

**TAMIZACIÓN GENÉTICA DEL PROTO-ONCOGEN *RET* EN UNA RED  
FAMILIAR DEL NORORIENTE COLOMBIANO AFECTADA POR CARCINOMA  
MEDULAR DE TIROIDES FAMILIAR. ESTABLECIMIENTO PRELIMINAR DE LA  
CORRELACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA**

**ADRIANA LUCIA MANOSALVA CORTES**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE SALUD  
ESCUELA DE MEDICINA - ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
BUCARAMANGA  
2016**

**TAMIZACIÓN GENÉTICA DEL PROTO-ONCOGEN *RET* EN UNA RED  
FAMILIAR DEL NORORIENTE COLOMBIANO AFECTADA POR CARCINOMA  
MEDULAR DE TIROIDES FAMILIAR. ESTABLECIMIENTO PRELIMINAR DE LA  
CORRELACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA**

**ADRIANA LUCIA MANOSALVA CORTES**

**Trabajo de Investigación presentado como requisito para optar al título de  
MAGISTER EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS**

**Director**

**HERMAN JOSE ARTEAGA NARVAEZ**

**Médico, PhD**

**Codirector**

**CLARA INES VARGAS CASTELLANOS**

**Médica, MSc**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE SALUD**

**ESCUELA DE MEDICINA - ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS**

**BUCARAMANGA**

**2016**

## DEDICATORIA

*¡Oh, profundidad de las riquezas y de la sabiduría y del conocimiento de Dios!  
¡Cuán insondables son sus juicios e inescrutables sus caminos! Pues, ¿quien ha  
conocido la mente del Señor?, ¿o quien llegó a ser su consejero?, ¿o quien le ha  
dado a El primero para que se le tenga que recompensar ? Porque de El, por El y  
para El son todas las cosas. A El sea la gloria para siempre. Amén*

*Romanos 11:33-36 LBLA*

## AGRADECIMIENTOS

*Por tanto, al Rey eterno, inmortal, invisible, único Dios, a El sea honor y gloria por los siglos de los siglos. Amén. 1 Timoteo 1:17 LBLA.*

A Dios, quién me ha permitido la vida, y es quién soberanamente orquesta cada situación, de manera que cada circunstancia, siempre ayuda para bien.

A mi amada congregación CDA 24/7 y a mis amigos del Faro por sus continuas plegarias a Dios en todo tiempo, muchas gracias.

A mi padres y hermanos, quienes hicieron posible con su amor, cuidado y apoyo incondicional el camino difícil más fácil.

A todos y cada uno de los pacientes y familiares de la red familiar analizada, quienes hicieron posible la realización de este estudio.

A la Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas por todo el apoyo académico y financiero para desarrollar cada una de las fases del proyecto de investigación y a cada una de las personas que forman parte de la parte administrativa y de dirección del programa, quienes siempre ofrecieron su apoyo constante y gran amabilidad.

A la DIEF y la VIE por el apoyo económico para desarrollar este trabajo de investigación.

A mi director de trabajo de grado, el Doctor H. José Arteaga por la oportunidad de desarrollar esta investigación, por su asesoría y apoyo para culminar este proceso académico.

A la Doctora María Eugenia Cardona por toda su amabilidad, paciencia y constante apoyo para la revisión y corrección de todos los escritos relacionados con este trabajo de grado.

A mi co-directora, la Doctora Clara Inés Vargas por toda su asesoría y apoyo durante este proceso académico y a su grupo de investigación en genética humana quienes me brindaron su valioso tiempo y su importante ayuda durante la fase final de mi proceso académico.

A la Doctora Olga Mercedes Álvarez directora del departamento de Patología de la UIS por su valiosa asesoría médico-científica para hacer posible los análisis histopatológicos y los documentos relacionados con la producción intelectual de este trabajo de grado.

Al el Doctor Álvaro Herrera, médico cirujano de cabeza y cuello y a su grupo de investigación de cirugía de cabeza y cuello del Hospital Universitario de Santander, quienes hicieron posible el contacto y el seguimiento a los pacientes.

A la Dra. Clara Isabel González Rugeles, directora del grupo de investigación GIEM, de la Universidad Industrial de Santander por su aval y apoyo para realizar los trabajos experimentales asociados con esta investigación.

A los estudiantes de pregrado y posgrado de las Escuelas de Medicina y de Bacteriología de la UIS quienes apoyaron con su trabajo la fase inicial de este proyecto.

A todos mis compañeros del Laboratorio Central de Investigaciones de la Facultad de Salud por el cariño, el ánimo y la asesoría que siempre me ofrecieron.

Al Laboratorio de Biología Molecular del INDRE en Ciudad de México, quienes nos apoyaron durante la fase experimental de secuenciamiento de muestras.

A mis amigos de afuera, de lejos y de cerca, quienes siempre estuvieron para escucharme, cuestionarme y motivarme para culminar este proyecto, a ustedes gracias, gracias por tan generoso cariño inmerecido.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág</b>
INTRODUCCION	19
1. OBJETIVOS	21
1.1 OBJETIVO GENERAL	21
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
3. MARCO TEORICO	25
3.1 GLÁNDULA TIROIDES	25
3.1.1 Generalidades	25
3.1.2 Histología	26
3.1.3 Embriología	27
3.1.4 Origen de las células parafoliculares o células C	28
3.1.5 Aspectos fisiológicos	31
3.2 TUMORES TIROIDEOS	33
3.2.1 Generalidades	33
3.2.2 Epidemiología del cáncer de tiroides	34
3.3 CARCINOMA MEDULAR DE TIROIDES	35
3.3.1 Generalidades	35
3.3.2 Aspectos histopatológicos relevantes del CMT	36

3.3.3 Marcadores bioquímicos e inmunohistoquímica	37
3.3.4 Aspectos clínicos, de diagnóstico y tratamiento	37
3.4 NEOPLASIA ENDOCRINA MÚLTIPLE	38
3.4.1 Generalidades	38
3.4.2 Clasificación de la NEM	39
3.5 CARCINOMA MEDULAR DE TIROIDES FAMILIAR (CMTF)	43
3.5.1 Definición	43
3.5.2 Genética y biología molecular del síndrome NEM 2	43
3.5.2.1 El proto-oncogén <i>RET</i>	43
3.5.2.2 La Proteína RET	44
4. MATERIALES Y METODOS	52
4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	52
4.1.1 Selección de la población	52
4.1.2 Criterios de inclusión	52
4.1.3 Aspectos Éticos	52
4.2 PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO	53
4.2.1 <i>Extracción de ADN</i>	53
4.2.2 <i>Amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR) secuencias exónicas del gen RET</i>	53
4.2.3 <i>Secuenciación</i>	55
4.2.4 Análisis de histopatología	56
5. RESULTADOS	57
6. DISCUSIÓN	69

7. CONCLUSIONES	75
8. RECOMENDACIONES	76
BIBLIOGRAFÍA	78
ANEXOS	95

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág</b>
Tabla 1. Subtipos Neoplasia Endocrina Múltiple	42
Tabla 2. Frecuencia de mutaciones proto-oncogén <i>RET</i>	49
Tabla 3. Nivel de riesgo ATA y mutaciones proto-oncogén <i>RET</i> asociadas	50
Tabla 4. Lista de cebadores empleados	54
Tabla 5. Condiciones de PCR para la amplificación de exones	55
Tabla 6. Lista de individuos participantes en el estudio	60
Tabla 7. Lista de portadores de la mutación C618S	66

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág</b>
Figura 1. Patrón de distribución de las células C en la glándula tiroides de dos especies diferentes	27
Figura 2. RNAm RET y proteína RET	45
Figura 3. Mutaciones del gen <i>RET</i> asociadas con NEM 2	48
Figura 4. Árbol genealógico caso índice.	59
Figura 5. Árbol genealógico caso índice con reporte de mutación.	62
Figura 6. Electroforesis de los productos de PCR de los exones amplificados	64
Figura 7. Cromatograma de la Mutación G/C en la reacción de Secuenciamiento del exón 10 del gen <i>RET</i> de un paciente con CMT de la red familiar estudiada	65
Figura 8. Patrón histológico del CMT en un paciente de la red familiar estudiada	67
Figura 9. Patrones histológicos de CMT, CPT y Tiroiditis de Hashimoto en un paciente de la red familiar estudiada.	68

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág</b>
Anexo A. Declaración de consentimiento informado para mayores de 18 años	96
Anexo B. Declaración de consentimiento informado para menores de 18 años	99
Anexo C. Declaración de asentimiento para menores de 18 y mayores de 7 años	102
Anexo D. Certificate of Attendance 15th International Thyroid Congress and 85th Annual Meeting of the American Thyroid Association	105

## LISTA DE ABREVIACIONES

ADN: Acido DesoxirriboNucleico  
AKT: Proteína kinasa B, o PKB: del inglés Protein Kinase B  
ATA: del inglés: *American Thyroid Association*  
ATP: Adenosintrifosfato  
CFT: Cáncer Folicular de Tiroides  
CT: Cáncer de Tiroides  
CTA: Cáncer de Tiroides Anaplásico  
CMT: Carcinoma Medular de Tiroides  
CMTF: Carcinoma Medular de Tiroides Familiar  
CPT: Carcinoma Papilar de Tiroides  
CTPD: Cáncer de Tiroides Pobremente Diferenciado  
C618S: Mutación codón 618 (Cisteína/Serina)  
EDTA: Etilendiaminotetraacético  
EH: Enfermedad de Hirschsprung  
ERK: del inglés, *Extracellular signal-Regulated Kinases*  
FEO: Feocromocitoma  
FMTC: del inglés, *Familial Medullary Thyroid Cancer*  
GNDF: del inglés, *Glial Cell Derived Neurotrophic Factor*  
HE: Hematoxilina-Eosina  
HPT: Hipoparatiroidismo  
HSCR: del inglés, *Hirschsprung Disease*  
HT: del inglés, *Hashimoto Thyroiditis*  
LPT: Linfoma Primario de Tiroides  
MEK: del inglés, *Mitogen/Extracellular signal-regulated Kinases*  
MEN: *del ingles, Multiple Endocrine Neoplasia*  
MPT: Microcarcinoma Papilar de Tiroides

NEM: Neoplasia Endocrina Múltiple  
NEM 1: Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 1  
NEM 2A: Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2 A  
NEM 2B: Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2 B  
NEM 4: Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 4  
PHEO: del inglés, *Pheochromocytoma*  
PHPT: del inglés, *Primary Hyperparathyroidism*  
PI3K: del inglés, *Phosphatidylinositide 3-Kinase*  
PCR: del inglés, *Polimerase Chain Reaction*  
PRGC: Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina  
RAF: del inglés, *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*  
RET: del inglés, *REarranged during Transfection*  
RET/PTC: del inglés, *REarranged during Transfection/Papillary Thyroid Cancer*  
SPT: Sarcoma Primario de Tiroides  
TAE: TrisacetatoEDTA  
Tg: Tiroglobulina  
TH: Tiroiditis de Hashimoto  
TK: del inglés: *Tirosin Kinase*  
TSH: del inglés, *Thyroid-Stimulating Hormone*  
TRH del inglés, *Thyrotropin-Releasing Hormone*  
T3: Triyodotironina  
T4: Tetrayodotironina

## RESUMEN

**TITULO:** TAMIZACIÓN GENÉTICA DEL PROTO-ONCOGEN *RET* EN UNA RED FAMILIAR DEL NORORIENTE COLOMBIANO AFECTADA POR CARCINOMA MEDULAR DE TIROIDES FAMILIAR. ESTABLECIMIENTO PRELIMINAR DE LA CORRELACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA\*

**AUTORA:** ADRIANA LUCIA MANOSALVA CORTES\*\*

**PALABRAS CLAVE:** *RET*, NEM 2, CMTF, C618S

### DESCRIPCION

Las mutaciones germinales en el proto-oncogén *RET* causan NEM 2 y CMTF. La mutación *RET* C618S (TGC/TCC), según la ATA, es de riesgo B (moderado) y se asocia con NEM 2A y CMTF, con penetrancia del 100% para CMT y riesgo menor para HPT, FEO y EH. Aquí, reportamos un caso de CMTF asociado con la mutación C618S y coexistente con CPT y TH. Se identificó una familia del nororiente colombiano, de 31 miembros con 9 afectados por enfermedad nodular tiroidea, sin evidencia de otras patologías asociadas a NEM 2 y se diagnóstico presuntivamente con CMTF. Una paciente de 41 años de edad, de este grupo, con diagnóstico de CMT, se trató mediante tiroidectomía total y vaciamiento ganglionar. Los análisis histopatológicos mostraron CMT, CPT y TH y múltiples metástasis ganglionares del CMT. Posteriormente, la paciente ha mantenido remisión clínica y bioquímica durante 7 años y sin otras patologías asociadas a NEM 2. En la paciente y en 13 de 28 miembros de la familia estudiados, se encontró la mutación C618S. El CPT en pacientes con mutaciones del proto-oncogén *RET* y CMT se considera incidental. Las mutaciones *RET* K603Q, M918T, V804L y C634S se han encontrado en familias con NEM 2 afectadas tanto por CMT y CPT. Estudios *in vitro* en células epiteliales de tiroides, han mostrado cierta actividad mitogénica de estas mutantes. La coexistencia de TH con CMT es rara, pero es frecuente con CPT. Por lo tanto, la causa del CPT observado en este caso podría ser la TH, más que la mutación de *RET*. Hasta donde conocemos, este es el primer reporte de la mutación *RET* C618S en asociación con CMTF y CPT. Estas observaciones justifican estudios moleculares y celulares adicionales para determinar la actividad transformadora de la mutación *RET* C618S.

---

\* Trabajo de Investigación

\*\*Facultad de Salud, Escuela de Medicina y Escuela de Microbiología. Director: Herman Jose Arteaga Narvaez Codirectora: Clara Ines Vargas Castellanos

## ABSTRACT

**TITLE:** GENETIC SCREENING OF THE RET PROTO-ONCOGENE RET IN A COLOMBIAN NORTH-EAST KINDRED AFFECTED WITH FAMILIAL MEDULLARY THYROID CARCINOMA. PRELIMINARY ESTABLISHMENT OF A GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATION

**AUTHOR:** ADRIANA LUCIA MANOSALVA CORTES\*\*

**KEYWORDS:** *RET*, MEN 2, FMTC, C618S

### DESCRIPTION

Different germ-line mutations in the RET proto-oncogene cause MEN2 and FMTC. The MTC and PTC association is rare, although the reported cases are increasing. The RET C618S (TGC/TCC) mutation is classified as level B or higher risk and is associated with MEN2A and FMTC, with an organ penetrance of 100% for MTC and minor risk for PHPT, PHCT and HSCR. Here, we report a case of FMTC associated with PTC, HT and the RET C618S mutation. A 31 member kindred, from the Colombia Northeast, with at least 9 members affected by thyroid nodular disease and none evidence of other MEN 2 associated diseases, was identified and a presumptive diagnosis of FMTC was established. A 41-year-old female patient, from this group, underwent total thyroidectomy after clear findings of MTC. Histopathology analysis showed MTC, papillary microcarcinoma and HT. MTC dissemination to multiple regional lymph nodes was observed. After complete ablation of the affected lymphatic chains, the patient has remained with clinical and biochemical remission for 7 years. The mutation C618S was found in the patient and in 13 out 28 studied family members. PTC in patients with MTC and RET mutations is considered coincidental and the RET K603Q, M918T, V804L and C634S mutations have been reported in families with MEN2 affected by both MTC and PTC. Studies in vitro have shown some mitogenic activity of these mutants in thyroid epithelial cells. The association of HT with MTC is rare but is clear with PTC. Therefore, the cause of the PTC observed in this case could be the HT background rather than the RET mutation. To our knowledge this is the first report of the RET C618S mutation in association with FMTC and PTC. This observation warrants further molecular and cellular studies regarding the transforming activity of the RET C618S mutation.

---

\*\* Faculty of Health, School of Medicine-School of Microbiology and Bioanalysis. Director: Herman Jose Arteaga Narvaez Co-Director: Clara Ines Vargas Castellanos

## INTRODUCCION

El Carcinoma Medular de Tiroides (CMT) es un tumor que afecta las células parafoliculares (células C, productoras de calcitonina) de la glándula tiroides, representa el 5-10% de todos los cánceres tiroideos (Leboulleux et al., 2004) y puede presentarse en forma esporádica o hereditaria. La condición heredable forma parte de un síndrome poliglandular, el Síndrome de Neoplasia Endocrina Múltiple (NEM), que se relaciona con la aparición de neoplasias en uno o más órganos endocrinos y en algunos casos con presencia de otras patologías no endocrinas. Las neoplasias endocrinas hereditarias muestran una penetrancia variable dependiendo de la mutación relacionada, y además están acompañadas de un patrón de expresión también variable, no sólo en la presentación clínica sino también en la edad de aparición de la enfermedad (Hyer et al., 2005).

El CMT asociado a NEM puede estar acompañando a otras patologías neuroendocrinas tales como feocromocitoma e hiperparatiroidismo, entre otras y en este caso constituye parte de un tipo de NEM denominada NEM tipo 2 (NEM 2) de la cual existen dos subtipos, la NEM tipo 2A (NEM 2A) y la NEM tipo 2B (NEM 2B) ó puede presentarse como una entidad única, constituyendo lo que algunos autores consideran un subtipo de NEM 2 denominado Carcinoma Medular de Tiroides Familiar (CMTF), aunque otros autores consideran el CMTF como una variable de NEM 2A (Niccoli-Sire et al., 1999; Kloos et al., 2009; Wells et al., 2015)

El CMT heredable es una patología tumoral con 100% de penetrancia (Ponder et al., 1988), asociada a varios tipos de mutaciones en el proto-oncogén *RET* (del inglés *R*Eranged *d*uring *T*ransfection), las cuales se relacionan con su forma de aparición, solo o acompañado de otras alteraciones, su grado de agresividad y la edad de aparición (Plaza-Menacho et al, 2006; Niederle et al., 2014). Esta alteración se transmite con un patrón de herencia autosómica dominante y por lo tanto es

bastante útil y relativamente fácil identificar los individuos portadores de la mutación relacionada en una red familiar afectada por la forma heredable del CMT. El CMT heredable es una entidad de buen pronóstico, si su diagnóstico se hace en forma temprana y es una entidad curable si se trata con tiroidectomía antes de la diseminación del tumor. Además, es prevenible si se realiza una tiroidectomía profiláctica, a la edad apropiada en los individuos portadores de la mutación. La caracterización molecular de la mutación circulante en redes familiares afectadas de CMT permite definir conductas médicas apropiadas más personalizadas y curativas, permitiendo la oportunidad de reducir la morbilidad y la mortalidad para este tipo de tumor (Kloos et al., 2009; Wells et al., 2015).

