

# Carcinoma medular de tiroides familiar (CMTF): primera familia descrita con CMTF asociado a la mutación Cys611Trp del proto-oncogen RET\*

Tomás Fernández Gianotti, Patricia Fainstein Day, María Fabiana Russo Picasso, Pablo Knoblovits y Marcelo Figari.

## RESUMEN

La neoplasia endócrina múltiple tipo 2 (NEM 2) es un síndrome autosómico dominante identificado en 500-1.000 familias hasta la fecha. Todas las variantes de NEM 2 muestran una penetrancia mayor al 90% para la manifestación del carcinoma medular de tiroides, mientras que la penetrancia es menor y variable para el feocromocitoma (50%) y tumores paratiroides (25%). El CMTF es una variante rara dentro del NEM 2 en la que cuatro o más miembros de una familia presentan evidencia de carcinoma medular de tiroides sin manifestación asociada de feocromocitoma o hiperparatiroidismo primario. En los últimos años, el estudio genético del proto-oncogen RET en los casos índices para carcinoma medular y en sus posibles portadores se ha impuesto debido a que se ha demostrado que la tiroidectomía en los primeros 2 a 5 años de edad puede prevenir o curar el CMT, inclusive antes de su expresión bioquímica en el NEM 2. La indicación de tiroidectomía profiláctica es menos clara en CMTF. Con respecto a las mutaciones halladas en el proto-oncogen RET (10q11.2) el 80-90% afectan el codón 634, y con menor frecuencia los codones 918 (10-20%), 620 (6-8%), 618 (3-5%), 611 (2-3%) y 609 (0-1%). En este trabajo presentamos una familia portadora de una mutación heterocigota infrecuente en el proto-oncogen RET, Cys611Trp, (sólo un caso previo mencionado en la literatura internacional) que no fue detectada en un estudio genético previo. Se plantean dos posibles conductas en los dos niños asintomáticos, portadores de la mutación. Tiroidectomía preventiva, o la conducta expectante hasta la expresión bioquímica. Basándonos en distintos consensos internacionales, nos inclinaremos por la primera conducta. Rev. Hosp. Ital. B.Aires 2004; 24: 8-11.

**Palabras claves:** CMTF, proto-oncogen RET, codon 611.

## FAMILIAL MEDULLARY THYROID CARCINOMA (FMTC): FIRST FAMILY DESCRIBED WITH FMTC ASSOCIATED TO Cys611Trp MUTATION OFF RET PROTO-ONCOGENE ABSTRACT

Multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN 2) is an autosomal dominant syndrome identified to date in 500-1.000 kindreds. All variants of MEN 2 show a penetrance higher than 90% for medullary thyroid carcinoma (MTC), whilst the penetrance for pheochromocytoma (50%) and parathyroid tumors (25%) is lower and variable. Familial medullary thyroid carcinoma (FMTC) is a rare variant of MEN 2, in which four or more members of a family have MTC without pheochromocytoma or primary hyperparathyroidism. In recent years genetic testing for the proto-oncogene RET mutations in the index case of MTC and in possible carriers has been used, because it has been demonstrated that prophylactic thyroidectomy before 2 – 5 years of age can prevent or cure MTC in MEN 2, even before its biochemical expression. Prophylactic thyroidectomy is not so clearly beneficial in FMTC. Mutations in the proto-oncogene RET (10q11.2) affect codon 634 in 80 – 90%, and less frequently, codons 918 (10-20%), 620 (6-8%), 618 (3-5%), 611 (2-3%) and 609 (0-1%). In this report we describe a family with an infrequent mutation in the proto-oncogene RET, Cys611Trp, (only one case reported in the bibliography). This mutation had not been detected in a previous genetic study, and we discuss herein the clinical management. Two approaches for the 2 asymptomatic young carriers: 1) prophylactic thyroidectomy as soon as the mutation is detected or 2) to wait for a positive stimulated calcitonin test and then perform a thyroidectomy. Studies from an international consortium lead us to believe that an early prophylactic thyroidectomy is the appropriate course of action.

