

DETECCION DE UNA MUTACION NO ESTANDAR EN EL PROTO-ONCOGEN *RET* POR MUTAGENESIS DIRIGIDA

SEBASTIAN REAL¹, LAURA GOMEZ¹, HECTOR PERINETTI², LUIS S. MAYORGA¹,
EDUARDO PUSIOL², MARIA ROQUE¹

¹Laboratorio de Biología Celular y Molecular, IHEM-CONICET; ²Instituto de la Patología de la Tiroides, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza

Resumen El síndrome de MEN2A es una enfermedad autosómica dominante que se caracteriza por el desarrollo de cáncer medular de tiroides, feocromocitoma e hiperplasia de paratiroides. Mutaciones en el *ret* proto-oncogén se asocian con MEN2A, con una penetrancia cercana al 100%. El gen se encuentra en el cromosoma 10q11.2 y codifica para una proteína transmembrana con función de receptor del tipo tirosina quinasa. Mutaciones que afectan el dominio extracelular de la proteína estimulan la dimerización espontánea del receptor y un aumento de la actividad de tirosina quinasa basal. El codón 634 codifica para una cisteína, y es considerado un sitio *hot-spot* por encontrarse mutado en el 85% de las familias con MEN2A. Para este sitio, nuestro grupo desarrolló en 2002 una metodología de detección indirecta y económica. Ante una familia sospechada de MEN2A, se aplicó esta estrategia, que reveló un codón 634 sano. Por posterior secuenciación se confirmó que el paciente índice portaba una mutación en el codón 611. Se desarrolló una nueva estrategia familia-específica por PCR mutagénica, que permitió diagnosticar en nuestro país a todos los integrantes de la familia con costos accesibles. Un niño en el cual se halló la mutación, fue tiroidectomizado preventivamente, y a la fecha goza de buena salud. De esta manera, combinando la estrategia de detección de mutaciones en el sitio *hot-spot* y un posterior diseño de otra metodología familia-específica se pudo diagnosticar e intervenir preventivamente a la familia, sin enviar todas las muestras al extranjero.

Palabras claves: proto-oncogen, sitio *hot-spot*, PCR mutagénica

Abstract *Detection of a non-standard mutation in the ret protooncogene by site directed mutagenesis.*

MEN2A is an autosomic dominant disease, characterized by medullary thyroid cancer, pheochromocytoma and parathyroid hyperplasia. Mutations in the *ret* proto-oncogene are associated with this disease, with almost 100% of penetrance. The gene, situated on chromosome 10q11.2, codes for a transmembrane protein with a tyrosinkinase-like receptor function. Mutations that affect its extracellular domain, stimulate spontaneous homodimerization and elevate the basal tyrosinkinase activity. The codon 634 of the gene is considered a *hot-spot* site, since it is mutated in 85% of the MEN2A families. Our group developed in 2002 an indirect and costless strategy to detect alterations in this site. We present a family suspected of having MEN2A. We applied our PCR based indirect strategy on the DNA of the index patient and found that there was no mutation in that site. Posterior sequencing of exon 10 and 11 confirmed that the mutation affecting this family was in codon 611. Thus, we developed a new costless family-specific strategy based on mutagenic PCR and enzymatic cuts to diagnose all the family members. A seven-year old boy with this mutation was preventively thyroidectomized. In this way, combining the indirect methodology for codon 634 previously developed by our group, and a posterior family-specific mutation detection strategy, we were able to diagnose and intervene presymptomatically the family members, avoiding sending all the samples to foreign centers.

Key words: protooncogene, *hot-spot* site, mutagenic PCR

El síndrome de neoplasias endócrinas múltiples tipo 2A (MEN2A) es una enfermedad genética que se caracteriza por el desarrollo de cáncer medular de tiroides (CMT), feocromocitoma e hiperplasia de paratiroides^{1,2}.

Esta enfermedad se hereda en forma autosómica dominante con una penetrancia muy elevada, desarrollándose en casi todos los individuos afectados CMT. La probabilidad de aparición de feocromocitoma e hiperplasia de paratiroides es variable de familia en familia e incluso en algunos casos el CMT es la única manifestación del síndrome; se habla entonces de CMT familiar y no de MEN2A.