## **1. OBJETIVOS**

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar genotípicamente los individuos de una red familiar afectada con Carcinoma Medular de Tiroides Familiar (CMTF) y establecer la correlación entre el tipo de mutación presente y las características clínicas de la enfermedad en los individuos sintomáticos.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Identificar los miembros portadores de mutaciones en el proto-oncogén RET dentro de la red familiar.

Establecer la correlación entre el tipo específico de mutación en la secuencia del proto-oncogén RET encontrada en la red familiar y las características clínicas de la enfermedad en los individuos sintomáticos.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El grupo de Cirugía de Cabeza y Cuello del Hospital Universitario de Santander identificó varios pacientes, relacionados consanguíneamente, afectados con CMT provenientes de la Provincia Guanentina de Santander en el Nororiente Colombiano y se sospecho la posibilidad de la presencia de un caso de NEM 2. Posteriormente, junto con el grupo de Inmunología y Medicina Molecular de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, se identificó una red familiar afectada por CMT con siete generaciones de individuos y se realizó el diagnóstico presuntivo de NEM 2. En esta familia se desconocía el componente genético asociado a esta patología familiar, el cual probablemente sería una mutación en el proto-oncogén *RET*.

Dada la importancia, y la facilidad relativa de la caracterización molecular de diversas patologías hereditarias, mediante técnicas de biología molecular, actualmente consideradas convencionales, se decidió identificar la mayor cantidad de miembros de la red familiar relacionados con los individuos afectados por CMT, para realizar la tamización genética en busca de la mutación circulante en la red familiar y establecer la condición de portador para cada miembro estudiado.

Esto es de gran significado en CMTF dado que esta es la única patología tumoral hereditaria con 100% de penetrancia y la caracterización molecular de esta constituye una herramienta fundamental para el diagnóstico temprano con el fin de establecer el tratamiento definitivo para todos los individuos portadores de mutación *RET* en redes familiares con casos de CMT, permitiendo también clasificar acertadamente a la familia en el subtipo de NEM y establecer el pronóstico y las estrategias terapéuticas y de prevención (Brandi et al., 2001; Yip et al., 2003).

Adicionalmente, es importante destacar que la identificación de portadores permite orientar y hacer más eficiente la utilización de otras pruebas diagnósticas tales como la determinación de niveles de calcitonina basal y/o post-estímulo con pentagastrina en individuos con sospecha de CMT (Van Veelen et al., 2009; Erovic et al., 2012).

La Asociación Americana de Tiroides (ATA, del inglés *American Thyroid Association*) inicialmente estableció un sistema de clasificación en 4 niveles de riesgo (de A a D, de menor a mayor nivel de riesgo) en NEM 2 basados en el tipo de mutación específica que afecta a codones determinados del proto-oncogén *RET* (Kloos et al., 2009), más recientemente Wells y colaboradores definen 3 tipos de niveles de riesgo, el nivel de riesgo moderado agrupando los niveles A y B, nivel de riesgo alto para C y nivel de riesgo muy alto para D (Wells et al., 2015). El sistema de clasificación de riesgo permite agrupar dichas mutaciones en grados de agresividad de acuerdo a la probabilidad de metástasis, la presencia de diferentes tipos de neoplasias y otras patologías asociadas a NEM 2, la edad de aparición de cada una de las posibles patologías y la mortalidad asociada a cada tipo de mutación; por ejemplo, las mutaciones en los codones 883 y 918 se consideran de riesgo D y para este caso la tiroidectomía profiláctica es recomendada antes del primer año de vida; para las mutaciones de riesgo C, relacionadas con mutaciones en el codón 634 la tiroidectomía es requerida entre los 2 y 4 años de vida; para el caso de las mutaciones clasificadas con riesgo B la tiroidectomía profiláctica es recomendada antes de los 5 años y para el riesgo A antes de los 10 años de edad. Para cada caso particular se deben considerar algunos criterios adicionales (Kloos et al., 2009; Niederle et al., 2014). La detección molecular del genotipo asociado en esta familia afectada por CMT hereditario es factible y relativamente fácil en nuestro medio, dadas las facilidades para desarrollar los procedimientos moleculares requeridos y es de gran importancia para la familia afectada y para los médicos tratantes (Brauckhoff et al., 2004; Kloos et al., 2009). En nuestro medio este tipo de diagnóstico molecular no está aún

disponible como herramienta rutinaria de diagnóstico y dada su viabilidad se consideró importante y necesario la caracterización molecular de esta red familiar. Adicionalmente, es de interés académico y de importancia médica y de salud pública la caracterización de las mutaciones circulantes en la región, asociadas a los diversos tipos de patologías hereditarias y el establecimiento de las correlaciones fenotipo-genotipo propias de nuestra población.

### 3. MARCO TEORICO

#### 3.1 GLÁNDULA TIROIDES

##### 3.1.1 Generalidades

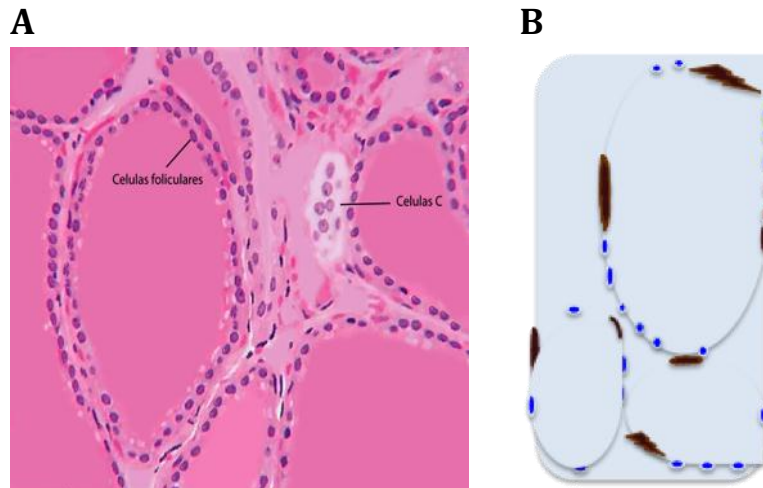
**Anatomía** La glándula tiroides se encuentra ubicada medialmente, en la cara anterior del cuello por debajo del cartílago cricoides, anterior a la tráquea y la faringe, dentro del espacio visceral (Ellis, 2007). El peso estimado de la glándula tiroides en un adulto es de 30 gramos y se extiende desde el segundo hasta el sexto cartílago cricoide; cuando aumenta de tamaño, puede alcanzar el espacio retroesternal del mediastino. El nombre característico de este órgano se debe a su particular apariencia de escudo, y proviene del vocablo griego (θυροειδης-*thyroeidees*, en forma de escudo), debido a que se consideraba que esta estructura era un escudo protector de la laringe (Quiroga-Sánchez, 2013). La tiroides es un órgano simétrico, impar y encapsulado, formado por dos lóbulos unidos por un segmento medio denominado istmo y sobre éste se puede encontrar en algunos casos, un tercer lóbulo, el lóbulo piramidal (Fancy et al, 2010).

**Drenaje linfático** La glándula tiroides es un órgano relativamente pequeño pero tiene una inervación, irrigación sanguínea y drenaje linfático relativamente complejos. La comprensión del drenaje linfático de la tiroides es importante, debido a que la conducta quirúrgica durante la tiroidectomía profiláctica en los pacientes portadores de mutaciones asociadas a Cáncer Medular de Tiroides Familiar (CMTF) en el proto-oncogén *RET*, incluye vaciamiento ganglionar de distinto grado según el tipo de mutación y la edad del paciente (Kloos et al., 2009).

Los canales linfáticos superiores y medios que drenan la tiroides vierten su contenido en los ganglios superiores profundos de la cadena cervical. En el 20% de los casos se puede encontrar drenaje linfático de la parte posterior de los lóbulos tiroideos al espacio faríngeo y retrofaríngeo. Los canales linfáticos inferiores de la tiroides drenan a los ganglios inferiores de los plexos cervical, supraclavicular, paratraqueal y parafaríngeos (Mohebbati & Shaha, 2012).

**3.1.2 Histología.** El primordio tiroideo esta constituido, inicialmente, por una masa sólida de células endodérmicas las cuales entre las semanas 8 y 12 de la gestación se interconectan y fusionan para dar lugar a un lumen central o folículo tiroideo; las células remanentes se disponen en una única capa alrededor del lumen y se conocen como células foliculares. Entre las semanas 11 y 12 de gestación, aparece el componente coloidal del lumen en los folículos. Durante este mismo período, los folículos tiroideos comienzan a incorporar yodo y se puede evidenciar el inicio de la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas (Mohebbati & Shaha, 2012). Otro tipo de células que se observa en el tejido tiroideo son las llamadas células parafoliculares o células C, las cuales derivan su nombre a partir de su disposición parafolicular e interfolicular en la tiroides de algunas especies. Sin embargo, independiente de su patrón de distribución, las células C están siempre adheridas a las células foliculares en la glándula tiroides de los mamíferos (Figura 1). En humanos, las células C normales se localizan predominantemente dentro del folículo tiroideo y menos del 1% tienen localización parafolicular (Fancy et al, 2010; Schmid, 2015). La glándula tiroides no tiene conductos, esta libera sus secreciones directamente al torrente sanguíneo. Las secreciones endocrinas tiroideas tienen un papel preponderante en la regulación del metabolismo y durante el período fetal tienen una función importante en la maduración del cerebro (Kester et al., 2004).

**Figura 1.** Patrón de distribución de las células C en la glándula tiroides de dos especies diferentes



Adaptado de (Williams, 1966) en **A** y de (Schmid, 2015) en **B**.

La figura muestra las células C localizadas, (**A**) entre los folículos tiroideos, lo que hace alusión al nombre original de células parafoliculares; en este caso se observan como un componente adicional del tejido epitelial tiroideo, esta distribución se observa en las aves; el patrón de localización de las células C en los mamíferos (**B**) es diferente; la figura corresponde a tejido tiroideo en el perro y en el cual las células C se encuentran dentro de los folículos tiroides (color café) intercaladas entre las células foliculares (color azul). Este último patrón de localización es el observado en el tejido tiroideo humano, en el cual menos del 1% de células C se localizan en el espacio parafolicular.

**3.1.3 Embriología.** La glándula tiroides se origina del divertículo tiroideo, el cual se forma, alrededor de la cuarta semana de gestación, a partir del endodermo faríngeo, entre la primera y segunda bolsa faríngea; esta estructura penetra el tejido mesenquimatoso originado de la cresta neural; desciende para situarse, alrededor de la séptima semana de gestación, en la parte inferior del cuello y se

expande lateralmente para formar dos lóbulos simétricos. Parte de la tiroides se forma a partir de un componente derivado de la cuarta y quinta bolsas faríngeas, el cuerpo último branquial. Inicialmente se consideró que en los humanos las células de la cresta neural migraban al cuerpo último branquial y daban lugar a las células C de la tiroides, las cuales infiltraban la glándula tiroides al momento de la fusión del cuerpo último branquial con la tiroides (Policeni et al., 2012). Sin embargo, datos recientes de estudios, con técnicas de biología molecular, demuestran que las células de la cresta neural no migran al cuerpo último branquial y que las células C de la tiroides de los mamíferos se derivan del endodermo. La glándula tiroides es funcional a partir del tercer mes de gestación (Johansson et al., 2015; Kameda, 2016).

**3.1.4 Origen de las células parafoliculares o células C.** Los primeros estudios relacionados con el origen embriológico de las células parafoliculares han vinculando este tipo celular con una procedencia neuroectodérmica a partir de la cresta neural (Whitwam, 1977) (Fontaine & Le Douarin, 1977). Las células de la cresta neural son células migratorias y pluripotenciales que surgen de conexiones entre el tubo neural y el ectodermo dorsal, y dan origen a diversos tipos de células, incluyendo neuronas periféricas y células gliales de los sistemas sensorial, simpático y entérico, melanocitos, células del tejido óseo y cartilaginoso, células del tejido conectivo craneofacial y del músculo liso (Fontaine & Le Douarin, 1977) (Baker & Bronner-Fraser, 1997), como también células endocrinas, células cromafines de la médula adrenal y en algunas especies células parafoliculares de la glándula tiroides (Pearse, 1966; Le Douarin & Teillet, 1974; Adams & Bronner-Fraser, 2009).

Sin embargo, desde tiempo atrás algunos investigadores han cuestionado el que se haya atribuido el origen a partir de la cresta neural a varios tejidos, sin evidencia directa (Andrew et al., 1998). De hecho, en investigaciones recientes se

muestran evidencias experimentales sólidas que descartan el origen de las células parafoliculares a partir de la cresta neural (Johansson et al., 2015; Kameda, 2016).

Las células C de la tiroides producen calcitonina, la cual reduce las concentraciones séricas de calcio y mantiene así su homeostasis. El patrón de distribución de las células C es específico de especie; así por ejemplo a diferencia de lo que sucede en otras especies, por razones aun no conocidas, en los mamíferos las células C de la tiroides están en estrecho contacto con las células foliculares, adheridas a su cara basal y son fundamentalmente intrafoliculares.

En otros vertebrados las células C se encuentran separadas en la glándula último branquial, la cual se deriva del cuerpo último branquial. Este último, en los mamíferos se fusiona a la cara posterior de cada uno de los lóbulos tiroideos y se disemina entre las células del parénquima del primordio tiroideo, dando origen a las células C (Kameda et al., 2009). La integración en este sitio explica porque las células C no se encuentran en todo el lóbulo tiroideo, sino que están restringidas su área media y tercio superior (Fancy et al., 2010).

Utilizando modelos de ratones transgénicos, que expresan sistemas de genes reporteros bajo el control de promotores de genes constitutivos, pero condicionados a la activación de promotores de genes específicos de linajes celulares, ha sido posible rastrear, a lo largo del transcurso del desarrollo embrionario, el proceso de colonización de las células progenitoras embrionarias y la diseminación de sus descendientes a los sitios en los que se conforman los diferentes tejidos y estructuras anatómicas, que dan lugar a la glándula tiroides (Blanpain & Simons, 2013). Con base en este tipo de experimentos, diferentes grupos de investigación han mostrado recientemente evidencias directas, muy convincentes, las cuales sugieren que las células C de la tiroides se originan durante el desarrollo glandular del endodermo anterior en la porción faríngea del intestino anterior (Johansson et al., 2015; Kameda, 2016).

La tiroides y el cuerpo último branquial se derivan del ectodermo faríngeo a partir del divertículo tiroideo y de la cuarta bolsa faríngea, respectivamente. Inicialmente, mediante experimentos en modelos animales de aves, se demostró que células mesenquimales de la cresta neural colonizan la tiroides y la glándula última branquial y dan lugar en esta última glándula a las células C (Le Lièvre & Le Douarin, 1975). Por analogía y sin evidencias directas, como se expuso anteriormente, se ha asumido desde hace muchos años que en los mamíferos superiores y en los humanos las células C se originan de la cresta neural. No obstante, utilizando un sistema de ratones transgénicos Cx43-*lacZ* y *Wnt1-Cre/R26R*, el cual permite el rastreo genético de las células derivadas de la cresta neural que migran a diferentes tejidos, Kameda y colaboradores demostraron que las células mesenquimales de la cresta neural que colonizan los arcos faríngeos, no invaden la cuarta bolsa faríngea ni el cuerpo último branquial (Kameda et al., 2007b).

Trabajos adicionales han demostrado que en ratones las células C expresan cadherina E, marcadores de células de origen epitelial (Kameda et al., 2007b) y marcadores genéticos exclusivos de células de origen endodérmico como *Islet1* (Westerlund et al., 2008) y *Foxa2*, el cual es expresado en el endodermo del intestino anterior (Johansson et al., 2015). Finalmente, Johansson y colaboradores, en experimentos de rastreo de linajes celulares con ratones transgénicos *Sox17-2A-iCre/R26R*, demostraron que las células C se derivan del endodermo anterior a partir de precursores *Sox17+* predeterminados para coexpresar los genes *Foxa1* y *Foxa2*, característicos de las células C (Johansson et al., 2015).

El gen *Mash1* se expresa en el cuerpo último branquial pero no es esencial para su formación, sin embargo, se requiere para la diferenciación y supervivencia de las células C. El gen *Nkx2.1* codifica para un factor de transcripción esencial para el desarrollo normal del cuerpo último branquial y del primordio tiroideo, como también para la proliferación tanto de las células foliculares como de las células C

de la tiroides, además de jugar un papel fundamental en la producción de las hormonas tiroideas, estos dos marcadores sugieren que algunas células foliculares pudieran tener origen en el cuerpo último branquial. Experimentos utilizando ratones heterocigóticos para la deficiencia de Nkx2.1 muestran rudimentos del cuerpo último branquial no fusionados con tejido tiroideo pero que presentan pequeños folículos rudimentarios e inmunoreactividad para hormonas tiroideas. Los factores de transcripción Mash1, Hes1 y Nkx2.1 son esenciales para la diferenciación y supervivencia de las células C-progenitoras (Fagman & Nilsson, 2010). En experimentos en ratones, la deficiencia del gen Nkx2.1, se ha asociado a ausencia completa de células C o presencia de unas pocas células en el lóbulo tiroideo (Kimura et al., 1996).