**Key words:** FMTC, proto-oncogen RET, codon 611.

## INTRODUCCIÓN

La neoplasia endócrina múltiple tipo 2 (NEM 2) es un síndrome autosómico dominante identificado en 500-1.000 familias hasta la fecha. Todas las variantes de la NEM 2 muestran una penetrancia mayor al 90% para la manifestación del carcinoma medular de tiroides, mientras que la penetrancia es menor y variable para el feocromocitoma (50%) y tumores paratiroides (25%). El CMTF es una variante rara dentro de la NEM 2 en la que cuatro o más miembros de una familia presentan evidencia de carcinoma medular de tiroides sin manifestación asociada de feocromocitoma o hiperparatiroidismo primario<sup>1</sup>.

Por estudios genéticos de ligamiento en familias bien caracterizadas, el gen responsable fue localizado en el cromosoma 10q11.2, hallándose para la NEM 2 mutaciones activantes en el proto-oncogen RET. Este gen codifica un receptor tirosina quinasa, que tiene 3 dominios. Un dominio extracelular rico en residuos de cisteína, un dominio transmembrana y un dominio intracelular tirosina quinasa. Está ubicado en la superficie de células derivadas de la cresta neural, como las células C parafoliculares de la glándula tiroidea, productoras de calcitonina. Luego de combinarse a un ligando endógeno, este receptor se dimeriza y se autofosforila. Así se inicia una cadena de fosforilaciones que llevan a la activación de factores de transcripción y síntesis proteica que tendrían funciones de crecimiento celular. El ligando fisiológico del receptor es un factor neurotrófico derivado de las células de la glía (FNDG)<sup>2</sup>.

En los últimos años, el estudio genético del proto-oncogen RET en los casos índice para carcinoma medular y en sus posibles portadores se ha impuesto debido a que se ha demostrado que la tiroidectomía en los primeros 2 a 5 años de edad puede prevenir o curar el CMT, inclusive antes de su expresión bioquímica (niveles basales o post-estímulo de calcitonina plasmática) en la NEM 2<sup>3</sup>. La indicación de tiroidectomía profiláctica es menos clara en CMTF.

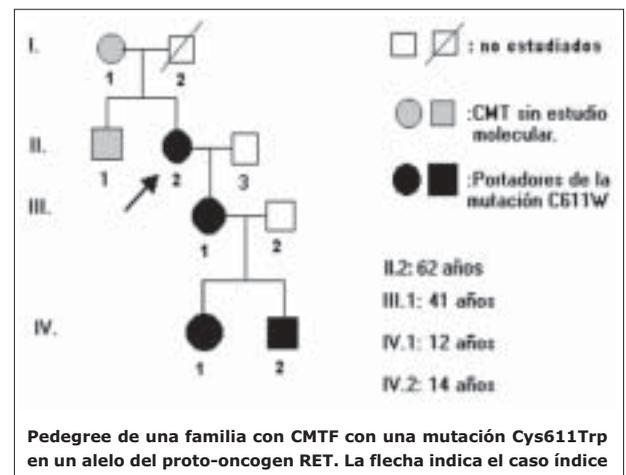
Con respecto a las mutaciones halladas en el proto-oncogen RET, el 80-90% afectan el codón 634, y con menor frecuencia los codones 918 (10-20%), 620 (6-8%), 618 (3-5%), 611 (2-3%) y 609 (0-1%)<sup>4-5</sup>. Distintas técnicas de biología molecular pueden utilizarse para hallar algunas de las mutaciones descriptas, pero sólo la secuenciación completa del proto-oncogen RET permite descartar la presencia de mutaciones.

El objetivo de este trabajo es presentar una familia portadora de una mutación heterocigota infrecuente en el proto-oncogen RET, Cys611Trp, (sólo un caso previo mencionado en la literatura internacional)<sup>6</sup> que no fue detectada en un estudio genético previo que presumiblemente no utilizó el método de secuenciación. Además, se discute la conducta a seguir en portadores asintomáticos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Sujetos:** Se estudió una familia de 9 individuos (4 generaciones) con CMTF (fig. 1). El estudio del caso índice y su descendencia incluyó la historia clínica, examen físico, análisis bioquímicos (calcitonina, hormona paratiroidea medio molecular -PTH-, catecolaminas urinarias) y el estudio molecular del proto-oncogen RET.