Tradicionalmente MEN2A se ha diagnosticado en base a la aparición familiar de CMT y feocromocitomas. El

Recibido: 20-V-2004

Aceptado: 9-IX-2004

Dirección Postal: Dra. María Roqué, Laboratorio de Biología Celular y Molecular, IHEM, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Parque General San Martín, 5500 Mendoza, Argentina
Fax: (54 261) 4494117 e-mail: mroque@fcm.uncu.edu.ar

CMT se caracteriza por producir niveles elevados de calcitonina, hormona específica de las células C de la tiroides. Durante años, para el diagnóstico precoz de CMT, que es la primera neoplasia que se desarrolla en los individuos afectados, se utilizó una prueba de liberación de calcitonina bajo estimulación con calcio y pentagastrina³. A pesar de que hoy la detección precoz de MEN2A se efectúa a través de detección de mutaciones en el gen relacionado con el síndrome, la prueba de liberación de calcitonina es de enorme utilidad para determinar la efectividad del tratamiento quirúrgico y la aparición de metástasis⁴. Esta prueba es suficientemente sensible como para poder detectar hiperplasia de células C de la glándula tiroidea, que se considera una lesión premaligna y precursora del CMT.

Entre 1993 y 1995 varios trabajos genéticos y bioquímicos mostraron que mutaciones en el proto-oncogén *ret* se asocian con varias enfermedades, entre ellas MEN2A, MEN2B y CMT familiar^{5, 6, 7}. A partir de estos informes se comenzó a pensar en el desarrollo de un test genético para el diagnóstico de MEN2A⁸.

El gen, que se encuentra en el cromosoma 10q11.2, está activo en células de la cresta neural durante el desarrollo y su producto migra hacia el intestino. La proteína es una proteína transmembrana con la estructura de un receptor con actividad de tirosina quinasa. El ligando que se une a un co-receptor pegado al receptor y que se describió años después del gen, es un factor neuro-trófico derivado de la glía –sigla en inglés: GDNF–. Dentro de las proteínas de tipo receptor, el *ret* es clasificado como “receptor dependiente” dependiendo su función de la presencia o ausencia del ligando. El receptor *ret* sin ligando induce a la apoptosis y con ligando, activa la proliferación mediante su homodimerización^{9, 10}.

Mutaciones en el gen afectan de distinta manera la función proteica, según qué dominio de la misma alteren. Mutaciones que afectan el dominio citoplasmático del receptor y alteran la especificidad del sustrato fosforilable se relacionan con MEN2B. Mutaciones que inactivan la proteína (pérdidas de nucleótidos, secuencias de STOP anticipado, etc.) se asocian con la enfermedad de Hirschsprung^{11, 12} que se caracteriza por la ausencia congénita de inervación parasimpática a nivel del tracto intestinal. Mutaciones en los exones 10 y 11 del *ret*, que codifican una región extracitoplasmática del receptor rica en residuos de cisteína, se asocian con MEN2A y CMT. Estas mutaciones estimulan la dimerización espontánea del receptor y un aumento de la actividad de tirosina quinasa basal⁶. Cabe destacar que el 85% de las mutaciones que producen MEN2A se han encontrado en el codón 634 del exón 11¹³.

En 2002 nuestro grupo desarrolló un método indirecto para detectar cualquier mutación posible en el codón 634 del *ret*¹⁴, dada su alta frecuencia como sitio *hot-spot* en familias afectadas con MEN2A. Ante un paciente con

CMT y una historia familiar que permite sospechar del síndrome hereditario MEN2A, este método nos permite identificar si el codón 634 del proto-oncogén *ret* del paciente está sano o mutado, a partir de una muestra de sangre periférica. De hallarse mutado, se da comienzo al diagnóstico presintomático en los restantes integrantes de la familia, también a partir de una muestra de sangre periférica. De no hallarse mutado el codón 634 en el paciente con CMT, existen un 15% de mutaciones en el proto-oncogén *ret* que también se relacionan con MEN2A y que no ocurren en un sitio *hot spot*. Para rastrear este 15% de mutaciones “no estándar”, la metodología es la secuenciación de los exones del *ret*, comenzando por los más probablemente mutados: los exones 10 y 11.

