otros genes | 4 |
| 1.4.4. Participación en la regulación del ciclo celular | 5 |
| 1.4.5. Participación en procesos de daño y reparación del ADN | 5 |
| 1.4.6. Participación en la regulación de la metilación | 5 |
| 1.4.7. Participación en la regulación de apoptosis mediada por Caspasa 8 | 7 |
| 1.4.8. Participación en el control de tumorigenesis | 8 |
| 1.4.9. Regulación de la expresión de menina por miRNAs | 9 |
| 1.4.10. Mutaciones en el gen <i>MEN1</i> | 9 |
| 1.5. Características clínicas de NEM1 | 11 |
| 1.5.1. Criterios diagnósticos | 11 |
| 1.5.2. Hiperparatiroidismo primario | 12 |
| 1.5.3. Hipófisis Anterior | 13 |
| 1.5.4. Tumores del Tracto Gastro-Entero-Pancreático | 14 |
| 1.5.5. Tumores carcinoides | 16 |
| 1.5.6. Glándula suprarrenal | 16 |
| 1.5.7. Otros tumores no neuroendocrinos | 16 |
| 1.6. Diagnóstico molecular de NEM1 | 18 |
| 1.6.1. Confirmación del diagnóstico clínico en pacientes | 18 |
| 1.6.2. Análisis genético en los familiares | 19 |
| 1.6.2.1. Riesgo para los miembros de la familia | 19 |
| 1.6.2.2. Riesgo para familias con mutaciones de novo | 19 |
| 1.6.3. Diagnóstico molecular presintomático | 20 |
| 1.6.4. Diagnóstico prenatal | 20 |
| 1.7. Seguimiento y tratamiento de los pacientes con NEM1 confirmado | 20 |
| 1.7.1. Tumores paratiroides | 20 |
| 1.7.2. TNEPs | 20 |
| 1.7.3. Evaluación de glándula hipófisis anterior | 21 |
| 1.7.4. Tumores de timo, bronquios y TNE gástricos | 21 |
| 1.7.5. Tumores suprarrenales | 22 |
| 1.8. Diagnósticos diferenciales | 23 |
| 1.8.1. Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 4 | 23 |
| 1.8.2. Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 2A | 23 |
| 1.8.3. Síndrome de Von Hippel Lindau | 23 |
| 1.8.4. Síndrome de Predisposición Adenomas Hipofisarios | 23 |
| 1.8.5. Hiperparatiroidismo Aislado Familiar | 23 |
| 1.9. Pronóstico | 23 |
| 1.10. NEM1 en la población mexicana | 24 |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN | 25 |
| 3. HIPÓTESIS | 26 |
| 4. OBJETIVOS | 27 |

| | |
|--|----|
| 4.1. Objetivo general | 27 |
| 4.2. Objetivos específicos | 27 |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS | 28 |
| 5.1. Diseño general | 28 |
| 5.2. Criterios de selección | 28 |
| 5.2.1. Criterios de inclusión | 28 |
| 5.2.2. Criterios de exclusión | 28 |
| 5.3. Reclutamiento de pacientes | 29 |
| 5.4. Estructura de la base de datos | 29 |
| 5.5. Abordaje para el diagnóstico molecular | 29 |
| 5.6. Procedimientos de laboratorio y técnicas | 31 |
| 5.6.1. Extracción del ADN de leucocitos de sangre periférica | 31 |
| 5.6.2. Amplificación de los fragmentos del gen MEN1 | 31 |
| 5.6.3. Evaluación y purificación de los fragmentos amplificados | 32 |
| 5.6.4. Secuenciación directa del gen MEN1 | 32 |
| 5.6.5. Purificación de los productos de la reacción de secuencia | 33 |
| 5.6.6. Análisis de los productos de la reacción de secuencia mediante electroforesis capilar | 33 |
| 5.6.7. Búsqueda de deleciones mediante Amplificación Múltiple de Sondas dependiente de Ligación (MLPA) | 33 |
| 5.7. Análisis estadístico | 35 |
| 6. RESULTADOS | 36 |
| 6.1. Descripción de la muestra..... | 36 |
| 6.1.1. Características Demográficas | 36 |
| 6.1.2. Características Clínicas | 37 |
| 6.2. Descripción de las mutaciones encontradas | 40 |
| 6.3. Comparación de las características demográficas y clínicas entre pacientes con y sin mutación en el gen <i>NEM1</i> | 43 |
| 7. DISCUSIÓN | 46 |
| 8. CONCLUSIONES | 52 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA | 53 |
| 10. ÍNDICE DE FIGURAS | 62 |
| 11. ÍNDICE DE TABLAS | 63 |
| 12. ANEXOS | 64 |

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes históricos.

En 1903 Jacob Erdheim, distinguido patólogo austríaco, fue quien por primera vez describió la autopsia de un hombre con acromegalia, presencia de tumor hipofisario y adenomatosis paratiroidea [Erdheim, 1903.]. En años posteriores se han descrito varios casos de presentación conjunta de adenomas o hiperplasias de glándula pituitaria, glándula paratiroidea y páncreas [Carney, 2005]. En 1929, Lloyd, al reportar un caso de adenoma pituitario inoperable, comentó que los cambios anatómicos de los tres tejidos endocrinos están relacionados, pero que no hay evidencia suficiente para concluirlo [Lloyd, 1929]. En 1953, un grupo de patólogos de la Clínica Mayo encabezado por Laurentius Underdahl reportaron una serie de 8 casos describiendo el síndrome de adenomas múltiples: pituitaria, paratiroidea y de islotes pancreáticos [Underdahl et al., 1953]. A pesar de que 5 de sus pacientes tenían historia familiar de al menos un caso relacionado, los investigadores no indicaron un posible origen genético de la enfermedad. Un año después, Paul Wermer, médico cirujano del Hospital Presbiteriano de Nueva York, reporta una familia de dos generaciones con adenomas endocrinos múltiples, afirmó que la afección de las tres glándulas endocrinas es de un mismo origen patogénico, y propuso el origen genético de adenomatosis endocrina múltiple con un modo de herencia autosómica dominante [Wermer, 1954]. En 1964, en un debate sobre el origen de los tumores pancreáticos, Wermer afirmó: “*Tenemos todas las razones para pensar que la causa del síndrome es la acción de un gen mutado que es dominante, acarreado por un autosoma y que es de alta penetrancia*” [Wermer, 1963; JAMA Medical News, 1964]. Debido a las aportaciones realizadas por el catedrático neoyorquino, el síndrome fue conocido por el epónimo de *Síndrome de Wermer*, con la descripción de la triada clásica de las P: tumores **p**aratiroideos, **p**ituitarios y **p**ancreáticos [revisado en Falchetti, 2017]. Posteriormente se propuso un nuevo nombre que se ha usado desde entonces: Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 1 (NEM1) [Steiner et al., 1968].

En 1988 en la revista *Nature*, Catharina Larsson del Departamento de Genética Clínica del Hospital Karolinska, reportó la localización de la región génica ligada a NEM1 ubicándola en el brazo largo del cromosoma 11 al lado del gen *PYGM* [Larsson et al., 1988]. Posteriormente, Camilla Byström junto con Catharina Larsson y col.(1990)

franquearon la región en el brazo largo del cromosoma 11 en la banda 13, donde se ubica el gen *MEN1* confirmando la asociación del mismo con NEM1. El gen *MEN1* fue identificado por primera vez en 1997 por Chandrasekharappa y colaboradores (1997).

1.2. Definición.

NEM1 es una enfermedad genética, autosómica dominante, causada por mutaciones en el gen supresor de tumores *MEN1*. Caracterizada por la presencia de tumores de glándula paratiroides, tracto gastrointestinal e hipófisis anterior, además de tumores no neuroendocrinos, más de 20 combinaciones de tumores se reportan en esta entidad [Turner et al., 2002; Frost et al., 2018].

1.3. Epidemiología.

En estudios postmortem la incidencia de NEM1 se estima de 0.25%, en pacientes con hiperparatiroidismo primario de 1 al 18%, en pacientes con gastrinomas del 16 al 38% y en pacientes con tumores hipofisarios hasta un 3%. [Thakker et al., 2012]. Se presenta en casi todas las edades con un rango de 5 a 81 años. [Thakker et al., 2012; Vannucci et al., 2018]. La penetrancia de las manifestaciones clínicas oscila entre el 80 al 98% de los pacientes con NEM1 a la edad de 50 años. Hasta un 90% de los casos presentan historia familiar y del 8 al 14% son esporádicos, de éstos aproximadamente el 10% tienen mutaciones *de novo* en el gen *MEN1* [Thakker et al., 2012].

1.4. Gen *MEN1*, menina, funciones y vías de regulación.

1.4.1. Características generales del gen *MEN1*.

El gen *MEN1* es un gen supresor de tumores, se localiza en el brazo largo del cromosoma 11 (Figura 1), en la región q13.; tiene 10 exones [Turner et al., 2002], abarca 9 kb [Owens et al., 2008] y codifica para una proteína llamada menina la cual tiene dos isoformas. Una que abarca un fragmento de 1830 pb que codifica para una proteína de 610

aminoácidos y la otra de 1845 pb que codifica para una proteína de 615 aminoácidos, siendo la primera la más común [Falchetti, 2017].

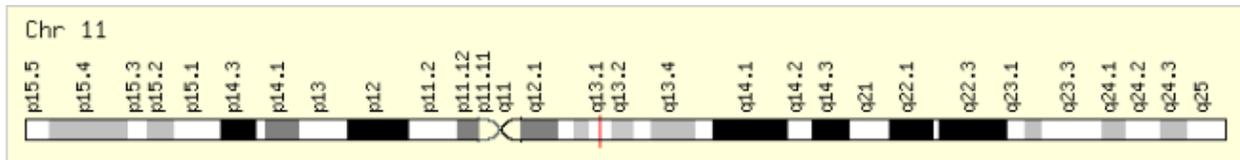


Figura 1. Estructura del cromosoma 11 y localización del gen *MEN1*. [Modificada de Genecards.]

1.4.2. Características de la proteína menina, localización, expresión y funciones.

La proteína menina presenta tres señales de localización nuclear (SLN) cerca del extremo carboxilo. El extremo carboxilo terminal se encuentra codificado por secuencias que son esenciales para la regulación de la expresión génica y que se superponen con las SLN [La, 2007].

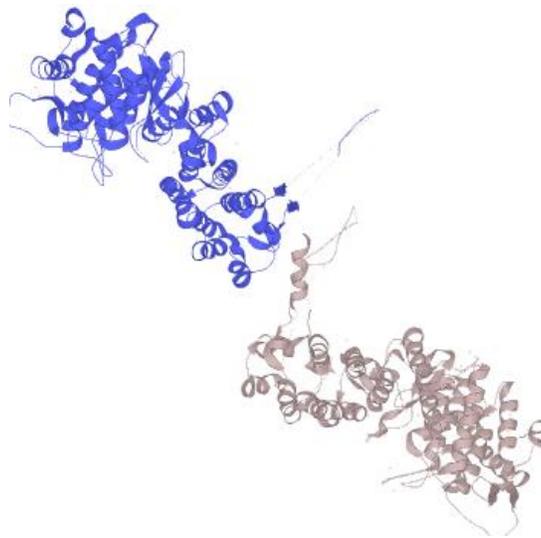


Figura 2. Estructura cristalográfica de la proteína **menina**. Isoforma 1. UniProtKB-o00255 [modificada de MEN1_HUMAN].

Menina no muestra similitud con ninguna otra proteína humana conocida, se expresa en todos los tejidos (Figura 3) y participa en la regulación del ciclo celular, regulación de la transcripción, reparación del ADN y apoptosis [Vijayaraghavan *et al.*, 2014]. Se localiza principalmente en el núcleo, interactúa con una variedad de factores de transcripción y proteínas modificadores de la cromatina, como AP1 factor de transcripción JunD; proteínas NF κ B p50, p52 y p65; proteínas Pem que contienen homeobox, TGF β proteína inducible de

Smad3, BMP-2 proteína inducible de Smad1, Smad5 y Runx2, co-rrepressor mSin3A; y del complejo de proteínas COMPASS-like MLL1/MLL2 [Agarwal *et al.*, 2007]. Estas interacciones de menina con proteínas reguladoras transcripcionales pueden producir una supresión o efecto potenciador sobre la expresión génica, por lo tanto la regulación transcripcional parece ser una actividad fisiológica de menina.

1.4.3. Interacción de menina con otros genes.

Argarwal y colaboradores (2007) estudiaron las interacciones del gen menina con otros genes, ya que la menina no posee un dominio de unión al ADN, se cree interactúa con el ADN a través de otros blancos, dentro de las categorías de genes los más sobresalientes fueron 51% los asociados al metabolismo celular, 33% al metabolismo de macromoléculas y 7% a los asociados al ciclo celular. En la tabla 1, se muestran los principales genes que interactúan con *MEN1* ya sea como regular o diana y en la figura 3 se observan los niveles de expresión del gen tejido específico.

Tabla. 1. **Genes que interactúan con *MEN1*.**

| GEN | |
|-----------------|--|
| <i>APP</i> | PROTEÍNA PRECURSORA AMILOIDE. |
| <i>DDR2</i> | RECEPTOR 2 QUE CONTIENE EL DOMINIO DISCONTINA. |
| <i>DSCR1L1</i> | REGIÓN CRÍTICA DE SÍNDROME DOWN LIKE-1. |
| <i>Hoxa10</i> | HOMEBOX A10. |
| <i>PRDX4</i> | PEROXIREDOXIN 4. |
| <i>SEC23A</i> | HOMOLOGO A DE Sec23 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>). |
| <i>SERPINH1</i> | INHIBIDOR DE LA SERINA (O CISTEÍNA) PROTEINASA, CLADO H (PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 47), MIEMBRO 1, (PROTEÍNA DE UNIÓN AL COLÁGENO 1). |
| <i>SKI</i> | V-Ski, ONCOGEN HOMOLOGO DEL SARCOMA VIRAL (<i>Aviar</i>). |
| <i>ST5</i> | SUPRESIÓN DE TUMORIGENICIDAD 5. |
| <i>TRAP1</i> | PROTEÍNA ASOCIADA AL RECEPTOR DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- TIPO 1. |

Los genes descritos en la tabla anterior corresponden a factores de transcripción, segundos mensajeros, homeobox ó supresores de tumores; involucrados en distintas vías del ciclo celular [Imagen modificada de Agarwal *et al.*, 2007].

1.4.4. Participación en la regulación del ciclo celular.

La menina regula directamente la expresión de los genes inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas (CDK), *CDKN1B* que codifica para p27 y *CDKN2C* que codifica para p18 y posiblemente otros inhibidores de CDK sobre todo a nivel de células endocrinas [Karnik *et al.*, 2005]. Estos autores determinaron que la menina se une *in vivo* a regiones específicas de promotores proximales de p27 y p18 en células endocrinas pancreáticas, observando que la pérdida simultánea de la función de p27 y p18 en ratones conduce a un espectro de tumores similares al observado en pacientes con NEM1. Además, se ha sugerido que las cinasas inhibidoras de CDKs sirven como reguladores esenciales de crecimiento en tejidos neuroendocrinos [Milne *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006].

1.4.5. Participación en procesos de daño y reparación del ADN.

Menina desempeña funciones específicas del tejido a nivel de la replicación y reparación del ADN, inhibiendo la transcripción mediada por JunD, se ha visto que en linfocitos de individuos con variantes patogénicas en estado heterocigoto, muestran división prematura del centrómero e hipersensibilidad a los agentes alquilantes. Lo que sugiere que podría ser un regulador negativo de la proliferación celular después del daño al ADN [Giusti *et al.*, 2005].

1.4.6. Participación en la regulación de la metilación.

El mecanismo de acción de menina es a través de la unión a los factores de remodelación de cromatina, incluyendo metiltransferasas de histonas y desacetilasas de histona. Específicamente, menina interactúa con el complejo de metiltransferasa de histonas que contiene la proteína de leucemia de linaje mixto (MLL) y promueve la trimetilación de la histona H3 de lisina 4 (H3K4) en los *loci* de los genes *HOXA9*, *CDKN2C* y *CDKN1B* [La *et al.*, 2007]. Por lo tanto, puede regular la expresión génica al influir en la estructura de la cromatina, incluyendo modificación de histonas. Menina forma un complejo con MLL2 y regula su actividad metiltransferasa. MLL y MLL2 asociados a menina se unen a elementos cis-reguladores próximos del promotor para mantener la expresión de genes diana como p27 y p18 [Ringrose y Paro, 2004; Milne *et al.*, 2005]. Karnik y cols (2005) observaron que la menina podría funcionar como un coactivador transcripcional en

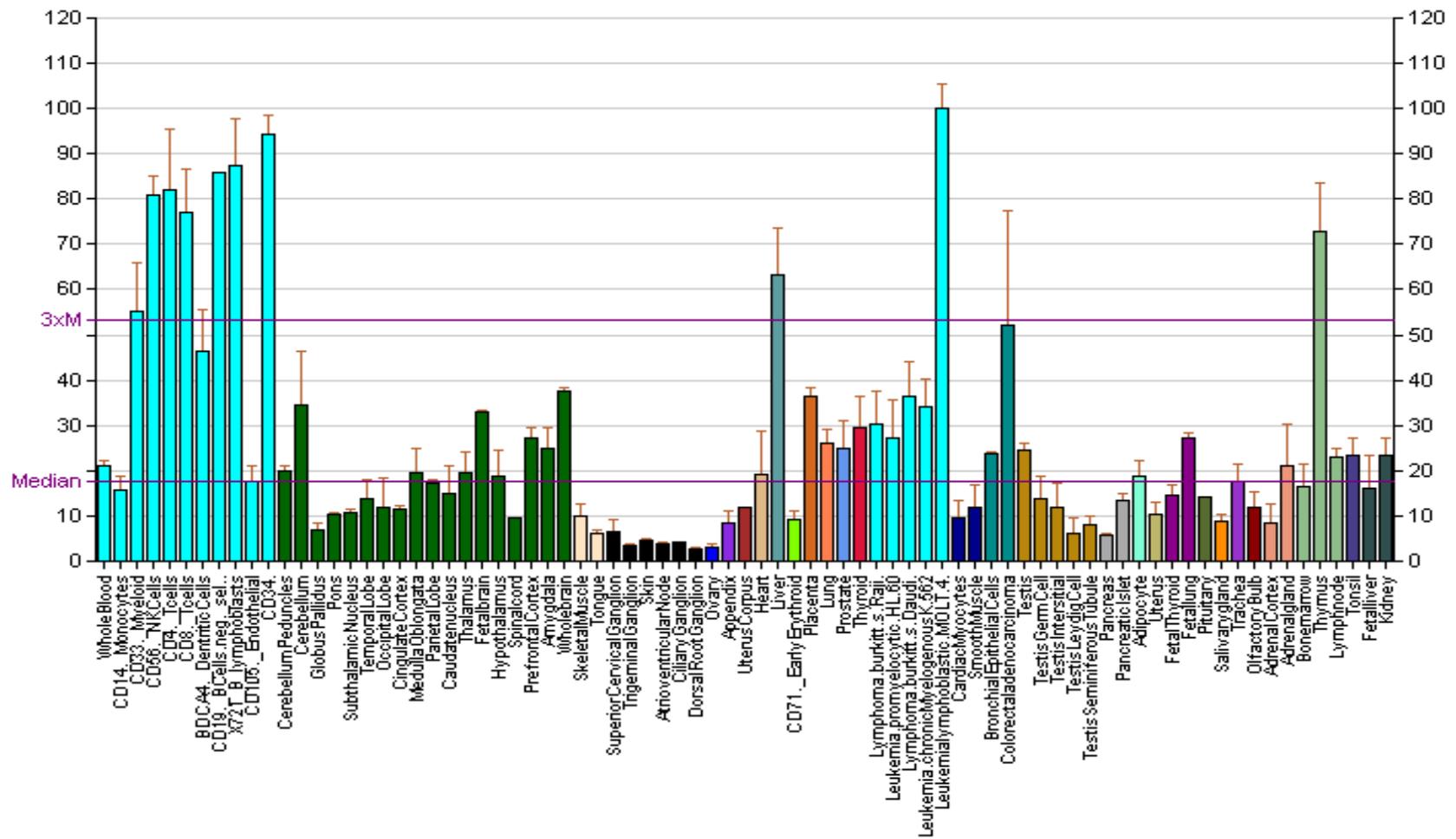


Figura 3. **Patrones de expresión génica de menina.** Se muestra los niveles de expresión del gen *MEN1* a nivel tejido específico, los niveles de expresión más altos representados en color azul aqua.

promotores específicos de p27 y p18 demostrando la asociación de menina con la transcripción de activadores y represores.

