

DIAGNÓSTICO DEL PROTO- ONCOGÉN RET

EN UNA FAMILIA
TAMAULIPECA CON
UN ANTECEDENTE
POSITIVO DE CÁNCER
MEDULAR DE TIROIDES

Diagnosis of RET proto-oncogene in a family with a history Tamaulipas positive medullary thyroid cancer

Por Méd. Xicoténcatl González-Uresti, Hospital General "Dr. Norberto Treviño Zapata", Ciudad Victoria, Tamaulipas, México; Ph.D Ernesto José Aguirre-Ezkauriatza*, Lic. Johari Salgado-Gallegos y Dr. José Manuel Aguilar-Yáñez, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Centro de Biotecnología Femsa, Laboratorio de Biotecnología 5o. piso, Monterrey, Nuevo León, México; Gerardo Humberto Flores-Gutiérrez, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa Aztlán, Reynosa, Tamaulipas, México.

* Autor responsable: eezkauriatza@itesm.mx

RESUMEN

En este trabajo se presentan los materiales y la metodología utilizada para la búsqueda de la mutación del codón 634 del exón 11 del protooncogén RET del cromosoma 10 en 11 personas, de las cuales 9 son familiares directos de un paciente ya diagnosticado clínica y patológicamente con cáncer medular de tiroides, siendo este el único caso reportado en el estado de Tamaulipas. Se encontró la mutación del codón 634 del exón 11 en el paciente positivo y no se encontró en los 9 familiares, ni en el negativo. Con esto se concluye que sí existe una relación muy estrecha entre el diagnóstico molecular y el diagnóstico clínico, ya que ni los familiares ni el negativo presentan sintomatología de este padecimiento, mientras que el paciente positivo, ya diagnosticado clínica y patológicamente, sí presentó la mutación en el codón 634.

PALABRAS CLAVE: cáncer medular de tiroides (CMT), protooncogén RET, diagnóstico molecular.

ABSTRACT

In this paper we present the materials and the methodology used to search the mutation of codon 634 of exon 11 of RET Protooncogene of chromosome 10 in 11 persons, which 9 are relatives of a patient already diagnosed clinically and pathologically with medullary thyroid carcinoma, and this is the only case reported in the entire state of Tamaulipas. The mutation was found at codon 634 of exon 11 in positive patient, but not was found in the 9 relatives and in the negative. This concludes that if there is a close relationship between the molecular diagnosis and clinical diagnosis, as family members and the negative don't present symptomatology of this disease, while positive patient clinically and pathologically diagnosed if present the mutation at codon 634.

KEYWORDS: medullary thyroid cancer (CMT), RET protooncogene, molecular diagnosis.



Único caso en Tamaulipas diagnosticado clínicamente para el cáncer medular de tiroides y diagnosticado molecularmente el protooncogén RET

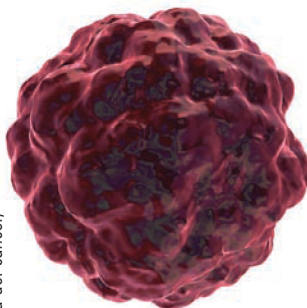
INTRODUCCIÓN

El cáncer medular de tiroides (CMT) es un tipo de cáncer tiroideo que ocurre en las células parafoliculares o células C que producen la hormona calcitonina y comprende entre el 3 % y 5 % de todos los cánceres tiroideos. El National Cancer Institute de los Estados Unidos publicó que aproximadamente un 25 % de los casos de cáncer medular de la tiroides ocurre en familias y recibe el nombre de CMT familiar y un 70 % ocurre sin ser hereditario y recibe el nombre de CMT esporádico. Cuando coexiste con tumores de la glándula paratiroides y con componentes medulares de las glándulas suprarrenales recibe el nombre de neoplasia endocrina múltiple tipo 2 o MEN2 (por sus siglas en inglés). Gracias a los avances biotecnológicos, se ha detectado una serie de mutaciones de la línea germinal, que es la responsable del desarrollo de esta enfermedad, conocido como protooncogén RET (Rearranged During Transfection, por sus siglas en inglés), el cual se encuentra localizado en el cromosoma 10q11.21 (Brandi *et al.*, 2001; Real *et al.*, 2005). El protooncogén RET es responsable del desarrollo de múltiples enfermedades, tanto hereditarias como no hereditarias. Las mutaciones han sido localizadas en MEN2 tipos A y B, así como en el CMT familiar y esporádico. Alrededor de un 45 % de las mutaciones se