El objetivo de este trabajo fue diagnosticar en nuestro país a una familia MEN2A, que según nuestra metodología desarrollada previamente para el codón 634, no presentaba mutado el sitio *hot spot* y podría portar una mutación “no estándar”.

Materiales y métodos

Obtención de ADN a partir del paciente índice y sus familiares

Se realizó la purificación del ADN a partir de sangre total obtenida con EDTA como anticoagulante mediante la técnica de extracción salina¹⁵. Esta técnica evita el uso de fenol y cloroformo, utilizando altas concentraciones de sales para remover las proteínas del ADN. La cantidad de ADN obtenida a partir de 3 ml de sangre es aproximadamente 50 µg de una calidad excelente.

Amplificación del codón 634 para detección de mutaciones en el mismo

Se utilizó un cebador *forward* mutagénico de secuencia: 5'ATCCACTGTGCGGCAAGCTG, y un *reverse*: 5'AAGAGGA CAGCGGCTGCGATGCCCGTGCG. El programa de amplificación consistió en 30 ciclos de 94 °C, 30 segundos, 55 °C 2 minutos y 72 °C 30 segundos, con un paso inicial de 94 °C 3 minutos, y uno final de 72 °C 3 minutos.

Amplificación del codón 611

Los cebadores para la PCR utilizados fueron: *forward* 5'AAAGCTGGCTATGGCACCTGCAGC3' y *reverse* 5'TGGA TGTCTTCGGGCTCGCA3'. El programa consistió en 30 ciclos de 94 °C 30 segundos, 64 °C 1 minuto y 72 °C 30 segundos con una incubación inicial y final de 94 °C 3 minutos, y 72 °C 3 minutos, respectivamente.

Análisis por endonucleasas de restricción en corridas electroforéticas

Una alícuota de 25 µl del producto de amplificación se incubó con 19 µl de agua destilada, 5 µl de buffer 10X correspondiente a la enzima de restricción, 1 µl de enzima de restricción (PvuII 10 U/µl o BstApl 10 U/µl *Promega*) bajo una gota de aceite mineral. Como control se realizó la misma incubación reemplazando la enzima por 1 µl de agua miliQ. Se agregaron 2 µl de buffer de sembrado (2.5 mg/ml de azul

de bromofenol, 400 mg/ml de sacarosa en agua) y la totalidad de las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida no desnaturizante al 12% con una diferencia de potencial de 120 V, durante 45 minutos. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y observados bajo luz ultravioleta.

Resultados

A partir del ADN del paciente índice –único afectado clínicamente en la familia y operado de un cáncer medular de tiroides– analizamos por PCR mutagénica la integridad del codón 634 del *ret* a través de nuestra metodología. La muestra presentaba en un gel de poliacrilamida no desnaturizante, el mismo patrón de bandas que un control sano (Fig. 1).

Según bases de datos, de todas las familias con MEN 2A, un 85% presenta mutado el codón 634. Para confirmar si la familia en estudio padecía el síndrome hereditario MEN2A, había que secuenciar las regiones restantes del gen *ret*, en busca del 15% de mutaciones restantes que afectan zonas diferentes al sitio *hot spot* 634.

Se envió el ADN a secuenciar a un centro especializado en Italia. El informe confirmó que el codón 634 estaba intacto, y que se hallaba una mutación en el exón 10 afectando al residuo 611, otra cisteína del dominio extracelular, cambiada por una treonina (TGC>TTC). De esta manera se confirmaba la familia como una familia MEN2A, con una mutación en una región no estándar del proto-oncogén *ret*.

Nuestro grupo diseñó una nueva estrategia indirecta para poder diagnosticar esta mutación específica en el resto de los familiares. La estrategia se basó en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), introduciendo una mutación mediante el cebador 5' al codón 611.