La menina podría regular otras modificaciones que controlan la expresión de genes neuroendocrinos, se sugiere que la metilación de la H3K4 antagoniza la metilación de CpG, se cree un medio importante para reprimir la actividad de promotores. La H3K4 interrumpe la unión de la remodelación nucleosomal y desacetilación [Nishioka *et al.*, 2002; Zegerman *et al.*, 2002; Sánchez-Aguilera *et al.*, 2004].

1.4.7. Participación en la regulación de apoptosis mediada por Caspasa 8.

La caspasa 8 es un componente crucial de la vía de apoptosis inducida por ligandos de muerte celular. La disrupción dirigida en ratones de caspasa 8, conducen a defectos en la apoptosis de linfocitos y letalidad embrionaria [Varfolomeev, 1998; Chen 2006; Schnepf, 2008]. Debido a que la caspasa 8 se encuentra disminuida en algunos tipos de tumores, puede jugar un papel en la supresión de la tumorigénesis potenciando la apoptosis inducida por receptores/ligandos de muerte [La, 2007]. La expresión de caspasa 8 es silenciada debido a la hipermetilación del ADN en el locus del neuroblastoma [Teitz, 2001; Takita, 2002] que conduce a resistencia de las células tumorales a la apoptosis inducida por ligandos de muerte.

La expresión de caspasa 8 dependiente de menina es relevante para la tumorigénesis en el síndrome de MEN1. Menina regula la expresión de caspasa 8 y promueve la apoptosis inducida por TNF- α . Las mutaciones de *MEN1* hacen que menina pierda su capacidad de unirse al locus de la caspasa 8 y no pueda inducir la expresión de la misma y en consecuencia la apoptosis mediada por TNF- α . Estos hallazgos sugieren que menina suprime la tumorigénesis, al menos en cierta parte, a través de una pre-regulación sobre la expresión de caspasa 8 [La *et al.*, 2007].

1.4.8. Participación en el control de tumorigénesis

La menina inhibe la tumorigénesis a través de tres mecanismos principales:

- 1) Interacción directa con varios factores de transcripción (ejemplo: JunD, NF- κ B, PPAR γ , VDR) induce o reprime la transcripción génica.
- 2) Interacción con enzimas modificadoras de histonas (MLL, HDACs y EZH2).

- 3) Interactúa directamente con promotores de genes y actúa como un factor de transcripción de sí mismo. La figura 4 muestra un esquema de los principales mecanismos de control para la tumorigenesis.

Los tumores en NEM1 tienen una mutación somática y una mutación germinal, consistente con la hipótesis del doble Hit de Knudson, debido al rol de gen supresor de tumores en la oncogénesis. [Falchetti, 2017; Frost et al., 2018].

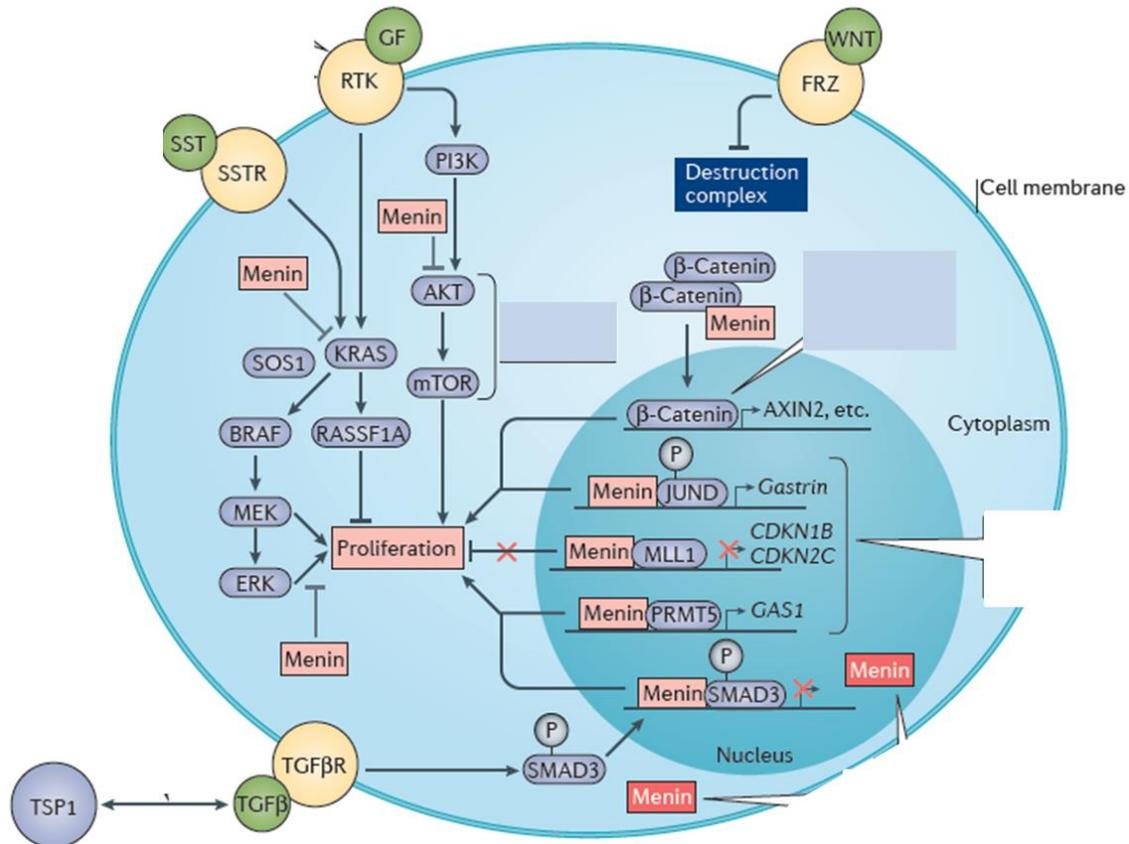


Figura 4. **Vía de acción de menina en los mecanismos de tumorigenesis.** Se muestra las principales vía de interacción para el desarrollo de la tumorigenesis, podemos observar la activación o inhibición de vías como KRAS, AKT y β-Catenina involucradas en la proliferación celular, activación de factores de transcripción: JunD, interacción con proteínas activadoras de histonas MLL y diversos genes: *PRMT5* y *SMAD3*. [Imagen modificada de Frost, et al., 2018].

1.4.9. Regulación de la expresión de menina por miRNAs

Los microRNAs (MiRNAs) una clase evolutivamente conservada de reguladores postranscripcionales, son pequeñas secuencias de ARN de 22 nucleótidos que regulan la expresión del ARN mensajero (ARNm), tiene como blanco la región 3'-UTR, inhibiendo la

traducción y/o la degradación del ARNm, evidencia reciente sugiere que regulan procesos biológicos en los islotes pancreáticos [Vijayaraghavan et al., 2014].

El miR-24 es un MiRNA que regula la producción de insulina al tener como blanco a los represores de la transcripción de insulina Sox6 y Bhlhe22. La interacción de miR-24 y ARNm de MEN1 se ha descrito, Luiz y col encontraron una correlación inversa entre la menina y la expresión de miR-24 en los tejidos de adenomas paratiroides en MEN1 [Luiz y Brandi, 2011]. Vijayaraghavan y col (2014) describieron que miR-24 disminuye los niveles de menina expresados en los islotes pancreáticos, afectando la producción de los inhibidores del ciclo celular p27 y p18, sugiriendo que miR-24 regula los niveles de menina y procesos de proliferación. Un análisis de CHIP demostró asociación directa entre menina y el promotor de miR-24 [Luiz y Brandi, 2011]. Diversos estudios han demostrado evidencia de un ciclo de retroalimentación negativa entre miR-24 y menina que imita la hipótesis de Knudson, proporcionando una explicación específica para la tumorigénesis para NEM1 [Luiz y Brand, 2011; Vijayaraghavan et al., 2014].

Ouyang y col (2015) informaron que el ARNm de Men1 está dirigido y regulado negativamente por miR-29b, demostraron que este miR reprime la traducción del ARNm de Men1 a proteína menina, afectando la homeostasis del epitelio intestinal reduciendo la apoptosis en estas células.

1.4.10. Mutaciones en el gen *MEN1*.

Más del 90% de los pacientes con NEM1 presentan mutaciones germinales en *MEN1* [Frost et al., 2018]. Más de 1000 mutaciones diferentes en línea germinal se han descrito a lo largo de la región codificante y sitios de *splicing* del gen *MEN1*. No se han descrito regiones *hot-spot*, y tampoco correlaciones entre las mutaciones y las características fenotípicas específicas en pacientes y familias [Falchetti, 2017].

Se estima que el mayor número de mutaciones son deleciones o inserciones frameshift 40%, seguida del 21% de mutaciones nonsense, 19 %, 9% deleciones o inserciones in-frame, 7% de mutaciones en el sitio de *splicing* [Turner et al., 2002], del 1 al 4% son grandes deleciones detectadas por análisis de Southern Blot u otro procedimiento de dosis génica. Variantes polimórficas se han descrito de igual manera [Falchetti, 2017]. Recientemente se han reportado mutaciones intrónicas que afectan el sitio de *splicing* y podrían estar involucradas en el la etiología de hasta un 10% de casos de NEM1 en los que

no se detectaron mutaciones en las regiones codificantes [*Lemos et al., 2007; Raghavan et al., 2007*].

Más del 80% de los NEM1 familiar tiene una mutación única. Aun que se ha observado que 5 mutaciones que representan el 17 %de todas las mutaciones germinales consisten en deleciones, inserciones o mutaciones missensen, involucran los codones 83-84, 118-119, 209-211, 4180 y 516. [*Turner et al., 2002*].

Del 5 al 10% de los pacientes de NEM1 pueden presentar mutaciones en otros genes involucrados en la misma vía molecular de la proteína menina, entre ellos tenemos el gen *AIP* y cuatro genes inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas: *CDK1A* (p15), *CDKN2C* (p18), *CDKN2B* (p21) y *CDKN1B* (p27). [*Falchetti, 2017*]. De estos genes el gen *CDKN1B* es donde se han descrito más mutaciones patogénicas, Cusan y Cols (2018) describen 15 mutaciones en este gen causantes de NEM 1.

1.5. Características clínicas de NEM1.

1.5.1. Criterios diagnósticos.

- La presencia de dos de tres tumores asociados al espectro NEM1.
- La presencia de HPTPA y un tumor del espectro asociado.
- La presencia de una variante patogénica en estado heterocigoto del gen *MEN1*.

La figura 5 muestra las principales características clínicas asociadas a NEM1.

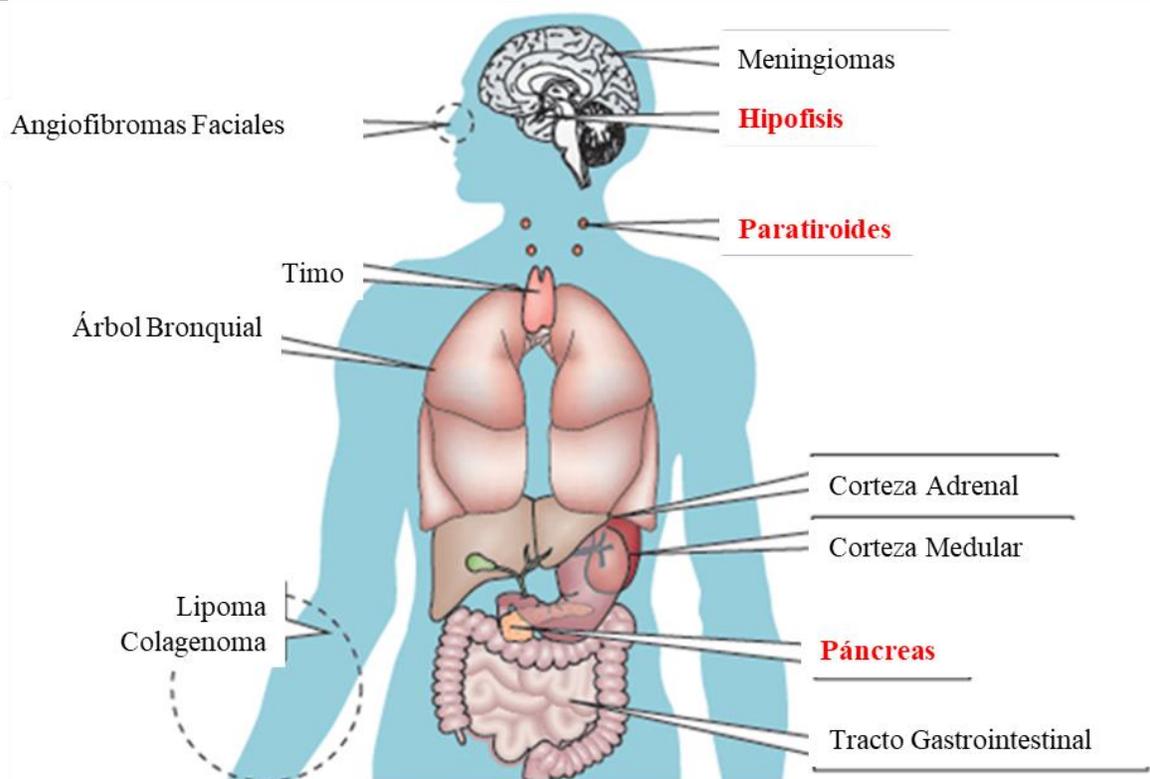


Figura 5. **Sitios de presentación de manifestaciones clínicas en el espectro de NEM1.** Las características clínicas de la triada clásica están señaladas con línea verde. Los tumores asociados a NEM1 se presentan en varias partes del cuerpo, por frecuencia >90% de los pacientes hacen HPTPA, del 60-80% hacen tumores del TGE, del 40-60% hacen AH, del 10-15% tienen tumores carcinoides (en timo, bronquios, duodeno), del 20-40% presentan tumores de la corteza suprarrenal, además en raras ocasiones pueden estar involucrados la piel y SNC. [Modificado de *Frost et al., 2018*].

1.5.2. Hiperparatiroidismo primario

El HPTPA es causa de tumores paratiroides, es la manifestación más frecuente [Thakker *et al.*, 2012], se presenta en el 100% de los pacientes a la edad de 50 años [Frost *et al.*, 2018]. Tiene una edad de presentación típica entre los 20 y 25 años, la principal manifestación clínica es la hipercalcemia, sin embargo, los pacientes suelen cursar un largo tiempo asintomático.

Las manifestaciones clínicas de hipercalcemia son:

- Sistema nervioso central: alteraciones del estatus mental, incluyendo letargia, depresión, confusión (raro observar obnubilación y coma).
- Gastrointestinales: anorexia, constipación, náuseas y vomito.
- Renales: disuria, deshidratación, hipercalciuria y cálculos renales.
- Esqueléticas: incremento de la reabsorción ósea con incremento del riesgo de fracturas.
- Cardiovasculares: causa o exacerbación de la hipertensión, acortamiento del intervalo QT.

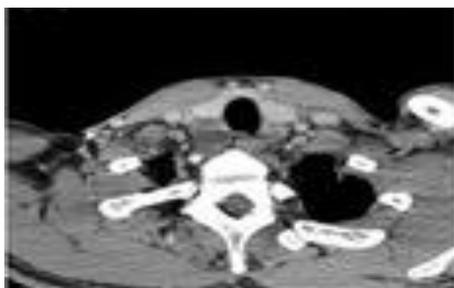


Figura 6. **Imagen por resonancia magnética de la glándula paratiroidea con adenoma.** Corte transversal, izquierda. Corte longitudinal, derecha. Las flechas en rojo están señalando el adenoma paratiroideo. [Tomado de Kim, 2017].

La hipercalcemia incrementa la secreción de gastrina en gastrinomas, precipitando o exacerbando los síntomas del síndrome Zollinger-Ellison [Norton *et al.*, 2008].

A nivel patológico es común la enfermedad paratiroidea multiglandular con agrandamiento de las paratiroides, en lugar de adenomas únicos; los adenomas se consideran tumores esporádicos de origen clonal [Marx, 2001]. Mutaciones somáticas en

MEN1 son responsables hasta del 20% de tumores aislados de paratiroides. El riesgo de carcinoma paratiroideo es raro [*del Pozo et al., 2011*].

1.5.3. Hipófisis Anterior

Los tumores hipofisarios se presentan con una frecuencia aproximada del 40% de los pacientes suelen ser adenomas. Son la primera manifestación de la enfermedad hasta en un 25% de los casos aislados y 10% de los familiares [*Vergès et al., 2002*].

Aproximadamente un 90% son secretores de prolactina, hormona de crecimiento (HC) o hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y el 10 % restante no son funcionales [*Frost et al., 2018*], del 65 a 85% suelen ser macroadenomas [*Brandi et al., 2001; Vergès et al., 2002*]. Se reporta una mayor frecuencia en mujeres 50% contra un 31% en hombres [*Thakker et al., 2012*]. Es raro observar más de un adenoma simultáneo en un solo individuo [*Al Brahim et al., 2007*], sin embargo, la presencia de múltiples adenomas es significativamente más frecuente [*Trouillas et al., 2008*].

Las manifestaciones clínicas de dependiendo las hormonas hipofisarias.

- Prolactina: galactorrea y amenorrea en mujeres; disminución del libido e impotencia.
- ACTH: hipercortisolismo, se ha descrito en niños en edades de 11 a 13 años la presencia de Enfermedad de Cushing [*Matsuzaki et al., 2004*].
- HC: gigantismo y acromegalia [*Stratakis et al., 2002*].
- Hormona folículo estimulante: reducción de libido y disfunción eréctil en hombres [*Ształ-Mazer et al., 2008*].
- Efectos de compresión: cefalea, compresión de nervios o hipopituitarismo [*Thakker et al., 2012*].

En cuanto al riesgo de progresión a cáncer, se ha reportado que tanto un aumento en la invasión, como la degeneración a malignidad, no son frecuentes [*Vergès et al., 2002*]. Solo existen reportes ocasionales de casos [*Benito et al., 2005; Gordon et al., 2007; Thakker et al., 2012*].

Mutaciones somáticas en *MEN1* son responsables hasta del 4% de tumores aislados de hipófisis anterior.

1.5.4. Tumores del Tracto Gastro-Entero-Pancreático.

Tumores neuroendocrinos de páncreas (TNEP). Los tumores neuroendocrinos de páncreas (TNEPs) tiene una incidencia de 0.48% por 100,000 personas en Estado Unidos de América, usualmente son esporádicos. Mutaciones somáticas en *MEN1* son responsables hasta del 40% de TNEPs aislados. Como componente de síndrome hereditario, se encuentra asociado a NEM1 con una prevalencia del 30-80% de los casos, en la enfermedad de von Hippel-Lindau con aproximadamente un 15%, en Neurofibromatosis tipo 1 menos del 10% y en el Complejo de Esclerosis Tuberosa menos del 1%. [Frost et al., 2018].

Existen dos formas de TNEPs descritos en NEM1:

- Los TNEPs secretores de hormonas polipeptídicas.
- Los TNEP no secretores.

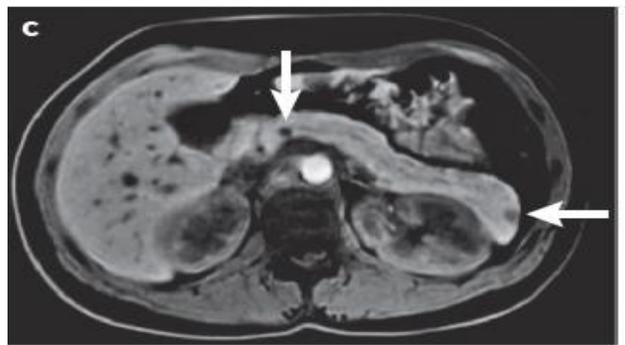


Figura 7. **Corte transversal de Resonancia magnética de múltiples TNEP.** Las flechas blancas señalan un TNEP en un paciente con NEM1 [modificada de Frost et al.].

