Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo Vol 41 • No. 1
Copyright © 2004 por la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo

TRABAJO ORIGINAL 1ER PREMIO A COMUNICACIONES LIBRES ENTREGADO EN EL XIII CONGRESO DE LA SAEM

Carcinoma medular de tiroides familiar (CMTF): Primera familia descripta con CMTF asociado a la mutación Cys611T rp del protooncogen RET .

Familial Medullary Thyroid Carcinoma (FMTC): First family described with FMTC associated to Cys611Trp mutation of proto-oncogen RET .

Fernández Gianotti, T. [1]; Fainstein Day, Patricia [1]; Russo Picasso, María Fabiana [1]; Knoblovits, P.[1]; Figari, M. [2]

Servicio de Endocrinología, Metabolismo y Medicina Nuclear [1], y Servicio de Cirugía [2], Hospital Italiano de Buenos Aires.

Resumen

La neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (NEM 2) es un síndrome autosómico dominante identificado en 500-1000 familias hasta la fecha. Todas las variantes de NEM 2 muestran una penetración mayor al 90% para la manifestación del carcinoma medular de tiroides, mientras que la penetración es menor y variable para el feocromocitoma (50%) y tumores paratiroideos (25%). El CMTF es una variante rara dentro de NEM 2 en la que 4 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 protooncogen 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 (niveles basales o postestímulo de calcitonina plasmática) en NEM 2. La indicación de tireoidectomía profiláctica es menos clara en CMTF. Con respecto a las mutaciones halladas en el protooncogen 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 protooncogen RET, Cys611Trp, (sólo un caso previo mencionado en la literatura internacional) que no fue detectada en un estudio genético previo, que presumiblemente no utilizó el método de secuenciación, en la que se discute la conducta a seguir en portadores asintomáticos.

Se plantean 2 posibles conductas en los 2 niños asintomáticos, portadores de la mutación. Tiroidectomía preventiva, o la conducta expectante hasta la expresión bioquímica. Basándonos en distintos consensos internacionales, nos inclinaríamos por la primera conducta.

Dirección Postal: Bioq. Tomás Fernández Gianotti. Servicio de Endocrinología, Metabolismo y Medicina Nuclear. Hospital Italiano, Gascón 450. Capital Federal. Tel: 4959-0200 int: 8232/8320 - Fax: 4959-0323
E-mail: tomas.gianotti@hospitalitaliano.org.ar
Palabras clave: CMTF, Protooncogen RET, Codón 611
Key words: FMTC, Proto-oncogen RET, Codon 611

Abstract

Multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN 2) is an autosomal dominant syndrome identified to date in 500-1000 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 4 o more members of a family have MTC without pheochromocytoma or primary hyperpathyroidism. 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 it developes any biochemical expression (basal or post-stimulus plasmatic calcitonin levels). 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 proto-oncogene RET, Cys611Trp, (only one case reported in the bibliography). This mutation had not been detected in a previous genetic study, presumably DNA sequencing was not used, and we discuss herein the clinical management of the asymptomatic carriers.

Two approaches are available for the 2 asymptomatic young carriers: 1) to perform prophylactic thyroidectomy as soon as the mutation is detected or 2) to wait for a positive result in the stimulated calcitonin test and then perform a thyroidectomy. Studies from an international consortium lead us to believe that an early prophylactic thyroidectomy is the appropiate course of action.

Introducción

La neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (NEM 2) es un síndrome autosómico dominante identificado en 500-1000 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 penetración es menor y variable para el feocromocitoma (50%) y tumores paratiroideos (25%). El CMTF es una variante rara dentro de NEM 2 en la que 4 o más miembros de una familia presentan evidencia de carcinoma medular de tiroides sin manifestación asociada de feocromocitoma o hiperparatiroidismo primario [1].