**Figura 1.**



**Análisis bioquímicos:** En muestras de suero en ayunas de los pacientes portadores de la mutación y sintomáticos (II.2 y III.1) se dosó calcitoninemia basal (RIA, V.N.: < 15,0 pmol/L) y hormona paratiroidea (PTH) (RIA, V.N.: < 125,0 pg/mL). En muestras de orina de 24 hs de estos pacientes se dosó catecolaminas (HPLC, V.N.: adrenalina: < 8,5mg/24 hs; noradrenalina: 18,5–100,0 mg/24 hs).

**Estudio Molecular:** En ADN genómico extraído de leucocitos de sangre periférica de la paciente caso índice (II.2) se amplificó por PCR los exones 10, 11, 13, 14, 15 y 16 del proto-oncogen RET. El ADN genómico fue extraído utilizando GFX Genomic Blood DNA Purification KIT (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England).

Los primers específicos para amplificar los exones mencionados se muestran en la tabla 1.

Aproximadamente 100 ng de ADN fueron amplificados en el equipo *Mastercycler Personal* (Eppendorf, Hamburg, Germany) en un volumen final de 60 µL que contenía: 1,0 mM de cada primer, 0,25 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl y 3 U Taq polimerasa (*Inbio-Highway*). Para cada exón se realizó una PCR *hot-start*.

**Tabla 1.** Secuencia de los *primers* utilizados para amplificar y secuenciar algunos exones del proto-oncogen RET.

Exón	Primer	Tamaño del producto
10	F: 5' GCGCCCCAGGAGGCTGAGTG 3' R: 5' GGTGGTGGTCCCGGCCGCC 3'	187 bp
11	F: 5' GACACGGCAGGCTGGAGAGC 3' R: 5' CTTGAAGGCATCCACGGAGA 3'	352 bp
13	F: 5' GTGCTGCATTCAGAGAACG 3' R: 5' GGCTGGGTGCAGAGCCATA T 3'	521 bp
14	F: 5' AGCTGCCTGACCCGCACGCC 3' R: 5' GGCTGGGTGCAGAGCCATAT 3'	287 bp
15	F: 5' GACTCGTGCTATTTTCCTC 3' R: 5' GCTTCCCAAGGACTGCCTGC 3'	222 bp
16	F: 5' AGGGATAGGGCCTGGGCTTC 3' R: 5' TAACCTCCACCCAAGAGAG 3'	191 bp

La PCR se realizó en 10 ciclos de 94°C 2 min, 65°C 1 min y 72°C 2 min, seguidos de 31 ciclos de 94°C 1 min, 60°C 1 min y 72°C 2 min, finalizando con una extensión de 7 min a 72°C.

Mediante una electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1,0% en *buffer* TAE, y utilizando bromuro de etidio para su visualización bajo luz U.V., se separaron, y luego se extrajeron los productos amplificados.

Cada uno de los productos extraídos fue secuenciado utilizando dideoxinucleótidos marcados con P<sup>33</sup> (*Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit, USB Corp, Cleveland, USA*). Luego de separar los productos de la secuenciación en PAGE en condiciones desnaturalizantes, se realizó una autorradiografía.

Una vez identificada la mutación Cys611Trp en el caso índice, se realizó el estudio molecular en su descendencia, sujetos III.1, IV.1 y IV.2. De cada uno de ellos se extrajo ADN de leucocitos de sangre periférica y se amplificó y secuenció sólo el exón 10 del proto-oncogen RET.

## RESULTADOS

### Análisis bioquímicos:

Los pacientes estudiados presentaron valores normales de PTH plasmática y catecolaminas urinarias.

En la tabla 2 se observan los valores de calcitoninemia.