TNEPs 60% secretan hormonas polipeptídicas como gastrina, insulina, glucagón y péptido intestinal vaso activo (VIP). Los tumores no secretores (TNS), caracterizados por la ausencia de producción o liberación de péptidos neuroendocrinos [Giudici et al., 2017] son el 40% restante de los TNEPs [Frost et al., 2018].

La penetrancia de los TNEPs en NEM1 es alta alcanzando el 80-90% a los 60 años de edad, de manera similar al HPTP [Giudici et al. 2017].

Entre las múltiples manifestaciones tenesmos: múltiples úlceras gástricas y duodenales, hipoglucemia con convulsiones, intolerancia a la glucosa y síndrome de diarrea acuosa con alcalosis hipopotasémica [Giudici et al. 2017].

Gastrinoma: se manifiesta como síndrome de Zollinger-Ellison con hipersecreción de gastrina. La microadenomatosis de páncreas suele estar relacionada esta se caracteriza por macrotumores (gastrinomas) con diámetro mayor de 1 cm y es distintiva de pacientes NEM1 [Giudici *et al.*, 2017]. Los gastrinomas pequeños <1% suelen localizarse en duodeno, el 80% dentro de la 1ra y 2da porción de duodeno [Hoffmann *et al.*; 2005], se asocian a cambios hiperplásicos difusos de las células de gastrina, siendo microtumores multifocales [Anlauf *et al.*; 2006]. Los gastrinomas son múltiples y de carácter maligno, hasta un 50% presentan metástasis al diagnóstico [Brandi *et al.* 2001; Anlauf *et al.*, 2006]. A nivel pancreático son más agresivos y con mayor riesgo de metástasis [Tonelli *et al.*, 2005].

Insulinoma: son originados por múltiples microadenomas de los islotes pancreáticos [Brandi *et al.*, 2001], aparecen una década antes que la presentación esporádica, con 1 y 4 cm de diámetro, de carácter benignos.

Glucagonoma: son raros, el tamaño suele ser mayor del 3%, frecuentemente hacen metástasis visceral, el 80% son malignos y se diseminan a hígado [Castro *et al.*, 2011].

VIPoma: de carácter maligno con un tamaño mayor de 3% suelen tener metástasis al diagnóstico. Hasta un 17% de pacientes con NEM1 desarrollan VIPomas en algún momento de la enfermedad [Yeung y Tung, 2014].

Los **TNEP no secretores:** tiene una frecuencia entre el 40 a 59.9 por dependiendo de la cohorte, con una penetrancia de 34% a los 50 años y el más común es el tumor pancreaticoduodenal [Thomas-Marques *et al.*, 2006].

La malignidad en los tumores del TGEP es variable, depende de factores como el tamaño y el tipo histológico. Las lesiones mayores de 2 cm de diámetro tienden a malignizar independientemente del tipo histológico. Los insulinomas malignizan en un 12-20%, los TNEP y gastrinomas hasta en un 70% [Giudici *et al.*, 2017].

Francesco Giudici y col. (2017), describieron en una cohorte de 77 pacientes italianos con NEM1 que mutaciones en el exón 8 se asociaban con mayor progresión y mortalidad en pacientes con NEM1.

1.5.5. Tumores carcinoides

Menos del 5% de los pacientes con NEM1 desarrollan tumores carcinoides, estos pueden ser timo, bronquios y células enterocromafines gástricas [Frost *et al.*, 2018], de carácter multifocal, se presentan a edades tardías mayor de 50 años. Los carcinoides de timo suelen ser más prevalentes en hombres en comparación con los bronquiales en mujeres [Thakker *et al.*, 2012]. El curso clínico es indolente, suelen ser más agresivos y resistentes a terapia. Rara vez secretan sustancias como ACTH, calcitonina, HC, serotonina o histamina y manifiestan síndrome carcinoide [Boix *et al.*, 2002].

Francesco Giudici y col. (2017) mostraron que en su cohorte no hubo riesgo aumentado de mortalidad en tumores carcinoides, sin embargo, Ferolla y col. (2005) determinaron que los carcinoides de timo eran más agresivos sobre todo en hombres fumadores.

1.5.6. Glándula suprarrenal.

Se describen con una frecuencia variable que oscila del 20 al 73%, estos tumores incluyen adenomas corticales, hiperplasia, adenomas múltiples, hiperplasia nodular, quistes o carcinomas [Thakker *et al.*, 2012]. De los tumores de la glándula suprarrenal 10% presentan hipersecreción de glucocorticoides o mineralocorticoides y el 90% son adenomas no son funcionales [Frost *et al.*, 2018].

Francesco Giudici y colaboradores (2017) mostraron que en su cohorte no hubo riesgo aumentado de mortalidad en tumores de glándulas suprarrenales.

Menos del 2% de tumores de glándula suprarrenal aislados son causados por mutación somática en *MEN1*.

1.5.7. Otros tumores no neuroendocrinos.

- **Piel:** se presentan hasta en el 85% de los pacientes [Thakker *et al.*, 2012], estos suelen ser angiofibromas faciales, tumores benignos de vasos sanguíneos y tejido conectivo, colagenomas (70%), lipomas (30%), manchas café con leche (38%), manchas hipopigmentadas de tipo confeti (6%) y múltiples pápulas gingivales (6%) [Darling 1997; Thakker *et al.*, 2012].

- **Sistema Nervioso Central:** es raro, pero se ha informado presencia de meningioma hasta en un 8% y el ependimoma 1% [Asgharian *et al.*, 2004].

- **Leiomiomas:** son una entidad común en las mujeres en edad reproductiva hasta un 30% llegan a presentar, se desconoce la incidencia en pacientes con NEM1 comparado con el de la población general [McKeeby, 2001].

- **Tumores de tiroides:** se manifiestan en más del 25% de los pacientes, pueden ser adenomas, bocios coloides y carcinomas [Thakker *et al.*, 2012].

- **Mama:** en pacientes femeninos con NEM1 se ha visto un incremento en la ocurrencia de cáncer de mama [Frost *et al.*, 2018].

También se pueden encontrar de manera adicional los lipomas, angiofibromas faciales, colagenomas y meningiomas [Thakker *et al.*, 2012].

Los tumores neuroendocrinos en NEM1 ocurren con una variedad de combinaciones en cada individuo. A continuación se presentan los diversos tipos (tabla2):

Tabla 2. **Tumores del espectro NEM1.**

| GLÁNDULA | TIPO DE TUMOR | PREVALENCIA | |
|---------------------|--------------------|--------------------------|------|
| PARATIROIDES | NE | HPTPA 100% A LOS 50 AÑOS | |
| HIPÓFISIS ANTERIOR | PROLACTINOMA | 60% | |
| | SECRECIÓN HC | 25% | |
| | SECRECIÓN HC/PRL | 30-40% LOS TUMORES DE | |
| | SECRECIÓN TSH | HIPOFISIS | RARO |
| | SECRECIÓN ACTH | | <5% |
| | NO SECRETORES | | <5% |
| GASTRO-PANCREÁTICOS | GASTRINOMA | 40% | |
| | INSULINOMA | 10% | |
| | GLUCAGONOMA | <1% | |
| | VIOMA | <1% | |
| | NO SECRETORES | 20-55% | |
| CARCINOIDES | BRONCOPULMONAR | 2% | |
| | TIMO | 2% | |
| | GASTRICO | 10% | |
| ADRENOCORTICAL | SECRECIÓN CORTISOL | 40% | |
| | SECRECIÓN | | |
| | FEOCROMOCITOMA | <1% | |

NE: no específico. HC: hormona de crecimiento. PRL: prolactina, TSH: hormona estimulante de tiroides. ACTH: hormona adrenocorticotrófica. HPTP: hiperparatiroidismo primario aislado.

1.6. Diagnóstico molecular de NEM1.

1.6.1. Confirmación del diagnóstico clínico en pacientes.

La técnica de secuenciación detecta de un 80 a 90% de mutaciones puntuales o pequeñas deleciones/inserciones en pacientes con antecedentes familiares y hasta un 65% en casos aislados, de un 1 a 3% de pacientes tendrán mutaciones de grandes deleciones las cuales se pueden detectar por análisis de dosis génica por técnica de *Southern Blot* o Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA) [Falchetti, 2017].

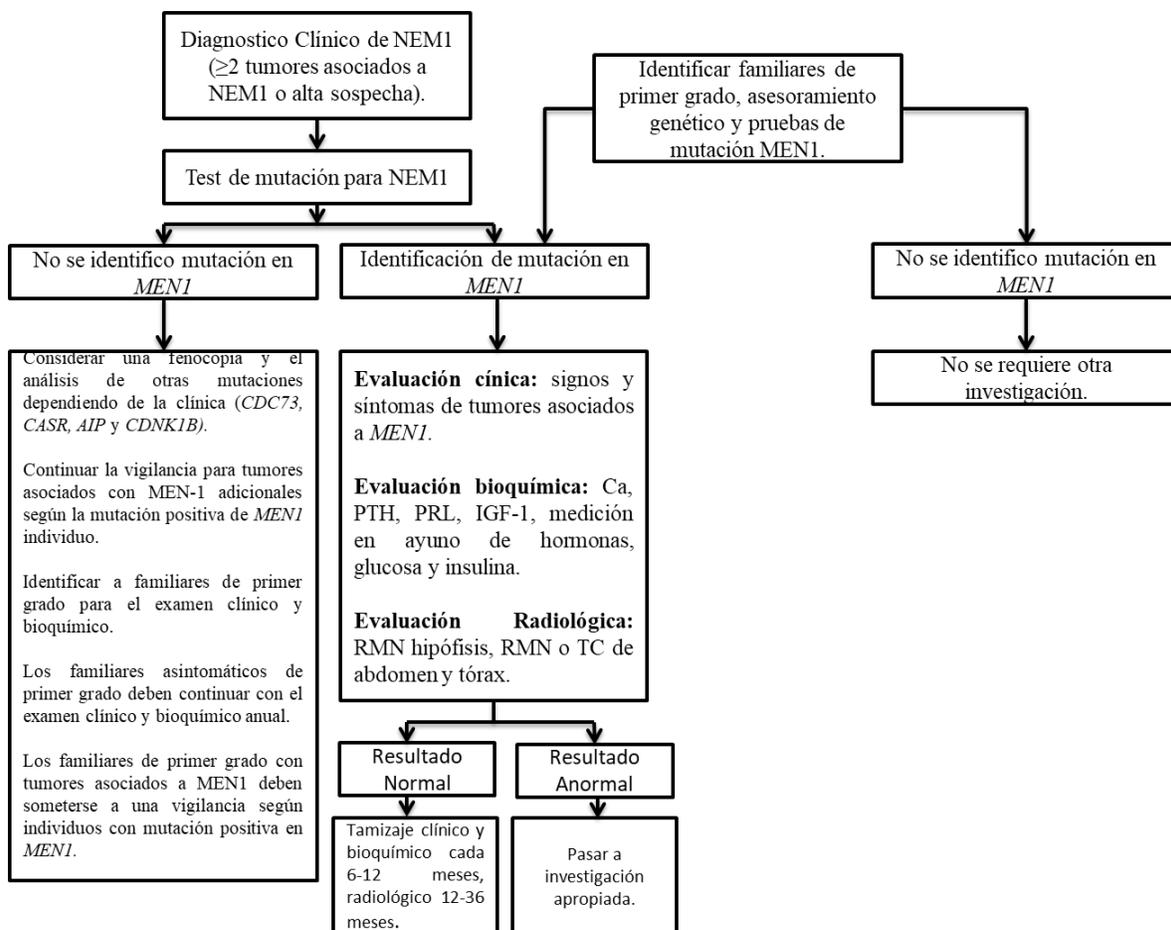


Figura 8. Algoritmo de diagnóstico molecular y seguimiento de casos de NEM1 [modificado de Thakker et al., 2012].

1.6.2. Análisis genético en los familiares.

El test de mutación germinal se debe ofrecer a los familiares de primer grado de los pacientes con NEM1, incluyendo asintomáticos o con manifestaciones clínicas; esta se debe ofrecer a partir de edad de 5 años. Se debe realizar test en los casos con fenotipo atípicos de NEM1. Todos los individuos a quienes se les ofreció la prueba molecular deben recibir asesoramiento genético antes de realizar la prueba. Las pruebas de mutación en línea germinal *MEN1* deben realizarse por un laboratorio de genética acreditado en análisis de mutación del gen *MEN1*. Si no se identifica mutación en la región codificadora de *MEN1* se debe realizar prueba para deleciones parciales o completas o análisis de haplotipos del locus de *MEN1* o considerar el análisis de otro gen [Thakker et al., 2012].

1.6.2.1. Riesgo para los miembros de la familia.

El 90 % de las individuos con NEM1 tienen un padre afectado, sin embargo, los antecedentes familiares pueden parecer negativos debido a no reconocer la enfermedad en los miembros de la familia, muerte prematura de los padres antes del inicio de los síntomas o aparición tardía de la enfermedad. El riesgo para los hermanos del probando depende del estado genético de los padres del afectado. [Falchetti; 2017]. Si un padre está afectado o tiene una mutación causante de enfermedad, el riesgo para los hermanos es del 50%. Si la mutación encontrada en el probando no puede ser detectada en los padres, existen dos posibles explicaciones: A) mosaicismo de línea germinal en un padre o B) una mutación *de novo*. Cada hijo del individuo con NEM1 tiene una probabilidad de 50% de heredar la mutación. El riesgo para otros miembros de la familia dependerá del estado genético de los padres del probando [Falchetti, 2017].

1.6.2.2. Riesgo para familias con mutaciones *de novo*.

Cuando ninguno de los padres de un probando con NEM1 tiene la mutación causante de enfermedad o evidencia clínica del síndrome, es probable que tenga una mutación *de novo*. Explicaciones como la paternidad o maternidad alternativa (reproducción asistida), adopción no revelada o secretos dentro de la familia podrían considerarse [Falchetti, 2017]. El riesgo para la descendencia de un probando *de novo* es del 50% de heredar la mutación causal de la enfermedad.

1.6.3. Diagnóstico molecular presintomático.

Los individuos genéticamente predispuestos a NEM1 pueden beneficiarse del diagnóstico presintomático. Los individuos en riesgo son aquellos que tienen el antecedente de un familiar en primer grado con diagnóstico de NEM1 [Falchetti, 2017].

1.6.4. Diagnóstico prenatal.

Las pruebas prenatales para síndrome de NEM1 no son comúnmente solicitadas, en parte debido a la falta de un consenso universal a realizar dicho diagnóstico [Falchetti, 2017].

1.7. Seguimiento y tratamiento de los pacientes con NEM1 confirmado

A los pacientes con mutaciones en el gen *MEN1*, se les debe ofrecer un programa de tamizaje clínico, bioquímico y radiológico.

1.7.1. Tumores paratiroides

Los estudios para la identificación de hiperparatiroidismo primario deben realizarse con seguimiento anual, medición de niveles de calcio sérico y PTH en plasma. Se recomienda paratiroidectomía subtotal o total, o paratiroidectomía total con autotransplante. [Thakker et al.; 2012].

1.7.2. TNEPs

El panel de los estudios clínicos para la búsqueda de los tumores gastropancreáticos incluye, medición anual de niveles de gastrina, glucagón, péptido intestinal vasoactivo, polipéptido pancreático, cromogranina A e insulina asociado a niveles de glucosa. Se recomienda estudio de imagen donde se incluya visualización del páncreas y duodeno anual, sea resonancia magnética, tomografía computada, ultrasonido y endoscopia.

El tratamiento quirúrgico debe ser individualizado el manejo del gastrinoma es muy controversial. Se recomienda cirugía en los casos no metastásicos.

Las terapias médicas incluyen inhibidores de la bomba de protones y análogos de somatostatina para suprimir la hiperacidez. La vigilancia periódica gastroscópica está

indicada en aquellos con hipergastrinemia para la identificación de úlcera péptica enfermedad y carcinoide gástrico.

El papel de la cirugía para los tumores pancreáticos que no funcionan es controversial se sugiere considerar la cirugía para tumores que tienen más de 1 cm de tamaño y / o demuestren crecimiento significativo durante 6-12 meses. El tratamiento de tumores no resecables incluye somatostatina análogos, bioterapia, terapia radionucleotida específica, tratamientos locorregionales y quimioterapia. La quimioterapia se puede utilizar en casos no operables o metastásicos. *Sunitinib* y *Everolimus* pueden ser considerados para pacientes con estadios avanzados (inoperable o metastásico) progresivo bien diferenciado.

1.7.3. Evaluación de glándula hipófisis anterior.

La evaluación bioquímica de los tumores de hipófisis dependerá del juicio clínico y los recursos locales; incluiría una evaluación anual de prolactina plasmática y IGF-1, acompañado de resonancia magnética de hipófisis cada 3 a 5 años. En pacientes con resultados bioquímicos anormales, se debe realizar la resonancia magnética para caracterizar aún más la naturaleza de la lesión [*Thakker et al. 2012*].

El tratamiento de los tumores pituitarios asociados a MEN1 es similar a la de los tumores pituitarios no MEN1 y consiste de terapia médica apropiada (por ejemplo, agonistas dopaminérgicos) para prolactinoma; octreotide o lanreotide para somatotropinomas) o cirugía transesfenoidal selectiva hipofisectomía, con radioterapia reservada para el residuo tejido tumoral irresecable.

1.7.4. Tumores de timo, bronquios y TNE gástricos.

Evaluación bioquímica con 5-hydroxyindoleacetic urinario ácido y cromogranina A no son útiles. Se recomienda CT o RNM cada 1-2 años para detección de tumores carcinoides tímicos y broncopulmonares. Examen gastroscópico (con biopsia) cada 3 años en aquellos con hipergastrinemia para la detección de úlcera péptica enfermedad y carcinoide gástrico tipo II se recomienda. Ultrasonido endoscópico y somatostatina la gammagrafía del receptor puede ayudar al diagnóstico [*Thakker et al., 2012*].

La cirugía curativa, cuando sea posible, es el tratamiento de elección para tumores carcinoides tímicos y bronquiales. Donde la enfermedad está avanzada y la cirugía curativa no es posible, las terapias adicionales incluyen radioterapia y quimioterapia. El tratamiento

óptimo de los carcinoides gástricos tipo II no ha sido establecido. Pueden quedar pequeñas lesiones (10 mm) bajo vigilancia endoscópica. Los tumores más grandes requieren endoscópica resección o resección local con parcial o total gastrectomía. Indicaciones para los análogos de somatostatina en el tratamiento de los carcinoides gástricos de tipo II no está definido [*Thakker et al., 2012*].

1.7.5. Tumores suprarrenales

La detección mínima debe incluir imágenes abdominales por CT o MRI cada 3 años. Lesiones suprarrenales debería permanecer bajo vigilancia radiológica y debería ser evaluado por características malignas. Las imágenes deben ser revisadas por un radiólogo con experiencia en imágenes suprarrenales.

La evaluación bioquímica de las lesiones suprarrenales debe restringirse para aquellos con características clínicas ortumormorethan1cm de tamaño y debe centrarse en la evaluación del hiperaldosteronismo primario e hipercortisolemia primaria. Tratamiento El tratamiento de los tumores suprarrenales asociados a MEN1 es similar a la de los tumores suprarrenales no MEN1. La cirugía está indicada para tumores funcionales (por ejemplo, hiperaldosteronismo primario) o hipercortisolismo) y no funciona tumores con características atípicas, tamaño mayor a 4 cm, o crecimiento significativo durante un intervalo de 6 meses [*Thakker et al., 2012*].

Actualmente la prueba de ADN que identifica a un individuo como portador de una mutación no suele conducir a tratamiento médico o quirúrgico inmediato, pero sugiere que la clínica precoz y frecuencia de detección debe llevarse a cabo. Como no se puede predecir la penetrancia del tumor y la malignidad individualmente, el seguimiento a lo largo de la vida de los portadores de NEM1 es fuertemente recomendado para prevenir la morbilidad tumoral [*Falchetti; 2017*].