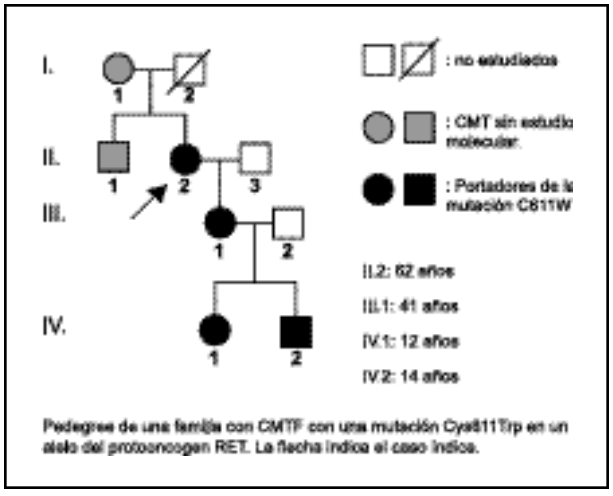
En los últimos años, el estudio genético del proto-oncogen RET en los casos índices para carcinoma medular y en sus posibles portadores se ha impuesto debido a que se ha demostrado que la tiroidectomía en los primeros 2 a 5 años de edad puede prevenir o curar el CMT, inclusive antes de su expresión bioquímica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

Con respecto a las mutaciones halladas en el protooncogen 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%) [3,4]. Distintas técnicas del laboratorio de biología molecular pueden utilizarse para hallar algunas de las mutaciones descriptas, pero sólo la secuenciación completa del protooncogen RET permite descartar la presencia de mutaciones.

El objetivo de este trabajo es presentar una familia portadora de una mutación heterocigota infrecuente en el protooncogen RET, Cys611Trp, (sólo un caso previo mencionado en la literatura internacional) [5] 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, PTH, catecolaminas urinarias) y el estudio molecular del protooncogen RET.



Pedegree de una familia con CMTF con una mutación Cys611Trp en un alelo del protooncogen RET. La flecha indica el caso índice.

Figura 1.

Análisis bioquímicos: Se dosó calcitoninemia basal (RIA, V.N.: < 15.0 pmol/l) y PTH (RIA, V.N.: < 125.0 pg/ml) en muestras de suero en ayunas de los pacientes portadores de la mutación, sintomáticos (II.2 y III.1) y asintomáticos (IV.1 y IV.2). En muestras de orina de 24 hs de los pacientes portadores sintomáticos se dosó catecolaminas (HPLC, V.N.: Adrenalina: < 8.5µg/24hs; Noradrenalina: 18.5-100.0 µg/24hs).

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 protooncogen RET. El ADN genómico fue extraído utilizando GFX Genomic Blood DNA Purification KIT (Amersham Bioscience).

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) en un volumen final de 60 µl que contenía: 1.0 mM de cada "primer", 0.25 mM dNTPs, 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl y 3 U Taq polimerasa (Inbio-Highway). Para cada exón se realizó una PCR hot-start.

La PCR se realizó en 10 ciclos de 94ºC 2 min, 65ºC 1 min y 72ºC 2 min, seguidos de 31 ciclos de 94ºC 1 min, 60ºC 1 min y 72ºC 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 P33 (Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham Bioscience). 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 IV2. De cada uno de ellos se extrajo ADN de leucocitos de sangre periférica y se amplificó y secuenció sólo el exón 10 del protooncogen 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´ GTGCTGCATTTCAGAGAACG 3´ R: 5´ GGCTGGGTGCAGAGCCATAT 3´	521 bp
14	F: 5´ AGCTGCCTGACCCGCACGCC 3´ R: 5´ GGCTGGGTGCAGAGCCATAT 3´	287 bp
15	F: 5´ GACTCGTGCTATTTTTCCTC 3´ R: 5´ GCTTCCCAAGGACTGCCTGC 3´	222 bp
16	F: 5´ AGGGATAGGGCCTGGGCTTC 3´ R: 5´ TAACCTCCACCCCAAGAGAG 3´	191 bp

Tabla 1. Secuencia de los "primers" utilizados para amplificar y secuenciar algunos exones del protooncogen RET.

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	Si	sin datos
II.2	60 años	No	70 pmol/L (sin cirugía)
III.1	37 años	Si	700 pmol/L (post cirugía)
IV.1	-----	-----	< 3.0 pmol/L
IV.2	-----	-----	< 3.0 pmol/L

Tabla 2.