De esta manera se genera en el alelo sano solamente, junto con el triplete TGC del codón 611, un sitio de restricción reconocible por la enzima PvuII (Fig. 2). Como

se puede observar en la Fig. 2, el producto de PCR tiene un tamaño total de 70 pb. Al incubar el producto con la enzima PvuII, ésta reconoce el sitio CAGCTG sólo en el producto derivado de amplificar un alelo sano. En un individuo homocigota sano, ambos alelos portan la secuencia reconocible por la enzima y el total del producto es cortado en dos fragmentos de 43 y 27 pb. En el caso de un individuo heterocigota, un solo alelo presenta el sitio de corte de restricción, por lo cual el 50% es cortado en dos fragmentos de 43 y 27pb, y el resto permanece con el tamaño inicial de 70 pb. La diferencia entre 70 y 43 pb

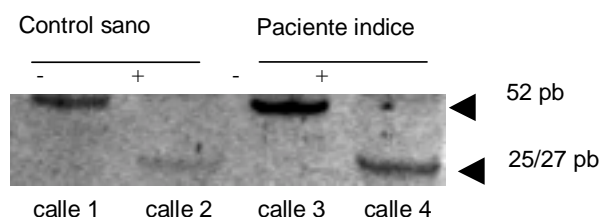


Fig. 1.– Gel de poliacrilamida no desnaturizante al 10%. Calles 1 y 2 corresponden a un paciente sano para el codón 634, que fue utilizado como control positivo de la estrategia. El producto de PCR fue sembrado sin incubación enzimática (calle -) y con incubación enzimática (calle +). Calles 3 y 4 corresponden al paciente índice P1. El producto de PCR fue igualmente sembrado sin (-) y con (+) incubación enzimática. Ambos pacientes muestran el mismo patrón de bandas: todo el producto de PCR de 52 pb es cortado en fragmentos de 25 y 27 pb –no distinguibles entre sí–, resultado correspondiente a un codón 634 sano. Por lo pequeño de los fragmentos de 25 y 27 pb teñidos con bromuro de etidio, en algunos casos se suelen ver estas bandas más tenues (caso control sano). Un difuso artefacto de la PCR se observa por encima de la banda de 52 pb en todas las calles, que no corresponde al diagnóstico ni interfiere con el mismo.

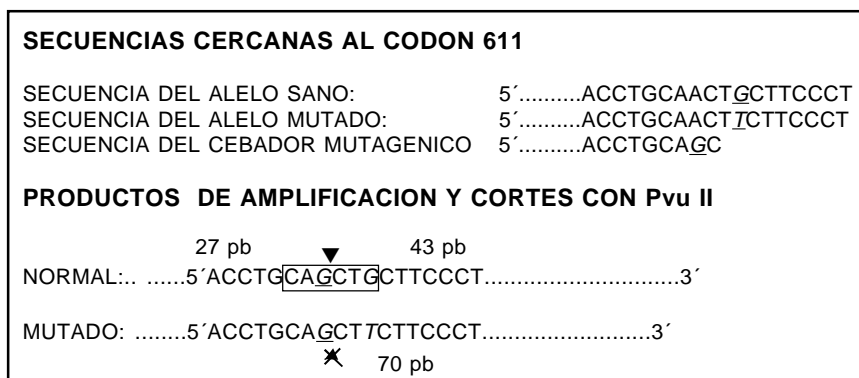


Fig. 2.– Esquema de la estrategia por PCR mutagénica y corte enzimático. Bases subrayadas: mutación introducida mediante el cebador. Bases en cursiva: sitio de la mutación de la familia. Bases con recuadro: sitio de reconocimiento para PvuII. La flecha indica el sitio de corte de la enzima PvuII.

es fácilmente visible en una corrida electroforética en un gel de poliacrilamida. Los homo-cigotas mutados no son viables.

Luego de poner a punto el método, se citó a la familia, y se extrajo ADN de sangre periférica de los parientes del paciente índice (Fig. 3). Así, amplificando la zona del codón 611 por PCR mutagénica a partir del ADN de cada paciente, incubando luego el producto con la enzima de restricción PvuII (CAG/CTG), y separando luego los productos por electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizantes, el diagnóstico del resto de la familia fue factible sin enviar sus muestras al extranjero y por lo tanto a bajo costo.