1.8. Diagnósticos diferenciales.

1.8.1. Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 4.

Esta entidad se caracteriza por la presencia de adenomas de paratiroides e hipofisarios, tumores neuroendocrinos de páncreas, tumores carcinoides y angiomiolipomas renales. Mutación causal en el gen *CDKN1B*, gen supresor tumoral involucrado en la vía de ciclo celular [Georgitsi, 2008; Occhi 2013].

1.8.2. Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 2A.

Entidad caracterizada por carcinoma medular de tiroides, feocromocitoma e hiperplasia/adenoma paratiroideo. Mutación causal en el gen *RET* [Hyde, 2017].

1.8.3. Síndrome de Von Hippel Lindau.

Caracterizado por las presenmutaciones en el gen *VHL* son causales de esta entidad, se manifiesta con presencia de hemangiomas de SNC, tumores endocrinos de páncreas o quistes, feocromocitomas y tumores de ligamento ancho en mujeres o cistoadenoma de epidídimo en hombres [Maher, 2011].

1.8.4. Síndrome de Predisposición Adenomas Hipofisarios.

Se manifiesta por la presencia de múltiples adenomas hipofisarios, pueden secretar hormona de crecimiento. El gen causal es *AIP* [Rostomyan, 2017].

1.8.5. Hiperparatiroidismo Aislado Familiar.

Entidad caracterizada por presencia de Hiperparatiroidismo aislado en 2 o más miembros de una familia. Causada por mutaciones en los genes *MEN1*, *CASR* y *CDC73* [DeLellis y Mangray, 2018].

1.9. Pronóstico

Los tumores neuroendocrinos en pacientes con *NEM1* se asocian a una disminución de la supervivencia a 20 años en casi un 65% en comparación con la población general de EUA. [Frost et al., 2018].

1.10. NEM1 en la población mexicana.

Hay muy pocos datos sobre la NEM1 en la población mexicana. Se han presentado reportes de casos individuales con la descripción clínica de NEM1 en los pacientes mexicanos [Prado-Calleros, 1998; Domínguez-Gasca, 2014; Gamboa-Jimenez, 2018]. También se han incluido los casos con posible NEM1 en series de pacientes agrupados por alguna característica patológica en particular, como series de pacientes con TNE o HPTP con la caracterización clínica y abordaje terapéutico [Mendoza-Zubieta, 2009; Grajeda, 2015], un enfoque diagnóstico [Bellacetin-Figueroa et al., 2016], estudio de factores de riesgo asociados [Soto-Solis, 2018], tratamiento quirúrgico o factores pronósticos de supervivencia [Medrano-Guzman, 2011; Velasco-Morales, 2014]. Sin embargo, en ninguno de estos se discuten los antecedentes heredo-familiares, la confirmación diagnóstica mediante un estudio molecular, abordaje de los familiares en riesgo o el asesoramiento genético. Se ha mencionado la importancia de asesoramiento genético en las familias con alta susceptibilidad a cáncer como NEM1 [Ochoa-Carrillo y Vidal, 2006]. Los reportes de casos más recientes ya están incluyendo los resultados de estudio genético [de la Fuente-Bartolomé et al., 2017]. Sin embargo, no se cuenta con algún registro de cohortes o series de casos de NEM1 en individuos mexicanos que incluyeran la descripción de las alteraciones genéticas asociadas y su integración con las características clínicas.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La Neoplasia Endocrina Múltiples tipo 1, es una enfermedad caracterizada por la presencia de múltiples tumores neuroendocrinos, los pacientes que presentan esta entidad deben llevar una vigilancia muy estrecha y la detección oportuna de tumores; así como el asesoramiento y vigilancia a los familiares que se encuentren en riesgo. En México no se cuenta con un registro de alteraciones genéticas asociadas a NEM1 encontradas en pacientes y sus familiares. Los estudios genéticos no se realizan con frecuencia al no contar con un centro de referencia o posibilidad de realizar la prueba. Como un primer paso, es necesario apuntalar el estudio epidemiológico de esta patología desde el punto de vista genético, para poder determinar las características de las mutaciones y ofrecer a los pacientes una atención integral. El hiperparatiroidismo se puede manifestar antes de los 20 años en los portadores de la mutación, por lo cual es de suma importancia el estudio genético de los familiares en riesgo y el monitoreo de los portadores asintomáticos.

3. HIPÓTESIS

En este estudio descriptivo se espera encontrar la presencia de mutaciones en el gen *MEN1* en pacientes con diagnóstico clínico de dos o más tumores neuroendocrinos asociados a síndrome de NEM1. Además, la presencia de mutaciones podría estar asociada con un inicio más temprano de la enfermedad o un número mayor de órganos afectados. Los antecedentes heredo-familiares podrían estar relacionados con un inicio más temprano de la aparición de los síntomas. De acuerdo a lo reportado en la literatura, en los casos con antecedentes familiares la detección de mutaciones puede ser de hasta un 90%, mientras que en casos sin antecedentes familiares es de hasta un 65%.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Describir las características clínicas y determinar las alteraciones moleculares del gen *MEN1* en los pacientes con diagnóstico de Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 1 en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

4.2. Objetivos específicos

- a) Describir, agrupar y clasificar las características clínicas de los pacientes con diagnóstico clínico de NEM1 mediante la revisión del expediente clínico.
- b) Determinar la frecuencia de mutaciones puntuales en el gen *MEN1* identificadas mediante la secuenciación directa por el método *Sanger*.
- c) Determinar la frecuencia de alteraciones de tipo deleciones/duplicaciones (rearrreglos genómicos grandes) en el gen *MEN1* por técnica de MLPA.
- d) Determinar la frecuencia de casos con antecedentes familiares en la serie de pacientes con diagnóstico NEM1.
- e) Determinar la presencia de portadores asintomáticos en los familiares de los pacientes con alteraciones génicas identificadas.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Diseño general.

Diseño: observacional, descriptivo, transversal.

Población a estudiar: pacientes de la consulta del INCMNSZ con diagnóstico clínico de NEM1.

Tamaño de muestra: de conveniencia.

5.2. Criterios de selección.

5.2.1. Criterios de inclusión:

- Individuos con presencia de hiperparatiroidismo primario y uno o más tumores neuroendocrinos asociados a esta entidad.
- Individuos con presencia de 2 o más tumores neuroendocrino asociados a esta entidad.
- Individuos con diagnóstico de NEM1 con presencia de mutación en el gen *MEN1*.

5.2.2. Criterios de exclusión:

- Individuos con solo un tumor neuroendocrino asociado a esta entidad.
- Individuos con solo hiperparatiroidismo aislado primario.
- Pacientes con diagnóstico de NEM1 sin estudio molecular.
- Pacientes fallecidos con diagnóstico clínico de NEM1, sin estudio molecular.

5.3. Reclutamiento de pacientes.

Se obtuvieron los datos de pacientes con criterios clínicos para NEM1 dentro del registro del archivo del INCMNSZ, la búsqueda de pacientes que cumplieron los criterios se realizó mediante los diagnósticos registrados en el archivo clínico de acuerdo al CIE10, los diagnósticos de búsqueda fueron: neoplasia endocrina múltiple, hiperparatiroidismo primario y tumor neuroendocrino.

5.4. Estructura de la base de datos.

Con la información recopilada se realizó una base de datos de todos los pacientes con NEM1 atendidos en el INCMNSZ desde enero de 1998 a junio 2018.

La base de datos incluyó: datos generales de los pacientes, como edad, género, manifestaciones clínicas, edad del diagnóstico de la 1^{era} manifestación, edad al diagnóstico de NEM1, antecedentes heredofamiliares de NEM1; registro de los datos histopatológicos de las biopsias realizadas y del análisis de bloques quirúrgicos; se incluyó el registro de los estudios moleculares de secuenciación directa del gen *MEN1* y posteriormente se agregaron los resultados del estudio molecular complementario para la búsqueda de deleciones por MLPA.

5.5. Abordaje para el diagnóstico molecular.

Los pacientes con diagnóstico clínico que no contaban con el estudio molecular de secuenciación previo, se les invitó a realizarse los estudios moleculares del gen *MEN1*.

Aquellos pacientes que contaban sólo con el análisis de secuencia del exón 4 del gen *MEN1* con resultado negativo para las mutaciones, se les realizó secuenciación completa del gen. A los pacientes con secuenciación completa del gen *MEN1* negativos para la mutación, se les realizó la búsqueda de deleciones mediante la técnica de MLPA (Figura 9).

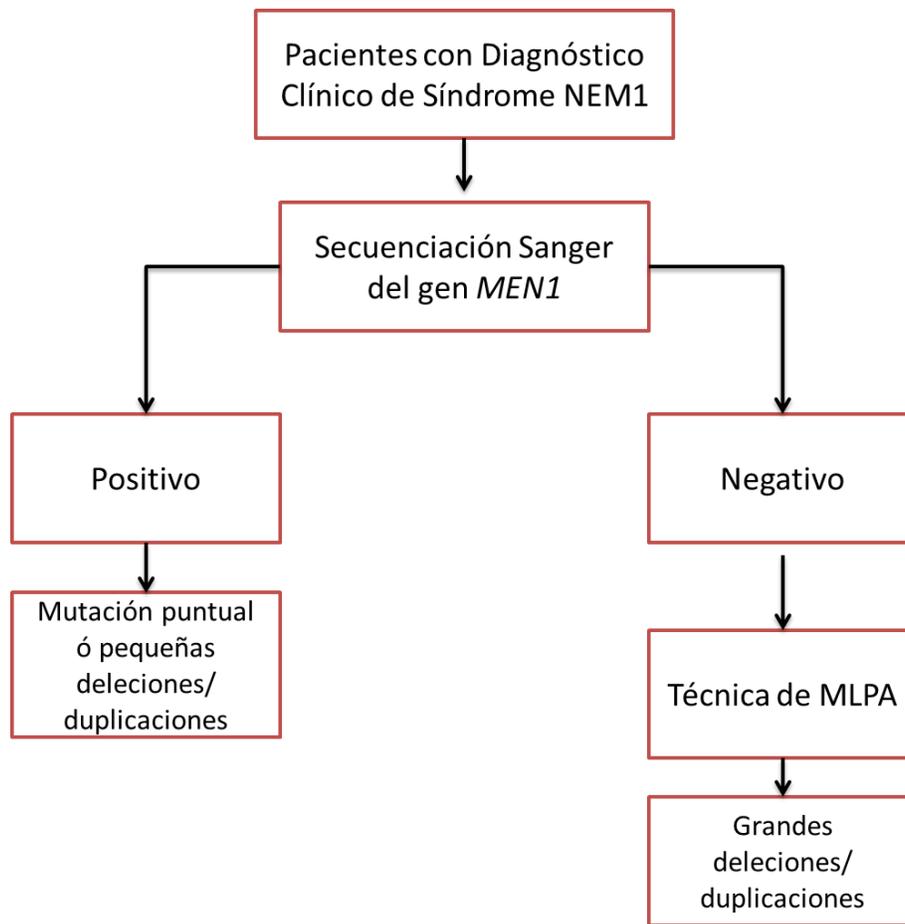


Figura 10. **Algoritmo para el diagnóstico molecular de NEM1.** [Modificado de *GeneReviews*[®], 2018].

5.6. Procedimientos de laboratorio y técnicas.

5.6.1. Extracción del ADN de leucocitos de sangre periférica

La obtención de sangre periférica se realizó de acuerdo al protocolo estándar de venopunción [WHO; 2010], resumido en el anexo A1. Para la extracción de ADN se utilizó el kit comercial de extracción por columna *QIAamp DNA Blood mini Kit* (Qiagen, Cat:51104) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico se cuantificó y se preservó a -20°C.

5.6.2. Amplificación de los fragmentos del gen MEN1.

Se realizó la reacción en cadena con polimerasa (PCR) para la amplificación de los exones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8v, 9 y 10 del gen *MEN1*. Se usaron las secuencias de los oligonucleótidos diseñados por Mayr y col. (1997), indicados en la tabla 3.

Tabla 3. Características de oligonucleótidos utilizados en el análisis de gen *MEN1*.

| EXÓN | PRIMER SENTIDO | PRIMER ANTISENTIDO | Ta | Tamaño, pb |
|---------------|-----------------------------|------------------------------|------|------------|
| 2 | 5'-GAACCTGCCCCGACCCTCC-3' | 5'-ACACCTGCCGAACCTCACAAG-3' | 61°C | |
| 3 Y 4 | 5'-TGGCCCTTTCCCCATGTTA-3' | 5'-CAGGGTCCCACAGCAAGTCAAG-3' | 61°C | |
| 5 Y 6 | 5'-CGTTCTCCTCCCTGTTCCGT-3' | 5'-GTCTCCCTTCTGCACCCTCC-3' | 60°C | |
| 7 | 5'-CCTCTGCCTCACCTCCATCCA-3' | 5'-GGACAGGCTGCAGGCCCTAGT-3' | 60°C | |
| 8 | 5'-GGGCTGACCCAGACAGCATC-3' | 5'-CCTGCCATCCCTAATCCCGTA-3' | 60°C | |
| 9 Y 10 | 5'-TGGAGCCAGGGGTCTTTGCCT-3' | 5'-CCCCACAAGCGGTCCGAAGT-3' | 63°C | |
| MEN1 x 10F | 5'-CACCTTGCTCTCCCCACTGGC-3' | - | 63°C | |

Cada reacción de PCR se preparó usando 12 µL de la mezcla comercial de reactivos *HotStarTaq DNA polymerase 2x* (Qiagen, Cat.: 203205), 2 µL de oligonucleótido sentido 10 µM (*Integrated DNA Technologies, primer synthesis*), 2 µL del oligonucleótido antisentido 10 µM y 25-50 ng de ADN en un volumen total de 25 µL ajustado con agua libre de DNAsas. La amplificación de los fragmentos se realizó en el termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (*Applied Biosystems, ThermoFisher*) de acuerdo al siguiente programa:

1. Desnaturalización inicial: 95°C / 10 min
2. Desnaturalización: 95°C / 30 s
3. Alineamiento/hibridación: temperatura variable (ver Tabla 3) / 30 s
4. Extensión/elongación: 72°C / 40 s
5. Repetir los pasos 2 - 4 por 34 ciclos mas
6. Fase final de extensión: 72°C / 10 min

5.6.3. Evaluación y purificación de los fragmentos amplificados

La longitud y la cantidad de los fragmentos amplificados se evaluaron mediante la separación por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, se anexa el procedimiento de preparación del gel y las condiciones de electroforesis (Anexo 2).

La purificación de los productos de PCR se realizó mediante separación en columna usando el kit comercial *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen Cat:28104) y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

5.6.4. Secuenciación directa del gen MEN1.

La secuenciación directa es un método de secuenciación de primera generación desarrollado por Sanger y col. en 1977 y se basa en la síntesis de una sola cadena de ADN mediante PCR usando la mezcla de 2'-deoxinucleotidos (dNTPs) y dideoxinucleotidos (ddNTPs), donde estos últimos cumplen la función de la terminación de síntesis de la cadena [Sanger, 1977]. La separación y visualización de los fragmentos se realiza usando equipos automatizados de electroforesis capilar [Smith, 1986] y los ddNTPs marcados con fluorocromos diferentes [Prober, 1987].

Para la secuenciación del gen *MEN1* se utilizó la mezcla comercial de reactivos *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific®, Cat.: 4337455). Cada reacción de secuencia incluyó los siguientes componentes: 2 µL de *BigDye™ 10X*, 3 µL de *buffer 5X* incluido en el kit, 2 µL del oligonucleótido (sentido o anti-sentido) 10 µM, 3 µL del producto amplificado y purificado de PCR, 10 µL de agua libre de DNAsas en un total de 20 µL.

La reacción de secuenciación se realizó en el termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific®) de acuerdo al siguiente programa:

1. Desnaturalización inicial: 96°C / 3 min
2. Desnaturalización: 95°C / 10 s
3. Alineamiento/hibridación: 52°C / 15 s
4. Extensión/elongación: 60°C / 2 min
5. Repetir los pasos 2 - 4 por 34 ciclos mas
6. Fase final de extensión: 60°C / 3 min

5.6.5. Purificación de los productos de la reacción de secuencia.

Los productos de la reacción de secuencia contienen sales, dNTPs, ddNTPs, y otras impurezas de bajo peso molecular que podrían afectar la resolución y la intensidad de la señal durante la electroforesis capilar. Para eliminar las impurezas, la purificación las reacciones de secuencia se realizó mediante la separación por centrifugación en columna de gel usando las columnas comerciales *Centri-Sep*[™] (ThermoFisher Scientific[®], Cat.: 401762), el procedimiento se describe en el Anexo 3.

5.6.6. Análisis de los productos de la reacción de secuencia mediante electroforesis capilar.

Los productos de la reacción de secuencia purificados y secos se resuspendieron en 15 µl de formamida *HiDi* (ThermoFisher Scientific[®], Cat.: 4311320), se desnaturalizaron a 95°C por 5 minutos y se analizaron en el equipo *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems[™], ThermoFisher Scientific[®]).

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la secuencia de referencia del gen *MEN1* en el cromosoma 11 con localización en el segmento NC_000011.10 de la versión GRCh38.p7 del genoma humano (Genome-NCBI, 2005-) y Homo sapiens chromosome 11, alternate assembly CHM1 1.1, ID: NC 018922.2.

5.6.7. Búsqueda de deleciones mediante Amplificación Múltiple de Sondas dependiente de Ligación (MLPA).

Para la detección de deleciones a nivel de exones, gen completo o regiones grandes que incluyen el gen *MEN1*, se utilizó la técnica de MLPA. Se basa en el uso de sondas de ADN sintético con secuencias complementarias a las regiones específicas de interés. Cada sonda consta de dos partes separadas, que al unirse a la secuencia blanco en el ADN genómico,

pueden ser enlazadas entre ellas por la enzima ligasa y entonces pueden amplificarse por la ADN polimerasa. La amplificación se lleva a cabo a partir de las secuencias sintéticas integradas en el diseño de la sonda con los oligonucleótidos universales para todos los fragmentos de interés en una misma reacción de PCR múltiple. Si la secuencia de interés en el ADNg está ausente completa- o parcialmente, no habrá ligación de la sonda y en consecuencia no habrá amplificación de la misma. Los oligonucleótidos están marcados con fluorescencia, lo cual permite la detección y cuantificación de los fragmentos amplificados mediante electroforesis capilar.

Se utilizó la mezcla comercial de sondas *SALSA*[®] *MLPA*[®] *P244-c1 AIP-MEN1-CDKN1B* (MRC-HollandTM), que contiene 11 sondas específicas para los 10 exones del gen *MEN1*, 3 sondas para cada uno de los exones del gen *CDKN1B* y 2 sondas para el exón 1 del gen *AIP*, así como 6 sondas adicionales de genes varios en la región 11q13. Además se incluyeron 10 sondas de referencia dirigidas a regiones estables del genoma humano.

Las muestras de ADNg se re-purificaron mediante precipitación en etanol (Anexo 4). Las reacciones de MLPA se realizaron acorde a las especificaciones del proveedor (Anexo 5). La separación de los fragmentos se realizó en el equipo de electroforesis capilar *Genetic Analyzer 3500* (Applied BiosystemsTM, ThermoFisher Scientific[®]) usando 1 uL de la reacción de MLPA, 0.7 uL del estándar de tamaños *GS-500* (Applied BiosystemsTM) en 18.3 uL de formamida *HiDi*[®] (Applied BiosystemsTM). Los fragmentos se desnaturalizaron a 95°C/5 min y se corrieron bajo las siguientes condiciones: temperatura del capilar 50°C; desnaturalización 90°C por 120s; voltaje de inyección 1.6 kv, tiempo de inyección 30s; tiempo de corrida 60 min a 4.8 kv.

5.7. Análisis estadístico.

Herramientas de estadística descriptiva (STATA). Se evaluó la distribución normal de las variables continuas usando la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y la prueba de normalidad para asimetría y kurtosis. La homogeneidad de varianzas se evaluó con la prueba de Levene modificada [Brown; 1974] Para las comparaciones variables continuas con distribución normal se usó la t Student. Para las comparaciones de variables categóricas o con distribución no normal se aplicaron las pruebas de estadística no-paramétrica: *chi* cuadrada y U de Mann-Whitney. Se consideró un valor de significancia α menor a 0.05.