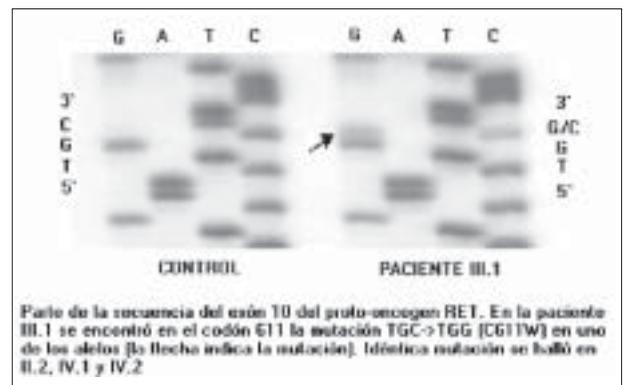
### Estudio molecular:

En el caso índice (II.2) y su descendencia (III.1, IV.1 y IV.2) se halló un alelo mutado del proto-oncogen RET: exón 10, Cys611Trp. (fig. 2).

**Tabla 2.**

Paciente	Edad presentación del tumor	Cirugía	Calcitoninemia (VN: < 15.0 pmol/L)
I.1	aprox. 80 años	No	sin datos
II.1	aprox. 70 años	Sí	sin datos
II.2	60 años	No	70 pmol/L (sin cirugía)
III.1	37 años	Sí	700 pmol/L (post cirugía)
IV.1	—	—	< 3.0 pmol/L
IV.2	—	—	< 3.0 pmol/L

**Figura 2**



## DISCUSIÓN

La mutación Cys611Trp ha sido mencionada previamente en un sólo caso de la literatura internacional<sup>6</sup>, y ésta es la primera familia descrita con esta mutación, en este caso asociada a CMTF.

La técnica de secuenciación de ADN genómico utilizada nos permitió detectarla en los cuatro pacientes estudiados genéticamente, dos de ellos con signos clínicos y bioquímicos de enfermedad (CMT). En un estudio genético previo del caso índice, que presumiblemente se basaría en la detección de mutaciones frecuentes o más conocidas, no se había logrado detectar la mutación genómica aquí descrita. Una de las técnicas utilizadas para detectar mutaciones es la de PCR con digestión con enzimas de restricción (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms, PCR-RFLP*), basada en que la mutación crea o destruye un sitio de corte para la enzima. Considerando las 40 mutaciones teóricamente posibles en los codones 609, 611, 618, 620 y 634, 32 de ellas pueden ser detectadas por PCR-RFLP, para lo que se necesitaría

contar con unas 15 enzimas, quedando otros codones sin explorar. Las 8 mutaciones restantes no crean ni destruyen un sitio de restricción, por lo que no serían detectadas por esta técnica<sup>3</sup>. El gran número de enzimas necesarias para realizar la pesquisa de mutaciones en los codones más frecuentemente mutados, sumado a la baja frecuencia con que se dan las mutaciones en el codón 611 (2-3%), nos hace suponer que no permitieron realizar la detección previa de la mutación Cys611Trp. La secuenciación directa de ADN genómico, si bien es una técnica más laboriosa y costosa que PCR-RFLP, permite detectar cualquier mutación en cualquier codón del gen estudiado.

Por las características clínicas y bioquímicas, se trataría de una familia portadora de CMTF, subsíndrome que según una definición del Consorcio Internacional de mutaciones del gen RET requiere un mínimo de cuatro miembros afectados por CMT, sin evidencias objetivas de feocromocitoma ni hiperparatiroidismo<sup>7</sup>.