Aplicando la metodología desarrollada, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Fig. 4. Luego de la incubación enzimática, un patrón de 3 bandas corresponde a un individuo heterocigota y por lo tanto portador de la mutación (P1 y P5), y un patrón de 2 bandas corresponde a un individuo homocigota sano (P2, P3, P4, P6 y P7). De los cuatro hijos del paciente P1, sólo uno heredó la mutación (P5), el hijo menor de 7 años a la fecha del estudio.

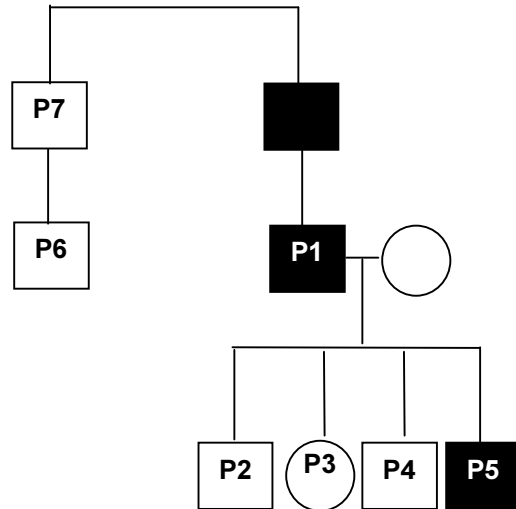


Fig. 3.- Esquema de la familia analizada para MEN2A. P1: paciente índice operado de un cáncer medular de tiroides.
 ■ = con mutación
 ○ = sin mutación

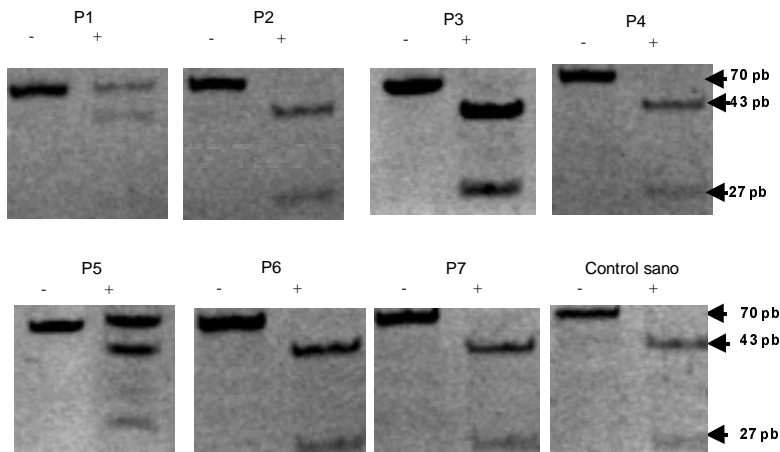


Fig. 4.- Geles de poliacrilamida no desnaturizantes al 12%. P1-P7: pacientes diagnosticados. Calles + : productos de PCR incubados con la enzima PvuII. Calles - : productos de PCR sin incubación con la enzima PvuII. En todas las calles - se observa la banda a la altura de 70 pb, correspondiente al producto de PCR sin cortar. En las calles + de los pacientes homocigotas sanos (P2, P3, P4, P6 y P7) se observa que todo el producto es cortado en dos fragmentos de 43 y 27 pb (este último fragmento se observa más tenue en algunos casos debido a su pequeño tamaño). En las calles + de los pacientes P1 y P5 se observa que el 50% del producto de PCR permanece a la altura de 70pb; no puede ser cortado por la enzima de restricción por ser producto del alelo mutado que tiene el sitio de restricción alterado. El otro 50% del producto de PCR es sano y es cortado en dos fragmentos de 43 y 27 pb respectivamente. En el caso del paciente P1 el fragmento de 27 pb se ve más tenue, pero el diagnóstico es igualmente realizable al observarse claramente las bandas a 70 y 43 pb. El control sano es un individuo con el codón 611 sano, utilizado como control positivo de la estrategia.