**3.1.5 Aspectos fisiológicos.** La glándula tiroides produce hormonas tiroideas a partir de las células foliculares, en respuesta al efecto de la hormona estimulante de la tiroides (TSH del inglés, *Thyroid-Stimulating Hormone*) producida por la glándula pituitaria, la cual a su vez es liberada por el estímulo de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH del inglés, *Thyrotropin-Releasing Hormone*). Estas hormonas son importantes para la homeostasis del metabolismo basal y el gasto energético, como también para el mantenimiento de energía actuando virtualmente sobre el metabolismo de todas las células. Estas funciones por lo tanto son esenciales para el crecimiento y desarrollo del organismo, especialmente durante el desarrollo embrionario. La producción de hormonas tiroideas esta regulada también por la ingesta de yodo cuya captación y almacenamiento por las células foliculares es inducida por TSH. El yodo es utilizado para la yodación de residuos de tirosina de la proteína Tiroglobulina (Tg) a partir de la cual se generan las hormonas tiroideas Tetrayodotironina (T4) y Triyodotironina (T3). Entre las funciones mas importantes de estas hormonas están el incremento en el consumo de oxígeno, la oxidación de ácidos grasos y la generación de calor sin producción de ATP, síntesis y degradación de proteínas,

glucogenólisis y gluconeogénesis inducida por epinefrina (lo cual afecta la síntesis de glucógeno inducida por insulina), síntesis y utilización de glucosa y síntesis de colesterol. Mediante estos mecanismos y otras acciones órgano específicas las hormonas tiroideas regulan la función de órganos importantes tales como el cerebro, hueso, sistema cardiovascular, tejido graso, corazón, cerebro y pituitaria, entre otros (Cavalieri, 2009).

La mayoría de las células C producen calcitonina, una pequeña hormona de 32 aminoácidos que puede presentar dos isoformas necesarias para su funcionamiento, una de ellas funciona como agonista y la otra como antagonista del receptor de la calcitonina. Una pequeña fracción de las células C producen exclusivamente el Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina (PRGC) el cual es codificado por el mismo gen de la calcitonina y se genera por un mecanismo de corte y empalme diferencial del transcrito primario. EL PRGC es un potente vasodilatador, producido fundamentalmente por fibras nerviosas sensitivas (Grunditz et al., 1986). La producción de calcitonina se eleva con los incrementos de calcio sérico, también con la producción de otras hormonas gástricas y el péptido sintético pentagastrina (Foster, 1968; Barbot et al., 1994). La calcitonina reduce los niveles de calcio sérico fundamentalmente disminuyendo la reabsorción ósea, incrementado su excreción renal y disminuyendo la reabsorción intestinal. Las células C producen otros factores regulatorios que modulan la actividad de las células foliculares y para lo cual se requiere el contacto célula a célula (Bouknight, 2003; Stathatos, 2012).

## 3.2 TUMORES TIROIDEOS

**3.2.1 Generalidades.** El término tumor tiroideo hace referencia a una gran variedad de lesiones de la glándula tiroides originadas a partir de un nódulo tiroideo, en sus estadios iniciales de diagnóstico. Los nódulos tiroideos pueden clasificarse como benignos, indeterminados/sospechosos y malignos e involucran una amplia gama de procesos patológicos. Por lo tanto, para el manejo adecuado del paciente se requiere un procedimiento de diagnóstico planificado que incluya una adecuada evaluación de la historia clínica, pruebas de laboratorio, resultados ecográficos y en la mayoría de los casos, evaluación citológica de material sospechoso obtenido mediante aspirado con aguja fina (Cooper et al., 2006; Albarel et al., 2012; McIver, 2013). Adicionalmente, en las guías de manejo y control del paciente adulto con nódulo tiroideo, es reconocido el uso de marcadores genéticos moleculares, como complemento de los estudios citopatológicos (Camargo et al., 2009; Haugen, et al., 2016).

Las lesiones nodulares tiroideas incluyen los neoplasmas benignos y bien diferenciados, los nódulos tipo bocio, y las alteraciones neoplásicas malignas, que involucran cánceres diferenciados, pobremente diferenciados, no diferenciados, y los carcinomas medulares y anaplásicos. Los tipos histológicos más importantes de tumores malignos de la glándula tiroides se derivan de los dos tipos de células endocrinas de esta glándula, las células foliculares y las células parafoliculares. Los tumores de células foliculares incluyen el Cáncer Papilar de Tiroides (CPT), el Cáncer Folicular de Tiroides (CFT), el Cáncer de Tiroides Pobremente Diferenciado (CTPD) y el Cáncer de Tiroides Anaplásico (CTA) (DeLellis et al., 2004), estos tumores incluyen la mayoría de las enfermedades malignas de la tiroides (Xing, 2013). El tumor que afecta las células parafoliculares o células C, es el Cáncer Medular de Tiroides (CMT) con una proporción de aproximadamente el 3% de las neoplasias tiroideas. También se incluyen entre los cánceres de tiroides

los linfomas primarios de la tiroides (LPT) y el sarcoma primario de la tiroides (SPT) (Giusti et al., 2010).

**3.2.2 Epidemiología del cáncer de tiroides.** El cáncer de tiroides (CT) es el décimo sexto tipo de cáncer más frecuente en el mundo. En el año 2012 fueron diagnosticados 298.000 casos nuevos de CT, lo cual corresponde al 2% del total de casos reportados a nivel mundial para cualquier tipo de cáncer (Ferlay et al., 2015). Se estima que el CT es 2.9 veces más común en mujeres que en hombres. A nivel mundial la frecuencia de CT se ha incrementando de manera continua, particularmente en la población femenina, específicamente los cánceres diferenciados de tiroides y predominantemente el CPT; sin embargo, la tasa de mortalidad del CT ha permanecido estable, sugiriendo que el incremento de la incidencia esta relacionado con el aumento en la eficiencia para la detección de casos nuevos, debido a la utilización de la ultrasonografía diagnóstica, lo cual ha permitido mayor detección de microcarcinomas (Ferlay et al., 2015). También se considera que factores medioambientales tales como la falta de ingesta de yodo (Marcello et al., 2014) y la exposición a radiación ionizante (Zablotska et al., 2015) pueden influir en la frecuencia del CT en las distintas poblaciones, regiones y países.

En 2012, se publicaron los resultados de la primera evaluación del programa de registros de casos de cáncer basados en poblaciones de Bucaramanga, el cual incluyó la frecuencia de los diferentes tipos de cáncer registrados durante el período de 2003 a 2007. En este trabajo se reportó que el CT estaba entre los primeros cinco tipos de tumores mas frecuentemente registrados en población femenina con una frecuencia del 5.6% mientras que en población masculina fue del 1.4%. En este estudio la tasa de incidencia del CT para mujeres y para hombres fue de 9.7 y 2.6 casos por cada 100.000 personas, respectivamente (Uribe et al., 2012).

### 3.3 CARCINOMA MEDULAR DE TIROIDES

**3.3.1 Generalidades.** El CMT representa del 2-3% del total de los neoplasmas tiroideos (Giusti et al., 2010; Xing, 2013). El CMT fue descrito inicialmente por Jaquet en 1906 como un “bocio maligno con amiloide” (Jaquet, 1906), pero fueron Hazard y colaboradores en 1959 quienes realizaron la caracterización clínica y patológica de este tipo de tumor (Hazard et al., 1959). Posteriormente, Williams y colaboradores en 1966 sugirieron que este tipo de tumor se derivaba de las células parafoliculares (Williams, 1966; Williams & Pollock, 1966)

La presentación clínica del CMT puede ser esporádica (75%) o familiar (22%-44%) (Hemminki et al., 2001). La condición heredable del CMT tiene un patrón de transmisión autosómico dominante con un grado de penetrancia del 100% y con presentación multifocal y bilateral (Fallah et al., 2013). El CMT puede presentarse en dos formas clínicas; (i) como un síndrome poliglandular denominado Neoplasia Endocrina Múltiple (NEM) tipo 2 (NEM 2), el cual incluye las subclases NEM 2A (55%) y NEM 2B (5-10%) o (ii) como un síndrome hereditario asociado únicamente con presencia de CMT, denominado Carcinoma Medular de Tiroides Familiar (CMTF) (35%) (Norton et al., 2015).

Los reportes epidemiológicos con respecto a la edad de presentación del CMT difieren unos de otros; sin embargo, se considera que en promedio en NEM 2B el CMT se presenta durante la primera infancia, en NEM 2A durante la adultez temprana y el CMTF en la edad media de la vida (Kloos et al., 2009). No obstante, la edad en la cual se pueden identificar las primeras manifestaciones histológicas de la variedad familiar del CMT puede variar grandemente debido a que cada vez es más frecuente la caracterización genética de los individuos portadores de mutaciones asociadas con esta patología en los grupos familiares afectados (Ríos et al., 2011).

**3.3.2 Aspectos histopatológicos relevantes del CMT.** El CMT está precedido por una alteración histológica denominada Hiperplasia Neoplásica de las células C (HCC) la cual puede ser identificada fácilmente con técnicas histopatológicas de tinción (Wells et al., 2013), en especímenes de tiroides removidos por cirugía profiláctica en pacientes portadores de mutaciones del gen *RET* teñidos con Hematoxilina-Eosina (HE). Los CMT esporádicos no están precedidos por HCC. En el CMT se considera que existe malignidad cuando la HCC hace invasión a través de la membrana folicular. Sin embargo, una proporción menor de CMT pueden encontrarse notablemente circunscritos (Machens, 2003; Schmid, 2015).

El CMT es un tumor sólido firme, localizado generalmente en los dos tercios superiores de la porción lateral de la tiroides y en la forma familiar casi siempre es multifocal y bilateral. Histológicamente presenta una gran variedad y se recomienda la confirmación con la determinación histoquímica de calcitonina. En su forma clásica se caracteriza por la presencia de nidos de células neoplásicas con morfología poligonal o plasmocitoide. En tumores muy pequeños la aparición de desmoplasia estromal es un signo de invasividad y la gran mayoría de los tumores claramente establecidos presentan esta alteración; la presencia de células multinucleadas es más frecuente en los casos familiares que en los esporádicos. La presencia de amiloide se observa entre el 60 al 80% de los CMT y es tipo específico (Khurana et al., 2004). Otros hallazgos histopatológicos incluyen, las calcificaciones y la neovascularización. Sin embargo, existe un gran número de variables histológicas y por lo tanto, la determinación de distintos marcadores histoquímicos es muy importante para corroborar el diagnóstico.

La gran mayoría de los CMT producen calcitonina y son positivos para este marcador y negativas para tiroglobulina en tinciones de inmunohistoquímica. Igualmente los niveles séricos de calcitonina se encuentran elevados en la mayoría de los pacientes con CMT (Schröder et al., 1988; Kaserer et al., 2001; Schmid, 2015).

**3.3.3 Marcadores bioquímicos e inmunohistoquímica.** La mayoría de los CMT expresan marcadores específicos de célula, Calcitonina, Antígeno Carcinoembrionario (ACE) y Cromogranina A, un marcador para tejido neuro-endocrino. Se considera que el uso de estos tres marcadores permite caracterizar a la mayoría de los CMT (Schröder et al., 1988; Harach, 1992; DeLellis, 2004). Adicionalmente, una gran variedad de péptidos y productos neuro-endocrinos pueden ser detectados en una alta proporción de CMT a diferentes concentraciones (Wang, 1998; Chan, 2007; Van Veelen, 2009) Algunos CMT denominados atípicos son negativos para calcitonina y ACE (Schmid & Ensinger, 1998) por lo cual algunos pacientes pueden carecer de niveles séricos elevados de calcitonina (Frank-Raue et al., 2013); algunos de estos tumores sin embargo pueden ser positivos para PRGC (Nakazawa et al., 2014).

**3.3.4 Aspectos clínicos, de diagnóstico y tratamiento.** Los valores plasmáticos elevados de calcitonina se pueden correlacionar con la presencia de CMT (Wells & Franz, 2000). La calcitonina es el marcador serológico más sensible y específico en el diagnóstico prequirúrgico de CMT y útil en el seguimiento postquirúrgico (Hinze, 1998; Moley, 1998; Ismailov & Piulatova, 2004). Los valores plasmáticos de calcitonina disminuyen sustancialmente después de la tiroidectomía, y en los pacientes con compromiso regional se utiliza como marcador de evaluación para la condición libre de metástasis.

El CMT es un tumor de crecimiento lento y la supervivencia de los pacientes bien manejados medicamente es buena y el diagnóstico precoz puede conducir a la curación del paciente. En los casos de CMTF, la cirugía profiláctica puede prevenir la aparición de la enfermedad. El pronóstico del curso del CMT, al momento del diagnóstico, depende de su localización (Clark et al., 2000).

Los pacientes con tumores sin diseminación ganglionar presentan largas supervivencias, en la mayoría de los casos, mientras que aquellos que presentan

metástasis tienen un pronóstico menos favorable (Bergholm, 1997; Erovic, 2012).

El diagnóstico y tratamiento del CMT esporádico y familiar presenta algunas diferencias. El único tratamiento curativo es la cirugía, siempre y cuando sea posible la remoción completa del tumor y sus metástasis ganglionares regionales. En los casos de CMT esporádico el monitoreo con determinaciones de calcitonina sérica de los pacientes con nódulo tiroideo es el método de elección para realizar el diagnóstico de CMT. Mientras que en el CMTF la tiroidectomía profiláctica realizada de acuerdo al tipo de mutación del gen *RET* es la conducta ideal (Cooper et al., 2009).

Un incremento en el valor de las concentraciones de calcitonina sérica, después de seis meses de resección glandular, es sugestivo de enfermedad residual o metastásica. Estos pacientes requieren tratamiento quimioterapéutico sistémico. Por su etiología, en el CMT secundario a mutaciones en el gen *RET*, los inhibidores de quinasas de tirosina han mostrado gran eficiencia (Sherman, 2015; Craven, 2015). En el caso de los pacientes en quienes falla el tratamiento con inhibidores de quinasas de tirosina, el tratamiento con fármacos citotóxicos sigue siendo una alternativa (Ball, 2007).

### **3.4 NEOPLASIA ENDOCRINA MÚLTIPLE**

**3.4.1 Generalidades.** La Neoplasia Endocrina Múltiple (NEM) comprende una serie de síndromes de origen genético autosómico dominante; por lo tanto la identificación temprana de la condición de portadores en los individuos de las familias afectadas es de crucial importancia y determina el curso y desenlace de la enfermedad.

La NEM puede ser definida como la aparición de dos ó más tumores endocrinos en un paciente y comprende varios síndromes poliglandulares, cada uno caracterizados por la presencia de tumores malignos o benignos y otras alteraciones que comprometen distintos patrones de grupos de órganos endocrinos y, en ocasiones, otros órganos y tejidos. Existen tres grandes grupos de síndromes de NEM: NEM tipo 1 asociada a alteraciones del gen *MEN1*, NEM tipo 2A y NEM tipo 2B, las cuales forman parte de un grupo común, la NEM tipo 2, asociadas a mutaciones en el proto-oncogén *RET*. Recientemente, se ha propuesto una cuarta forma denominada NEM tipo 4 (Lee & Pellegata, 2013).

Cada uno de estos síndromes incluye diferentes combinaciones de tumores que pueden comprometer los islotes pancreáticos, la pituitaria anterior, la paratiroides, las glándulas adrenales y las células C de la tiroides.

### **3.4.2 Clasificación de la NEM**

#### **NEM Tipo 1**

La NEM1 es causada por distintos tipos de mutaciones en el gen supresor de tumores *MEN1*, localizado en el cromosoma 11 (11q3), el cual codifica para la proteína menina. El mecanismo exacto mediante el cual las alteraciones de la proteína menina conducen al desarrollo de tumores no se conoce completamente. Los pacientes con NEM 1 desarrollan hiperparatiroidismo (HPT) en el 90-100% de los casos, seguido en orden de frecuencia por diferentes tipos de tumores pancreáticos neuro-endocrinos, adenomas de la glándula pituitaria, tumores de las glándulas adrenales y adenomas de tiroides. Otro tipo de tumores encontrados en este síndrome incluyen, tumores carcinoides, tumores cutáneos y subcutáneos, tumores del sistema nervioso central y tumores del músculo liso. Otros tumores no endocrinos reportados en concurrencia con NEM 1 incluyen, linfomas, tumores de las células renales, melanoma, leiomiomas, mieloma, tumores de ovario, tumores estromales gastrointestinales, entre otros (Norton et al., 2015).

## **NEM tipo 2**

El síndrome NEM 2 se asocia a diversos tipos de mutaciones en la línea germinal del proto-oncogén *RET*, con penetrancia variable para los distintos tipos de mutaciones. Este síndrome tiene una incidencia de 1 en cada 200.000 nacidos vivos y se divide en tres subgrupos, NEM 2A, NEM 2B y CMTF los cuales incluyen aproximadamente el 55, 10 y 35% del total de los pacientes con NEM 2, respectivamente (Brandi et al., 2001; Kloos et al., 2009). La característica fundamental de NEM 2 es el CMT; se considera que tiene una penetrancia cercana al 100%, ya que sin tratamiento profiláctico un paciente tiene un riesgo del 100% de desarrollar CMT alrededor de los 70 años y este tumor es la causa principal de mortalidad en NEM 2. Adicionalmente, la sobrevivencia de los pacientes con CMT se incrementa grandemente si este es tratado en estadios tempranos de la enfermedad. Por lo tanto, se debe enfatizar en la necesidad de la tamización genética de los miembros portadores en las familias afectadas y la detección temprana del CMT (Moline & Eng, 2011). Todos los pacientes con NEM 2 pueden desarrollar CMT multinodular bilateral y aproximadamente la mitad presentan feocromocitoma.

## **NEM tipo 2A**

NEM 2A fue reportado en 1961 por John H. Sipple (Sipple, 1961) y descrito como síndrome de Sipple. La mayoría de los pacientes con NEM 2A desarrollan CMT alrededor de los 5 años de edad, pero este se manifiesta clínicamente alrededor de los 20 a 30 años de edad, en promedio. Aproximadamente el 50% desarrollan feocromocitoma y alrededor del 25% desarrollan hiperparatiroidismo (Quayle et al., 2007). Algunos pacientes además pueden desarrollar enfermedad de Hirschsprung (Decker, 1998), liquen cutáneo amiloidótico y pruriginoso (Gagel et al., 1989), pero presentan una apariencia normal.