El CMTF sería la variante más moderada de la NEM 2. Entre los pacientes rotulados con este diagnóstico es posible que haya sujetos con NEM 2A y baja penetrancia para feocromocitoma e hiperparatiroidismo. Por este motivo, en el 7mo. Congreso Internacional de NEM, se sugirió ampliar la exigencia del número de familiares afectados a diez, contando varios de ellos con más de 50 años de edad<sup>1</sup>. Si bien la evolución clínica sería más benigna en esta variante de la NEM 2, y la conducta quirúrgica temprana o preventiva planteada para el resto de las variantes de la NEM 2, no estaría clara para algunos autores<sup>8</sup>. En el Congreso Internacional mencionado<sup>1</sup> y durante el Consorcio Europeo de NEM (EUROMEN)<sup>9</sup>, no se ha diferenciado la actitud terapéutica

ante estos pacientes, de aquellos portadores de NEM 2A. En cambio, sí se sugieren conductas terapéuticas diferentes basándose en el codón afectado. Los codones serían así clasificados en tres categorías que predecirían la variante sindrómica, la edad de aparición del CMT y su agresividad. Según esta clasificación, los pacientes afectados por mutaciones en el codón 611 (junto a 634, 620 y 610) pertenecerían a la categoría II de tres niveles, sugiriendo riesgo intermedio y recomendándose tiroidectomía total, incluyendo la cápsula posterior, antes de los 5 años de edad en portadores asintomáticos<sup>1,10</sup>.

Por otro lado, es interesante destacar que en el EUROMEN, cuyas conclusiones fueron publicadas en el año 2003, si bien la mayoría de los pacientes incluidos en este estudio portaban mutaciones en el codón 634 (categoría II del 7mo. Congreso Internacional), ninguno de los pacientes con mutaciones en el codón 611 tuvo evidencia de CMT antes de los 5 años de edad, y las metástasis ganglionares raramente se presentaron antes de los 14 años de edad.

La familia estudiada en el presente trabajo parece encuadrar en la definición de CMTF. La observación de la tabla 2 sugiere, a lo largo de las generaciones presentadas, una tendencia a mayor agresividad en el curso de la enfermedad y edad de presentación más temprana. El fenómeno de anticipación genética ha sido previamente relatado en NEM 1<sup>11</sup>.

Si bien los miembros de la cuarta generación son clínicamente asintomáticos y las calcitoninemias basales normales, nuestra postura médica sería la de efectuar tiroidectomía profiláctica basándonos en los estudios de consenso internacional mencionados.

## REFERENCIAS

- Brandi ML, Gagel RF, Angeli A y col. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(12): 5658-71.
- Hansford JR, Mulligan LM. Multiple endocrine neoplasia type 2 and RET: from neoplasia to neurogenesis. *J Med Genet* 2000; 37(11): 817-27.
- Gagel RF, Cote GJ, Martins Bugalho MJ y col. Clinical use of molecular information in the management of multiple endocrine neoplasia type 2A. *J Intern Med* 1995; 238(4): 333-41.
- Eng C, Clayton D, Schuffenecker I y col. The relationship between specific RET protooncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *JAMA* 1996; 276(19): 1575-9.
- Cote GJ, Wohllk N, Evans D y col. RET protooncogene mutations in multiple endocrine neoplasia type 2 and medullary thyroid carcinoma. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1995; 9(3): 609-30.
- Donis-Keller H, Dou S, Chi D y col. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet* 1993; 2(7): 851-6.
- Mulligan LM, Marsh DJ, Robinson BG y col. Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2: report of the International RET Mutation Consortium. *J Intern Med* 1995; 238(4): 343-6.
- Hansen HS, Topping H, Godballe C y col. Is thyroidectomy necessary in RET mutations carriers of the familial medullary thyroid carcinoma syndrome? *Cancer* 2000; 89(4): 863-7
- Machens A, Niccoli-Sire P, Hoegel J y col. Early malignant progression of hereditary medullary thyroid cancer. *N Engl J Med* 2003; 349(16): 1517-25.
- Yip L, Cote GJ, Shapiro SE y col. Multiple endocrine neoplasia type 2: evaluation of the genotype-phenotype relationship. *Arch Surg* 2003; 138(4): 409-16; discussion 416.
- Giraud S, Choplin H, Teh BT, y col. A large multiple endocrine neoplasia type 1 family with clinical expression suggestive of anticipation. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(10): 3487-92.