Discusión

El diagnóstico presintomático del cáncer es analizado y discutido por científicos, psicólogos, médicos y consultores genéticos porque su utilidad en algunos casos pareciera no ser tan obvia, sobre todo cuando no está consensuado el modo de intervenir luego del diagnóstico genético. Sin embargo, en el caso de MEN2A, éste se escapa unánimemente a las dudas y críticas sobre su utilidad. Dada la altísima penetrancia (cercana al 100%) de las mutaciones que lo provocan, y la posibilidad de prevención a través de una tiroidectomía preventiva en los individuos mutados, es el caso "ejemplo" en la utilidad del diagnóstico presintomático de un cáncer hereditario. Una ventaja de este gen para la detección de mutaciones, es el sitio *hot-spot* en el codón 634. Hasta nuestro conocimiento, no hay otro gen relacionado con cáncer hereditario que presente un sitio donde las mutaciones se manifiesten con semejante frecuencia. Esto nos motivó en el año 2002 para desarrollar una metodología económica e indirecta que verificara la integridad de dicho codón. Esta estrategia nos permitió detectar rápidamente la integridad del sitio *hot-spot* en la familia comunicada en este trabajo. Ante el resultado del codón 634 sano, y la sospecha clínica de un MEN2A, se analizaron por secuenciación otros codones para cisteínas cercanas, codificadas por los exones 10 y 11 del *ret*, resultando alterada la cisteína de posición 611. El desarrollo posterior de una metodología por PCR mutagénica y corte enzimático, permitió realizar todo el diagnóstico presintomático de los familiares en nuestro país, sin envío de muestras al exterior. La economía devaluada de Argentina, impide a la inmensa mayoría de las familias afectadas costear estos estudios en el extranjero. Aplicando a la familia sospechada de MEN2A la metodología desarrollada por nuestro grupo para el codón 634, descartando este sitio mutacional y posteriormente desarrollando una estrategia por PCR mutagénica específica para la familia, los costos fueron mucho menores y accesibles.

Algunos grupos predicen un bajo riesgo de desarrollar CMT cuando las mutaciones afectan hasta el residuo 609 de la proteína; a partir del 610, el riesgo se elevaría y se asemejaría a los portadores de mutaciones en el codón 634¹⁶. Sin embargo, otro grupo informa sobre una familia que portaba una mutación en el codón 611 –idéntica a la familia presentada en este trabajo–, cuya progresión de la enfermedad fue muy lenta y con bajo grado de malignidad¹⁷. Otro grupo de investigadores plantean también la discusión sobre si es necesaria la tiroidectomía en todos los casos, mostrando una familia con el codón 611 mutado, en la cual dos integrantes de más de 70 años no han mostrado manifestación clínica alguna¹⁸. Aparentemente mutaciones que afectarían a la cisteína 611, mostrarían un rango fenotípico variable.

Los cirujanos integrantes de nuestro grupo consideraron, en conjunto con la familia afectada, la conveniencia de someter a una tiroidectomía al paciente P5 portador de esa mutación, dada la temprana edad de manifestación de su padre –menor de 45 años– y lo que sugiere al respecto gran parte de la literatura actual^{19, 20, 21, 22}. La familia decidió la realización de la operación para no correr ningún posible riesgo; hoy el paciente goza de buena salud, y su sobrevida se estima equiparada al estándar poblacional.

