

ESTUDIO DEL PROTOONCOGEN RET EN NEOPLASIA ENDOCRINA MULTIPLE 2A  
Y EN CARCINOMA MEDULAR DE TIROIDES FAMILIAR  
HALLAZGOS CLINICO-PATOLOGICOS EN PORTADORES ASINTOMATICOS

SUSANA BELLI<sup>1,2</sup>, MARIA E. STORANI<sup>3</sup>, RICARDO J. DOURISBOURE<sup>1</sup>, ERNESTO J. PODESTA<sup>4</sup>,  
ANGELA R. SOLANO<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Instituto Alexander Fleming; <sup>2</sup> División de Endocrinología-Hospital Durand; <sup>3</sup> Servicio de Endocrinología, Hospital de San Isidro; <sup>4</sup> Laboratorio HRDC, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

**Resumen** El 25% de los carcinomas medulares de tiroides son hereditarios. Se presentan en forma de familiar (CMTF 5%) o como neoplasia endocrina múltiple (MEN) tipo 2A (17%) o 2B (3%), y comparten la herencia, autosómica dominante, de una mutación germinal en el protooncogen RET en uno de 12 codones conocidos. Estudiamos 7 familias (5 CMTF y 2 MEN 2A) con el objeto de detectar la mutación familiar e identificar a los portadores asintomáticos. Seis de las siete mutaciones (4 CMTF y 2 MEN 2A) fueron en el codón más frecuente, el 634, y una familia con CMTF presentó una mutación germinal *novel*: una transición T>C en el codón 630, resultando el cambio C630A. De los 57 individuos estudiados, 25 (43.85 %) fueron portadores de la mutación, 7 de éstos (28%) eran portadores asintomáticos de los cuales 5 eran niños, con una edad  $\bar{X}=11\pm 3.2$  años y fueron tiroidectomizados. Presentaron hiperplasia de células C y focos de microcarcinoma en ambos lóbulos tiroideos aun cuando la calcitonina basal o estimulada con pentagastrina fueron normales. En conclusión, describimos una mutación germinal *novel* en el protooncogen RET: C630A y el hallazgo de enfermedad de la célula C en los portadores asintomáticos, que enfatiza la importancia de la tiroidectomía profiláctica tan pronto como se confirma el diagnóstico molecular.

**Palabras clave:** neoplasia endocrina múltiple tipo 2A, MEN 2A, protooncogen RET, carcinoma medular de tiroides familiar

**Abstract** *Analysis of the RET protooncogene in multiple endocrine neoplasia 2A and in familial medullary thyroid carcinoma. Clinical-pathological findings in asymptomatic carriers.* Twenty five percent of the medullary thyroid carcinoma (MTC) is hereditary and 5% is familiar (FMTC), or considered as multiple endocrine neoplasia (MEN) type 2A (17%) or 2B (3%). These diseases are the result of the autosomic dominant inheritance of a mutation in the RET protooncogene, in one out of 12 different known codons. We analyzed 7 families (2 MEN 2A and 5 FMTC). Six mutations were detected in the most frequent codon, 634 (2 MEN 2A y 4 FMTC) and one family with FMTC presented a *novel* mutation: a transition T>C at codon 630, resulting a C630A change. Among 57 individuals studied, 25 (43.85%) presented the mutation. Seven (28%) were asymptomatic carriers, including 5 children aged  $11\pm 3.2$  years. The children underwent total thyroidectomy. The histopathologic examination showed C cells hyperplasia and microcarcinoma focus in both lobes, even in the presence of normal, basal or pentagastrine stimulated, calcitonine levels. In conclusion, we describe a germline *novel* mutation in the RET protooncogene: C630A; and the corresponding findings of C-cell disease in gene mutated carriers that emphasize the importance of prophylactic thyroidectomy as soon as the molecular diagnosis is confirmed.