Una de las ventajas del diagnóstico molecular es la de poder anticipar el desarrollo del padecimiento, aun si este no es sintomático en el paciente

presentan en el CMT esporádico, siendo ampliamente de apoyo para el diagnóstico molecular (Elisei, 2009). Estas mutaciones inducen la activación oncogénica del RET tirosín quinasa por factores neurotróficos en el que destaca el factor derivado de células gliales (GDNF, por sus siglas en inglés) (Jing *et al.*, 1996; Airaksinen y Saarna, 2002). Las mutaciones más comunes encontradas son en los codones 609, 611, 618 y 620 en el exón 10 y en los codones 630, 634 y 666 del exón 11 (Belli *et al.*, 2003; Muzza *et al.*, 2010). Estudios más recientes también han encontrado mutaciones asociadas al CMT esporádico en el exón 8 en los codones 510, 511 y 531 (Muzza *et al.*, 2010). A nivel mundial se reportan 1000 casos anuales de CMT, tanto familiar como esporádico, al igual que en los Estados Unidos de América, según el National Cancer Institute de ese país. En México es una patología poco común. En el 2001 solo 4 casos fueron reportados como CMT (Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología), siendo esta situación la que provoca que se realice su diagnóstico por medios convencionales que representan métodos invasivos, de muy alto costo económico y, por consecuencia, muy poca información sobre el diagnóstico molecular de este padecimiento en México. Una de las ventajas del diagnóstico molecular es la de poder anticipar el desarrollo del padecimiento, aun si este no es sintomático en el paciente; en este caso, el uso de *primers* para múltiples exones reduce el costo y amplía la estrategia de diagnóstico (Bergant y Hocevar, 2003; y Kouvaraki *et al.*, 2005). En el estado de Tamaulipas, hasta la fecha, se ha detectado solo el caso de una paciente de sexo femenino, de 48 años de edad, originaria del estado y radicada en el municipio de Padilla. En este artículo se pretende realizar un diagnóstico rápido y anticipado en 9 miembros de la familia de la paciente, utilizando técnicas moleculares para localizar mutaciones en los exones 10 y 11 del cromosoma 10, entre las cuales estarán PCR y secuenciación. Cabe mencionar la gran relevancia de este trabajo pues es el único caso diagnosticado clínicamente para el cáncer medular de tiroides y diagnosticado molecularmente el protooncogén RET.

Fuente: <http://medtempus.com/archivos/los-7-signos-de-alarma-del-cancer/>



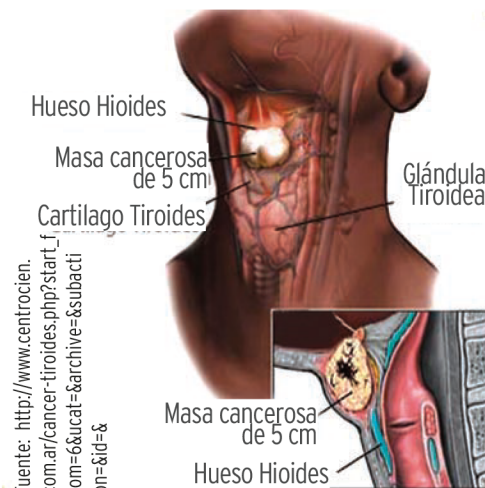
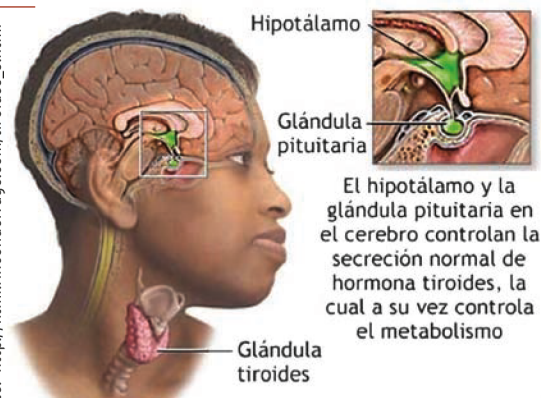
MATERIAL Y MÉTODOS

Diagnóstico clínico de cáncer medular de tiroides. Una paciente de sexo femenino, de 48 años de edad, es referida a consulta de endocrinología por tumoración en cara anterior del cuello de 6 meses de evolución (ella lo descubrió en forma espontánea) y, a descripción de la paciente, de crecimiento muy lento. No tiene antecedentes heredofamiliares de importancia para su padecimiento actual, niega toxicomanías y su actividad laboral la desempeña como ama de casa. Se solicitó perfil tiroideo y se programó para biopsia por aspiración con aguja fina del tiroides (BAAF). Se pide un reporte de perfil tiroideo normal y se realiza BAAF, incluyendo e identificando ganglios cervicales; a su vez, se solicita determinación de calcitonina basal.