6. RESULTADOS

6.1.Descripción de la muestra

Se incluyeron 23 casos índice, además se consideraron 6 familiares afectados sumando un total de 29 pacientes con diagnóstico clínico de NEM1, para la descripción y evaluación de las características demográficas y clínicas.

Se incluyeron 12 familiares sin ninguna manifestación clínica para la identificación de portadores mediante la detección de mutaciones.

Los pacientes provienen de diferentes estados y localidades de la república: Aguascalientes, Baja California, Ciudad de México, Chiapas, Estado de México, Guanajuato, Michoacán, Sinaloa y Veracruz.

6.1.1. Características Demográficas

En la Tabla 4 se presentan las principales características demográficas de los pacientes. La proporción de sexo femenino fue de 1.6 por cada hombre. La edad promedio al diagnóstico de la primera manifestación clínica (PMC) fue de 37.7 ± 11.7 años. Al estratificar por sexo, la edad al diagnóstico de la PMC en mujeres fue de 39.6 ± 14.3 años y en los hombres de 34.6 ± 4.2 años, la diferencia observada no fue estadísticamente significativa ($p_{t\text{ Student}} = 0.182$).

Tabla 4. **Características demográficas generales**

| | |
|--|-------------------|
| TOTAL, n | 29 |
| CASOS ÍNDICE | 23/29 |
| DISTRIBUCIÓN POR SEXO | F 62% (18/29) |
| | M 38% (11/29) |
| EDAD AL DIAGNÓSTICO DE LA PRIMERA MANIFESTACIÓN CLÍNICA, años | F 39.6 ± 14.3 |
| | M 34.6 ± 4.2 |
| AHF | 43.5% (10/23) |

n: número de muestra, F: femenino, M: masculino, AHF: antecedentes heredo-familiares.

El 57% de los casos índice presentaron antecedentes heredo-familiares (AHF) (13/23); 12 de ellos tenían familiares de 1er grado únicamente (padres, hermanos o hijos) con sospecha o el diagnóstico confirmado de NEM1; un caso presento familiares de 1ro y 2do grado (tíos o abuelos). La edad promedio al diagnóstico de la PMC en los casos índice con AHF fue de 41.3 ± 12.2 años, mientras que en los casos índice sin AHF fue de 35.5 ± 13.3 años, la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p_{t\text{-Student}} = 0.292$).

6.1.2. Características Clínicas

Las características clínicas más importantes de cada caso se resumen en la Figura 11. La manifestación clínica predominante fue HPTPA (96.6%). El estudio anatomopatológico mostro adenoma en 12 de 28 casos y la hiperplasia de paratiroides en 8 de 28 (Figura 10-A).

Los T-TGEP se presentaron con una frecuencia de 69% (20/29): el tumor más frecuente fue el tumor neuroendocrino de páncreas en 10 de 20 casos (Figura 10-B).

El adenoma hipofisario se presentó con la misma frecuencia que el T-TGEP (69%) en 20 de 29; en la clasificación de adenomas el más común fue no secretor en 13 de 20 casos (Figura 10-C); no se encontraron secretores de TSH, ACTH FSH y LH.

Los tumores carcinoides se presentaron en 17% (5/29); el adenoma de suprarrenal en 13.7% (4/29); las alteraciones en la piel en 13.7% (4/29) y la nefrocalcinosis en 58.62% (18/29).

| ID PACIENTE | CRITERIOS DIAGNÓSTICOS | | | CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS ADICIONALES | | | | | | |
|-------------|-------------------------|--------|----------------------|--------------------------------------|----------------|------------------------|------------------|-----------------|----------|--|
| | ENFERMEDAD PARATIROIDEA | T-TGEP | ADENOMA HIPOFISIARIO | TUMOR CARCINOIDE | FEOCROMOCITOMA | ENFERMEDAD SUPRARRENAL | TUMOR EN LA PIEL | NEFROCALCINOSIS | MUTACIÓN | |
| P-01 | ■ | 5 | 6 | 12 | | ■ | | ■ | ✓ | |
| P-03 | ■ | 1 | 7 | | | ■ | 13 | ■ | ✓ | |
| P-02 | ■ | 1 | 6 | 10 | | | 13 | ■ | ✓ | |
| P-04 | ■ | 2 | 6 | | | | | ■ | ✓ | |
| P-05-F1 | ■ | 1 | 6 | | | | | ■ | ✓ | |
| P-06 | ■ | 1 | 7 | | | | | ■ | ✓ | |
| P-07 | ■ | 3 | 7 | | | | | ■ | ✓ | |
| P-08 | ■ | 2 | 6 | | | | | ■ | ✓ | |
| P-12 | ■ | 2 | 6 | | | | | ■ | ✓ | |
| P-14 | ■ | 2 | 6 | | ■ | | | ■ | ✓ | |
| P-11 | ■ | 1 | 6 | | | | | ■ | ✓ | |
| P-10 | ■ | | 6 | | | ■ | 14 | ■ | ✓ | |
| P-09 | ■ | 3 | | 11 | | | | ■ | ✓ | |
| P-13-F1 | ■ | 1 | | 9 | | | | ■ | ✓ | |
| P-02-F1 | ■ | | 6 | | | | | ■ | ✓ | |
| P-13 | ■ | 1 | | | | | | ■ | ✓ | |
| P-05 | ■ | 3 | | | | | | ■ | ✓ | |
| P-05-F2 | ■ | 1 | | | | | | ■ | ✓ | |
| P-11-F1 | ■ | | | | | | | ■ | ✓ | |
| P-11-F2 | ■ | | | | | | | ■ | ✓ | |
| P-15 | ■ | 2 | 6 | | | | | ■ | ✓ | |
| P-19 | | 1 | 6 | | | ■ | 15 | ■ | ✓ | |
| P-16 | ■ | | 7 | | | | | ■ | ✓ | |
| P-20 | ■ | | 8 | | | | | ■ | ✓ | |
| P-21 | ■ | | 8 | | | | | ■ | ✓ | |
| P-22 | ■ | | 7 | | | | | ■ | ✓ | |
| P-23 | ■ | 1 | | 9 | | | | ■ | ✓ | |
| P-17 | ■ | | 6 | | | | | ■ | ✓ | |
| P-18 | ■ | 4 | | | | | | ■ | ✓ | |

ENFERMEDAD PARATIROIDEA:

- HPTPA
- HPTPA+HIPERPLASIA
- HPTPA+ADENOMA

TIPO DE T-TGEP:

- 1 TUMOR NEURO-ENDOCRINO
- 2 INSULINOMA
- 3 GASTRINOMA
- 4 PROINSULINOMA
- 5 PSEUDOPAPILAR DE PANCREAS

TIPO DE ADENOMA HIPOFISIARIO:

- 6 NO SECRETOR
- 7 PROLACTINOMA
- 8 SECRETOR DE HORMONA DE CRECIMIENTO

LOCALIZACIÓN DEL TUMOR CARCINOIDE:

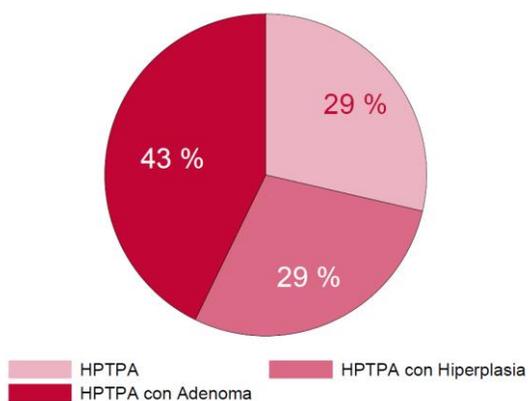
- 9 TIROIDES
- 10 TIMO
- 11 PULMÓN
- 12 DUODENO

TIPO DE TUMOR EN LA PIEL:

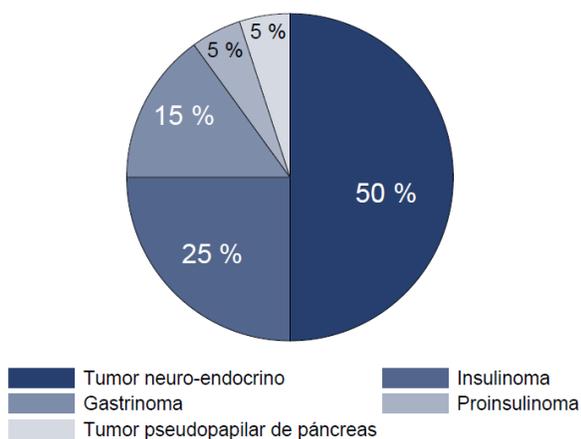
- 13 LIPOMA
- 14 MIXOMA
- 15 COLAGENOMA

Figura 11. Principales características diagnósticas y clínicas de los 29 pacientes con NEM1. HPTPA – hiperparatiroidismo primario aislado; T-TGEP – Tumor del Tracto Gastro-Entero-Pancreático; HC –hormona de crecimiento.

A.



B.



C.

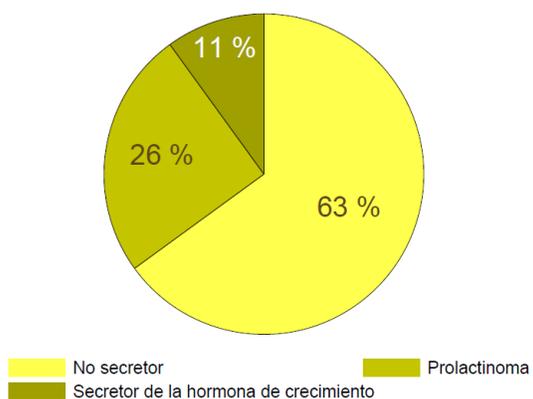


Figura 12. **Distribución de frecuencias por subtipo de las principales características diagnósticas de NEM1 en los pacientes estudiados.** A. Hiperparatiroidismo primario aislado; B. Tumores del Tracto Gastro-Entero-Pancreático; C. Adenomas Hipofisarios

6.2. Descripción de las mutaciones encontradas

Se detectaron 14 variantes patogénicas en los casos índice el 60% (14/23). El 64% fueron variantes puntuales (9/14): 7 mutaciones sin sentido, una de sentido erróneo y una que afecta el sitio aceptor de *splicing*. El 36% restante fueron rearrreglos pequeños (5/14): 2 deleciones, 2 duplicaciones y una inserción, todos provocaron el corrimiento del marco de lectura. No se encontraron rearrreglos grandes usando MLPA. La localización y el tipo de alteraciones encontradas se resumen en la Figura 13, así como los electroferogramas correspondientes en la Figura 14. El mayor número de mutaciones se encontró en el exón 10, seguido del exón 9 y 7. Los exones 1, 5 y 6 no fueron afectados en los pacientes estudiados.

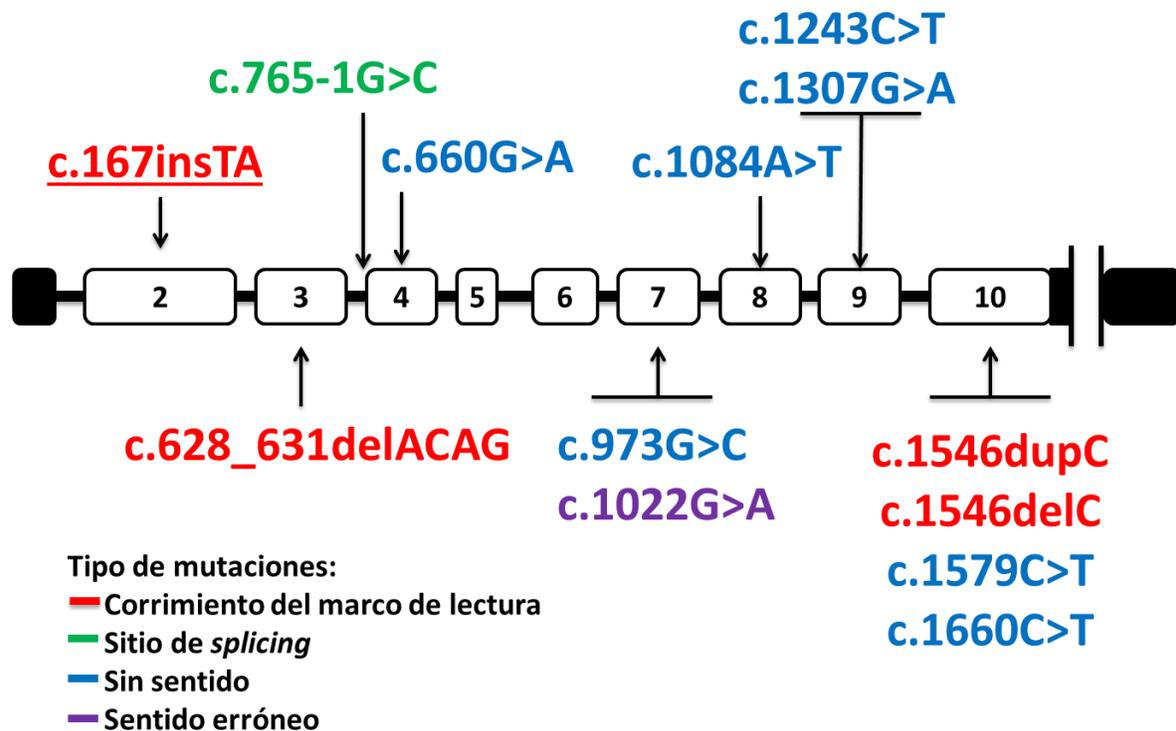


Figura 13. Localización de las mutaciones del gen *MEN1* identificadas en la serie de pacientes con Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 1. Se presenta la estructura del gen con exones (cuadros blancos) e intrones (línea negra); el tipo de mutación está indicado en colores.

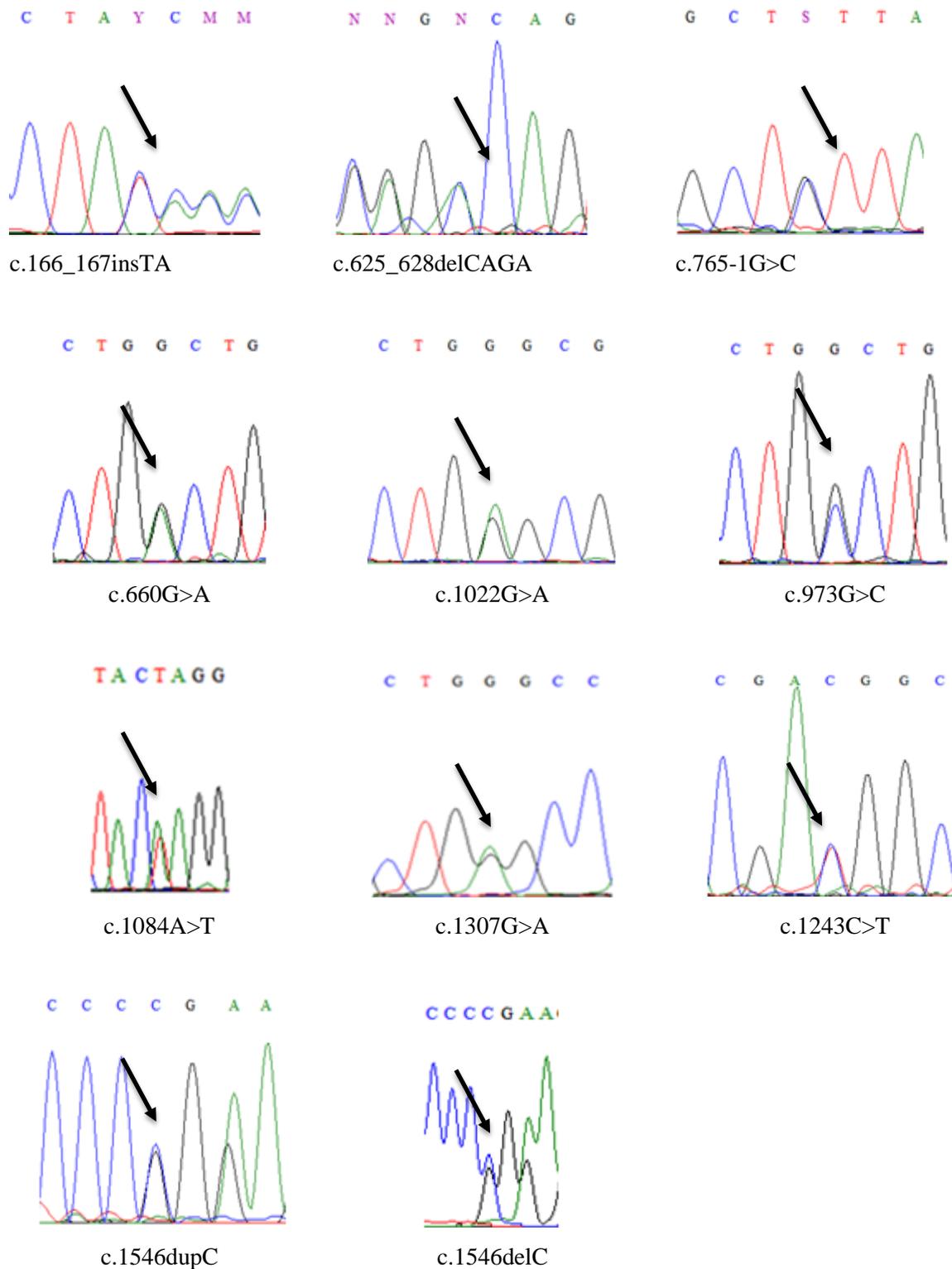


Figura14. Electroferogramas de la secuencias con presencia de mutación en el *MEN1*.

De las mutaciones identificadas, 7 se encontraron en los casos índice con AHF (7 de 10); las 7 restantes se detectaron en los casos índice sin familiares afectados (7 de 13). En la tabla 5 se presentan las mutaciones por caso índice y las características de cada una. En todos los familiares afectados se confirmó la presencia de mutación.

Durante el estudio de extensión para la detección de portadores asintomáticos se identificaron 6 familiares positivos a mutación de 12 tamizados.

Tabla 5. Características Moleculares de las mutaciones por caso índice.

| No. | MUTACIÓN | PROTEÍNA | EXÓN | CLASIFICACIÓN | AHF |
|----------------------------------|------------------|------------------|---------------|-----------------------------|-----|
| P-07 | c.166_167insTA | p. T56Ifs*64 | 2 | CML | Si |
| P-04 | c.625_628delCAGA | p.Thr210Serfs*13 | 3 | CML | No |
| P-13/P-13-F1 | c.765-1G>C | ---- | 3 (INTRÓN) | SITIO DE <i>SPLICING</i> | SI |
| P-02/P-02-F1 | c.660G>A | p.Trp220Ter | 4 | SIN SENTIDO | Si |
| P-08 | c.1022G>A | p.Trp341Ter | 7 | SIN SENTIDO | No |
| P-06 | c.973G>C | pla325Pro | 7 | SENTIDO ERRONEO | No |
| P-12 | c.1084A>T | p.Lys326Ter | 8 | SIN SENTIDO | No |
| P-14 | c.1307G>A | p.Trp436Ter | 9 | SIN SENTIDO | No |
| P-01 | c.1243C>T | p.Arg415Ter | 9 | SIN SENTIDO | Si |
| P-09 | c.1546dupC | p.Arg516Profs*15 | 10 | CML | Si |
| P-03 | c.1546dupC | p.Arg516Profs*15 | 10 | CML | No |
| P-10 | c.1546delC | p.Arg516Glyfs | 10 | CML | Si |
| P-11/P-11-F1/ P-11-F2 | c.1579C>T | p.Arg527Ter | 10 | SIN SENTIDO | SI |
| P-05/P-05-F1/ P-05-F2 | c.1660C>T | p.Gln554Ter | 10 | SIN SENTIDO | Si |

AHF: antecedentes heredo-familiares; CML: corrimiento del marco de lectura.