**Key words:** multiple endocrine neoplasia type 2A, MEN 2A, RET protooncogene, familial medullary thyroid carcinoma

El carcinoma medular de tiroides se origina en las células C o parafoliculares y es una neoplasia poco frecuente, que comprende a un 10% de los carcinomas tiroideos<sup>1</sup>. Puede presentarse en forma esporádica (75%) o familiar (25%). La variedad hereditaria puede

expresarse con tres cuadros diferentes: sólo a través del tumor tiroideo (5%) y se la denomina carcinoma medular familiar (CMTF), o asociada a otras patologías constituyendo un síndrome poliglandular, la neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (MEN 2) con dos subtipos: A (17%) y B (3%)<sup>2</sup>. En el MEN 2A se asocia al carcinoma medular, hiperparatiroidismo (10-20%), feocromocitoma (30-50%) y en algunas familias liquen amiloidótico cutáneo. En el MEN 2B además del carcinoma medular, los pacientes presentan hábito marfanoide, feocromocitoma, ganglioneuomas difusos en labios, ojos,

Recibido: 7-III-2002

Aceptado: 28-XI-2002

Dirección Postal: Dra. Angela R. Solano, Laboratorio HRDC, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UBA, Paraguay 2155, 1121 Buenos Aires, Argentina.  
Fax: (54-11) 4508-3672 e-mail: asolano@ciudad.com.ar

lengua y tracto gastrointestinal e hipertrofia de nervios corneales<sup>3</sup>.

El carcinoma medular de tiroides familiar, el MEN 2A y el MEN 2B son enfermedades hereditarias autosómicas dominantes, resultado de una mutación germinal del protooncogen RET, que está localizado en la región proximal del brazo largo del cromosoma 10, banda q11.2. El protooncogen RET codifica para un receptor de la familia de las tirosina quinasa y está compuesto por tres dominios: el extracelular, el transmembrana y la porción intracelular que contiene el dominio tirosina quinasa<sup>4</sup>. Se han detectado mutaciones germinales en el protooncogen RET en el 95% de los MEN 2B, en el 98% de los MEN 2A y en el 88% de los carcinomas medulares familiares<sup>5</sup>. Las mutaciones involucran cisteínas del dominio extracelular identificadas en el exón 10 (codones 609, 611, 618, 620) y en el exón 11 (codones 630 y 634), y otras mutaciones en los dominios tirosina quinasa: en el exón 13 (codones 768, 790, 791), en el exón 14 (codón 804) y en el exón 15 (codón 883 y 891). El análisis directo del ADN nos da la oportunidad de detectar a los sujetos con riesgo, aun antes de que se expresen bioquímicamente, eliminando los falsos positivos de la prueba de pentagastrina<sup>6</sup>, que hasta hace poco era utilizada como el marcador precoz de la hiperplasia de las células C.

La cirugía es el único tratamiento curativo en el CMTF por lo que la identificación temprana de los portadores es crucial. En el presente estudio evaluamos nuestra experiencia en la detección de la mutación en el protooncogen RET en los casos índice y en los portadores asintomáticos de familias con carcinoma medular familiar y MEN 2A. Correlacionamos la mutación genética con la expresión fenotípica y en los portadores asintomáticos que fueron tiroidectomizados, correlacionamos los niveles de calcitonina con los hallazgos anatomopatológicos y evaluamos si la edad en que se indicó la cirugía era la adecuada.

Fueron estudiadas 7 familias con carcinoma medular familiar: 2 con MEN 2A y 5 con carcinoma medular familiar. Las familias con CMTF presentaban como mínimo 4 miembros afectados con una evolución entre 10 y 35 años. Se descartaron el feocromocitoma y el hiperparatiroidismo con dosajes de catecolaminas urinarias seriadas, calcio iónico y PTH. Evaluamos un total de 57 individuos, de los cuales 33 eran mujeres y 24 varones, con una edad  $\bar{X}=23.3\pm 13.9$  años (rango de 2 a 55). Treinta y dos individuos eran asintomáticos pero en su evolución 25 de los 57 habían presentado carcinoma medular de tiroides, 5 (20%) feocromocitoma (2 bilaterales) y 1 (4%) hiperparatiroidismo.

Para el estudio del protooncogen RET, se aisló ADN de sangre periférica recogida con EDTA y se amplificó con la reacción en cadena de la polimerasa en cinco

amplicones. Se amplificaron los exones 10, 11, 13, 14 y 15 del protooncogen RET<sup>7</sup>. Se realizó la secuenciación directa de los productos amplificados, utilizando los reactivos de Sequenase (*Amersham*) para productos de PCR y se analizaron las secuencias de bases.

