

UTILIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE HIGH RESOLUTION MELTING PARA EL CRIBADO MUTACIONAL DEL PROTO-ONCOGEN RET, HRAS Y KRAS EN CÁNCER MEDULAR DE TIROIDES.

MOYA Christian Martín(1), TOLABA Norma Noemí(1), BAZZONI Paola (2), GONZA María Natalia(3), SAUS Agustín(4), ABATE Cintia(4), CERIONI Valeria(4), GALÍNDEZ Macarena(4) y MONTEROS ALVI Marcelo(2)
 (1) Sector de Biología Molecular y (2) Anatomía Patológica, Programa de Diagnóstico y Tratamiento.
 (3) Programa de Medicina Nuclear. (4) Programa de Endocrinología. Hospital de Endocrinología y Metabolismo, Dr. Arturo Oñativía. Salta, Argentina.

Introducción:

El cáncer medular de tiroides medular (CMT) es una neoplasia neuroendocrina relativamente poco frecuente derivada de las células C o parafooliculares de tiroides. Sin embargo, las muertes por CMT representan una fracción significativamente alta dentro del cáncer de tiroides. El CMT puede ocurrir esporádicamente o como parte del síndrome hereditario autosómico dominante, la neoplasia endócrina múltiple (MEN2). Las formas hereditarias representan el 25% de los casos y se deben a mutaciones activantes en el proto-oncogen RET en el 95-98% de los casos. Aunque, en las formas esporádicas de CMT las mutaciones somáticas en el RET desciende a un 40-50% de los tejidos tumorales [1]. Sin embargo, la probabilidad de tener una mutación germinal en el RET en un paciente con CMT aparentemente esporádico es de tan solo el 1-7% [2]. Informes recientes han documentado frecuentes mutaciones en los genes KRAS y HRAS en el subgrupo de CMT esporádico con secuencia normal de RET [3].

Debido a que las mutaciones en RET se producen en diferentes exones del gen y no posee sitios hotspot de mutaciones, no existe un kit diagnóstico comercial para los estudios moleculares. Por ello, si no se dispone de una técnica de cribado mutacional, se deben secuenciar la mayoría los exones del gen en búsquedas de mutaciones.

Objetivos:

- Implementar una técnica molecular de cribado que facilite la identificación de mutaciones, variantes de significado incierto y polimorfismos.
- Utilizar esta técnica molecular para el estudio de pacientes tanto con CMT esporádico, familiar y/o NEM2.

Materiales y Métodos:

Luego de valorar diferentes técnicas moleculares se decidió poner a punto y utilizar la técnica de High Resolution Melting (HRM) para la identificación de mutaciones puntuales en los genes de interés. Los genes elegidos para estudiar por HRM en los pacientes con CMT fueron: en primer lugar el proto-oncogen RET (exones 3, 5, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15 y 16), y en caso de no identificarse una mutación patogénica, los genes HRAS y KRAS (exones 2 y 3). Una vez puesta a punto y teniendo controles normales para cada uno de los exones mencionados, se procedió al estudio de pacientes. Hasta el momento se estudiaron 3 controles normales (2 varones y 1 mujer), 3 pacientes con CMT esporádico (3 mujeres), un paciente varón con CMT y enfermedad de Hirschsprung y sus padres, y una familia con CMT familiar (CMTF) compuesta por 15 miembros (8 varones y 7 mujeres).

Resultados:

A partir del ADN procedente de 3 controles normales se amplificaron por PCR y luego se secuenciaron los 10 exones de RET, y los 2 exones de HRAS y KRAS donde se producen prácticamente la totalidad de mutaciones descritas. Posteriormente se analizaron los mismos ADNs mediante HRM para evaluar la sensibilidad y especificidad de la técnica en detectar los polimorfismos identificados por secuenciación. Una vez puesta a punto la técnica, se procedió a analizar por HRM el ADN de los pacientes obtenido a partir de sangre periférica (además se incluyó en el estudio el ADN purificado del tejido tumoral de 2 pacientes). Se identificó la mutación puntual c.1858T>C (p.C620R) en el exón 10 de RET en el paciente con CMT y enfermedad de Hirschsprung. Se analizaron los padres del paciente y presentaron secuencia normal. Además, se identificó la mutación puntual c.1901G>A (p.C634Y) en el exón 11 de RET en 3 mujeres y 1 varón de la familia con CMTF. No se identificaron mutaciones puntuales en ninguna de las 3 mujeres con CMT esporádico en los genes RET, HRAS, ni KRAS. Se identificaron también 3 polimorfismos de nucleótido simple (SNP) exónicos ya descritos en las bases de datos, a saber: G691S (exón 11), L769L (exón 13), S904S (exón 15). Y un SNP intrónico 24 nucleótidos antes de finalizar el intrón 14, todos ellos en RET.

Conclusiones:

La técnica de HRM demostró ser un método rápido, sensible, específico y fiable de detección de variantes genéticas, además permite la detección simultánea de más de una variante, y evita la secuenciación innecesaria de genotipos normales.

El análisis de esta muestra de 21 individuos permitió la identificación de 2 mutaciones patogénicas ya descritas en la literatura, y 4 SNPs no patogénicos frecuentes en la muestra analizada. El estudio de los padres del paciente con la mutación p.C620R confirmó que es una mutación de novo en la línea germinal. Y el análisis de la familia con CMTF, permitió realizar 1 tiroidectomía profiláctica en un niño positivo para la mutación p.C634Y.

La importancia de los estudios moleculares en CMT y sobre todo en NEM2 radica en que permiten la estratificación del diagnóstico basado en la mutación de los portadores, la prevención temprana e incluso evitar la aparición del cáncer realizando tiroidectomías profilácticas.

Bibliografía:

1. Elisei R, Cosci B, Romei C, et al. Prognostic significance of somatic RET oncogene mutations in sporadic medullary thyroid cancer: a 10-year follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:682-687.
2. Eng C, Mulligan ML, Smith DP, et al. Low frequency of germline mutations in the RET proto-oncogene in patients with apparently sporadic medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1995;43:123-7.

3. Moura MM, Cavaco BM, Pinto AE, Leite V. High prevalence of RAS mutations in RET-negative sporadic medullary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:863-868.