## **NEM tipo 2B**

El síndrome NEM 2B fue definido inicialmente por Williams y Pollock en 1966, como un síndrome con presencia de CMT, feocromocitoma, neuromas mucosos y *habitus marfanoide* o síndrome de Marfan (Williams & Pollock, 1966) . NEM 2B da lugar al 5% de los CMT heredables y su presentación es más agresiva, se estima que, en promedio, el CMT en estos pacientes, se desarrolla durante el primer año de vida. El 40% de los pacientes con NEM 2B desarrollan feocromocitoma, pero en este síndrome no se observa hiperparatiroidismo. A diferencia de NEM 2A, este síndrome se acompaña de otro tipo de alteraciones fenotípicas, tales como, *habitus marfanoide*, malformaciones oculares y musculoesqueléticas, así como también neuromas de mucosas generalizados y ganglioneuromas intestinales (Heshmati, 1997; Kouvaraki, 2005) . En este grupo de pacientes la enfermedad se presenta en el primer año de vida y en el 45% de los casos se debe a mutaciones de novo en el gen *RET* y por lo tanto no hay antecedentes familiares (Brandi et al., 2001; Walls, 2014; Norton et al., 2015).

## **NEM tipo 4**

NEM 4 es un síndrome definido recientemente con similitudes a NEM 1 pero relacionado con mutaciones de la línea germinal en el gen supresor de tumor *CDKN1B*, el cual codifica para la proteína inhibidora de las quinasas dependientes de ciclinas, p27. Este síndrome pudiera también estar asociado a otro tipo de mutaciones que afectan de manera similar a genes relacionados con la función de las quinasas dependientes de ciclinas (Lee & Pellegata, 2013; Thakker, 2014). Los pacientes con NEM 4 desarrollan cánceres de paratiroides y pituitaria e hiperparatiroidismo (Norton et al., 2015). Los pacientes pueden también presentar el síndrome de Zollinger–Ellison como consecuencia del desarrollo de gastrinomas o carcinoides gástricos o bronquiales (Lee & Pellegata, 2013).

Tabla 1. Subtipos Neoplasia Endocrina Múltiple

Tipo NEM	CMT	HPT	FEO	Megacolón EH	Neuromas	Liquen cutáneo amiloidótico	Carcinoides y/o Gastrionomas	Tumores Órganos Reproductivos	Adenoma Paratiroides	Adenoma Pituitaria	Hábito marfanoide
NEM 1	0%	90% <sup>i</sup>	<1%	0%	--	0%	+	40%	90%	30-40%	0%
NEM 2 A	90%	25- 30%	50%	7%	0%	10-15%	+	0%	20-30%	0%	0%
NEM 2 B	>90%	0%	50- 60%	60% <sup>a</sup>	100%	0%	0%	0%	0%	0%	60-80%
FMTC	100%	0%	0%	7%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
NEM 4	0%	81% <sup>i</sup>	0%	0%	0%	0%	+	+	+	+	0%

Adaptado de Lee & Pellegata, 2013; Niederle et al., 2014; Thakker et al., 2014 y Wells, SA Jr et al., 2015

NEM, Neoplasia Endocrina Múltiple; CMT, Carcinoma Medular de Tiroides; FEO, Feocromocitoma; HPT, Hiperparatiroidismo; EH, Enfermedad de Hirschsprung. Prevalencias reportadas en %.

(a) Pseudo-Hirschsprung (megacolón y pseudo-obstrucción simulando EH debido a ganglioneuromatosis intestinal).

(i) Valor reportado para la incidencia.

(+) Casos reportados, pero insuficientes para establecer prevalencia.

(--) Información no reportada.

### **3.5 CARCINOMA MEDULAR DE TIROIDES FAMILIAR (CMTF)**

**3.5.1 Definición.** La presentación del CMT asociado a mutaciones de la línea germinal en el proto-oncogén *RET* fue descrito inicialmente en 1986 por Farndon y colaboradores (Farndon et al., 1986). Esta entidad se considera una variable de NEM 2 y presenta un tipo de CMT menos agresivo. Inicialmente, se propuso un criterio amplio para el diagnóstico de CMTF (Eng, et al., 1996), el cual se definió como la presencia de al menos cuatro miembros de una misma familia afectados con CMT sin ninguna otra manifestación endocrina asociada, posteriormente este criterio ha sido revisado, como se discutirá más adelante.

#### **3.5.2 Genética y biología molecular del síndrome NEM 2**

**3.5.2.1 El proto-oncogén *RET*.** El proto-oncogén *RET* fue aislado en 1985 por Takahashi y colaboradores en experimentos de transfección de fibroblastos NIH 3T3 con segmentos de ADN sonificado proveniente de linfomas humanos (Takahashi et al., 1985). En estos experimentos se identificó un nuevo gen con potencial oncogénico que era el producto de un rearreglo de dos unidades de ADN localizadas en sitios diferentes, de ahí su nombre *RET* (del inglés, REarranged during Transfection); más adelante en 1990 Grieco y colaboradores, identificaron un nuevo oncogén en Cáncer Papilar de Tiroides (CPT) el cual es el producto de un rearreglo *in vivo* entre el dominio con actividad de quinasa de tirosina del proto-oncogén *RET* con el extremo 5' del gen H4 (*RET/H4*) y se ha conocido desde entonces como *RET/PTC* (Grieco et al., 1990). Este último hallazgo demuestra el potencial oncogénico de la expresión aberrante del proto-oncogén *RET* en Cáncer de Tiroides.

El proto-oncogén *RET* se localiza en el cromosoma 10 (10q11.2), esta constituido por 21 exones y codifica para tres isoformas de la proteína RET (*RET9* de 1.072 aminoácidos, *RET43* de 1.106 aminoácidos y *RET51* de 1.114 aminoácidos) la

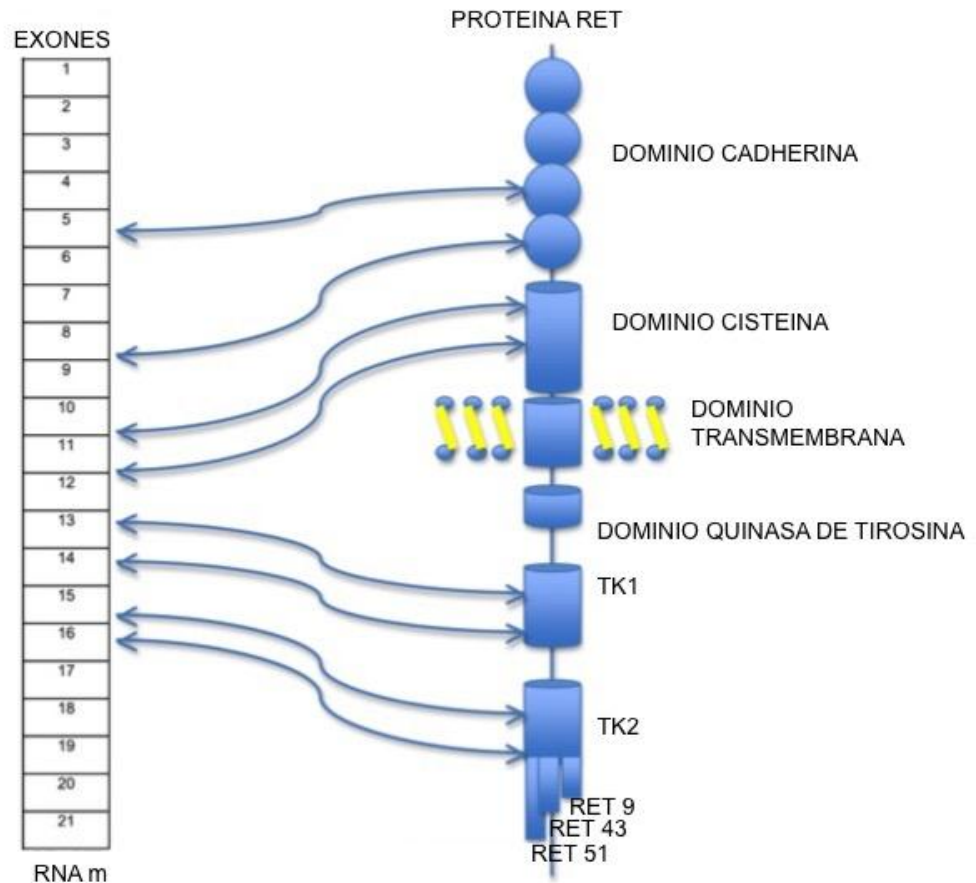
cual actúa como receptor de membrana y con actividad de kinasa de tirosina. Los ligandos de este receptor son proteínas de la familia del factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales (GDNF, del inglés *Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor Family*) tales como neurturina, persepina y artemina, los cuales interactúan con la proteína RET mediante el acoplamiento previo a otros correceptores que en su conjunto constituyen la familia de receptores de GDNF (GFR-del inglés GDNF-family receptor). El complejo ligando correceptor se une a los receptores RET dimerizándolos, lo cual conduce a la activación de RET y a su auto-fosforilación en residuos de tirosina de su dominio intracitoplasmático.

**3.5.2.2 La Proteína RET.** La proteína RET esta constituida por un dominio extracelular el cual contiene 4 residuos semejantes a cadherina y una región rica en cisteína esencial para la formación de puentes disulfuro y la dimerización del receptor; un dominio transmembranal y un dominio intracitoplasmático rico en tirosinas con dos subdominios con actividad de quinasa de tirosina (TK1 y TK2), los cuales se activan cuando RET se dimeriza como resultado de su interacción con el complejo ligando correceptor e inician diferentes vías de señalización. Esta activación es importante para la regulación del desarrollo de células progenitoras de los sistemas nervioso entérico, renal y de la cresta neural. Por lo anterior, se postula que RET es importante para la neurogénesis entérica y la organogénesis renal.

Varias mutaciones de ganancia de función en el gen *RET* se han relacionado con las formas tanto esporádicas como familiares de feocromocitoma y CMT. Mutaciones en los exones 10, 11, 13, 14 y 15 se han encontrado asociadas tanto a NEM 2A como a CMTF y NEM 2B se ha relacionado con las mutaciones V804M, T806C, A883F, S904C y M918T que afectan dominios intracelulares con actividad de quinasa de tirosina (Magalhaes et al., 2003; De Groot et al., 2006).

Las mutaciones en NEM 2A alteran los enlaces disulfuro de los monómeros de RET y conducen a su dimerización y activación persistente mientras que las mutaciones asociadas a NEM 2B alteran la especificidad del sustrato de RET (Figura 2).

**Figura 2. RNAm RET y proteína RET**



Adaptado de (Plaza-Menacho et al., 2006)

La Figura ilustra los exones del RNAm RET con mayor frecuencia de mutaciones asociadas a NEM 2, entre los que se incluyen los exones 5, 8, 10, 11, 13, 14, 15 y 16 y la región de los dominios proteicos correspondientes afectados en la proteína RET.

Las mutaciones asociadas a las diferentes formas de NEM 2 pueden cambiar entre las diferentes familias afectadas y se relacionan bien con el grado de severidad del CMT. El método de elección actual para la caracterización genética de los pacientes con NEM 2 es el secuenciamiento de los amplicones de PCR de los exones reportados como sitios afectados por mutaciones.

La tamización genética permite determinar el tipo de mutación en el 100% de los portadores y es de gran utilidad para definir el tipo de tiroidectomía profiláctica según el tipo de mutación y la edad del paciente debido a que existe una correlación muy marcada entre genotipo y fenotipo que permite predecir con bastante precisión la edad de desarrollo de la enfermedad, el grado de severidad del CMT y la posibilidad de desarrollar otras patologías. La correlación entre fenotipo y genotipo se encuentra resumida en la Tabla 1. Esto ha permitido clasificar las mutaciones en 4 grupos de riesgo. La conducta médica a seguir según el tipo de mutaciones están bastante bien definidas en las guías para el manejo de los pacientes con CMT de la Asociación Americana de Tiroides (ATA) (Wells et al., 2015) .

Hasta el momento se han reportado más de 80 mutaciones patogénicas las cuales causan en su mayoría sustitución de un único aminoácido que resultan en activación aberrante del receptor RET (Figura 3; Tablas 2 y 3). Estas mutaciones se han encontrado desde los exones 5 a 16, pero la mayoría son mutaciones recurrentes que afectan residuos estratégicos en el segmento extracelular y algunas pocas en el segundo dominio intracitoplasmático con actividad de quinasa de tirosina. Las sustituciones de los residuos de cisteínas del dominio extracelular del receptor, por mutaciones en los codones 609, 611, 618, 620, 630 y 634 del gen *RET* se han encontrado en más del 95% de los pacientes con NEM 2A y CMTF. Es de resaltar la mutación del residuo C634 del exón 11, la cual se presenta en el 85% de los casos de NEM 2A y se asocia con un riesgo más alto

de presentar FEO, HPT y liquen cutáneo amiloidótico. El fenotipo NEM 2B se asocia casi exclusivamente con la mutación M918T o A883F que afectan el dominio con actividad de quinasa de la proteína RET. La mutación M918T se asocia con el fenotipo más severo de la enfermedad. Las mutaciones M918T o A883F también se encuentran en el 40-50% de los CMT esporádicos y son de mal pronóstico.

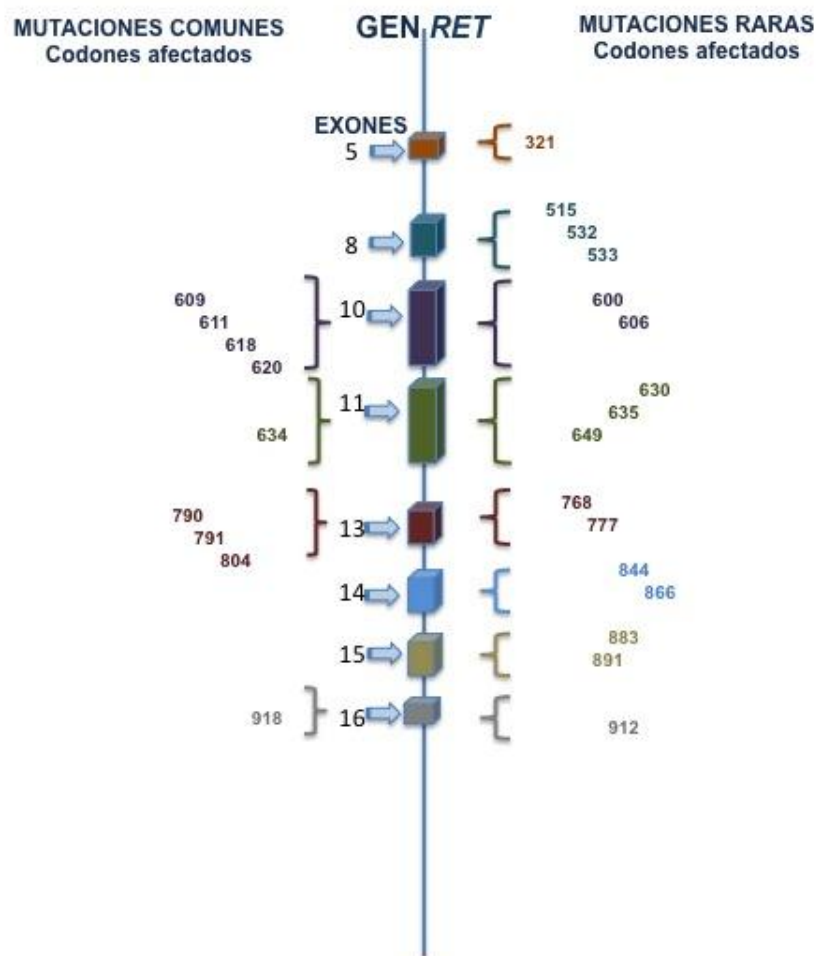
Las mutaciones en el exón 10 se asocian con un riesgo más alto de desarrollar enfermedad Hirschsprung. Por lo contrario mutaciones en los codones 768, 790, 791, 804 y 891 de los exones 12–14 que afectan el dominio con actividad quinasa de tirosina en el receptor RET en pacientes con CMTF son de bajo riesgo y el CMT se desarrolla generalmente en la edad adulta (Margraf et al., 2009; Mulligan, 2014; MEN2 Database; The Human Gene Mutation Database).

El gen *RET* juega un papel muy importante en la morfogénesis y maduración de un amplio número de tejidos y órganos; se expresa fundamentalmente durante la embriogénesis en tejidos neuroectodérmicos. RET se expresa en las células de la cresta neural y dirige su maduración y colonización hacia el tejido nervioso entérico y su diferenciación y mantenimiento en estos sitios. Esto explica por que mutaciones de pérdida de función del gen *RET* se asocian con enfermedad de Hirschsprung. Adicionalmente, RET se expresa en el adulto en varias líneas celulares de tejido neural y neuroendocrino tales como las células C de la tiroides y las células cromafines de la glándula renal. Se expresa también en el sistema nervioso central y periférico tanto simpático como parasimpático donde actúa como un receptor que mantiene la sobrevivencia neuronal y el desarrollo de los axones (Arigh et al., 2005).

La expresión de RET se requiere también para el desarrollo el riñón y los uréteres, y en el tracto genitourinario es esencial para el mantenimiento de la capacidad de auto renovación de las células madres espermato.goniales y para la diferenciación de las células germinales en el testículo (Pachnis et al, 1993; Naughton et al., 2006).

Esto explica por ejemplo el origen de las mutaciones del gen *RET* asociadas a NEM 2 en las células de la línea germinal y el por qué la alta frecuencia de NEM 2B asociado a mutaciones *de novo* en células de la línea germinal de origen paterno. *RET* es también expresado durante diferentes estadios de la vida en diversos tipos de células del sistema inmune, pero su función en este tipo de tejidos no es aún muy clara (Vargas-Leal et al., 2005).

**Figura 3. Mutaciones del gen *RET* asociadas con NEM 2**



Adaptado de (Magalhaes et al., 2003; Plaza-Menacho et al., 2006).

La figura ilustra las mutaciones comunes y raras de los diferentes exones del gen

*RET* que están asociados con NEM 2.