Seis de las siete mutaciones germinales fueron detectadas en el codón 634, 2 pertenecen a familias con MEN 2A y 4 con CMTF. La séptima mutación se detectó en el codón 630. Se detectaron dos transversiones (cambio de una base purínica por una base pirimidínica) T>A en las familias RE06 (CMTF) y G>T en la familia RE07 (CMTF), resultando una cisteína reemplazada por serina y por fenilalanina, respectivamente, en la proteína codificada por el protooncogen RET. Las demás mutaciones fueron transiciones (cambio de bases purínicas o pirimidínicas entre sí): G>A en la familia RE01 (MEN 2A) y en RE02 y RE05 (CMTF), resultando un cambio de cisteína por tirosina; T>C en la familia RE03 (MEN 2A) y RE04 (CMTF), resultando el cambio cisteína por arginina. La familia RE04 que mencionamos, presentó una mutación novel en el codón 630, transición T>C, (Tabla 1).

De los 32 pacientes asintomáticos, 7 presentaron la mutación familiar del protooncogen RET. De estos últimos, 5 eran niños con una edad  $\bar{X}=11\pm 3.2$  años (rango de 5 a 15), los que fueron tiroidectomizados profilácticamente; los padres de los 2 niños restantes (de 15 y 9 años) se negaron a la cirugía. A los 5 portadores asintomáticos, previo a la cirugía, se les dosó la calcitonina plasmática. A 2 de ellos, se les realizó la prueba de pentagastrina administrándoles 0.5 U/kg/peso EV en bolo de *PeptavlonNR* con dosajes plasmáticos a los 2', 5' y 10' post estímulo. A los 3 restantes se les midió sólo la calcitonina basal porque se negaron a realizar la prueba por temor a la intolerancia digestiva. Se consideró normal una concentración basal de calcitonina entre 0-10 pg/ml con una respuesta máxima hasta 36 pg/ml. La calcitonina fue medida por IRMA (DSL tubo recubierto).

La concentración basal de calcitonina, su respuesta a pentagastrina y la correlación con los hallazgos anatomopatológicos se detallan en la Tabla 2. Los niños operados profilácticamente evolucionaron adecuadamente durante 3 años de control clínico con calcitoninas por debajo del límite de detección del método.

En todas las familias evaluadas, 2 MEN 2A y 5 CMTF, se identificó la mutación del protooncogen RET en el exón 11, en la región que codifica para el dominio extracelular. La mutación en el residuo cisteína del codón 634 fue el hallazgo más frecuente comprendiendo a 6 de las 7 familias estudiadas. La familia restante (Fig. 1), con CMTF y 35 años de evolución, presentó una mutación novel T>C en el codón 630. Estos hallazgos coinciden con la extensa revisión de Eng y col.<sup>5</sup>, en la cual la mayoría de los casos presentaron la mutación en el codón

TABLA 1.– Mutaciones germinales en el protooncogen RET

Familia	Pacientes	Fenotipo	Codón	Mutación (TGC)	Aminoácido (Cisteína)
RE01	8	MEN 2A	634	TAC	Tirosina
RE02	4	CMTF	634	TAC	Tirosina
RE03	9	MEN 2A	634	CGC	Arginina
RE04	17	CMTF	630	CGC	Arginina
RE05	4	CMTF	634	TAC	Tirosina
RE06	11	CMTF	634	AGC	Serina
RE07	4	CMTF	634	TTC	Fenilalanina

Pacientes: número de individuos estudiados

TGC: secuencia normal para los codones 630 y 634

Cisteína: aminoácido normal para los codones 630 y 634

TABLA 2.– Concentración basal de calcitonina, edad de la tiroidectomía y hallazgo histopatológico

Familia	Sexo	Edad (años)	CT basal (pg/ml)	CT post pentagastrina (pg/ml)	Hallazgos Histopatológicos
RE04	Varón	11	4.5	130	Hiperplasia de células C y microcarcinoma medular
	Mujer	5	5	18	
RE06	Mujer	15	>30	ND	
RE03	Mujer	9	4	ND	
	Mujer	10	8	ND	

Edad: del análisis genético y de la tiroidectomía

CT: calcitonina (Valor normal: basal: hasta 10 pg/ml; post pentagastrina: hasta 36 pg/ml)

ND: No determinado

634 (85% de los MEN 2A y el 30% de los CMTF). En esta misma revisión<sup>5</sup> las bases del codón normal TGC, cambiaron en orden de frecuencia de la siguiente manera: 52.1% presentaron la mutación CGC y el 26% TAC; las mutaciones AGC y TTC sólo comprendieron al 1.8 y al 5%, respectivamente. En el presente estudio, nosotros hallamos las siguientes mutaciones: 3 TAC (42.8%), 2 CGC (28.57%), una AGC y una TTC (14.2%). Estas diferencias estarían justificadas por el bajo número de familias que nosotros estudiamos, o por diferencias étnicas aun por definir.