Muestras de sangre. Para el presente estudio se tomaron muestras de sangre periférica de 9 personas, las cuales fueron: 1 caso positivo, que de aquí en adelante se nombrará positivo en algunas figuras, con base en su diagnóstico clínico y patológico; 1 caso sin antecedentes como negativo; y 9 familiares directos del caso positivo. Se utilizaron tubos Vacutainer® BD® (EUA), con EDTA de 5 mililitros (ml).

Extracción de DNA. Se utilizó un kit UltraClean® Blood DNA Isolation de la marca MoBio Laboratoires® (EUA) para la extracción de ADN

Fuente: http://html.rincondelvago.com/tiroides_3.html



Fuente: http://www.centrocien.com.ar/cancer-tiroides.php?start_from=6&ucat=&archive=&subacti on=&id=&

de sangre periférica de cada uno de los familiares, así como del paciente positivo y del control negativo; una vez extraído el ADN, se cuantificó con un equipo de espectrofotometría Nanodrop® 1000 de la marca Thermo® Scientific (EUA).

PCR. Se realizaron las pruebas de PCR, utilizando los *primers* F_POR_1 CAGCATTGTTGGGG-GACAC y R_POR_1 AGGAGTAGCTGACCGGAAG (Radian *et al.*, 2007) para amplificación simple de los exones 10 y 11 con un número de pares de bases de 1107, con un kit de amplificación GoTaq® Green Master Mix de Promega® (EUA), utilizando 50 microlitro (ng) de ADN y se corrieron las muestras en un termociclador Axygen® modelo Maxygene® (EUA), con 1 ciclo de 95, 9 minutos; 40 ciclos de 95, 30 segundos; 57, 1 minuto; y 72, 2 minutos; finalizando con un ciclo de 72, 6 minutos y enfriando a 4 por tiempo indefinido. Cabe mencionar que el protocolo se estandarizó en el Laboratorio del Centro de Biotecnología Femsa, ya que el recomendado por Radian *et al.* (2007) no aplicó con este equipo. Una vez finalizado, se corrieron los geles de agarosa al 1% en un equipo de electroforesis de la marca Biorad® modelo Power Pac HC (EUA) y se dejaron por 35 minutos; posteriormente se observaron los geles en un fotodocumentador de la marca Biorad® modelo Universal Hood II® (EUA). Ya observadas las

bandas específicas, se procedió a cortarlas para ser purificadas y proceder con la elaboración de plásmidos para su secuenciación.

Plásmidos. Una vez cortados los geles, se procedió a purificar las amplificaciones utilizando un kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System®, Promega® (EUA), agregando el corte del gel en un tubo de 1.5 ml e incubándolo a 60 hasta que el gel quedó completamente disuelto y de ahí se procedió con el protocolo descrito por el fabricante. Purificada la fracción, se utilizó un kit pGEM®-T Easy Vector System® Promega® (EUA). Ya estando formados los plásmidos, se utilizó un equipo de electroporación modelo Gene Pulser Xcell® de la marca Biorad® (EUA), utilizando células competentes de *E. coli* cultivadas en placas con agar LB de la marca Sigma® (EUA) y ampicilina, seleccionando las colonias mediante punción y aislándolas en tubos individuales para luego ser enviadas a los laboratorios ETON Bioscience (EUA) para su secuenciación.

Análisis de secuenciación. Terminada la secuenciación se analizaron mediante un paquete computacional Sequencer Scanner® de Applied Biosciences® (EUA), haciendo la búsqueda correspondiente en cada una de las muestras para localizar la presencia del codón 634 mutado.

RESULTADOS

Diagnóstico clínico. A la exploración física solo datos positivos en cuello con tiroides aumentado de volumen multinodular y ganglios de cadenas cervicales hipertróficos, clínicamente eutiroides. El resultado de BAAF da un reporte de patología positivo para cáncer medular de tiroides con extensión a ganglios. En cuanto al reporte de calcitonina se encuentra un aumento muy significativo, siendo este de 5414 pg/ml (normal de 0-4 pg/ml). Ya con el resultado de patología se realiza tiroidectomía total con exploración de cuello, corroborando diagnóstico de cáncer medular del tiroides con metástasis a ganglios de cadena cervical lateral.