**Tabla 2. Frecuencia de mutaciones proto-oncogén *RET***

EXÓN	CODÓN	FENOTIPO	FRECUENCIA (%)
10	609	NEM 2 <sup>a</sup>	< 1
		CMTF	4
10	611	NEM 2A	2
		CMTF	< 1
10	618	NEM 2A	3
		CMTF	30
10	620	NEM 2A	6
		CMTF	21
11	630	CMTF	< 1
11	634	NEM 2A	87
		CMTF	26
13	768	CMTF	8
13	790	CMTF	< 1
13	791	CMTF	< 1
14	804	CMTF	3
15	883	NEM 2B	5
15	891	CMTF	< 1
16	918	NEM 2B	94

Adaptado de (Magalhaes et al., 2003)

**Tabla 3. Nivel de riesgo ATA y mutaciones proto-oncogén *RET* asociadas**

NIVEL DE RIESGO ATA	CODON	CMT (Edad promedio de hallazgos malignos )	TIROIDECTOMIA (Edad recomendada para Cirugía)
A	666	36 años	Antes de los 10 años
A	649	44 años	Antes de los 10 años
B	611	7 años	Antes de los 5 años
B	618	7 años	Antes de los 5 años
C	634	13 meses	Entre los 2-4 años
C	634G	13 meses	Entre los 2-4 años
D	883	--	Antes del 1 mes
D	918	9 meses	Antes del 1 mes

- = (Edad no reportada) Adaptado de (Kloos et al., 2009)

La dimerización del receptor RET con sus ligandos induce la activación de varias vías de señalización, entre otras, RAS-MAPK, PI3K-AKT y/o el reclutamiento de ligasas de ubiquitina de la familia CBL, las cuales tienen una función de regulación negativa de las funciones del receptor RET. Estas vías están implicadas en funciones tales como desarrollo de riñones y sistema nervioso, sobrevivencia neuronal y diferenciación y mantenimiento y diferenciación de las células madres espermagoniales. La unión de la fosfolipasa C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) al receptor RET activa la vía de la protein quinasa C (PKC, protein kinase C) la cual esta involucrada en la morfogénesis renal y migración de los progenitores neuronales durante el desarrollo cerebral.

De importancia desde el punto de vista fisiopatológico es la activación la proteína transductora de señales y activadora de la transcripción 3 (STAT3, del inglés, Signal Transducer and Activator of Transcription 3), la cual se ha relacionado con

la capacidad de inducir proliferación y transformación celular (Schuringa et al., 2001). La activación de la GTPasa RAC1 esta relacionada con la capacidad de inducir la formación de lamelopodia y migración de las células de la cresta neural (Mulligan, 2014).

## 4. MATERIALES Y METODOS

### 4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

**4.1.1 Selección de la población.** La muestra de la población fue seleccionada por conveniencia. Inicialmente, se realizó un estudio descriptivo transversal de cuatro pacientes con diagnóstico confirmado de CMT por estudios histopatológico pertenecientes a una misma red familiar. Posteriormente, con un diagnóstico presuntivo de síndrome NEM 2, del subtipo CMTF, se identificó el mayor número posible de integrantes de la red familiar con relación consanguínea directa y se busco información relacionada con posibles casos de enfermedad tiroidea en otros miembros de la red familiar. Luego se realizó un primer acercamiento con la mayor cantidad de miembros de la familia en el cual se explico algunos aspectos relacionados con la enfermedad, sus características de enfermedad hereditaria y el tipo de estudio a realizarse y la conveniencia del mismo. Seguidamente se construyó el árbol genealógico de la red familiar. Y se procedió a realizar la selección de los casos a estudiar y los controles respectivos.

**4.1.2 Criterios de inclusión.** Se eligieron para los análisis todos los individuos que fueran miembros de la red familiar a la que pertenecen los 4 miembros con diagnóstico confirmado de CMT, por vinculación consanguínea directa, en cualquier generación. Como controles se eligieron individuos que no fueran familiares entre sí, ni de los casos, sin antecedentes familiares de cualquier tipo de patología tumoral compatible con el síndrome NEM y que fueran originarios de la misma región.

**4.1.3 Aspectos Éticos.** Los miembros de la familia quienes hicieron parte del estudio, recibieron información directa y detallada en forma de charla educativa acerca de la enfermedad y la investigación a desarrollarse. A los miembros de la

red familiar y a todos los individuos controles que aceptaron voluntariamente ser incluidos en el estudio experimental se les explico el contenido escrito del asentimiento y los consentimiento informados (Anexos A, B y C) y los procedimientos a realizarse con las muestras de ellos obtenidas. Posteriormente, a todos los miembros de la red familiar que afirmaron comprender la información suministrada y aceptaron estar en conformidad con el material escrito (Anexos A, B y C) firmaron para autorizar la toma de muestra de sangre.

El diseño del estudio y los procedimientos de evaluación y seguimiento de las personas que participaron en la investigación fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander.

## **4.2 PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO**

**4.2.1 Extracción de ADN.** De todos los participantes en el estudio se obtuvo muestras de ADN genómico a partir de una muestra de 10 ml de sangre periférica extraída en tubos con anticoagulante EDTA. La extracción de ADN realizo el estuche comercial Mini kit QIAamp DNA (QIAGEN, Hilden, Germany), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

**4.2.2 Amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR) secuencias exónicas del gen RET.** La amplificación de los exones 10, 11, 13, 14, 15 y 16 del gen RET se efectuó utilizando los cebadores, previamente descritos en la literatura (Tabla 4), con algunas modificaciones.

La PCR se realizó en un volumen final de 25 ul, compuesto de buffer 1X (Tris-HCl 100 mM pH 8.5, KCl 500 mM), Mg Cl<sub>2</sub> 1.5mM, dNTPs 200 uM (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA), 0.5 uM de cebadores (Macrogen Inc., Seoul, KOR), 0.5 U de ADN polimerasa (Tucan-Taq, Corpogen, COL) y 50 ng/ul del ADN

a investigar. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador PT-100 (MJ Research Inc., Waltham, MI, USA). Las condiciones de amplificación y el tamaño de los fragmentos obtenidos se describen en la Tabla 5.

**Tabla 4. Lista de cebadores empleados**

Exón 10 F 5' CAG AAA GGC ACT GTG ACC AA 3'	(Wang, et al., 2016)
Exón 10 R 5' GGG ACC TCA GAT GTG CTG TT 3'	(Wang, et al., 2016)
Exón 11 F 5' CCT CTG GCG GTG CCA AGC CTC 3'	(Alvares Da Silva, et al., 2003)
Exón 11 R 5' CCT CGT CTG CCC AGC GTT G 3'	(Ceccherini, et al., 1994)
Exón 13 F 5' TGA CCT GGT ATG GTC ATG GA 3'	(Guo, et al., 2013)
Exón 13 R 5' GGA GAA CAG GGC TGT ATG GA 3'	(Guo, et al., 2013)
Exón 14 F 5' CCC AGG GCC CCT CTC TCC GC 3'	(Paszko, et al., 2007)
Exón 14 R 5' GTG GGT CAG GGT GTG GCC TG 3'	(Paszko, et al., 2007)
Exón 15 F 5' TGA CCG CTG CTG CCT GGC CAT 3'	(Paszko, et al., 2007)
Exón 15 R 5' GCT TCC CAA GGA CTG CCT GC 3'	(Paszko, et al., 2007)
Exón 16 F 5' TCT CCT TTA CCC CTC CTT CC 3'	(Guo, et al., 2013)
Exón 16 R 5' TGT AAC CTC CAC CCC AAG AG 3'	(Guo, et al., 2013)

**Tabla 5. Condiciones de PCR para la amplificación de exones**

Exón	Tamaño del segmento	Condiciones de la PCR
10	374pb	94°C 5min, 94°C 1min, 58°C 30seg, 72°C 1min, 35ciclos, 72°C 5 min
11	416pb	94°C 5min, 94°C 1min, 58°C 30seg, 72°C 1min, 30ciclos, 72°C 5 min
13	250pb	94°C 5min, 94°C 1min, 56°C 30seg, 72°C 1min, 30ciclos, 72°C 5 min
14	298pb	94°C 5min, 94°C 1min, 58°C 30seg, 72°C 1min, 35ciclos, 72°C 5 min
15	249pb	94°C 5min, 94°C 1min, 58°C 30seg, 72°C 1min, 35ciclos, 72°C 5 min
16	176pb	94°C 5min, 94°C 1min, 58°C 30seg, 72°C 1min, 30ciclos, 72°C 5 min

La detección de los fragmentos obtenidos por PCR se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% (Seaken LE Agarose Lonza, Rockland, ME, USA) preparado en buffer TAE 1X y bromuro de etidio (0.1 ug/ml) a 90V durante 1 hora y 45 minutos. El peso de las bandas resultantes se determinó por comparación con un patrón de peso molecular de 50-pb (GeneRuler, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA). La visualización de bandas se evidenció por exposición de los geles a luz ultravioleta en un transiluminador (UVP-FS-15E, Upland, CA, USA) y se registro fotográficamente en cámara digital (Canon Inc. EOS 450D digital SLR, Tokyo, JP).

**4.2.3 Secuenciación.** Inicialmente se secuenciaron los amplificadores de los pacientes con diagnóstico de CMT confirmado por histopatología y dos controles. La determinación de la secuencia de nucleótidos de los segmentos de ADN de los exones amplificadores fue realizada por una casa comercial (Macrogen Inc., Seoul, KOR). Las secuencias reportadas se compararon con la secuencia de referencia actualizada del gen RET (GenBank, NG\_ 007489.1). Las disparidades en

nucleótidos con relación a la secuencia de referencia que coincidieron en varias de las muestras de los pacientes y que no se encontraron en el 100% de las muestras de los controles se consideraron como mutaciones. La presencia de mutación y el carácter de heterocigotidad, fue conformada por la aparición de dos picos en el cronograma de la reacción de secuenciación. El secuenciamiento de las muestras del DNA de los pacientes con diagnóstico confirmado de CMT se realizó por duplicado en muestras de dos reacciones de PCR diferentes. Las muestras de el resto de los participantes se analizaron una sola vez en amplificadas del exón mutado. La mutación encontrada se comparó con las mutaciones previamente reportadas para el protooncogén RET en pacientes con síndrome de NEM (MEN2 Database) (The Human Gene Mutation Database).

**4.2.4 Análisis de histopatología.** Se realizó la caracterización histopatológica de una muestra de biopsia de tejido tiroideo de un paciente con diagnóstico de CMT sometido a tiroidectomía. La muestra fue procesada empleando las tinciones de HE, rojo Congo y determinaciones por técnicas de inmunohistoquímicas de Calcitonina, Cromogranina y Antígeno Carcinoembrionario.

## 5. RESULTADOS

### ***La identificación de varios individuos de una misma red familiar con CMT permitió identificar una red familiar con diagnóstico presuntivo de CMTF***

La recopilación de información permitió identificar una red familiar en la región Guantánima del Nororiente Colombiano, departamento de Santander, de 7 generaciones con 103 personas (79 vivas). Al parecer, el primer miembro de la red afectado de enfermedad tiroidea fue un individuo de sexo masculino de la tercera generación (III). Existen reportes de dos individuos de la cuarta generación (IV), de sexo masculino, de los seis descendientes del primer individuo afectado, que también padecieron el mismo tipo de enfermedad; todos los miembros de esta generación están muertos, excepto una persona de sexo femenino de la cual se desconoce su edad.

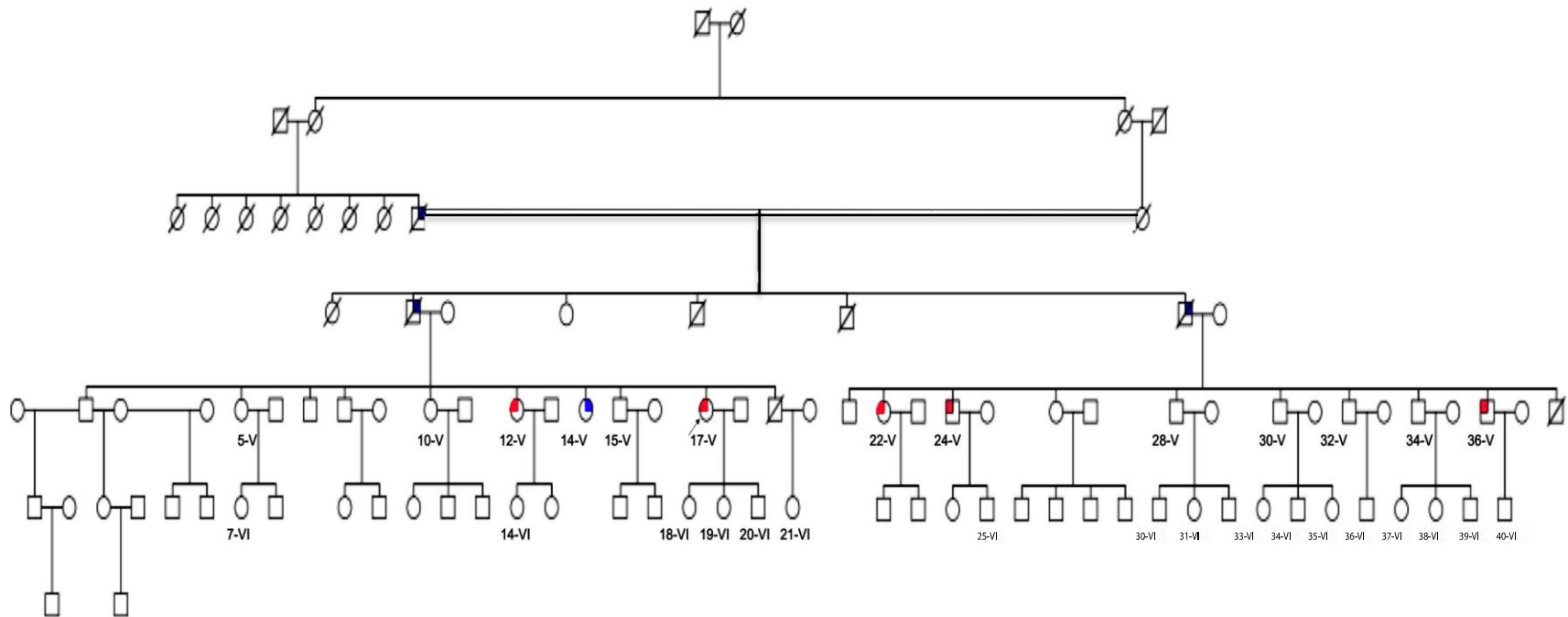
El grupo de personas de la familia estudiada está constituido por 30 individuos, los cuales se encuentran identificados en el árbol genealógico del caso índice, representado en la Figura 4. Todos los miembros de la familia identificados aceptaron voluntariamente participar en la investigación, de acuerdo al formato de consentimiento y asentimiento aprobados por el comité de ética de la Universidad Industrial de Santander (Anexos A, B y C). La identificación de los pacientes con CMT y la confirmación del diagnóstico fue realizada por un médico especialista en cirugía de cabeza y cuello y un médico especialista en patología, respectivamente, siguiendo los criterios de diagnóstico y manejo clínico de la ATA (Kloos, et al., 2009).

En la V generación, se encuentran 6 individuos con enfermedad nodular tiroidea, de los cuales, 4 casos (12-V, una mujer de 57 años, 17V, una mujer de 50 años, 24-V, un hombre de 58 años y 36-V, un hombre de 44 años) (Figura 4 y Tabla 6 ) tienen diagnóstico histopatológico confirmado de CMT, de los restantes no se dispone, al momento de información sobre sus historias clínicas, la edad de los individuos de esta generación oscila entre los 44 y 64 años.

La sexta generación (VI) esta compuesta de 40 descendientes cuyas edades oscilan entre 13 y 30 años y hasta donde fue posible obtener información, ninguno de ellos presenta signos o síntomas de enfermedad nodular tiroidea.

La VII generación presenta dos individuos menores de edad, de los cuales se desconoce su edad exacta y quienes al parecer no presentan ninguna sintomatología de enfermedad tiroidea, feocromocitoma y/o hiperparatiroidismo.

**Figura 4. Árbol genealógico caso índice.**



■ Carcinoma medular de tiroides   
 ■ Enfermedad tiroidea (sospecha o diagnóstico)

En este árbol genealógico están consideradas 7 generaciones del caso índice, los individuos que están vivos y que lograron aceptar participar en el estudio pertenecen a las generaciones V y VI, en color rojo están indicados los individuos con diagnóstico confirmado de CMT y en azul los individuos con sospecha o diagnóstico de enfermedad tiroidea y el caso índice se encuentra indicado.