Es interesante subrayar que la mutación CGC en el codón 634 correspondió a la única familia con MEN 2A con hiperparatiroidismo. Para Mulligan<sup>8</sup> y la revisión del Consorcio de RET<sup>5</sup> la mutación en el codón 634 fue la más frecuente y reveló una asociación significativa con cambio a CGC en 57 de 93 pacientes con hiperparatiroidismo. Sin embargo, Schuffenecker<sup>9</sup> no observó ninguna prevalencia de hiperparatiroidismo para una mutación dada, ya que el 23.1% de las familias tenían

CGC, el 17.5% TAC y el 16.3% otras mutaciones en el codón 634. Esto evidenciaría que cualquier mutación activante en el codón 634 generaría o predispondría para la hiperplasia paratiroidea, aunque no podemos descartar la asociación posterior con otros eventos genéticos.

Describimos además, la primera familia de la que tenemos conocimiento con carcinoma medular familiar que presenta la mutación germinal C630A (Fig. 1). Esta mutación había sido descrita<sup>5</sup> en la sangre periférica de un paciente con carcinoma medular familiar que no tuvo seguimiento posterior y cuya familia no fue analizada. También fue descrita como mutación somática<sup>10</sup>, pero nunca como mutación germinal en una familia, que además resultó numerosa (Fig. 1). En el codón 630 se describieron otras mutaciones germinales<sup>11</sup>, pero no la transición T>C; en efecto, es un codón que se encuentra mutado en baja frecuencia y algunos autores marcan la necesidad de conocer datos de las familias con mutación en 630<sup>12</sup>. La descripción de nuevas mutaciones es de gran importancia para incorporarlas al análisis de ADN,

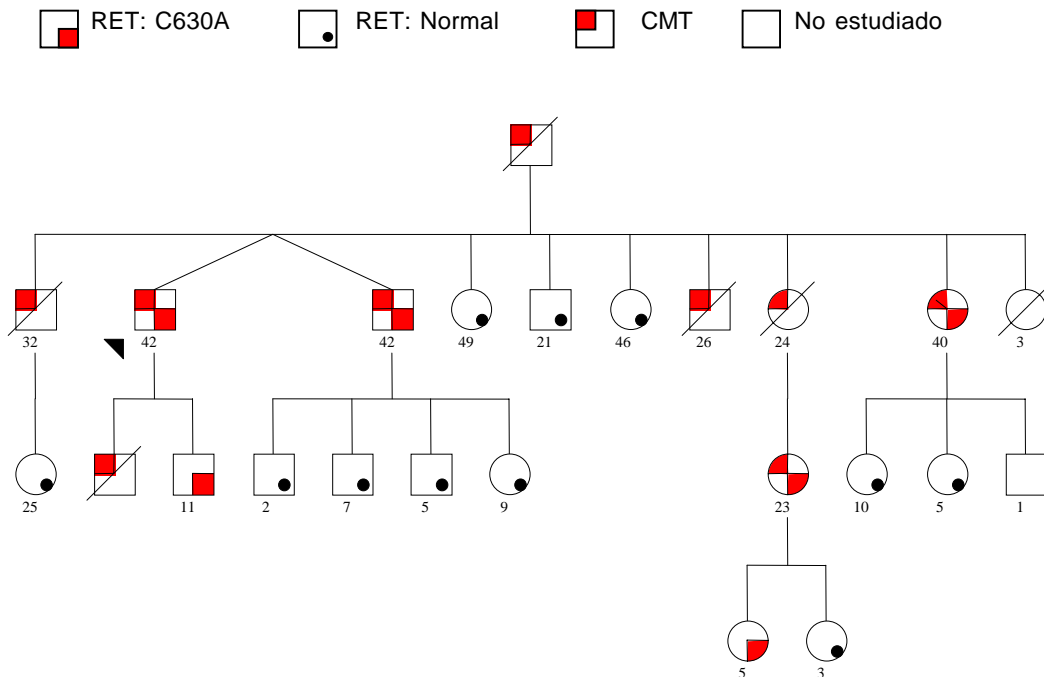


Fig. 1.- Familia RE04 con Carcinoma Medular de Tiroides Familiar (CMTF) en la que se detectó la mutación germinal novel RET C630A, resultante de la transición T>C en el codón 630 del protooncogen RET. CMT: carcinoma medular de tiroides. El número debajo del símbolo, indica la edad. La flecha indica el caso índice para esta familia.