Resultados

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

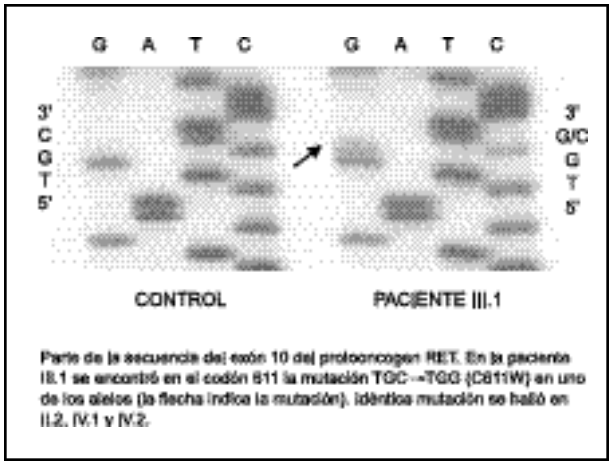
En la tabla 2 se observan los valores de calcitoninemia.

Estudio molecular: En el caso índice (II.2) y su descendencia (III.1, IV.1 y IV.2) se halló un alelo mutado del protooncogen RET: exón 10, Cys611Trp. (Fig. 2)

Discusión

La mutación Cys611Trp ha sido mencionada previamente en un solo caso de la literatura internacional [5], y ésta es la primera familia descripta 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 descripta. Una de las técnicas utilizadas para detectar mutaciones es la de PCR con digestión con enzimas de restricción (PCR-RFLP), basada en que la mutación crearía o destruiría 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 [2]. 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.



Parte de la secuencia del exón 10 del protooncogen RET. En la paciente III.1 se encontró en el codón 611 la mutación TGC→TGG (C611W) en uno de los alelos (la flecha indica la mutación). Idéntica mutación se halló en II.2, IV.1 y IV.2.

Figura 2.

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 4 miembros afectados por CMT, sin evidencias objetivas de feocromocitoma ni hiperparatiroidismo [6].

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

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 incluídos 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.

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 [10].

Si bien los miembros de la cuarta generación son clínicamente asintomáticos y las calcitoninemias basales normales (los padres no han dado aún autorización para el estudio del estímulo de la secreción de calcitonina posterior a la infusión de calcio), nuestra postura médica sería la de efectuar tiroidectomía profiláctica basándonos en los estudios de consenso internacional mencionados.

Bibliografía

1. Brandi, M.L.; Gagel, R.; Angeli, A. y col. Consensus: Guidelines for Diagnosis and Therapy of MEN Type 1 and Type 2. J Clin Endocrinol Metab. 2001; 86 (12): 5658-5671.
2. Gagel, R.F.; Cote, G.J.; Bugalho, M.J. y col. Clinical use of molecular information in the managment of multiple endocrine neoplasia type 2A. Journal of Internal Medicine 1995; 238: 333-341.
3. Eng, C.; Clayton, D.; Schuffenecker, I. y col. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in Multiple Endocrine Neoplasia Type 2: International RET Mutation Consortium Analysis. JAMA. 1996; 276: 1575-1579.
4. Cote, G.; Wohllk, N.; Evans y col. RET proto-oncogen mutations in multiple endocrine neoplasia type 2 and medullary thyroid carcinoma. Bailliere's Clin Endocrinol Metab. 1995; 9: 609-629.
5. Donis-Keller , H.; Dou, S.; Chi, D. y col. Mutations in the RET proto-oncogen are associated with MEN 2A and FMTC. Human Molecular Genetics. 1993; 2: 851-856.
6. Mulligan, L.; Marsh, D.; Robinson, B. y col. Genotype-phenotype correlation in Multiple Endocrine Neoplasia Type 2: report of the International RET Mutation Consortium. J Intern Med 1995; 238: 343-346.
7. Hansen, H.; Torring, H.; Godballe, C. y col. Is Thyroidectomy Necesary in RET Mutations Carriers of the Familial Medullary Thyroid Carcinoma Syndrome? Cancer. 2000; 89(4): 863-867
8. Machens, A.; Niccoli-Sire, P.; Hoegel, J. y col. (the European Multiple Endocrine Neoplasia, EUROMEN, Study Group). Early Malignant Progression of hereditary Medullary Thyroid Cancer. N Engl J Med 2003; 349: 1517-1525.
9. Yip, L.; Cote, G.; Shapiro, S. y col. Multiple Endocrine Neoplasia Type 2: Evaluation of the Genotype-Phenotype relationship. Arch Surg. 2003; 138: 409-416.
10. Giraud, S.; Choplin, H.; Teh, B. y col. A Large Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 Family with Clinical Expression Suggestive of Anticipation. J Clin Endocrinol Metab. 1997; 82: 3487-3492.