**Tabla 6. Lista de individuos participantes en el estudio**

CÓDIGO ÁRBOL GENEALÓGICO	DIAGNÓSTICO CMT	SEXO	EDAD	ESTADO CIVIL	NÚMERO DE HIJOS
18-VI	NO	F	27	S	0
19-VI	NO	M	21	S	0
17-V	SI	F	50	C	3
35-VI	NO	M	28	S	0
15-V	NO	M	60	C	2
24-VI	NO	M	29	S	0
38-VI	NO	M	16	S	0
10-V	NO	F	58	C	3
36-VI	NO	F	18	S	0
37-VI	NO	F	24	S	1
34-V	NO	M	53	C	3
32-V	NO	M	55	C	1
29-VI	NO	M	18	S	0
28-V	NO	M	52	C	3
30-VI	NO	F	20	S	0
39-VI	NO	M	13	S	0
14-V	NO	F	55	S	0
*36-V	SI	M	44	C	1
*22-V	SI	F	59	C	2
32-VI	NO	F	18	S	0
33-VI	NO	M	16	S	0
34-VI	NO	F	18	S	0
30-V	NO	M	53	C	4
*24-V	SI	M	58	C	2
*12-V	SI	F	57	C	2
7-VI	NO	F	30	S	0
5-V	NO	F	64	C	2
17-VI	NO	F	25	S	0
14-VI	NO	F	27	S	0
20-VI	NO	F	21	S	0

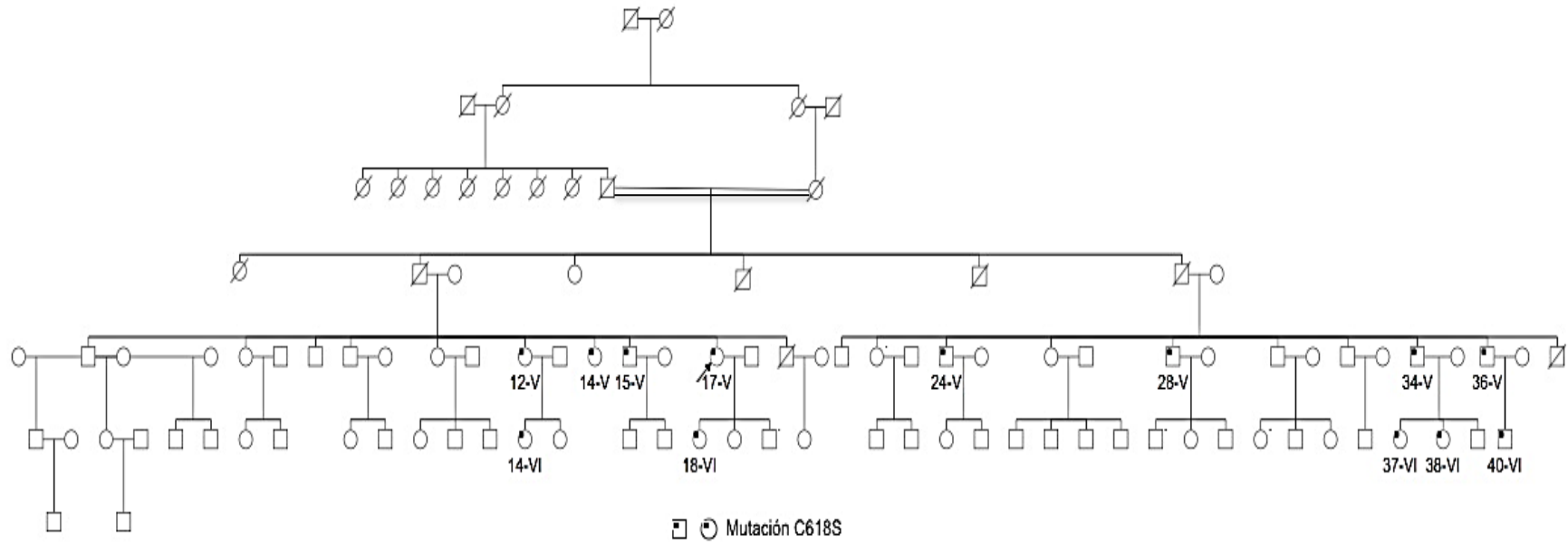
\*Casos confirmados de CMT; SI: Muestra adecuada para secuenciar, NO: Muestra insuficiente; F: Femenino; M: Masculino; Edad: En años; C: Casado, S:Soltero, V:Viudo.

***La caracterización genética de varios miembros de una red familiar con un diagnóstico posible de CMTF permitió identificar la mutación C618S en el gen RET.***

La identificación de la mutación asociada al síndrome de CMTF en la red familiar estudiada, se realizó mediante la tamización genética de los individuos participantes en los exones 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 donde se encuentran la mayoría de las mutaciones de gen *RET* reportadas hasta la fecha (MEN2 Database). La amplificación por PCR de las secuencias exónicas se realizó utilizando pares de cebadores previamente reportados por otros investigadores y ajustando las condiciones de la reacción a nuestras propias condiciones de laboratorio hasta obtener bandas únicas de los amplicones respectivos (Figura 6).

Los resultados del secuenciamiento del DNA de un paciente con diagnóstico confirmado de CMT y de un paciente con diagnóstico de enfermedad nodular tiroidea mostraron en el cromatograma de la reacción de secuenciamiento la mutación G/C con patrón heterocigotico en el amplicón del exón 10, correspondiente al segundo nucleotido del codón 618 del cDNA del gen *RET* (Figura 7), El análisis posterior de todos los miembros participantes permitió identificar la mutación en 12 individuos de 26 personas estudiadas; 4 personas no pudieron ser analizadas por razones técnicas. La edad de los individuos portadores de la mutación C618S (TGC/TCC) oscila entre 18 y 58 años de edad, los cuales corresponden a 7 mujeres y 6 hombres (Figura 5 y Tabla 7).

Figura 5. Árbol genealógico caso índice con reporte de mutación.

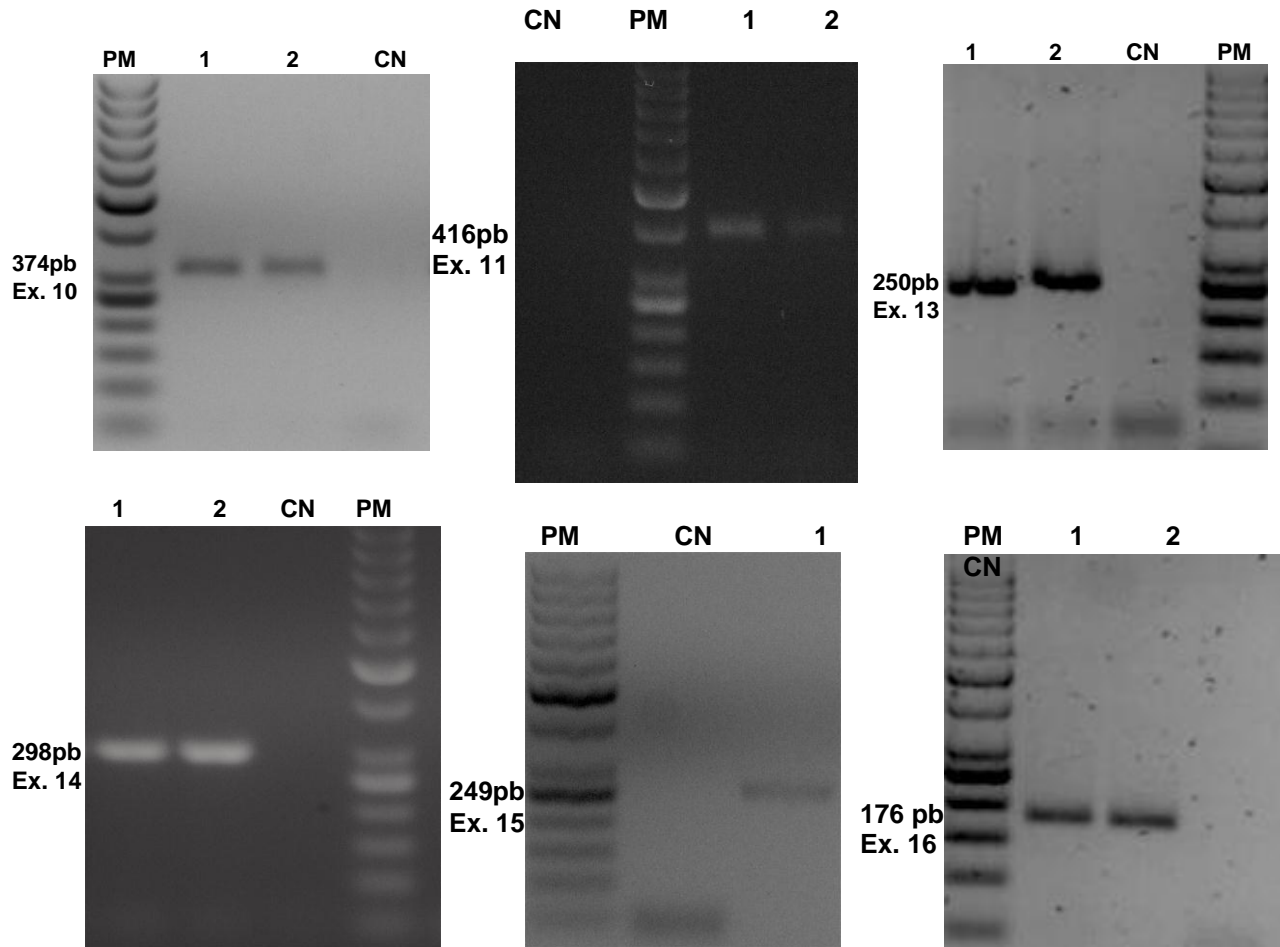


La tamización genética de la familia estudiada encontró en la V generación, 8 individuos portadores de 12 individuos analizados por secuenciamiento. Los individuos portadores fueron, 12-V, 14-V, 15-V, 17-V, 24-V, 28-V, 34-V y 36-V; de estos 3 fueron mujeres y 5 hombres, el rango de edad de los individuos portadores fue de 44 años-64 años.

En la VI generación de 14 individuos analizados por secuenciamiento, 5 fueron encontrados como portadores, y de estos 4 fueron mujeres y 1 hombre; el rango de edad de los individuos portadores fue de 13 años-27años.

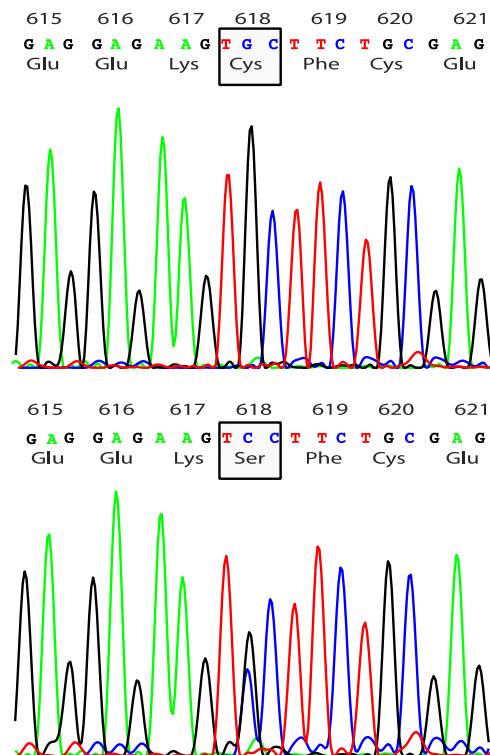
De estas observaciones es claro el patrón de transmisión hereditaria autosómica dominante de la mutación, a partir de portadores heterocigóticos, lo cual se corrobora en el resultado del cromatograma del secuenciamiento (Figura 7).

**Figura 6. Electroforesis de los productos de PCR de los exones amplificados**



Las reacciones de PCR se realizaron de acuerdo a las condiciones antes mencionadas y los productos de PCR se evaluaron por electroforesis de DNA en geles de agarosa según lo descrito en materiales y métodos. La líneas 1 y 2, la línea 1 es el caso índice y la línea 2 un familiar del caso índice en la línea paterna (generacion V); CN, control negativo; PM, marcador de peso molecular 50-pbGeneruler.

**Figura 7. Cromatograma de la Mutación G/C en la reacción de Secuenciamiento del exón 10 del gen *RET* de un paciente con CMT de la red familiar estudiada.**



Panel superior: secuencia de nucleótidos, aminoácidos y cromatograma de los codones enumerados del cDNA del gen *RET* que muestra en el codón 618 la secuencia normal TGC correspondiente a cisteína.

Panel inferior: Muestra los resultados del secuenciamiento del cDNA del paciente con CMT en el que se observa la mutación con sentido G/C en el segundo nucleótido del codón 618, la cual cambia a esta posición el aminoácido cisteína por serina en la proteína RET del paciente.

**Tabla 7. Lista de portadores de la mutación C618S**

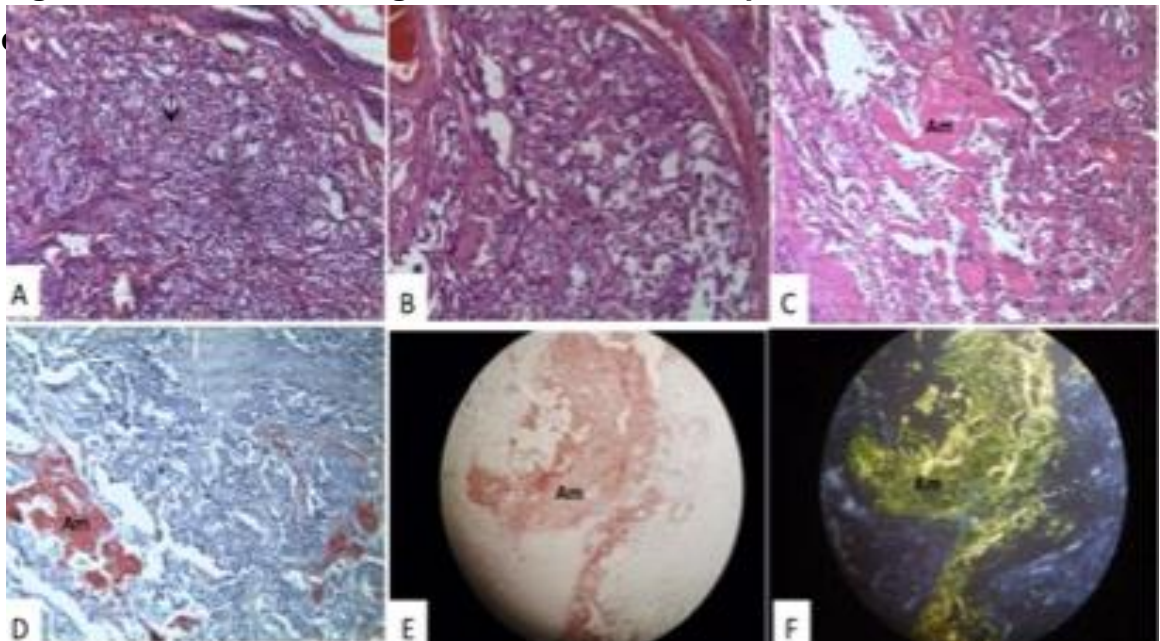
CÓDIGO ÁRBOL GENEALÓGICO	DIAGNÓSTICO CMT	SEXO	EDAD	MUESTRA AMPLIFICADA	MUTACION C618S
18-VI	NO	F	27	SI	(-)
19-VI	NO	M	21	NO	ND
17-V	SI	F	50	SI	(+)
35-VI	NO	M	28	SI	(-)
15-V	NO	M	60	SI	(+)
24-VI	NO	M	29	SI	(-)
38-VI	NO	M	16	SI	(-)
10-V	NO	F	58	SI	(-) ?
37-VI	NO	F	18	SI	(+)
38-VI	NO	F	24	SI	(+)
34-V	NO	M	53	SI	(+)
32-V	NO	M	55	SI	(-)
29-VI	NO	M	18	NO	ND
28-V	NO	M	52	SI	(+) ?
30-VI	NO	F	20	SI	(-)
40-VI	NO	M	13	SI	(+)
14-V	NO	F	55	SI	(+)
36-V	SI	M	44	SI	(+)
22-V	SI	F	59	NO	ND
32-VI	NO	F	18	NO	ND
33-VI	NO	M	16	SI	(-)
34-VI	NO	F	18	SI	(-)
30-V	NO	M	53	SI	(-) ?
24-V	SI	M	58	SI	(-)
12-V	SI	F	57	SI	(+)
7-VI	NO	F	30	SI	(-)
5-V	NO	F	64	SI	(-)
18-VI	NO	F	25	SI	(+)
14-VI	NO	F	27	SI	(+)
20-VI	NO	F	21	SI	(-) ?

Sexo, M:Maculino, F:Femenino; Diagnóstico, CMT: Hallazgos histopatológicos de CMT; Mutación, (+): Portador; (-): No portador, ND: No determinada, ?: Requiere confirmación.

**Los estudios histopatológicos de uno de los pacientes con CMT mostró que la mutación C618S puede estar relacionada con CMT asociado a CPT.**

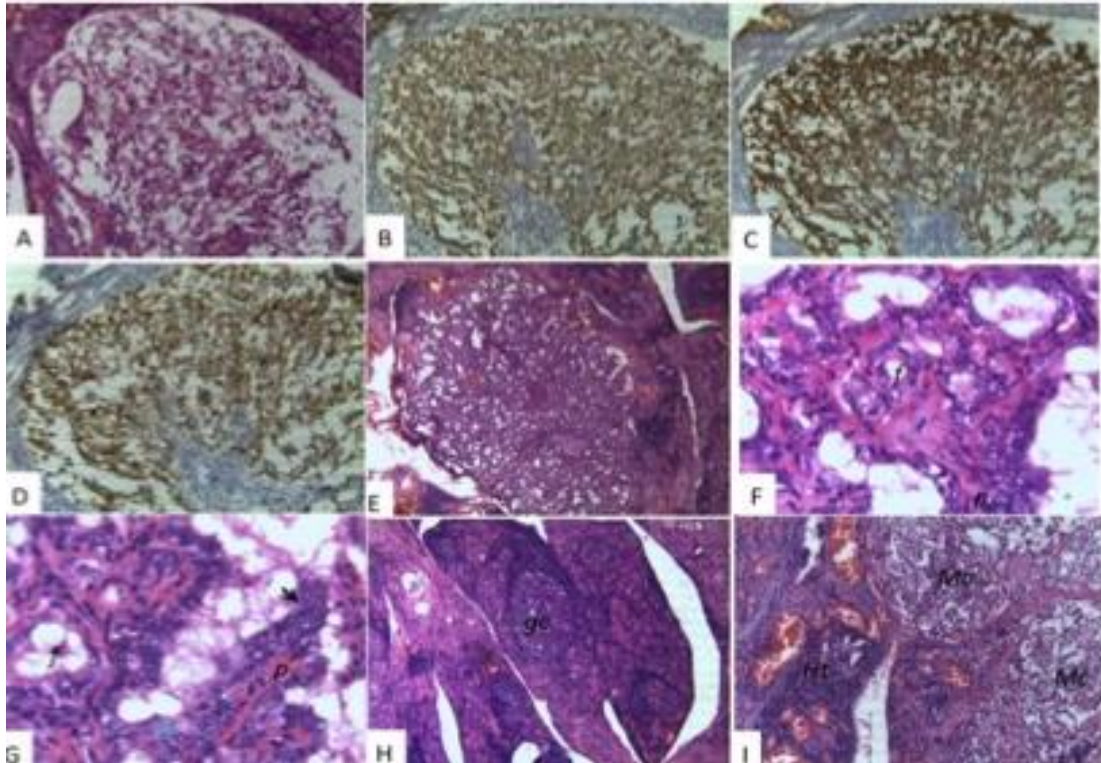
El análisis histopatológico de la biopsia de tejido tiroideo de uno de los pacientes, permitió evidenciar la presencia de CMT asociado con CPT y Tiroiditis de Hashimoto (Figuras 7 y 8). Aunque la asociación CMT/PTC a sido reportada en varias oportunidades, hasta donde es de nuestro conocimiento este es el primer reporte de esta asociación de tumores tiroideos y la presencia de la mutación C618S (Anexo D).