6.3. Comparación de las características demográficas y clínicas entre pacientes con y sin mutación en el gen *NEM1*.

La edad al diagnóstico de PMC en pacientes con mutaciones (34.5 ± 8.9 años) fue menor que en los pacientes sin mutación evidente (45.0 ± 14.4 años; $p_{t\text{ Student}} = 0.022$). Se puede observar que la proporción de pacientes con mutaciones tiende a aumentar a menor edad al diagnóstico de la PMC. Hay una mayor proporción de pacientes con mutaciones que presentan PMC a una edad menor de 40 años y es estadísticamente significativo (Figura 15).

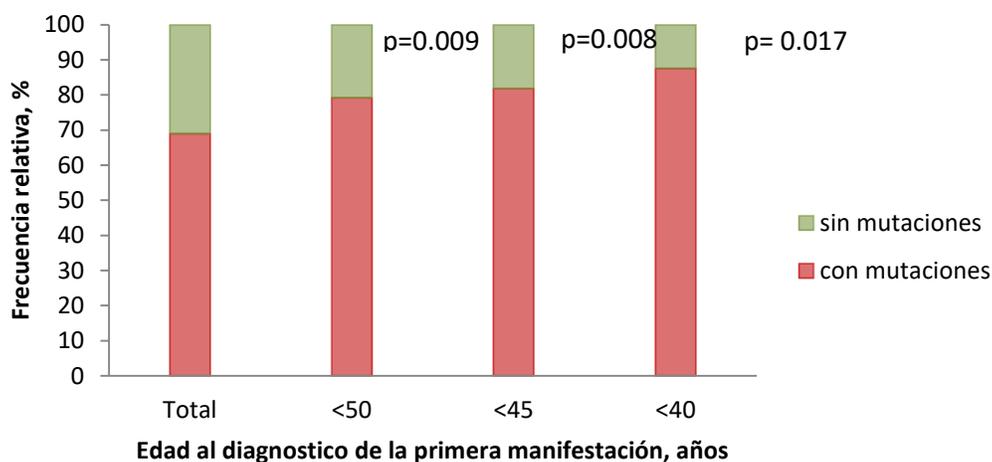


Figura 15. **Proporción de pacientes con y sin mutaciones por edad al diagnóstico de la primera manifestación clínica.** Se observa una tendencia de una mayor proporción de pacientes con mutaciones en *MEN1* a menor edad del primer diagnóstico. Se usó la prueba de χ^2 para cada valor de corte de la edad a la PMC

Al estratificar por sexo, sólo fue posible comparar la edad a la PMC en mujeres con y sin mutaciones, no se observaron diferencias significativas (tabla 6).

Tabla 6. **Comparación de la edad al diagnóstico entre pacientes con o sin alteraciones en el gen *MEN1* por sexo.**

| SEXO | Edx_PMC | | p |
|--------------|-----------|----------|-------|
| | Mujeres | Hombres | |
| Con mutación | 35.1±12.4 | 33.8±3.3 | 0.756 |
| Sin mutación | 45.3±15.3 | 43 | - |

Edx_PMC: edad al diagnóstico de la primera manifestación clínica.
Solo un paciente masculino no presentó mutación en *MEN1*.

La presencia de la tríada clínica clásica de NEM1 se observó mayormente en pacientes con mutaciones identificadas (11 de 20) a diferencia de los pacientes sin mutaciones (1 de 9), $\chi^2= 5.53$, $p=0.019$; RM = 9.8, $p=0.048$, IC_{95%}: 1.03-93.5. La característica clínica más frecuentemente observada en todos los pacientes con mutaciones identificadas fue el HPTAP y en segundo lugar los T-TGEP. En cambio en los casos sin mutación, la segunda característica más frecuente fue AH (tabla 7).

Tabla 7. Características clínicas de los pacientes* con NEM1 con y sin mutación.

| CARACTERÍSTICAS | MUTACIÓN | SIN MUTACIÓN | TOTAL |
|-----------------|----------|--------------|-------|
| CLÍNICAS | n=20 | n=9 | n=29 |
| HPTPA | 20 | 8 | 28 |
| AH | 13 | 7 | 20 |
| T-TGEP | 16 | 4 | 20 |
| TC | 4 | 1 | 5 |
| ES | 3 | 1 | 4 |
| PIEL | 3 | 1 | 4 |
| FEOCROMOCITOMA | 1 | 0 | 1 |

* los pacientes con NEM1: incluyendo los casos índice y los familiares. HPTPA - HiperParaTiroidismo Primario Asilado, AH - Adenoma Hipofisario, T-TGEP - Tumor del Tracto Gastro-Entero-Pancreático. Características clínicas adicionales: TC \ Tumor Carcinoude, ES- Enfermedad Suprarrenal.

Al comparar la edad de diagnóstico de las manifestaciones clínicas de la tríada clásica en pacientes con mutación identificada y aquellos sin mutación, encontramos significancia estadística ($p<0.05$) para HPTPA, siendo una edad menor al diagnóstico en los pacientes con mutación identificada. Una tendencia en el mismo sentido se observó para los T-TGEP ($p=0.072$) y para AH las edades fueron similares (tabla 8).

Tabla 8. Diferencias en la edad de diagnóstico entre los casos índice con y sin mutación por características clínicas más frecuentes.

| CARACTERÍSTICAS | MUTACIÓN | SIN MUTACIÓN | VALOR DE | | |
|-----------------|----------------|--------------|----------------|---|-----------------|
| CLÍNICAS | media±DE, años | n | media±DE, años | n | $P_{t Student}$ |
| HPTPA | 34.9 ±9.2 | 20 | 45.3±15.3 | 8 | 0.036* |
| AH | 38.1±14.1 | 13 | 42.7±13.6 | 7 | 0.486 |
| TNE-TGEP | 37.7±12.9 | 16 | 50.8±8.3 | 4 | 0.072 |

ED: edad de diagnóstico, HPTPA: hiperparatiroidismo primario aislado, AH: adenoma hipofisario, TNE-TGEP: tumor neuroendocrino del tracto gastro-entero-pancreático. * valor estadísticamente significativo

7. DISCUSIÓN

NEM1 es una enfermedad de origen genético, multisistémica, con un modo de herencia autosómico dominante y penetrancia edad dependiente. En el presente estudio se describen las características clínicas y moleculares de pacientes con diagnóstico de NEM1 de un hospital de tercer nivel. Los pacientes provenían de diferentes lugares de la república mexicana. En cuanto al sexo no se encontró ninguna diferencia significativa entre la proporción de hombres y mujeres, concordando con lo reportado por Romanet y cols. (2018), en una cohorte francesa de más de mil pacientes.

La edad promedio de la primera manifestación clínica fue 37.7 años, fue similar a lo publicado por Romaney y cols, de 37.5 años (2018). Esto concuerda con lo publicado sobre la penetrancia de la enfermedad que suele ser mayor del 95% a la edad de 40 años [Thakker et al., 2012]. No se encontró diferencia significativa al comparar las edades por sexo.

El 57% de los casos índices presentaron AHF, al comparar la edad promedio al diagnóstico de la PMC de los casos índice con y sin AHF no fueron estadísticamente significativo.

La frecuencia de HPTA en nuestro estudio fue del 96.6%, lo que concuerda con reportes en la literatura caucásica y brasileña, mientras que en la población asiática se ha observado una menor incidencia [Lourenço-Jr, 2007; Wu, 2019] siendo en población infantil es la manifestación clínica más frecuente [Vannucci, 2017]. La penetrancia se reporta para el HPTA en NEM1 es del 100% a la edad de 50 años [Frost et al., 2018], en nuestra muestra el paciente que debutó a mayor edad con HPTA tenía 62 años.

Todos nuestros HPTA fueron sintomáticos y 17 de 29 presentaron nefrocalcinosis a diferencia de la población infantil, donde suelen diagnosticarse en período asintomático [Goudet, 2015; Vannucci, 2017].

Los T-TGEP tuvieron una frecuencia del 60%, similar a lo reportado por Lourenço-Jr, y cols. (2007), Thakker y cols. (2012), Chiloiro y cols. (2017) y van Treijen y cols. (2018). El tumor con mayor frecuencia fue el TNE no funcionales concordando con lo reportado por Chiloiro y cols.; a diferencia de lo reportado en Latinoamérica, en población brasileña,

donde el T-TGEP más frecuente fue gastrinoma [Lourenço-Jr, 2007]. El insulinoma resultó de los tumores menos frecuentes, coincidiendo así con reportes previos en la literatura [Lourenço-Jr, 2007, Thakker et al. 2012; Chiloiro et al., 2017]. No se presentaron glucagonomas ni vipomas. De los casos con metástasis, describimos tres casos: dos gastrinomas y un tumor pseudopapilar de páncreas; aunque poco usual que se presente metástasis de estos tumores, se sabe, suelen tener un comportamiento más agresivo [Thakker et al., 2012].

El 69% de los pacientes presentaron adenoma hipofisario, en la literatura se reporta con una menor frecuencia (hasta 40%) [Verges, 2002; Thakker et al., 2012] y en población infantil suelen ser la segunda manifestación más frecuente [Goudet, 2015; Vannucci, 2017]. De estos el adenoma más frecuentes fueron no secretores, lo cual corresponde con lo reportado por Yanya y cols (2019) en un centro de referencia chino donde el 48% de sus pacientes con adenoma hipofisario era de tipo no secretor, a diferencia de lo reportado por Frost y cols. (2018) donde solo el 10% de los casos fueron no secretor. Dentro de la variedad secretora predominó el prolactinoma, al igual que en lo publicado por Yanya y cols. (2019). En nuestra muestra no se encontraron adenomas secretores de hormonas TSH, ACTH FSH y LH esto puede deberse al tamaño reducido de la muestra estudiada.

El adenoma hipofisario suele ser de las últimas manifestaciones clínicas de NEM1 en ser detectadas, pudiendo deberse al mayor número de adenomas no secretores; y que debido a su tamaño son catalogados en la mayoría de los casos como microadenomas.

Los tumores carcinoides se presentaron en igual proporción a lo descrito en la literatura: más del 10% y con diferentes ubicaciones, timo, bronquio y duodeno [Lourenço-Jr, 2007; Frost et al., 2018;]. Hasta la fecha existe poca información que profundice sobre este tipo de tumores y su comportamiento en los NEM1.

Respecto a los adenomas de suprarrenales en nuestra muestra fueron no secretores, coincidiendo así con lo publicado en la literatura, donde hasta el 90% es no secretor [Frost et al., 2018]. La enfermedad de Cushing se manifestó en 2 pacientes, sin embargo, esta no se encontraba asociada a tumor secretor de ACTH y aunque es una manifestación poco

frecuente (>2%) en NEM1, se ha visto que en la infancia puede ser la primera manifestación clínica de la enfermedad [Makri, 2018].

Las proporciones de pacientes con afectación combinada del páncreas, glándulas paratiroides y la glándula pituitaria reportados en la literatura son 41.9%, 51.7%, 59.8%, 63.0% [Verges, 2002; Sakurai, 2012; Giusti, 2017; Wu, 2019, respectivamente] y 44.8% en nuestro estudio, independientemente del tamaño de la muestra estudiada.

De un total de 23 casos índice con diagnóstico clínico de NEM1 solo en 14 (60%) se encontró una mutación, siendo esta frecuencia menor en comparación a lo mencionado en la literatura, reportándose frecuentemente más del 90% en los que se confirma una mutación [Chandrasekharappa et al., 1997; Frost et al., 2018; Pepe, 2019]. Otros informes dividen el porcentaje de mutación por casos familiares donde se describe hasta un tasa de detección de mutaciones en *MEN1* mayor al 95% y en casos aislados entre el 50% al 65% [Giusti 2017; Wu; 2019]. En nuestro estudio encontramos una tasa de detección menor en los casos familiares 70% y similar en los casos aislados 58%.

El tipo de mutación más frecuentemente encontrado en el presente estudio fue de tipo puntual; de estas las mutaciones, las de tipo sin sentido representaron 7/14 (50%), distinto de lo reportado en la literatura donde las mutaciones más frecuentes son de corrimiento del marco de lectura (40%) [Lemos et al., 2008; Concolino et al., 2016] solos o et al. A estos tipos de mutaciones (corrimiento de marco de lectura y sin sentido), se les ha asignado característica de mutaciones deletéreas, debido que en muchos casos da lugar a una proteína truncada y como consecuencia la pérdida de los dominios funcionales de la proteína menina. Las mutaciones de sentido erróneo se han asociado a diversos mecanismos como la inactivación de menina pues afectan la función crítica de los residuos de aminoácidos implicados en las interacciones de proteína-proteína y en su actividad supresora de tumores, alteración en la capacidad para regular los promotores diana, reducción de la actividad proteica de estabilidad o de degradación proteolítica [Lemos et al., 2008; Matkar, 2013; Concolino et al., 2016].

No detectamos rearrreglos genómicos grandes en nuestros casos, aunque el porcentaje de mutaciones que se detecta con técnica de MLPA varía del 1 al 5% [Lemos et al., 2008;

Concolino et al., 2016; Carvalho et al., 2018]. Aunque la evidencia de correlación genotipo-fenotipo no se ha podido establecer. El grupo Romanet y cols., (2018) postulan que rearrreglos genómicos grandes se asocian a una menor edad de aparición de los síntomas y de diagnóstico, cuando compararon la presentación clínica de estos casos con otras variantes que generan o no proteína truncada (mutaciones sin sentido y de sentido erróneo). Esta propuesta no ha sido confirmada por otros grupos de investigación.

En nuestros pacientes no se realizó secuenciación de la región promotora y ni intrónica. Carvalho y cols., (2018) no recomiendan la búsqueda de mutaciones en estos sitios ya que suelen ser eventos muy raros. En la literatura se han reportado en dos series de casos de 3 exones con mayor frecuencia de mutaciones, los exones 3, 4 y 10 [*Turner 2002; Romanet, 2018*] La mayoría de las mutaciones que encontramos en nuestros pacientes se encontraban en el exón 10, siendo concordante con lo reportado por Romanet y cols (2018), esto puede deberse a que este exón es el de mayor tamaño en el gen *MEN1*, seguido del exón 2; aunque actualmente no se considera que exista un *hot-spot* específico para las diversas mutaciones reportadas.

Más del 80% de las familias con NEM1 tienen una mutación única [*Thakker et al.; 2012*]. De los 14 pacientes que se reportan en 13 las mutaciones identificadas han sido previamente descritas. La mutación c.973G>C (p.Ala325Pro), de tipo sentido erróneo descrita en nuestro estudio, fue previamente reportada por Park y colaboradores [*Park, 2003*] en una familia coreana donde los pacientes presentaron HPT, insulinoma, glucagonoma y prolactinoma. En nuestro caso no existía historia familiar de NEM1 y los tumores eran HPT, TNEP y prolactinoma; a pesar que ambos casos se presentó la misma mutación, el comportamiento de los tumores del tracto gástro-pancreático fue distinto; otro ejemplo de que no existe correlación genotipo-fenotipo. La mutación c.1546dupC (p.Arg516Profs*15) de tipo corrimiento del marco de lectura, se encontró en dos familias no relacionadas, asimismo no se observó correlación en la edad de inicio ni en el tipo de tumores asociados.

En 9 (40%), de los 23 casos índice no se identificó algún tipo de mutación, aunque en estos pacientes se detectaron al menos dos tumores asociados al espectro de NEM. Se ha descrito otro tipo de NEM, el tipo 4 como una genocopia del NEM1, los genes involucrados en esta entidad son cinasas dependientes de ciclínicas, reguladoras del ciclo celular: *CDK1A* (p15), *CDKN2C* (p18), *CDKN2B* (p21) y *CDKN1B* (p27). Aún no se conoce la prevalencia de NEM4, al momento solo se han reportado casos familiares [Karnik, 2005; Occhi 2013 Falchetti, 2017] por lo que estaría indicado realizar búsqueda de mutaciones en estos genes cuando el antecedente familiar es muy importante. El gen donde más mutaciones se ha identificado es *CDKN1B*, 15 mutaciones diferentes hasta 2018 [Georgitsi 2008; Cusan, 2018], en nuestro estudio se descartó descartamos rearrreglos grandes tipo inserción/delección en este gen.

En los pacientes negativos a mutaciones en el gen *MEN1* y con presencia de acromegalia, se ha descrito mutaciones puntuales en el gen *AIP* y rearrreglos genómicos grandes de genes contiguos (*AIP* y *MEN1*) [Falchetti, 2017; Rostomyan, 2017]. En nuestros casos negativos dos pacientes tenían AH secretores de HC con acromegalia secundaria, sin antecedentes familiares, sin embargo no se detectaron este tipo de mutaciones en el gen *AIP*.

Al comparar la edad diagnóstica de la PMC en pacientes con mutación y sin mutación evidente fue estadísticamente significativo, esto podría deberse al fenómeno del doble hit que predispone a los pacientes con mutación germinal en *MEN1* tener una segunda mutación somática con mayor frecuencia y un mayor riesgo de tumores a edades más tempranas. [Vijaraghavan, 2014; Falchetti, 2017; Frost et al., 2018]. Además del fenómeno de anticipación en el tamizaje diagnóstico que suele ocurrir con los familiares de casos con mutación identificada [Falchetti, 2017]. Además en la edad de presentación de la PMC en pacientes con mutación encontramos una mayor proporción de pacientes con edad menor de 40 años con significancia estadística. Al estratificar por sexo la edad de PMC en pacientes con y sin mutación, no se observaron diferencias significativas.

La tríada clásica clínica de NEM1 se presentó con mayor frecuencia en los pacientes con mutación identificada, siendo estadísticamente significativo, además del HPTAP y T-TGEP fueron las manifestaciones clínicas más prevalentes en pacientes con mutación al contrario de los casos sin mutación donde fueron HPTAP y AH. Es el primer estudio donde se

evalúan las características clínicas de pacientes con dos o más tumores asociados a NEM1 y no se detecta mutación en el gen *MEN1* ni grandes rearrreglos genómicos en los genes *AIP*, *CDKN1B* y *MEN1*, no obstante falta realizar la secuenciación de los genes asociados a NEM tipo 4, para descartar que se traten de una genocopia o fenocopia.

En seis de nuestros pacientes sintomáticos familiares del caso índice con mutación detectada, se confirmó la mutación específica y la presencia para los distintos tumores asociados, ocurriendo el fenómeno de anticipación en la detección, ya reportado previamente [Falchetti, 2017]. La NEM1 es de los pocos síndromes de predisposición a cáncer que permiten la detección de portadores en individuos a partir de los 5 años. En nuestro estudio se identificaron 6 portadores, los cuales se refirieron a hospitales pediátricos de tercer nivel.

La NEM1 es una entidad que representa un reto diagnóstico para el médico, ya que solo se sospecha ante la presencia de historia familiar o el hallazgo clínico de 2 tumores asociados, ocurriendo generalmente a edades tardías en los pacientes. El carácter y evolución de la enfermedad dependerá de lo temprano del diagnóstico y del tipo de tumor que se presente en el paciente y de la tendencia a malignizarse de estos. La gran diversidad de mutaciones, la falta de *hot-spot* y de correlación genotipo-fenotipo hacen que el tamizaje e identificación de mutaciones en el gen *MEN1* sea un proceso muy laborioso y costoso.

8. CONCLUSIONES

Es el primer estudio en población Mexicana que describe las características clínicas y moleculares de casos índice con diagnósticos clínico de síndrome de NEM1. Dentro de los datos demográficos el sexo del paciente no fue relevante para el diagnóstico, la edad de presentación de la primera manifestación clínica fue menor de 40 años, siendo la característica clínica más prevalente el HPTPA.

Se detectaron 14 mutaciones en el gen *MEN1*, siendo la mayoría de tipo sin sentido diferente a lo reportado en la literatura. La mutación c.1546dupC se presentó en dos casos índice no relacionados. No encontramos rearrreglos genómicos grandes.

Al comparar las manifestaciones clínicas de los pacientes con mutación detectada contra los sin mutación encontramos una diferencia significativa siendo una menor edad de la PMC en los pacientes con mutación. Además, las principales manifestaciones en pacientes con mutaciones fueron el HPTPA y T- TGEP, mientras que en aquellos sin mutaciones el HPTPA y AH. En los pacientes sin mutación detectadas es recomendable descartar NEM tipo 4.