lo que aumenta su eficacia para detectar la mutación familiar, especialmente cuando se utilizan métodos indirectos (hibridación, análisis de sitios de restricción). Esto ocurrió con la familia RE06, portadora de la mutación AGC para el codón 634, que cuando fue evaluada previamente en otra institución por métodos indirectos (análisis por cambios en sitios de restricción) resultó normal y nosotros detectamos, por secuenciación, esta mutación de muy baja frecuencia.

Los cinco niños portadores asintomáticos que fueron tiroidectomizados, mostraron hiperplasia de células C y focos de microcarcinoma en ambos lóbulos tiroideos, aun en presencia de calcitonina basal o respuesta a la pentagastrina normales. Algunos autores<sup>13</sup> consideran que los portadores de la mutación en el protooncogen RET presentan una prueba de pentagastrina normal cuando la concentración de calcitonina post estímulo es menor de 10 pg/ml, en lugar del límite de 36 pg/ml que se utiliza para la población general. Utilizando este criterio, dos de nuestros pacientes eran hiperrespondientes (calcitonina post estímulo de 18 y 130 pg/ml) lo que se correlacionaba con el hallazgo histopatológico. Se ha referido<sup>13</sup>, una correlación directa entre el nivel de calcitonina plasmática y el grado de extensión de la enfermedad; sin embargo, se han observado concentraciones normales de calcitonina aun en pacientes con macrometástasis ganglionares<sup>13</sup>. Esto sugiere que la

tiroidectomía no debería demorarse hasta que la calcitonina fuese anormal porque estaríamos frente a un estadio avanzado de la enfermedad. El estudio directo del ADN es el método de elección para seleccionar a los portadores en estadio preclínico, reservando la evaluación bioquímica sólo para el seguimiento<sup>14</sup>.

Una vez identificados los portadores de una mutación se sugiere realizar la tiroidectomía lo más precozmente posible ya que existe una correlación directa entre la edad, la extensión histopatológica y el pobre pronóstico evolutivo. La mayoría de los autores<sup>15</sup> la recomiendan entre los 4 y 6 años, pese a que otros ya han observado focos de carcinoma medular en niños entre 1.7 y 4 años<sup>13, 16, 17</sup>, lo que sugiere que la edad no sería un parámetro confiable con el cual decidir el momento más oportuno para la cirugía, sino el hallazgo de la mutación. En disidencia con lo referido por todos los autores y con nuestros propios hallazgos, Hansen y col.<sup>18</sup> refieren que en Dinamarca la mutación más frecuente fue en el exón 10 (8/10 familias). Proponen una conducta conservadora porque dos miembros de una familia con más de 70 años portadores de la mutación presentaron un test de pentagastrina normal, especulando con una evolución más "benigna" de esa mutación en particular, aunque soslayan el hecho de que el caso índice desarrolló metástasis ganglionares al 1.5 años de la cirugía y que otro familiar de 15 años presentó microcarcinoma e hiperplasia de células C, lo que

pone en duda la validez de la conducta conservadora y resalta otros factores ambientales y/o individuales como interacciones entre genes que modifican la expresión en locus distantes resultando manifestaciones fenotípicas distintas (epistasia).

El RET codifica para un receptor de factores de crecimiento neurotrófico (GDNF) que se expresa en tejidos neuroectodérmicos (células C de la tiroides; médula suprarrenal; paratiroides). Las mutaciones del mismo generan una activación permanente sin que haya unión del ligando<sup>6</sup>. Dado que éste es un defecto genético, el individuo está expuesto desde la vida intrauterina al estímulo permanente del crecimiento celular en el órgano blanco, lo que avala el hallazgo de enfermedad de la célula C en todos los pacientes que fueron tiroidectomizados por el hallazgo de la mutación. El asesoramiento de la familia antes de realizar el estudio genético y reafirmarlo con un consentimiento del procedimiento, facilita la comprensión del resultado del estudio molecular y favorece la decisión de avalar la tiroidectomía de un niño aparentemente sano.