**Figura 8. Patrón histológico del CMT en un paciente de la red familiar**



La figura muestra en (A) la apariencia clásica apariencia del CMT en el cual se observa una capa sólida de células tumorales separadas por un séptum fibrovascular delgado; (B) células tumorales compuestas de un citoplasma granular fino y núcleos redondos con cromatina fina; (C) cantidad abundante de material eosinófilo amorfo correspondiente a sustancia amiloide (Am), característica importante de este tipo de tumor. Coloración Hematoxilina-Eosina 10X. En las figuras D, E y F se observan depósitos de sustancia amiloide (Am) teñidos con Rojo congo visualizados con luz de microscopia normal (D, E) y con microscopio de luz polarizarida, en color verde refringente, confirmando la positividad para la sustancia amiloide (F).

**Figura 9. Patrones histológicos de CMT, CPT y Tiroiditis de Hashimoto en un paciente de la red familiar estudiada.**



La figura muestra en (A) carcinoma medular de tiroides rodeado por una capa de tejido conectivo fibroso, sin invasión, HE 40X. En B, C y D se observan células tumorales mostrando alta positividad citoplasmática luego de inmunotinción para (B) calcitonina, (C) cromogranina y (D) antígeno carcinoembrionario. En E, F y G se observa microcarcinoma papilar de tiroides (E) sin esclerosis y (F) con arquitectura foliolar (f) predominante, a excepción de algunas estructuras papilares ocasionales (p); (G) células tumorales exhibiendo las características típicas de carcinoma papilar: núcleos largos y ovalados conocidas como “organ Annie eyes” con escasa cromatina marginal y adicionalmente con reforzamiento de la membrana nuclear, algunas hendiduras y pseudoinclusiones nucleares (flechas negras), HE 4X; (H) parenquima tiroideo con compromiso de tiroiditis de Hashimoto con infiltrado inflamatorio mononuclear y centros germinales activos (gc); (I) tiroiditis de Hashimoto adyacente al parénquima tiroideo con CMT(Mc), HE 10X.

## 6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos del estudio realizado a la red familiar estudiada, permiten decir que muy posiblemente se trata de un caso de CMTF asociado a la mutación C618S del gen *RET*, debido a que la red familiar tiene 2 generaciones evaluadas con 30 individuos participantes, de los cuales, 26 fueron analizados por secuenciamiento para identificación de la mutación C618S. Esta mutación fue inicialmente encontrada en dos pacientes de los 4 casos con CMT confirmados por histopatología (Tabla 5: 12-V mujer de 57 años, 17-V mujer de 50 años, 24-V hombre de 58 años y 36-V hombre de 44 años), los cuales, hasta ahora, no han reportado signos o síntomas sugestivos de feocromocitoma o hiperparatiroidismo.

Sin embargo, la definición y diferenciación entre CMTF y NEM 2A siempre ha sido motivo de controversia, debido a la posibilidad de clasificar una familia como afectada por CMTF y no continuar el monitoreo de los pacientes para la identificación temprana de un posible feocromocitoma, el cual aparece tardíamente en la edad media de la vida. Esta característica de la aparición tardía de feocromocitoma en los pacientes con NEM 2A, debe mantenerse siempre presente para evitar el riesgo de clasificar apresuradamente a una familia como afectada por CMTF (Siggelkow et al., 2001).

Eng y colaboradores describieron inicialmente un criterio no tan rígido para el diagnóstico de CMTF, el cual fue definido como la presencia de CMT en al menos 4 miembros de una misma familia, con relación consanguínea directa, sin otras manifestaciones de NEM 2A (Eng et al., 1996); sin embargo, posteriormente Brandi y colaboradores establecieron criterios mucho más rígidos y consideraron que para asignar el diagnóstico de CMTF en una familia afectada por CMT, se requiere la presencia de más de 10 miembros en la familia con CMT, múltiples portadores ó miembros afectados mayores de 50 años, y una adecuada historia

clínica, en particular para los miembros de la familia de mayor edad, que permita excluir la presencia de feocromocitoma e hiperparatiroidismo (Brandi et al., 2001).

Sin embargo, recientemente, Wells y colaboradores encontraron algunos estudios en familias grandes (5 o más generaciones), con individuos portadores de la mutación G533C, las cuales fueron diagnosticadas prematuramente como afectadas de CMTF; sin embargo, posteriormente, en esa misma red familiar, fue encontrado un miembro con feocromocitoma, mostrando que la mutación G533C estaba asociada claramente a un caso de NEM 2A (Oliveira et al., 2011). Algo similar pudiera presentarse más adelante en nuestro caso de estudio. También, es conveniente considerar que hay varios individuos de edad media y avanzada, en la red familiar de nuestro caso, que aún no han sido estudiados; por lo tanto es claro que la cohorte requiere de un seguimiento médico, por un tiempo apropiado, para descartar casos de feocromocitoma.

Hasta donde es de nuestro conocimiento existen tan solo 3 investigaciones que reportan familias que han cumplido estrictamente con los criterios de Brandi y colaboradores para ser clasificados como afectadas por CMTF (Brandi et al., 2001; Siggelkow et al., 2001; Jimenez et al., 2004).

Finalmente, Wells y colaboradores establecen en la última versión de las guías para el manejo del CMT de la Asociación Americana de Tiroides que el CMTF no debe definirse como una forma hereditaria de CMT diferente de NEM 2A y NEM 2B, sino que el CMTF debe ser reconocido como una variante de NEM 2A (Wells, et al., 2015) para incluir a: (i) familias que presentan únicamente CMT y que se ajustan a los criterios rígidos de CMTF, (ii) pequeñas familias con al menos dos generaciones con mínimo 2 afectados, pero menos de 10 miembros portadores de mutaciones germinales del gen *RET*, (iii) pequeñas familias en las cuales dos o menos miembros de una sola generación tiene mutaciones de la línea germinal en el gen *RET* y (iv) individuos aislados con este tipo de mutaciones (Wells et al., 2015).

Hasta donde conocemos en nuestro caso se sabe del reporte de 9 individuos de la familia con enfermedad nodular tiroidea, 4 personas con diagnóstico histopatológico de CMT y 12 portadores de la mutación hasta ahora identificados, lo que podría sugerir que nuestra familia analizada pudiera clasificarse como un caso de CMTF.

Los reportes alrededor del mundo relacionados con hallazgos de mutaciones en el codón 618, específicamente C618S (TGC/TCC) son pocos. En población coreana, se ha encontrado la mutación C618S en una familia caracterizada con NEM 2A (Chung, et al., 2004) y en población alemana una mutación en el mismo codón pero relacionada con cambio de otro aminoácido (C618G) fue hallada en familias con NEM 2A (Machens & Dralle., 2008). Finalmente, en un reporte de un caso una familia china portadora de la mutación C618S fue caracterizada como CMTF (Qi et al., 2012).

Recientemente, en población iraní, un individuo portador de la mutación C618S fue clasificado clínicamente como un individuo con sólo CMT (Yeganeh et al., 2015) y en población china los investigadores asumieron determinar como NEM no clasificada a los individuos portadores de C618S (Wang et al., 2016).

Se ha reportado ampliamente en la literatura que la edad media del diagnóstico clínico de CMT se realiza en pacientes con edades entre los 18 y los 59 años, con un promedio alrededor de los 35 años. Lo cual concuerda con los hallazgos de nuestro estudio. En un estudio realizado recientemente por Frank-Raue y colaboradores, en el que se analizaron los perfiles de riesgo y se estimó la penetrancia en NEM 2A causada por las mutaciones más importantes del exón 10 del proto-oncogén *RET* (codones 609, 611, 618 y 620), para ese grupo de edad la penetrancia para el CMT fue del 77% (Frank-Raue et al., 2011). No conocemos reportes de estudios en los que se haya estimado la penetrancia para individuos de edades más avanzadas, pero la proyección de los datos, del estudio en mención, permite prever una penetrancia del 100% para mayores de 70 años de

edad. En el mismo estudio se encontró que los individuos mayores de 42 años portadores de mutaciones en el codon 618 presentaron tumores con clasificación N1M0 y la clasificación M0 se observó en individuos menores de 39 y mayores de 32 años. Más del 50% de individuos diagnosticados clínicamente presentaron tumores con estadios T1- T4, N0, M0 y se estimó que pudieran considerarse curables en un 75% de los casos.

En este grupo de edad la penetrancia de las mutaciones en el codón 618 para feocromocitoma fue del 25% y según la proyección de los datos pudieran ser las mutaciones en los codones 609, 611, 618 y 620, las que presentan mayor penetrancia para feocromocitoma, después de los 60 años, lo cual hace pensar que si se estudian y se siguen cuidadosamente los individuos de la red familiar analizada en nuestro caso, algunos de ellos pudieran presentar feocromocitoma en edades más avanzadas, en las cuales la penetrancia para esta entidad incrementa.

En otro reporte, en un grupo de población norteamericana se encontró feocromocitoma en tan sólo 7 individuos de un total de 41 personas estudiadas, portadoras de la mutación C618S, lo cual representó una penetrancia del 17%. (Quayle et al., 2007). Adicionalmente, es importante mencionar que la mutación C618S se ha encontrado asociada con formas de CMT unilateral (Egawa et al., 1998).

En el caso estudiado en este trabajo de investigación hay al menos 9 casos reportados de enfermedad tiroidea con 4 casos de CMT en individuos de más de 50 años, sin reportes o información que haga pensar en la presencia de feocromocitoma. La mutación C618S ha sido reportada como una mutación asociada a NEM 2A y CMTF, por lo tanto es de esperarse que algunos miembros del grupo pudieran desarrollar feocromocitoma con una probabilidad del 25-60% entre los 50 y los 70 años de edad.

Nuestros hallazgos, hasta ahora, pudieran hacer pensar de que el fenotipo de nuestro grupo estudiado es el de CMTF, pero por el tipo de mutación, existe una probabilidad importante de que también pudiera tratarse de un caso de NEM 2A y que, más adelante, algunos de los miembros de la familia puedan presentar feocromocitoma. Por lo tanto es recomendable el seguimiento periódico y permanente de todos los individuos portadores de la mutación.

Si bien es cierto que mutaciones de la línea germinal en el proto-oncogén *RET* son la causa de NEM 2 y CMT heredable, el reordenamiento somático *RET/PTC1* es una alteración génica altamente asociada con Carcinoma Papilar de Tiroides (CPT). La asociación de CPT con CMT es una entidad rara. Aunque los casos reportados de esta asociación están aumentando, las alteraciones moleculares relacionadas siguen siendo desconocidos. Se ha sugerido que mutaciones germinales del proto-oncogén *RET* pudieran ser el detonante potencial en el desarrollo simultáneo de estos dos tipos histológicos de tumores malignos. NEM 2A y el CMTF se han asociado con diferentes mutaciones de *RET* que implican principalmente afectación en los residuos de cisteína, en el dominio extracelular rico en cisteína del receptor *RET*. La mutación C618S es una de las cinco mutaciones reportadas que afectan uno de los residuos de cisteína extracelulares (Machens et al., 2003). Esta mutación está clasificada como de nivel B o moderado (Kloos et al., 2009). En nuestro estudio se encontró un caso de CPT en asociación con CMT en un tejido afectado por Tiroiditis de Hashimoto (TH). La asociación de CPT en los pacientes con CMT heredable se considera generalmente una asociación coincidental. Sin embargo, varias mutaciones del proto-oncogén *RET* (K603Q, M918T, V804L y C634S) han sido reportadas en familias con NEM 2 afectadas por CMT y CPT (Rey et al., 2001; Melillo, et al., 2004).

De acuerdo con el aumento de la prevalencia de enfermedades neoplásicas en pacientes que sufren de enfermedades autoinmunes, se evidencia una clara asociación entre CPT y TH ( Segal, K et al., 1985). Sin embargo, la asociación de

CMT y TH es muy poco frecuente (Schuetz, 2006). Por lo tanto, el CPT observado en nuestro caso también podría tener como causa etiológica el fondo inflamatorio desencadenante de la TH en lugar de la mutación *RET*. Sin embargo, hasta donde conocemos este es el primer informe que muestra la relación entre la mutación *RET* (C618S) y CPT en asociación con CMT en una familia afectada por CMT heredable.

Nuestros hallazgos sugieren que la mutación C618S también puede estar relacionada con los casos de CPT asociado a CMT heredable. Esta observación justifica la realización de estudios moleculares y celulares adicionales para evaluar la actividad transformadora de la mutación *RET* (C618S) en modelos celulares. El seguimiento de la red familiar analizada en este trabajo, dará información acerca de si la asociación observada fue coincidental o tiene alguna relación directa con la mutación C618S del proto-oncogén *RET*, si se encuentra la misma asociación en los otros miembros portadores y con CMT de la familia.

## 7. CONCLUSIONES

- Nuestro trabajo ha identificado y caracterizado una red familiar afectada por el síndrome NEM 2 del subtipo NEM 2A hasta el momento con fenotipo de CMT únicamente, pero en la cual existe una probabilidad de más del 25% de encontrar individuos con FEO en los siguientes años de estudio de la corte.
- El caso estudiado esta asociado a la mutación C618S del proto-oncogén *RET*, la cual según las guías más recientes de clasificación de riesgo de la ATA, corresponde a un nivel de riesgo moderado y muy frecuentemente asociada con NEM 2<sup>a</sup> y CMTF.
- La edad de aparición de la transformación celular maligna pudiera estar entre los 5 y 10 años de edad y la aparición clínica de CMT usualmente se presenta después de la tercera década de vida de acuerdo a lo reportado en los estudios de cohortes y en nuestro caso.
- Varios miembros de la red familiar en dos generacines diferentes fueron analizados y el número de casos portadores corresponde a un patrón de transmision de herencia autosómico dominante y una condición heterocigótica.
- Los análisis histopatológicos realizados evidenciaron presencia de Carcinoma Medular de Tiroides, Carcinoma Papilar de Tiroides y Tiroiditis de Hashimoto en la biopsia analizada del caso índice portador de la mutación C618S.

## 8. RECOMENDACIONES

- Analizar molecularmente a todos los miembros de la familia, incluyendo los aún no estudiados y que nuestros resultados encontrados se convaliden por un laboratorio acreditado y/o de referencia para este tipo de análisis moleculares.
- Nuestros resultados deben ser transferidos de manera confidencial, siguiendo la normatividad vigente, para este tipo de casos es el médico tratante, quién identificó el caso índice. Adicionalmente, se debe establecer un equipo multidisciplinario, compuesto de médicos, cirujanos, patólogos, genetistas clínicos y biólogos o genetistas moleculares para el estudio y seguimiento de la cohorte de pacientes de esta red familiar.
- La información debe ser retroalimentada a la familia como retribución a su participación en el estudio, pero dada la sensibilidad del caso se deben seguir los protocolos delineados para este tipo de casos y este procedimiento debe ser manejado por un equipo de apoyo en consejería genética. Se considera de vital importancia el apoyo de enfermería, psicología y trabajo social para toda la familia .
- El médico tratante decidirá las conductas terapéuticas, de manejo y seguimiento clínico de los individuos analizados en este estudio, teniendo en cuenta la información molecular y la aplicación de otras pruebas clínicas de apoyo, siguiendo las recomendaciones de las respectivas asociaciones y academias médicas para el caso.
- La cohorte de pacientes merece un estudio prospectivo de seguimiento para determinar las frecuencias de las distintas patologías asociadas al síndrome NEM 2A y determinar sus penetrancias, contribuyendo en tal

sentido a alimentar la casuística de este tipo de casos por medio del fortalecimiento de la información básica que a su vez podrá retroalimentar la práctica clínica.

## BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, M. S., and BRONNER-FRASER, M. Review: The Role of Neural Crest Cells in The Endocrine System. *Endocr Pathol.* 2009, vol. 20, pp. 92-100.

ALBAREL, F., CONTE-DEVOLX, B., and OLIVER, C. From nodule to differentiated thyroid carcinoma. Contributions of molecular analysis in 2012. *Annales d'Endocrinologie.* 2012, vol. 73, pp. 155-164.

ALVARES DA SILVA, A. M., *et al.* A novel germ-line point mutation in RET exon 8 (Gly533Cys) in a large kindred with familial medullary thyroid carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2003, vol. 88, no. 11, pp. 5438-5443.

ANDREW, A., KRAMER, B., and RAWDON, B. The origin of gut and pancreatic neuroendocrine (APUD) cells: the last word? *J Pathol.* 1998, vol. 186, no. 2, pp.117-118.

ARIAS, N. E. Registros poblacionales de cáncer: Avances en Colombia, Chile y Brasil. *Rev Fac Nac Salud Pública.* 2013, vol. 31, no. 1, pp. 127-135.

ARIGHI, E., BORRELLO, M. G., AND SARIOLA, H. RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2005, vol. 16, pp. 441-467.

BAKER, C. V., and BRONNER-FRASER, M. The origins of the neural crest. Part I: embryonic induction . *Mechanisms of Development.* 1997, vol. 69, pp. 3-11.

BALL, D. Medullary thyroid cancer: monitoring and therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2007, vol. 36, no.3, pp. 823-837.

BARBOT, N., CALMETTES, C., and SCHUFFENECKER, I. Pentagastrin stimulation test and early diagnosis of medullary thyroid carcinoma using an immunoradiometric assay of calcitonin: Comparison with genetic screening in hereditary medullary thyroid carcinomag. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994, vol. 78, pp. 114-120.

BERGHOLM, U., BERGSTRÖM, R., EKBOM, A. Long-term follow-up of patients with medullary carcinoma of the thyroid. *Cancer,* 1997, vol. 79, no.1, pp.132-138.