Bibliografía

1. Wells SA, Jr., Donis-Keller H. Current perspectives on the diagnosis and management of patients with multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1994; 23: 215-28.
2. Raue F, Frank Raue K, Grauer A. Multiple endocrine neoplasia type 2. Clinical features and screening. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1994; 23: 137-57.
3. Wells SA, Baylin SB, Linehan WM, Farrell RE, Cox EB, Cooper CW. Provocative agents and the diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland. *Ann Surg* 1978; 188: 139-41.
4. Pusiol E, Roqué M, Perinetti H, Mayorga L. Uso combinado de calcio y pentagastrina en el diagnóstico y seguimiento del cáncer medular de tiroides. *Endocrinología y nutrición* 2001; 48: 63-9.
5. Mulligan LM, Kwok JBJ, Healey CS, et al. Germ line mutations of the *ret* proto oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993; 363: 458-60.
6. Carlson KM, Dou SS, Chi D, et al. Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the *ret* protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1579-83.
7. Santoro M, Carlomagno F, Romano A, et al. Activation of *ret* as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science* 1995; 267: 381-3.
8. Roqué M, Pusiol E, Perinetti HA, Mayorga LS. Diagnóstico de MEN2A mediante la detección de mutaciones puntuales en el protooncogen RET. *Endocrinología* 1997; 44: 291-5.
9. Mehlen P, Bredesen DE. Dependence receptors: links between apoptosis, nervous system development and control of tumorigenesis. *Bull Cancer* 2000; 87: 537-41.
10. Bordewaux MC, Forcet C, Grager L, et al. The Ret protooncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. *EMBO J* 2000; 19: 4056-63.
11. Romeo G, Ranchetto P, Luo Y, et al. Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the *ret* proto oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 1994; 367: 377-8.
12. Edery P, Lyonnet S, Mulligan LM, et al. Mutations of the *ret* proto oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 1994; 367: 378-80.
13. Sanchez B, Robledo M, Biarnes J, et al. High prevalence of the C634Y mutation in the RET proto-oncogene in MEN 2A families in Spain. *J Med Genet* 1999; 36: 68-70.
14. Roqué M, Pusiol E, Perinetti H, Pott Godoy C, Mayorga LS. A PCR-strategy for rapid detection of mutations in the hotspot-site of the *ret* proto-oncogene related to MEN2A. *BMC Medical Genetics* 2002; 3: 4.

15. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1988; 16: 1215-20.
16. Yip L, Cote GJ, Shapiro SE, et al. Multiple endocrine neoplasia type 2: evaluation of the genotype-phenotype relationship. *Arch Surg* 2003; 138: 409-16.
17. Siggelkow H, Melzer A, Nolte W, Karsten K, Hoppner W, Hufner M. Presentation of a kindred with familial medullary thyroid carcinoma and Cys611Phe mutation of the ret proto-oncogene demonstrating low grade malignancy. *Eur J Endocrinol* 2001; 144: 467-73.
18. Hansen HS, Topping H, Godballe C, Jager AC, Nielsen FC. Is thyroidectomy necessary in the ret mutations carriers of the familial medullary thyroid carcinoma syndrome? *Cancer* 2000; 89: 863-7.
19. Mattavelli F, Seregni E, Collini P, et al. Prophylactic thyroidectomy in MEN2A syndrome. *Tumori* 2003; 89: 553-5.
20. Skinner MA. Management of hereditary thyroid cancer in children. *Surg Oncol* 2003; 12: 101-4.
21. Takami H. Medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2. *Endocr Pathol* 2003; 14: 123-31.
22. Sanso GE, Domene HM, García R, et al. Very early detection of RET proto-oncogene mutation is crucial for preventive thyroidectomy in multiple endocrine neoplasia type 2 children: presence of C-cell malignant disease in asymptomatic carriers. *Cancer* 2002; 94: 323-30.

...No matter where you land, you have to do something well, and that will never be easy. Each of us must somehow put our scientific dreams in line with the balance sheet of our limitations and capabilities, because if we do, we may perpetuate the excitement of our youths and still be able to anticipate each new day as a unique opportunity to follow our heart's desire.

...No importa donde aterrice, tiene que hacer algo bien hecho, y eso nunca será fácil. Cada uno de nosotros debe de alguna manera poner sus sueños científicos en línea con sus limitaciones y posibilidades, porque si así lo hacemos, puede que perpetuemos el entusiasmo de nuestra juventud y que todavía podamos anticipar cada nuevo día como una única oportunidad para proseguir con los deseos de nuestro corazón.

James D. Watson (1928)

A Passion for DNA. Genes, Genomes and Society. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000, p. 103