Muestras de sangre. Se tomaron muestras de sangre periférica de 11 personas, las cuales fueron: el paciente positivo; una persona sin antecedentes de este tipo de cáncer, tomándose como negativo; y 9 familiares directos del paciente positivo, siendo estos 2 hermanas directas, 3 hijos y 4 nietos, como se ven en la figura 1. Estas muestras se tomaron en el Hospital General de Ciudad Victoria, Tamaulipas, México, con el consentimiento de los adultos para las muestras de los menores. Tomadas las muestras, estas fueron entregadas directamente en el

EXÓN	CODÓN	AMINOÁCIDO	BASES	TIPO	%
10	609	Cys a Arg	TGC a CGC	MEN2A/FMTC	0-1
		Cys a Gly	TGC a GGC		
		Cys a Tyr	TGC a TAC		
	611	Cys a Ser	TGC a AGC	MEN2A/FMTC	2-3
		Cys a Arg	TGC a CGC		
		Cys a Tyr	TGC a TAC		
		Cys a Phe	TGC a TTC		
		Cys a Trp	TGC a TGG		
	618	Cys a Ser	TGC a AGC	MEN2A/FMTC	3-5
		Cys a Arg	TGC a CGC		
		Cys a Gly	TGC a GGC		
		Cys a Tyr	TGC a TAC		
		Cys a Phe	TGC a TCC		
	620	Cys a Phe	TGC a TTC	MEN2A/FMTC	06-8
		Cys a Ser	TGC a AGC		
Cys a Arg		TGC a CGC			
Cys a Gly		TGC a GGC			
Cys a Tyr		TGC a TAC			
Cys a Ser		TGC a TCC			
Cys a Trp		TGC a TGG			
11	630	Cys a Tyr	TGC a TAC	MEN2A/FMTC	0-1
		Cys a Ser	TGC a TCC		
		Cys a Phe	TGC a TTC		
634	Cys a Ser	TGC a AGC	MEN2A	80-90	
	Cys a Arg	TGC a CGC			
	Cys a Gly	TGC a GGC			
	Cys a Tyr	TGC a TAC			
	Cys a Ser	TGC a TCC			
	Cys a Trp	TGC a TGG			

TABLA 1

Mutaciones más comunes en los exones 10 y 11 del protooncogén RET, (MEN2A, neoplasia múltiple endocrina, por sus siglas en inglés; FMTC, cáncer medular de tiroides familiar, por sus siglas en inglés).



FIGURA 1

Diagrama en forma de árbol genealógico, donde se representan a los familiares del paciente diagnosticado con CMT, representando en rojo al paciente con CMT y en negro a los familiares y al negativo que no presentan signos clínicos de la enfermedad.

En México, el CMT es una patología poco común; en el 2001 solo se reportaron 4 casos (Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología)

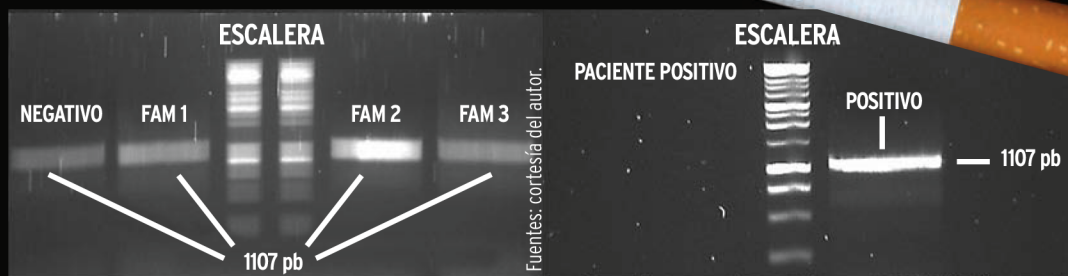


FIGURA 2

Geles representativos utilizados para la purificación y elaboración de plásmidos.

Centro de Biotecnología Femsa del Tecnológico de Monterrey por uno de los familiares, donde se trabajó en la extracción del ADN con los kits antes mencionados.