**Agradecimientos:** Este trabajo se realizó con subsidios de CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Universidad de Buenos Aires y Ministerio de Salud de la Nación. Gisella Dihartce prestó una ayuda eficaz en el manejo de la base de datos genéticos para el análisis de las familias con cáncer hereditario.

## Bibliografía

- Hazard JB, Hawk WA, Crile G Jr. Medullary (solid) carcinoma of the thyroid: a clinicopathologic entity. *J Clin Endocrinol Metab* 1959; 19: 152-61.
- Raue F. Multiple endocrine neoplasia type 2 and medullary thyroid carcinoma. In: PJ Jenkins R, Sheaves, Wass JA (eds). *Clinical Endocrine Oncology*, Blackwell Science, Oxford 1996, p 445-52.
- Raue F, Frank-Raue K, Grauer A. Multiple endocrine neoplasia type 2. Clinical features and screening. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1994; 23:137-56.
- Santoro M, Carlomagno F, Melillo RM, Billaud M, Vecchio G, Fusco A. Molecular mechanisms of RET activation in human neoplasia. *J Endocrinol Invest* 1999; 22: 811-9.
- Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, et al. The relationship between specific ret proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET consortium analysis. *JAMA* 1996; 276: 1575-9.
- Barbot N, Calmettes C, Schuffenecker I, et al. Pentagastrin stimulation test and early diagnosis of medullary thyroid carcinoma using an immunoradiometric assay of calcitonin: comparison with genetic screening in hereditary medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 114-20.
- Hofstra RMW, Fattoruso O, Quadro L, et al. A novel point mutation in the intracellular domain of the ret Protooncogen in a family with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4176-8.
- Mulligan LM, Eng C, Healey CS, et al. Specific mutations of the RET protooncogene are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC. *Nat Genet* 1994; 6: 70-4.
- Schuffenecker I, Virally-Monod M, Brohet R, et al. Risk and penetrance of primary hyperparathyroidism in multiple endocrine neoplasia type 2 A families with mutations at codon 634 of the RET proto-oncogene. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 487-91.
- Bugalho MJ, Frade JP, Santos JR, Limbert E, Sobrinho L. Molecular analysis of the RET proto-oncogen in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma: a novel point mutation in the extracellular cysteine-rich domain. *Eur J Endocrinol* 1997; 136: 423-6.
- Komminoth P, Kunz EK, Matias-Guiu X, et al. Analysis of RET protooncogene point mutations distinguished heritable from non heritable medullary thyroid carcinomas. *Cancer* 1995; 76: 479-89.
- Simon S, Pavel M, Hensen J, Berg J, Hummer HP, Carbon R. Multiple endocrine neoplasia 2A syndrome: Surgical management. *J Pediatr Sur* 2002; 37: 897-900.
- Wells SA, Skinner MA. Prophylactic thyroidectomy, based on direct genetic testing, in patients at risk for multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes. *Exp Clin Endocr Diab* 1998; 52: 455-60.
- Heshmati HM, Gharib H, van Heerden JA, Sizemore GW. Advances and controversies in the diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma. Review. *Am J Med* 1997; 103: 60-9.
- Wells SA, Chi DD, Toshima K, et al. Predictive DNA testing and prophylactic thyroidectomy in patients at risk for multiple endocrine neoplasia type 2A. *Ann Surg* 1994; 220: 237-50.
- Niccoli-Sire P, Murat A, Baudin E, et al. Early or prophylactic thyroidectomy in MEN 2/FMTC gene carriers: results in 71 thyroidectomized patients. The French Calcitonin Tumours Study Group (GETC). *Eur J Endocrinol* 1999; 141: 468-74.
- Sanso GE, Domene HM, Garcia Rudaz MC, et al. Very early detection of RET proto-oncogene mutation is crucial for preventive thyroidectomy in multiple endocrine neoplasia type 2 children. *Cancer* 2002; 94: 323-30.
- Hansen HS, Terring H, Godballe C, Jäger AC, Nielsen FC. Is thyroidectomy necessary in RET mutations carriers of the familial medullary thyroid carcinoma syndrome? *Cancer* 2001; 89: 863-907.

-----

La principal fuerza de una nación moderna está constituida por la calidad y cantidad de investigadores científicos y técnicos capaces que dispone, pues ellos son el más importante capital y riqueza de un país moderno. Existe un evidente paralelismo entre el desarrollo científico y el adelanto económico y la fuerza real de las naciones en el momento actual.

Bernardo A. Houssay (1887-1971)