En los doce familiares de pacientes con mutación detectada se realizó búsqueda de mutación dirigida resultando todos positivos: 6 eran sintomáticos y se ingresaron al INCMNSZ para su seguimiento y tratamiento, otros 6 eran portadores en edades pediátricas los cuales se refirieron a un hospital pediátrico de tercer nivel de atención.

La NEM1 es una entidad que representa un reto diagnóstico y se necesita un seguimiento oportuno para detectar las múltiples manifestaciones clínicas asociadas al espectro. La sospecha diagnóstica es importante en pacientes con HPTPA con diagnóstico menor de 30 años, T-TGEP menores de 50 años y AH en con diagnóstico en la infancia, además del antecedente familiar.

El papel del médico genetista en esta entidad es crucial, ya que se necesita un adecuado asesoramiento que incluya tanto al paciente como a sus familiares de primer grado, al ser de los pocos síndromes de predisposición genética a cáncer donde el diagnóstico molecular está indicado desde los 5 años y el seguimiento es de por vida.

9. BIBLIOGRAFÍA

Agarwal, S. K., Impey, S., Mc Weeney, S., Scacheri, P. C., Collins, F. S., Goodman, R. H., ... & Marx, S. J. (2007). Distribution of menin-occupied regions in chromatin specifies a broad role of menin in transcriptional regulation. *Neoplasia*, 9(2), 101-107.

Anlauf, M., Schlenger, R., Perren, A., Bauersfeld, J., Koch, C. A., Dralle, H., ... & Couvelard, A. (2006). Microadenomatosis of the endocrine pancreas in patients with and without the multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome. *The American journal of surgical pathology*, 30(5), 560-574.

Asgharian, B., Turner, M. L., Gibril, F., Entsuah, L. K., Serrano, J., & Jensen, R. T. (2004). Cutaneous tumors in patients with multiple endocrine neoplasm type 1 (MEN1) and gastrinomas: prospective study of frequency and development of criteria with high sensitivity and specificity for MEN1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(11), 5328-5336.

Al Brahim, N. Y., Rambaldini, G., Ezzat, S., & Asa, S. L. (2007). Complex endocrinopathies in MEN-1: diagnostic dilemmas in endocrine oncology. *Endocrine pathology*, 18(1), 37-41.

Bellacetin-Figueroa, O. y col. Tumores neuroendocrinos enteropancreáticos: diagnóstico y evaluación por ultrasonido endoscópico; análisis de 5 años de servicio de endoscopia del hospital de especialidades CMN Siglo XXI. *Endoscopia*. 2016. 28:114-118.

Benito, M., Asa, S. L., LiVolsi, V. A., West, V. A., & Snyder, P. J. (2005). Gonadotroph tumor associated with multiple endocrine neoplasia type 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(1), 570-574.

Boix, E., Pico, A., Pinedo, R., Aranda, I., & Kovacs, K. (2002). Ectopic growth hormone-releasing hormone secretion by thymic carcinoid tumour. *Clinical endocrinology*, 57(1), 131-134.

Brandi, M. L., Gagel, R. F., Angeli, A., Bilezikian, J. P., Beck-Peccoz, P., Bordi, C., ... & Lips, C. J. (2001). Consensus: guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(12), 5658-5671.

Brown, M. B., and A. B. Forsythe. 1974. Robust test for the equality of variances. *Journal of the American Statistical Association* 69: 364-367.

Byström, C., Larsson, C., Blomberg, C., Sandelin, K., Falkmer, U., Skogseid, B., ... & Nordenskjöld, M. (1990). Localization of the MEN1 gene to a small region within chromosome 11q13 by deletion mapping in tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(5), 1968-1972.

Carney, J. A. (2005). Familial multiple endocrine neoplasia: the first 100 years. *The American journal of surgical pathology*, 29(2), 254-274.

Carvalho, R. A., Urtremari, B., de Lima Jorge, A. A., Santana, L. S., de Souza Quedas, E. P., Sekiya, T., ... & Marx, S. (2018). Germline mutation landscape of multiple endocrine neoplasia type 1 using full gene next-generation sequencing. *European journal of endocrinology*, 1(aop).

Castro PG, de León AM, Trancón JG, Martínez PA, Alvarez Pérez JA, Fernández Fernández JC, García Bernardo CM, Serra LB, González González JJ. Glucagonoma syndrome: a case report. *J Med Case Rep*. 2011;5:402.

Chandrasekharappa, S. C., Guru, S. C., Manickam, P., Olufemi, S. E., Collins, F. S., Emmert-Buck, M. R., ... & Crabtree, J. S. (1997). Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. *Science*, 276(5311), 404-407. PMID: 9103196.

Chen, Y. X., Yan, J., Keeshan, K., Tubbs, A. T., Wang, H., Silva, A., ... & Hua, X. (2006). The tumor suppressor menin regulates hematopoiesis and myeloid transformation by influencing Hox gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(4), 1018-1023.

Chiloiro, S., Lanza, F., Bianchi, A., Schinzari, G., Brizi, M. G., Giampietro, A., ... & Pontecorvi, A. (2018). Pancreatic neuroendocrine tumors in MEN1 disease: a mono-centric longitudinal and prognostic study. *Endocrine*, 60(2), 362-367.

Concolino, P., Costella, A., & Capoluongo, E. (2016). Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): an update of 208 new germline variants reported in the last nine years. *Cancer genetics*, 209(1), 36-41.

Cusan, M., Mungo, G., Zompit, M. D. M., Segatto, I., Belletti, B., & Baldassarre, G. (2018). Landscape of CDKN1B mutations in luminal breast cancer and other hormone-driven human tumors. *Frontiers in endocrinology*, 9.

Darling, T. N., Skarulis, M. C., Steinberg, S. M., Marx, S. J., Spiegel, A. M., & Turner, M. (1997). Multiple facial angiofibromas and collagenomas in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Archives of dermatology*, 133(7), 853-857.

de la Fuente-Bartolomé, M., Moreno-Bargueiras, A., Osorio-Silla, I., Martínez-Pueyo, J. I., de la Cruz-Vigo, F., & Gutiérrez-Ashling, L. (2017). Localización intratiroidea de glándulas paratiroides. Presentación atípica del síndrome de neoplasia endocrina múltiple tipo 1. *Cirugía y cirujanos*, 85, 68-71.

DeLellis, R. A., & Mangray, S. (2018). Heritable forms of primary hyperparathyroidism: a current perspective. *Histopathology*, 72(1), 117-132.

- del Pozo, C., García-Pascual, L., Balsells, M., Barahona, M. J., Veloso, E., González, C., & Anglada-Barceló, J. (2011). Parathyroid carcinoma in multiple endocrine neoplasia type 1. Case report and review of the literature. *Hormones (Athens)*, *10*(4), 326-331.
- Domínguez-Gasca, L. G., Mora-Constantino, J., Arellano-Aguilar, G., & Domínguez-Carrillo, L. G. (2014). Neoplasias endocrinas múltiples tipo 1: síndrome de Wermer. *Acta Médica Grupo Ángeles*, *12*(4), 221-222.
- Erdheim, J. (1903). Zur normalen und pathologischen Histologie der Glandula thyreoidea, parathyreoidea und Hypophysis. *Beitr Pathol Anat*, *33*, 158-236.
- Falchetti, A. (2017). Genetics of multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome: what's new and what's old. *F1000Research*, *6*.
- Frost, M., Lines, K. E., & Thakker, R. V. (2018). Current and emerging therapies for PNETs in patients with or without MEN1. *Nature Reviews Endocrinology*, *14*(4), 216.
- Gamboa-Jiménez, T. I., & Juárez-Aguilar, F. G. (2018). Insulinoma multicéntrico asociado a neoplasia endócrina múltiple tipo 1: reporte de un caso. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, *56*(3), 316-319.
- Giudici, F., Cavalli, T., Giusti, F., Gronchi, G., Batignani, G., Tonelli, F., & Brandi, M. L. (2017). Natural history of MEN1 GEP-NET: single-center experience after a long follow-up. *World journal of surgery*, *41*(9), 2312-2323.
- Giusti F, Marini F, Brandi ML. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. 2005 Aug 31 [Updated 2017 Dec 14]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1538/>
- Gordon, M. V., Varma, D., McLean, C. A., Bittar, R. G., Burgess, J. R., & Topliss, D. J. (2007). Metastatic prolactinoma presenting as a cervical spinal cord tumour in multiple endocrine neoplasia type one (MEN-1). *Clinical endocrinology*, *66*(1), 150-152.
- Goudet, P., Dalac, A., Le Bras, M., Cardot-Bauters, C., Niccoli, P., Lévy-Bohbot, N., ... & Vergès, B. (2015). MEN1 disease occurring before 21 years old: a 160-patient cohort study from the Groupe d'étude des Tumeurs Endocrines. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *100*(4), 1568-1577.
- Grajeda, M. G. V., Carreón, C. A. R., Mendoza, A. D. J. M., & Borunda, A. K. D. (2015). Tumores neuroendocrinos: experiencia de 6 años en un centro de tercer nivel. *Gaceta Mexicana de Oncología*, *14*(3), 141-149.
- Hoffmann, K. M., Furukawa, M., & Jensen, R. T. (2005). Duodenal neuroendocrine tumors: classification, functional syndromes, diagnosis and medical treatment. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, *19*(5), 675-697.

JAMA Medical News & Perspectives. (1964). Zollinger-Ellison Syndrome: Investigators Debate the Origin of Pancreatic Tumors. *JAMA*. 189(2), 30.

Hyde, S. M., Cote, G. J., & Grubbs, E. G. (2017). Genetics of multiple endocrine Neoplasia type 1/multiple endocrine Neoplasia type 2 syndromes. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 46(2), 491-502.

Karnik, S. K., Hughes, C. M., Gu, X., Rozenblatt-Rosen, O., McLean, G. W., Xiong, Y., ... & Kim, S. K. (2005). Menin regulates pancreatic islet growth by promoting histone methylation and expression of genes encoding p27Kip1 and p18INK4c. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(41), 14659-14664.

Kim, D. D. (2017). Multifocal Pancreatic Neuroendocrine Tumors in MEN1 Syndrome. *Proceedings of UCLA Healthcare*, 21.

La, P., Yang, Y., Karnik, S. K., Silva, A. C., Schnepf, R. W., Kim, S. K., & Hua, X. (2007). Menin-mediated caspase 8 expression in suppressing multiple endocrine neoplasia type 1. *Journal of Biological Chemistry*, 282(43), 31332-31340.

Larsson, C., Skogseid, B., Öberg, K., Nakamura, Y., & Nordenskjöld, M. (1988). Multiple endocrine neoplasia type 1 gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma. *Nature*, 332(6159), 85-87.

Luzi, E., & Brandi, M. (2011). Are microRNAs involved in the endocrine-specific pattern of tumorigenesis in multiple endocrine neoplasia type 1?. *Endocrine Practice*, 17(Supplement 3), 58-63.

Lemos, M. C., Harding, B., Shalet, S. M., & Thakker, R. V. (2007). A novel MEN1 intronic mutation associated with multiple endocrine neoplasia type 1. *Clinical endocrinology*, 66(5), 709-713.

Lloyd, P. C. (1929). A case of hypophyseal tumor with associated tumor-like enlargement of the parathyroids and islands of Langerhans. *Bull. Johns Hopkins Hosp*, 45(1), 1-14.2.

Lourenço-Jr, D. M., Toledo, R. A., Coutinho, F. L., Margarido, L. C., Siqueira, S. A. C., Santos, M. A. C. G. D., ... & Toledo, S. P. A. (2007). The impact of clinical and genetic screenings on the management of the multiple endocrine neoplasia type 1. *Clinics*, 62(4), 465-470.

Maher, E. R., Neumann, H. P., & Richard, S. (2011). von Hippel–Lindau disease: a clinical and scientific review. *European Journal of Human Genetics*, 19(6), 617.

Makri, A., Bonella, M. B., Keil, M. F., Hernandez-Ramirez, L., Paluch, G., Tirosh, A., ... & Lodish, M. (2018). Children with MEN 1 gene mutations may present first (and at a young age) with Cushing disease. *Clinical endocrinology*.

Malanga, D., De Gisi, S., Riccardi, M., Scrima, M., De Marco, C., Robledo, M., & Viglietto, G. (2012). Functional characterization of a rare germline mutation in the gene encoding the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 (CDKN1B) in a Spanish patient with multiple endocrine neoplasia-like phenotype. *European journal of endocrinology*, 166(3), 551-560.

Marx, S. J., Agarwal, S. K., Heppner, C., Kim, Y. S., Kester, M. B., Goldsmith, P. K., ... & Zhuang, Z. (1999). The gene for multiple endocrine neoplasia type 1: recent findings. *Bone*, 25(1), 119-122.

Marx S. J. Multiple endocrine neoplasia type 1. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8 ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2001:943-66.

Matkar, S., Thiel, A., & Hua, X. (2013). Menin: a scaffold protein that controls gene expression and cell signaling. *Trends in biochemical sciences*, 38(8), 394-402.

Matsuzaki, L. N., Canto-Costa, M. H., & Hauache, O. M. (2004). Cushing's disease as the first clinical manifestation of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) associated with an R460X mutation of the MEN1 gene. *Clinical endocrinology*, 60(1), 142-143.

Mayr, B., Apenberg, S., Rothamel, T., Von Zur Muhlen, A., & Brabant, G. (1997). Menin mutations in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *European Journal of endocrinology*, 137(6), 684-687. PMID: 9437237.

Mendoza-Zubieta, V. y col. Hiperparatiroidismo primario. Experiencia en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 2009. 17:13-20.

Medrano-Guzmán R. y col. Resecabilidad del tumor primario neuroendocrino gastroenterohepático como factor pronóstico de supervivencia. 2011. *Ci Cir*, 79:498-504.

Milne, T. A., Dou, Y., Martin, M. E., Brock, H. W., Roeder, R. G., & Hess, J. L. (2005). MLL associates specifically with a subset of transcriptionally active target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(41), 14765-14770.

McKeeby, J. L., Li, X., Zhuang, Z., Vortmeyer, A. O., Huang, S., Pirner, M., ... & Lubensky, I. A. (2001). Multiple leiomyomas of the esophagus, lung, and uterus in multiple endocrine neoplasia type 1. *The American journal of pathology*, 159(3), 1121-1127.

Milne, T. A., Hughes, C. M., Lloyd, R., Yang, Z., Rozenblatt-Rosen, O., Dou, Y., ... & Hua, X. (2005). Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(3), 749-754.

Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C. D., Tempst, P., & Reinberg, D. (2002). Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates

transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes & development*, 16(4), 479-489.

Norton, J. A., Venzon, D. J., Berna, M. J., Alexander, H. R., Frake, D. L., Libutti, S. K., ... & Jensen, R. T. (2008). Prospective study of surgery for primary Hyperparathyroidism (HPT) in multiple endocrine neoplasia-type 1 (MEN1), and Zollinger-Ellison syndrome (ZES): long-term outcome of a more virulent form of HPT. *Annals of surgery*, 247(3), 501.

Nucleotide Database. [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2005-. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_000011.10; Última actualización: 03 de febrero del 2014. Último acceso: 21 de enero del 2019.

Occhi, G., Regazzo, D., Trivellin, G., Boaretto, F., Ciato, D., Bobisse, S., ... & Pellegata, N. S. (2013). A novel mutation in the upstream open reading frame of the CDKN1B gene causes a MEN4 phenotype. *PLoS genetics*, 9(3), e1003350.

Owens, M., Ellard, S., & Vaidya, B. (2008). Analysis of gross deletions in the MEN1 gene in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Clinical endocrinology*, 68(3), 350-354.

Ouyang, M., Su, W., Xiao, L., Rao, J. N., Jiang, L., Li, Y., ... & Wang, J. Y. (2015). Modulation by miR-29b of intestinal epithelium homeostasis through the repression of menin translation. *Biochemical Journal*, 465(2), 315-323.

Pepe, S., Korbonits, M., & Iacovazzo, D. (2019). Germline and mosaic mutations causing pituitary tumours: genetic and molecular aspects. *Journal of Endocrinology*, 240(2), R21-R45.

Prado-Calleros, H y col.. Paraganglioma timpánico y adenoma hipofisario: ¿una nueva variedad de Neoplasia Endocrina Multiple tipo I? Instituto Mexicano de Otolología y Otoneurología y Hospital Manuela Gea gonzalez. 1998.

Presbyterian, C. Zollinger-Ellison Syndrome: Investigators. doi:10.1001/jama.1964.03070020120056.

Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Zagursky, R. J., ... & Baumeister, K. (1987). A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science*, 238(4825), 336-341.

Raghavan, R., Shah, S., Kondkar, A. A., Dherai, A. J., Desai, D., Chauhan, P., ... & Ashavaid, T. F. (2007). MEN1 935-1G> C splicing mutation in an Indian patient with multiple endocrine neoplasia type 1. *Molecular diagnosis & therapy*, 11(2), 129-131.

Ringrose, L., & Paro, R. (2004). Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 413-443.

- Romanet, P., Mohamed, A., Giraud, S., Odou, M. F., North, M. O., Pertuit, M., ... & Borson-Chazot, F. (2018). UMD-MEN1 Database: An Overview of the 370 MEN1 Variants Present in 1676 Patients From the French Population. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *104*(3), 753-764. DOI: 10.1210/jc.2018-01170.
- Rostomyan, L., Potorac, I., Beckers, P., Daly, A. F., & Beckers, A. (2017, June). AIP mutations and gigantism. In *Annales d'endocrinologie* (Vol. 78, No. 2, pp. 123-130). Elsevier Masson.
- Sakurai, A., Suzuki, S., Kosugi, S., Okamoto, T., Uchino, S., Miya, A., ... & Yamada, M. (2012). Multiple endocrine neoplasia type 1 in Japan: establishment and analysis of a multicentre database. *Clinical endocrinology*, *76*(4), 533-539.
- Sánchez-Aguilera, A., Delgado, J., Camacho, F. I., Sánchez-Beato, M., Sánchez, L., Montalbán, C., ... & García, J. F. (2004). Silencing of the p18INK4c gene by promoter hypermethylation in Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphomas. *Blood*, *103*(6), 2351-2357.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, *74*(12), 5463-5467.
- Schnepp, R. W., Mao, H., Sykes, S. M., Zong, W. X., Silva, A., La, P., & Hua, X. (2004). Menin induces apoptosis in murine embryonic fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(11), 10685-10691.
- Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C. R., ... & Hood, L. E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, *321*(6071), 674.
- Soto-Solis, R y Barreño-Zuñiga, R. Factores relacionados a tumores neuroendocrinos gástricos INCMNSZ. *Revista de Gastroenterología de Mexico*. 2018.
- Stratakis, C. A., Schussheim, D. H., Freedman, S. M., Keil, M. F., Pack, S. D., Agarwal, S. K., ... & Oldfield, E. H. (2000). Pituitary Macroadenoma in a 5-Year-Old: An Early Expression of Multiple Endocrine Neoplasia Type. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *85*(12), 4776-4780.
- Steiner, A. L., Goodman, A. D., & Powers, S. R. (1968). Study Of A Kindred With Pheochromocytoma, Medullary Thyroid Carcinoma, Hyperparathyroidism And Gushing's Disease: Multiple Endocrine Neoplasia, Type 21. *Medicine*, *47*(5), 371-409.
- Sztal-Mazer, S., Topliss, D., Simpson, R., Hamblin, P., Rosenfeld, J., & McLean, C. (2008). Gonadotroph adenoma in multiple endocrine neoplasia type 1. *Endocrine Practice*, *14*(5), 592-594.

Thakker, R. V., Newey, P. J., Walls, G. V., Bilezikian, J., Dralle, H., Ebeling, P. R., ... & Brandi, M. L. (2012). Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *The Journal of clinical endocrinology & metabolism*, 97(9), 2990-3011.

Takita, J., Yang, H. W., Bessho, F., Hanada, R., Yamamoto, K., Kidd, V., ... & Hayashi, Y. (2000). Absent or reduced expression of the caspase 8 gene occurs frequently in neuroblastoma, but not commonly in Ewing sarcoma or rhabdomyosarcoma. *Medical and Pediatric Oncology: The Official Journal of SIOP—International Society of Pediatric Oncology (Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique)*, 35(6), 541-543.