PCR. Se hicieron las pruebas de PCR conforme al protocolo antes mencionado, corriendo los geles de agarosa al 1 % y cortando después las bandas que correspondían a los 1107 pares de base (pb), para purificarlas y posteriormente pasarlas a plásmidos para su secuenciación, en la cual se buscó la mutación correspondiente al codón 634 del exón 11. Se han reportado otras

mutaciones en otros codones tal como se ve en la tabla 1.

Los resultados de algunas de las corridas se muestran en la figura 2, donde se observan las bandas correspondientes a 1107 pb que, a su vez, corresponden a los exones 10 y 11 del cromosoma 10. Se observa en el gel de la parte superior al paciente positivo y se observa el gel de la parte inferior al negativo y algunos familiares.

Las extracciones y los geles se corrieron por triplicado, dando con esto validez y repetitividad al protocolo antes mencionado.

Plásmidos. Se utilizó el método de plásmidos con la idea de mantener más estable el producto de PCR. Se electroporaron células competentes de *E. coli* con los plásmidos correspondientes a cada muestra por triplicado. Luego se cultivaron las células en placas con agar LB y ampicilina, seleccionando clonas y aislándolas para ser enviadas a secuenciar.

Análisis de secuenciación. Una vez teniendo las secuencias se procedió a analizarlas, buscando una de las mutaciones mencionadas en la tabla 1, la que corresponde en el codón 634. Las

muestras del negativo y de los familiares no presentaron la mutación en el codón 634, no siendo así en el paciente positivo, como se muestra en la figura 3. Se ve cómo se cambia TGC/CGC, Cys-Arg, mientras que en los familiares y en el control negativo no presentan esa mutación. Todas las pruebas se hicieron por triplicado, a excepción del positivo, del cual se hicieron alrededor de 10 secuenciaciones, presentándose en todas la mutación y con esto dar mayor robustez al trabajo y validar los resultados.

CONCLUSIONES

Una vez obtenidos los resultados se llegó a las siguientes conclusiones: es posible amplificar mediante métodos moleculares convencionales la región correspondiente a los exones 10 y 11 del cromosoma 10, que son dos de los principales y con mayor evidencia científica de la presencia de las mutaciones en el protooncogén RET; también existe una estrecha relación entre los resultados moleculares y los clínicos, mencionando que los familiares del paciente positivo no presentaron la mutación en el codón 634 y, a su vez, no presentan signos clínicos del padecimiento, contrario al paciente positivo en el que sí se encontró la mutación del codón 634 y, a su vez, ya se diagnosticó positivo clínica y patológicamente. Actualmente, en países del continente europeo se utilizan mucho las técnicas moleculares para el diagnóstico de este tipo de enfermedades. Cabe mencionar que en México no es válido utilizarlas como método de diagnóstico final, pero nosotros sí recomendamos ampliamente el uso de estas técnicas como un método informativo rápido, sobre todo en familiares directos de algún caso clínicamente detectado, ya que se pueden evitar procedimientos costosos, invasivos y dolorosos en personas que quizá no presenten este tipo de cáncer o, de lo contrario, hacer un informe preliminar hacia algún posible caso positivo de esta

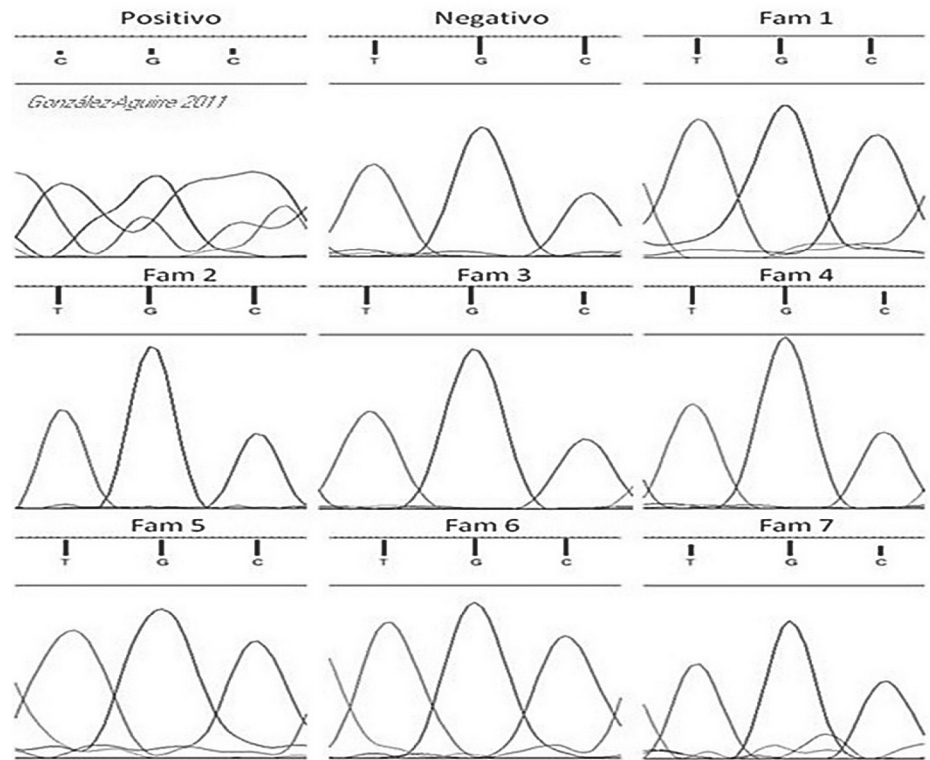


FIGURA 3

Resultados comparativos del paciente positivo con familiares, presentando la mutación del codón 634. Es evidente que el paciente positivo presenta la mutación CGC/TGC, Cys-Arg, en comparación con el negativo y algunos de los familiares.

enfermedad. Cabe reiterar la importancia de este trabajo por ser un caso único en el estado de Tamaulipas, que ha sido diagnosticado, tanto clínica como patológicamente, y ahora molecularmente mediante la búsqueda de esta mutación en el protooncogén RET.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a la Dirección del Laboratorio

del 5o. piso del Centro de Biotecnología Fems del Tecnológico de Monterrey por su amable cooperación con el préstamo de los equipos para el desarrollo óptimo del presente trabajo. Agradecemos de una manera muy especial a todos los familiares por su donación de sangre para este trabajo. Agradecemos también al Dr. Manuel Zertuche Guerra y al Dr. Mario Álvarez por apoyar con recursos para el desarrollo de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Airaksinen, M. y Saarma, M. (2002). "The GDNF family: Signalling, biological functions and therapeutic value", en *Nat Rev Neurosci*. 3: 383-394.
 Belli, S., Storani, M., Dourisboure, R., Podestá, E. y Solano, A. (2003). "Study of RET protooncogene in multiple endocrine neoplasm 2A and in familial medullary thyroid carcinoma. Clinical pathological findings in asymptomatic carriers", en *Medicina Buenos Aires*. 63(1): 41-45.
 Bergant, D. y Hocevar, M. (2003). "Medullary thyroid carcinoma. Genetic screening and prophylactic thyroidectomies", en *Acta Chir Iugosl*. 50(3): 121-124.
 Brandi, M. *et al.* (2001). "Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2", en *J Clin Endocrinol Metab*. 86(12): 56, 58-71.
 Elisei, R. (2009). "Cell neoplasia", en *Endocrine*

Abstracts. 20: S20.1.

Jing, S. *et al.* (1996). "GDNF-induced activation of the Ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-a, a novel receptor for GDNF", en *Cell*. 85: 1113-1124.
 Kouvaraki, M., Shapiro, S., Perrier, N., Cote, G., Gagel, R. y Hoff, A. (2005). "RET proto-oncogene: a review and update of genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid cancer and associated endocrine tumors", en *Thyroid*. 15(6): 531-544.
 National Cancer Institute. (s. f.) "Cáncer de la tiroides: tratamiento (PDQ®)". [En línea]. Disponible en: (www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/tiroides/patient). Fecha de consulta: marzo de 2011.
 Muzza, M. *et al.* (2010) "Four novel RET germline variants in exons 8 and 11 display oncogenic

potential in vitro", en *Journal of Endocrinology*. 162: 771-777.

Radian, S., Badiu, C., Capatina, C., Coculescu, M., Grigorescu, F. (2007). "Molecular diagnosis of multiple endocrine neoplasia (men) type 2a: implementation of mutation detection in ret oncogene and challenges in the management of affected individuals", en *Acta Endocrinológica*. 3(1): 13-22.
 Real, S., Gómez, L., Perinetti, H., Mayorga, L., Pusiol, E. y Roque, M. (2005). "Detección de una mutación no estándar en el protooncogén RET por mutagenesis dirigida", en *Medicina Buenos Aires*. 65: 41-46.
 Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología. (2001). Casos reportados como CMT. [En línea]. Disponible en: (<http://www.endocrinologia.org.mx/v2/paginas/index.php>).