Teitz, T., Lahti, J. M., & Kidd, V. J. (2001). Aggressive childhood neuroblastomas do not express caspase-8: an important component of programmed cell death. *Journal of molecular medicine*, 79(8), 428-436.

Thomas-Marques, L., Murat, A., Delemer, B., Penfornis, A., Cardot-Bauters, C., Baudin, E., ... & Jovenin, N. (2006). Prospective endoscopic ultrasonographic evaluation of the frequency of nonfunctioning pancreaticoduodenal endocrine tumors in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *The American journal of gastroenterology*, 101(2), 266.

Tonelli, F., Fratini, G., Falchetti, A., Nesi, G., & Brandi, M. L. (2005). Surgery for gastroenteropancreatic tumours in multiple endocrine neoplasia type 1: review and personal experience. *Journal of internal medicine*, 257(1), 38-49.

Trouillas, J., Labat-Moleur, F., Sturm, N., Kujas, M., Heymann, M. F., Figarella-Branger, D., ... & Chabre, O. (2008). Pituitary tumors and hyperplasia in multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome (MEN1): a case-control study in a series of 77 patients versus 2509 non-MEN1 patients. *The American journal of surgical pathology*, 32(4), 534-543.

Turner, J. J., Leotlela, P. D., Pannett, A. A., Forbes, S. A., Bassett, J. D., Harding, B., ... & Jackson, C. E. (2002). Frequent occurrence of an intron 4 mutation in multiple endocrine neoplasia type 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(6), 2688-2693.

Underdahl, L. O., Woolner, L. B., & Black, B. M. (1953). Multiple endocrine adenomas: report of 8 cases in which the parathyroids, pituitary and pancreatic islets were involved. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 13(1), 20-47.

Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., ... & Lapidot, T. (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*, 9(2), 267-276.

Vannucci, L., Marini, F., Giusti, F., Ciuffi, S., Tonelli, F., & Brandi, M. L. (2018). MEN1 in children and adolescents: Data from patients of a regional referral center for hereditary endocrine tumors. *Endocrine*, 59(2), 438-448.

van Treijen, M. J., van Beek, D. J., van Leeuwaarde, R. S., Vriens, M. R., & Valk, G. D. (2018). Diagnosing Nonfunctional Pancreatic NETs in MEN1: The Evidence Base. *Journal of the Endocrine Society*, 2(9), 1067-1088.

Velasco-Morales, A.S. Tesis. “Respuesta al tratamiento quirúrgico en pacientes con hiperparatiroidismo primario. Serie de casos”. 2014. Universidad Veracruzana. Registro: R-2013-30001-39.

Vergès, B., Boureille, F., Goudet, P., Murat, A., Beckers, A., Sassolas, G., ... & members of Groupe d'Etude des Nèoplasies Endocriniennes Multiples*. (2002). Pituitary disease in MEN type 1 (MEN1): data from the France-Belgium MEN1 multicenter study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(2), 457-465.

Vijayaraghavan, J., Maggi, E. C., & Crabtree, J. S. (2014). miR-24 regulates menin in the endocrine pancreas. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 307(1), E84-E92. PMID: 24824656.

Wermer, P. (1954). Genetic aspects of adenomatosis of endocrine glands. *The American journal of medicine*, 16(3), 363-371. PMID:13138607

Wermer, P. (1963). Endocrine adenomatosis and peptic ulcer in a large kindred: inherited multiple tumors and mosaic pleiotropism in man. *The American journal of medicine*, 35(2), 205-212. PMID: 14057623.

World Health Organization. (2010). WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy.

Wu, Y., Gao, L., Guo, X., Wang, Z., Lian, W., Deng, K., ... & Zhu, H. (2019). Pituitary adenomas in patients with multiple endocrine neoplasia type 1: a single-center experience in China. *Pituitary*, 1-11.

Yeung SJ, Tung DS. VIPomas. In: Griffing GT, eds. Medscape. Available online. 2014. Accessed 4-25-18.

Zegerman, P., Canas, B., Pappin, D., & Kouzarides, T. (2002). Histone H3 lysine 4 methylation disrupts binding of nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) repressor complex. *Journal of Biological Chemistry*, 277(14), 11621-11624.

10. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. . **Estructura del cromosoma 11 y localización cromosómica del gen *MEN1*.** *Genecards*.

Figura 2. **Estructura cristalográfica de la proteína menina.** UniProtKB-o00255 (MEN1_HUMAN).

Figura 3. **Patrones de expresión génica del gen menina.**

Figura 4. **Vía de acción de menina en los mecanismos de tumorigenesis.**

Figura 5. **Sitios de presentación de manifestaciones clínicas en el espectro de NEM1.**

Figura 6. **Imagen por resonancia magnética de la glándula paratiroidea con adenoma.**

Figura 7. **Corte transversal de Resonancia magnética de múltiples TNEP.**

Figura 8: **Algoritmo de diagnóstico molecular y seguimiento de casos de NEM1.**

Figura 9. **Principales características diagnósticas y clínicas de los 29 pacientes con NEM 1.**

Figura 10. **Algoritmo para el diagnóstico molecular de NEM1.**

Figura11. **Principales características diagnósticas y clínicas de los 29 pacientes con NEM1.**

Figura 12. **Distribución de frecuencias por subtipo de las principales características diagnósticas de NEM1 en los pacientes estudiados.**

Figura 13. **Localización de las mutaciones del gen *MEN1* identificadas en la serie de pacientes con Neoplasia Endocrina Multiple tipo 1.**

Figura 14. **Electroferogramas de la secuencias con presencia de mutación en el *MEN1*.**

Figura 15. **Proporción de pacientes con y sin mutaciones por edad al diagnóstico de la primera manifestación clínica.**

11. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. **Genes que interactúan con *MEN1*.**

Tabla 2. **Tumores del espectro NEM1.**

Tabla 3. **Características de oligonucleótidos utilizados en el análisis de gen *MEN1***

Tabla 4. **Características demográficas generales**

Tabla 5. **Características Moleculares de las mutaciones por caso índice.**

Tabla 6. **Comparación de la edad al diagnóstico entre pacientes con o sin alteraciones en el gen *MEN1* por sexo.**

Tabla 7. **Características clínicas de los pacientes* con NEM1 con y sin mutación.**

Tabla 8. **Diferencias en la edad de diagnóstico entre los casos índice con y sin mutación por características clínicas más frecuentes.**

12. ANEXOS

ANEXO 1. Técnica de toma de muestra de sangre periférica.

1. Identificar visualmente la vena a puncionar.
2. Colocar el torniquete 2 a 3 cm. Por encima del lugar de punción.
3. Palpar la vena (asegurarse de que no pulse, si pulsa es una arteria, Figura A1).
4. Limpiar el área con la torunda con alcohol del centro hacia la periferia.
5. No volver a tocar el área una vez desinfectada.
6. Colocar la aguja alineada con la vena, en un ángulo de 15 grados y con el bisel hacia arriba.
7. Puncionar la vena en lo posible con un solo movimiento directo, único piel y vena.
8. Retirar el torniquete tan pronto comience a fluir la sangre dentro de la jeringa.
9. Retirar la aguja una vez llena la jeringa (10 cc aprox.)
10. Vaciar directamente con la aguja el contenido de la jeringa en dos tubos de EDTA (morado).
11. Coloque un algodón firmemente en el sitio de la venopunción mínimo por 1 minuto.

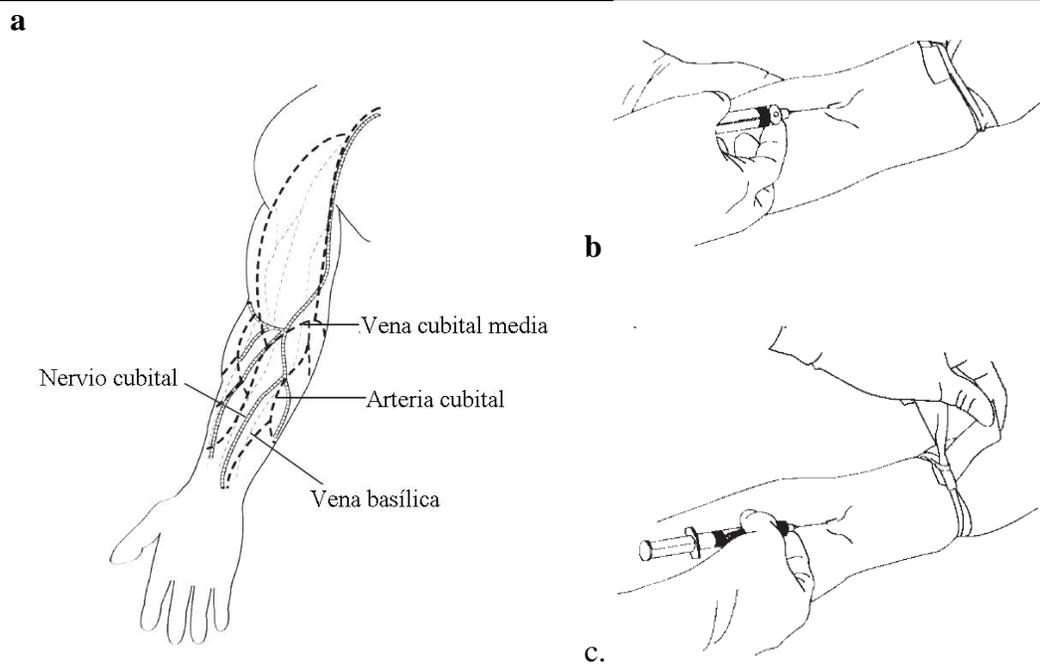


Figura A1: **Imagen ilustrativa de venopunción.** a) estructuras anatómicas del brazo; b) sitio y el ángulo de la venopunción; c) remoción del torniquete. Modificado del *World Health Organization*, 2010.

ANEXO 2. Procedimiento de separación de productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa

Preparación del gel de agarosa al 1.5%

1. Se toma un matraz limpio y se agrega 100 ml de buffer TAE 0.5X (tris-acetato-EDTA).
2. Disolver 1.5 gr de agarosa para obtener concentración del 1.5%.
3. Calentar en horno de microondas aproximadamente 1 a 2 minutos.
4. Agitar hasta disolver la agarosa.
5. Preparar la cámara de electroforesis, con un peine se forman múltiples pozos.
6. Añadir a la solución de agarosa 2 μ L de Bromuro de Etidio para visualización del ADN bajo luz UV.
7. Agregar la solución de agarosa al 1.5% y dejar polimerizar.
8. Polimerizado el gel retirar el peine.

Electroforesis:

1. Llenar la cámara con suficiente TAE 0.5X para cubrir el gel.
2. Conectar los electrodos a la fuente de poder.
3. Realizar la separación de los productos de PCR junto con un marcador de peso molecular de 100 pb.
4. Realizar electroforesis a 100V por 30 minutos.
5. Al término, retirar el gel de agarosa del buffer TAE 0.5X.
6. Colocar el gel en cámara fotográfica bajo luz UV.
7. Capturar imagen en equipo *UVITEC Imaging System* para visualizar amplificadores de interés.

ANEXO 3. Purificación de los productos de reacción de secuencia usando columnas *Centri-Sep*TM

Hidratación de la columna:

1. Se golpea suavemente la columna para que el sefadex llegue al fondo de la columna.
2. Se retira la tapa superior y se adiciona 800 µl de agua bidestilada para reconstituir la columna.
3. Se tapa la columna y se hidrata el gel mediante inversión de la columna o colocándola en el vórtex por un breve momento. Dejando solidificar el gel.
4. Se hidratan las columnas a temperatura ambiental por 30 minutos antes de usarlas.
5. Se eliminan las burbujas de aire de la columna de gel invirtiendo y golpeando ligeramente la columna.
6. Al solidificar el gel y se encuentre libre de burbujas, se retira la tapa de la columna superior y luego la inferior.
7. Se drena el exceso de líquido de la columna (por gravedad) en un tubo limpio de 2 ml.
8. La columna se centrifuga a 2,700 rpm durante 2 minutos para eliminar el líquido intersticial, dos ocasiones seguidas.

Procesamiento de la muestra:

1. Cada muestra se transfiere directamente sobre el centro de la cama de gel en la parte superior de la columna, sin perturbar la superficie del gel.
2. La columna se coloca en un tubo colector limpio (1.5 ml) y se centrifuga durante 2 minutos a 2,700 rpm.
3. Las muestras se desecaron por medio de vacío sin aplicar calor, durante 60 minutos.

ANEXO 4. Purificación de ADN en etanol

Reactivos:

- Acetato de sodio 3M a pH 5.2.
- Glicógeno 20 µg/µL.
- Etanol al 95%.
- Etanol al 70%.
- Solución de rehidratación: Tris-HCL 10mM, EDTA 1mM, pH=8.4

Procedimiento:

1. Por cada 10 µL de muestra agregar 1 µL de acetato de sodio Por cada muestra adicionar 0.25 µL de glicógeno 20 µg/µL.
2. Preparar el mix para “n” reacciones.
3. Agregar 10.25 µL de mix cada 100 µL de muestra a purificar. Homogeneizar.
4. Adicionar 2.5 volúmenes de etanol al 95% por cada volumen de muestra.
5. Centrifugar a 14000 rpm/2 min, descartar el sobrenadante
6. Lavar el botón con 200 µL de etanol al 70%. Mezclar por inversión.
7. Centrifugar a 14,000 rpm durante 1 min. Descartar el sobrenadante Repetir el lavado una vez más.
8. Secar al vacío durante 10 minutos.
9. Rehidratar en solución de rehidratación.

ANEXO 5. Procedimiento para la preparación de reacciones de MLPA.

Reactivos (MLPA® MRC-Holland™):

- MLPA buffer
- MLPA promix *AIP-MENI-CDKN1B*
- Ligasa buffer A
- Ligasa buffer B
- Ligasa 65
- SALSA PCR primer mix.
SALSA Polimerasa

Protocolo para la reacción de MLPA.

1. Desnaturalización de ADN (día 1)
 - a) 5 µL de ADN (20 ng/µL) en tiras de PCR (alternativamente en placa de 48 para un total de 100 ng por reacción).
 - b) Desnaturalizar a 98°C/5 minutos y enfriar a 25°C.
2. Hibridación de ADN (día 1).
 - a) Homogeneizar por vortexeo las soluciones “MLPA probemix” y “MLPA buffer”.
 - b) Preparar el Master Mix de Hibridación (MMH), ver tabla A5.1
 - c) Homogeneizar el MMH por vortexeo.
 - d) Tomar 3 µL del MMH para adicionar a cada una de las muestras desnaturalizadas.
 - e) Someter a una incubación a 95°C/1 min y luego a 60°C/16-20 horas.

Tabla A5.1. **Preparación del MMH.**

| Reactivo | Volumen, µL |
|---------------|-------------|
| MLPA buffer | 1.5 |
| MLPA probemix | 1.5 |
| Total | 3 |

3. Reacción de ligación (día 2)
 - a) Homogeneizar los dos buffers de Ligasa por vortexeo.
Nota: no vortexear a la Ligasa misma, este procedimiento la inhibe.
 - b) Preparar el Master Mix de Ligación (MML):

Tabla A5.2. **Componentes del MML**

| Reactivo | Volumen µL |
|-------------------|------------|
| dH ₂ O | 25 |
| Ligasa buffer A | 3 |
| Ligasa buffer B | 3 |
| Ligasa 65 | 1 |
| Total | 32 |

- c) Homogeneizar suavemente el MML por pipeteo.
- d) Después de la incubación de las muestras a 60°C por el tiempo antes indicado, incubar a 54°C, al alcanzar ésta temperatura añadir a cada una 32 µL del MML y mezclar por pipeteo.
- e) Continuar la incubación a 54°C por 15 minutos, luego inactivar la enzima a 98°C por 5 minutos y detenerla la reacción a 20°C.
Guardar los tubos a 4°C (máximo dejarlos así una semana).

4. Reacción de PCR (Día 2).

- a) Homogeneizar el SALSAS PCR primer mix por vortexeo.
- b) Precalentar en las manos a la polimerasa durante 10 minutos.
- c) Preparar el Master Mix de PCR (MMP):

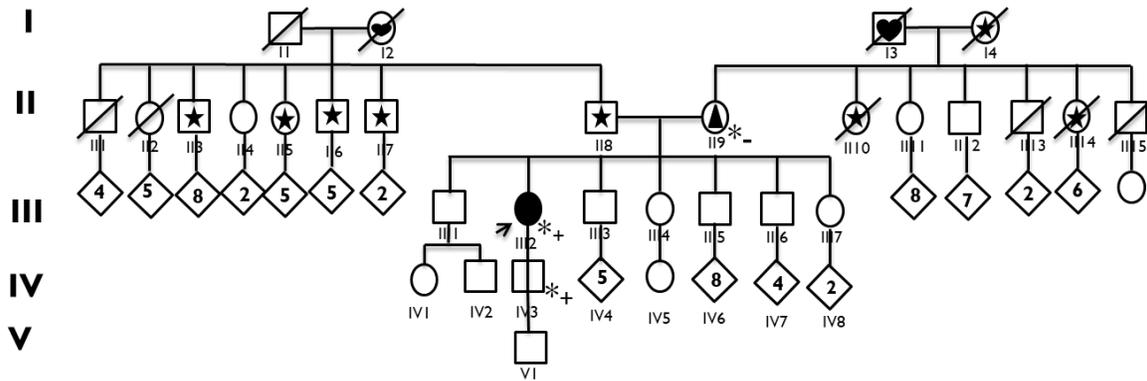
Tabla 8. **Preparación del MMP**

| Reactivo | Volumen µL |
|-----------------------|------------|
| dH ₂ O | 7.5 |
| SALSAS PCR primer mix | 2 |
| SALSAS Polimerasa | 0.5 |
| Total | 10 |

- d) Homogeneizar el MMP suavemente por pipeteo (mantener en hielo hasta su uso).
- e) A temperatura ambiente tomar 10 µL de MMP y añadirlos a cada una de las muestras ligadas. Mezclar por pipeteo suave.
- f) Correr el siguiente programa de PCR: (95°C por 30 Segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos)* 35 ciclos; 72°C por 20 minutos y 15 °C por tiempo indefinido.
- g) Cubrir las reacciones con papel aluminio o meterlos en una caja oscura, guardar a 4°C hasta una semana o a -20°C por más tiempo.

Anexo 6. Genealogías más representativas de las familias.

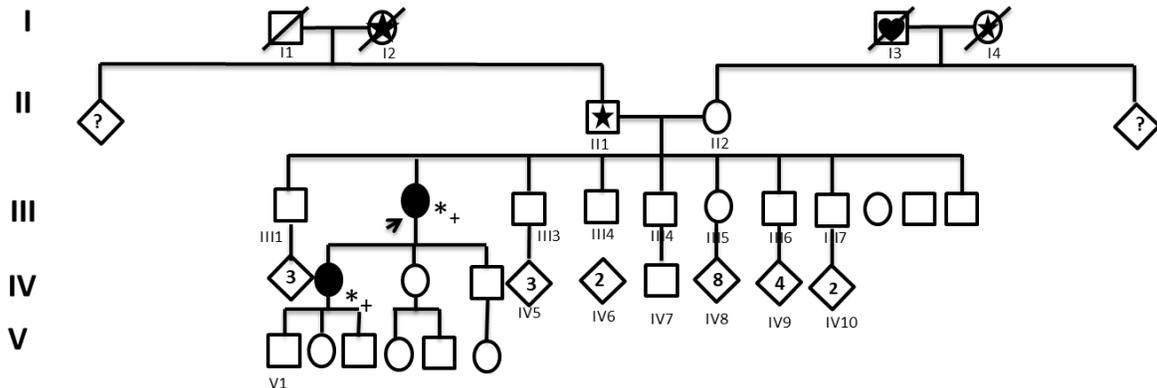
Genealogía 1.



Simbología

- NEM tipo 1
- ★ DM
- ♥ IAM
- ▭ Portador asintomático
- ▲ HAS
- * Variante patógena c.1243C>T (p.Arg415X)

Genealogía 2.



Simbología

- NEM tipo 1
- ★ DM
- ♥ IAM
- * Variante patógena c.765-1G>C

Genealogía 3.