BLANPAIN, C., and SIMONS, B. D. Unravelling stem cell dynamics by lineage tracing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2013, vol. 14, pp. 489-502.

BOUKNIGHT, A. L. Thyroid physiology and thyroid function testing. *Otolaryngol Clin North Am.* 2003, vol. 36, pp. 9-15.

BRANDI, M., *et al.* Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001, vol. 86, no.12, pp. 5658-5671.

BRAUCKHOFF, M., *et al.* Multiple endocrine neoplasia 2B syndrome due to codon 918 mutation: clinical manifestation and course in early and late onset disease. *World J Surg.* 2004, vol. 28, no.12, pp. 1305-1311.

CAMARGO, R., *et al.* Latin American Thyroid Society recommendations for the management of thyroid nodules. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2009, vol. 53, no. 9, pp. 1167-1175.

CAVALIERI, R. R. Iodine Metabolism and Thyroid. *Thyroid*. 2009, vol.7, no.2, pp.177-181.

CECCHERINI, I., *et al.* Identification of the Cys634->Tyr mutation of the RET proto-oncogene in a pedigree with multiple endocrine neoplasia type 2A and localized cutaneous lichen amyloidosis. *J Endocrinol Invest*. 1994, vol. 17, pp. 201-204.

CHAN J.K.C. Tumors of the thyroid and parathyroid glands (Chapter 18). In: *Diagnostic histopathology of tumors*, vol. 2, 3 ed. Churchill Livingstone, London: Fletcher CDM, 2007. p. 997–1079.

CHUNG, YJ., *et al.* RET proto-oncogene mutations are restricted to codon 634 and 618 in Korean families with multiple endocrine neoplasia 2A. *Thyroid*. 2004, vol. 14, no. 10, pp. 813-818.

CLARK, O., *et al.* Medullary thyroid carcinoma clinical characteristics, treatment, prognostic factors, and a comparison of staging systems. *Cancer*. 2000, vol. 88, no. 5, pp. 1139-1148.

COOPER, DS., *et al.* Management Guidelines for Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. The American Thyroid Association Guidelines Taskforce. *Thyroid*. 2006, vol. 16, no. 2, pp.109-141.

COOPER, DS., *et al.* Revised American Thyroid Association Management Guidelines for Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. The American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2009, vol. 19, no. 11, pp. 1167-1214.

CRAVEN, J. (23 de Octubre de 2015). Cabozantinib Improved Survival in Medullary Thyroid Cancer With RET Mutations. Recuperado el 9 de Noviembre de 2015, de Endocrinology Advisor Update: [www.endocrinologyadvisor.com](http://www.endocrinologyadvisor.com)

DECKER, R., PEACOCK, M., and WATSON, P. Hirschsprung disease in MEN2A: increased spectrum of RET exon 10 genotypes and strong genotype-phenotype correlation. *Hum Mol Genet*, 1998, vol. 7, pp. 129-134.

DELELLIS RA., *et al.* WHO histological classification of thyroid and parathyroid tumours. In: World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics. Tumours of endocrine organs. IARC Press, Lyon. 2004.

DE GROOT, J. W. B., *et al.* RET as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocrine Reviews*. 2006, vol. 27, no.5, pp. 535-560.

DONIS-KELLER, H., *et al.* Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN2A and FMTC. *Hum Mol Genet*. 1993, vol. 2, pp. 851-856.

ELLIS, H. Anatomy of the thyroid and parathyroid glands . *Surgery*. 2007, vol. 25, no. 11, pp. 467-468.

ENG, C *et al.* The relationship Between Specific RET Proto-oncogene Mutations and Disease Phenotype in Multiple Endocrine neoplasia Type 2. *JAMA*. 1996, vol 276, no. 19, pp. 1575-1579.

EROVIC, BM., *et al.* Prognostic and predictive markers in medullary thyroid carcinoma. *Endocr Pathol*. 2012, vol. 23, no. 4, pp. 795-832.

FAGMAN, H., and NILSSON, M. Morphogenesis of the thyroid gland. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2010, vol. 323, pp. 35-54.

FALLAH, M., SUNDQUIST, K., and HEMMINKI, K. Risk of thyroid cancer in relatives of patients with medullary thyroid carcinoma by age at diagnosis. *Endocr Relat Cancer*. 2013, vol. 20, no. 5, pp. 717-724.

FANCY, T., GALLAGHER III, D., and HORNING, J. D. Surgical Anatomy of the Thyroid and Parathyroid Glands. *Otolaryngol Clin N Am*. 2010, vol. 43, pp. 221-227.

FARNDON, J., *et al*. Familial medullary thyroid carcinoma without associated endocrinopathies: a distinct clinical entity. *Br J Surg*. 1986, vol. 73, no. 4, pp. 278-281.

FERLAY, J., *et al*. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015, vol. 136, no. 5, pp. E359-E386.

FONTAINE, J., and LE DOUARIN, N. M. Analysis of endoderm formation in the avian blastoderm by the use of quail-chick chimaeras. The problem of the neuroectodermal origin of the cells of the APUD series. *J Embryol Exp Morphol*. 1997, vol. 41, pp. 209-222.

FOSTER, G. V. (1968). Calcitonin A review of experimental and clinical investigations. *Postgrad. med. J*. 1968, vol. 44, pp. 411-422.

FRANK-RAUE, K., *et al*. Prevalence and clinical spectrum of nonsecretory medullary thyroid carcinoma in a series of 839 patients with sporadic medullary thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2013, vol. 23, no. 3, pp. 294–300.

FRANK-RAUE, K., *et al.* RET Exon 10 Consortium. Risk Profiles and Penetrance Estimations in Multiple Endocrine Neoplasia Type 2A Caused by Germline RET Mutations Located in Exon 10. *Human Mutation*. 2011, vol. 32, no.1, pp. 51-58.

FROHNAUER, M.K. and DECKER, R.A. Update on the MEN 2A c804 RET mutation: is prophylactic thyroidectomy indicated?. *Surgery*. 2000, vol. 128, no. 6, pp. 1052-1057; discussion pp. 1057-1058.

GAGEL, R., *et al.* Multiple endocrine neoplasia type 2A associated with cutaneous lichen amyloidosis. *Ann Intern Med*. 1989, vol. 111, pp. 802-806.

GIUSTI, F., *et al.* Thyroid Cancer: Current Molecular Perspectives. *J Oncol*. 2010, ID 351679.

GRIECO, M., *et al.* PTC is a Noe1 Rearranged Form of the RET Proto-Oncogene And is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell*. 1990, vol. 60, pp. 557-563.

GRUNDITZ, T., *et al.* Calcitonin gene-related peptide in thyroid nerve fibers and C cells: Effects on thyroid hormone secretion and response to hypercalcemia. *Endocrinology*. 1986, vol. 119, no. 5, pp. 2313-2324.

GUO, Y., *et al.* Genetic analysis of a chinese Han family with multiple endocrine neoplasia type 2A. *Indian J Biochem Biophys*. 2013, vol. 50, no. 1, pp. 26-31.

HAUGEN, B.R., *et al.* American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016, vol. 26, no. 1, pp. 1-133.

HARACH, HR., *et al.* Chromogranin A immunoreactivity compared with argyrophilia, calcitonin immunoreactivity, and amyloid as tumour markers in the histopathological diagnosis of medullary (C-cell) thyroid carcinoma. *Pathol Res Pract.* 1992, vol. 188 no.1-2, pp. 123-130.

HAZARD, J., HAWK, W., and CRILE, G. J. Medullary (solid) carcinoma of the thyroid: A clinicopathologic entity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1959, vol. 19, no.1, pp. 152-161.

HEMMINKI, K., and DONG, C. Population-based study of familial medullary thyroid cancer. *Fam Cancer.* 2001, vol. 1, pp. 45-49.

HESHMATI, H., GHARIB, H., and VAN HEERDEN, J. Advances and controversies in the diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma. *Am J Med.* 1997, vol. 103, pp. 60-69.

HINZE, R., *et al.* Primary hereditary medullary thyroid carcinoma--C-cell morphology and correlation with preoperative calcitonin levels. *Virchows Arch.* 1998, vol. 433, no. 3, pp. 203-208.

HYER S. L., *et al.* Familial medullary thyroid cancer: clinical aspects and prognosis S.L. *EJSO the Journal of Cancer Surgery.* 2005, vol. 31, pp. 415-419.

ISMAILOV, S., and PIULATOVA, N. Postoperative calcitonin study in medullary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer.* 2004, vol. 11, no. 2, pp. 357-363.

JAUQUET, J. Ein Fall von metastasierenden Amyloidtumoren (Lymphosarkom). *Virchows Archiv.* 1906, vol. 185, no.2, pp. 251-268.

JIMENEZ C., *et al.* A novel point mutation of the RET protooncogene involving the second intracellular tyrosine kinase domain in a family with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004, vol. 89, pp. 3521-3526.

JOHANSSON, E., *et al.* Revising the embryonic origin of thyroid C cells in mice and humans. *Development.* 2015, vol. 142, pp. 3519-3528.

KAMEDA, Y. Cellular and Molecular events on the development of mammalian thyroid C cells. *Developmental Dynamics.* 2016, vol. 245, no. 3, pp. 323- 341.

KAMEDA, Y., *et al.* FRS2 $\alpha$  is required for the separation, migration, and survival of pharyngeal-endoderm derived organs including thyroid, ultimobranchial body, parathyroid, and thymus . *Developmental Dynamics.* 2009, vol. 238, pp. 503-513.

KAMEDA, Y., *et al.* Expression of the epithelial marker E-Cadherin by thyroid C cells and their precursors during murine development. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2007b, vol. 55, no. 10, pp. 1075-1088.

KASERER, K., *et al.* Sporadic versus familiar medullary thyroid microcarcinoma: a histopathologic study of 50 consecutive patients. *Am J Surg Pathol.* 2001, vol. 25, pp. 1245-1251.

KESTER, M. H., *et al.* Iodothyronine levels in the human developing brain: Major regulatory roles of iodo-thyronine deiodinases in different areas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004, vol. 89, pp. 3117-3128.

KHURANA, R., *et al.* Unraveling the amyloid associated with human medullary thyroid carcinoma. *Endocrinology.* 2004, vol. 145, no. 12, pp. 5465-5470.

KIMURA, S., *et al.* The T/ebp null mouse: Thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev.* 1996, vol. 10, no.1, pp. 60-69.

KLOOS, R., *et al.* Medullary Thyroid Cancer: Management Guidelines of the American Thyroid Association. The American Thyroid Association Guidelines Task Force. *Thyroid.* 2009, vol. 19, no.6, pp. 565-612.

KOUVARAKI, M., SHAPIRO, S., and PERRIER, N. RET proto-oncogene: a review and update of genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid cancer and associated endocrine tumors. *Thyroid.* 2005, vol. 15, pp. 531-544.

LEBOULLEUX, S., *et al.* Medullary Thyroid Carcinoma. *Clin Endocrinol.* 2004, vol. 61, pp. 299-310.

LEE, M., and PELLEGGATA, NS. Multiple endocrine neoplasia syndromes associated with mutation of p27. *J Endocrinol Invest.* 2013, vol. 36, no. 9, pp. 781-787.

LE DOUARIN, N. M., and TEILLET, M. A. Experimental Analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neurectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique . *Developmental Biology.* 1974, vol. 41, pp. 162-184.

LE LIÈVRE, C., and LE DOUARIN, N. Mesenchymal derivatives of the neural crest: Analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morphol.* 1975, vol. 34, no. 1, pp. 125-154.

MACHENS, A., and DRALLE, H. Familial prevalence and age of RET germline mutations: implications for screening. *Clin Endocrinol.* 2008, vol. 69, pp. 81-87.

MACHENS, A., *et al.* Early malignant progression of hereditary medullary thyroid cancer. *N Engl J Med.* 2003, vol. 349, no. 16, pp. 1517-1525.

MARCELLO, M. A., *et al.* The influence of the environment on the development of thyroid tumors: a new appraisal. *Endocrine-Related Cancer.* 2014, vol. 21, no. 5, pp. T235-T254.

MARGRAF, R. L., *et al.* Multiple Endocrine Neoplasia Type 2 RET Protooncogene Database: Repository of MEN2 Associated RET Sequence Variation and Reference for Genotype/Phenotype Correlations. *Human Mutation.* 2009, vol. 30, no. 4, pp. 548-556.

MCIVER, B. Evaluation of the thyroid nodule. *Oral Oncology.* 2013, vol. 49, pp. 645-653.

MELILLO RM., *et al.* The oncogenic activity of RET point mutants for follicular thyroid cells may account for the occurrence of papillary thyroid carcinoma in patients affected by familiar medullary thyroid carcinoma. *Am J Pathol.* 2004, vol. 165, no. 2, pp. 511-521.

MEN2 Database. (s.f.). Recuperado el 9 de 11 de 2015, de ARUP Scientific Resource for Research and Education: MEN2 Database: [arup.utah.edu/database/MEN2/MEN2\\_display.php](http://arup.utah.edu/database/MEN2/MEN2_display.php)

MOHEBATI, A., and SHAHA, A. Imaging techniques in parathyroid surgery for primary hyperparathyroid. *Am J Otolaryngol.* 2012, vol. 33, no. 4, pp. 457-468.

MOLEY, J., *et al.* Surgical management of patients with persistent or recurrent medullary thyroid cancer. *J Intern Med.* 1998, vol. 243, no. 6, pp. 521-526.

MOLINE, J., and ENG, C. Multiple endocrine neoplasia type 2: an overview. *Genet Med.* 2011, vol. 13, no. 9, pp. 755-764.

MULLIGAN, L., *et al.* Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature.* 1993, vol. 363, pp. 458-460.

NAKAZAWA T, *et al.* C-cell-derived calcitonin-free neuroendocrine carcinoma of the thyroid: the diagnostic importance of CGRP immunoreactivity. *Int J Surg Pathol.* 2014, vol. 22, pp. 530–535.

NICCOLI-SIRE, P., *et al.* Early or prophylactic thyroidectomy in MEN2/FMTC gene carriers: Results in 71 thyroidectomized patients. The French Calcitonin Tumours Study Group (GETC). *Eur J Endocrinol.* 1999, vol. 141, no. 5, pp. 468-474.

NIEDERLE, B., SEBAG, F., and BRAUCKHOFF, M. Timing and extent of thyroid surgery for gene carriers of hereditary C cell disease--a consensus statement of the European Society of Endocrine Surgeons (ESES). *Langenbecks Arch Surg.* 2014, vol. 399, pp. 185-197.

NORTON, JA., KRAMPITZ, G., and JENSEN, RT. Multiple Endocrine Neoplasia: Genetics and Clinical Management. *Surg Oncol Clin N Am.* 2015, vol. 24, no. 4, pp. 795-832.

OLIVEIRA, MN., *et al.* The RET p.G533C mutation confers predisposition to multiple endocrine neoplasia type 2A in a Brazilian kindred and is able to induce a malignant phenotype in vitro and in vivo. *Thyroid.* 2011, vol. 21, pp. 975-985.

PASZKO, Z., *et al.* The occurrence and the type of germline mutations in the RET gene in patients with medullary thyroid carcinoma and their unaffected kindred's from central Poland. *Cancer Investigation.* 2007, vol. 25, pp. 742-749.

PEARSE, A. The Cytochemistry of the thyroid C cells and their relationship to calcitonin. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1996, vol. 164, no. 996, pp. 478-487.

POLICENI, B. A., SMOKER, W. R., and REEDE, D. L. Anatomy and Embriology of the Thyroid and Parathyroid Glands. *Seminars in Ultrasonod CT and MRI.* 2012, vol. 33, pp. 104-114.

PLAZA-MENACHO, I., *et al.* Current concepts in RET-related genetics, signaling and therapeutics. *Trends Genet.* 2006, vol. 22, no. 11, pp. 627-636.

PONDER, B., *et al.* Risk estimation and screening in families of patients with medullary thyroid carcinoma. *Lancet.* 1988, vol. 1 no. 8582, pp. 397-401.

QUAYLE, F. J., *et al.* Pheochromocytoma penetrance varies by RET mutation in MEN 2A. *Surgery.* 2007, vol. 142, no. 6, pp. 800-805.

QUIROGA-SANCHÉZ, V. G. Origen del nombre de la glándula de tiroides o tiroidea. *Revista de Endocrinología y Nutrición.* 2013, vol. 21, no. 4, pp. 154-158.

REY JM, *et al.* Novel Germline RET Mutation Segregating With Papillary Thyroid Carcinomas. *Genes Chromosom Cancer.* 2001, vol. 32, pp. 390-391.

RÍOS, A., *et al.* Perfil histopatológico e inmuno-histoquímico del carcinoma medular de tiroides esporádico y familiar. *Endocrinol Nutr.* 2011, vol. 58, no.10, pp. 521-528.

SCHMID, K. W. Histopathology of C cells and Medullary Thyroid Carcinoma. *Recent Results Cancer Research.* 2015, vol. 204, pp. 41-60.

SCHMID, K. W., and ENSINGER, C. "Atypical" medullary thyroid carcinoma with little or no calcitonin expression. *Virchows Arch.* 1998, vol. 433, pp. 209–215.

SCHRÖDER, S., *et al.* Prognostic Factor in Medullary Thyroid Carcinomas. Survival in Relation to Age, Sex, Stage, Hystology, Immunocytochemistry, and DNA Content. *Cancer.* 1988, vol. 61, pp. 806-016.

SCHUETZ M., *et al.* Calcitonin measurements for early detection of medullary thyroid carcinoma or its premalignant conditions in Hashimoto's thyroiditis. *Anticancer Res.* 2006, vol. 26, no.1B, pp. 723-727.

SHERMAN, S. Short Oral Communication 51: The Impact Of RET And RAS Mutation Status On Overall Survival In The Exam Trial, A Phase 3 Study of Cabozantinib (Cabo) In Patients (PTS) With Progressive, Metastatic Medullary Thyroid Cancer (MTC). 15th International Thyroid Congress and 85th Annual Meeting of the American Thyroid Association (ITC/ATA). 2015. Lake Buena Vista, Florida, USA.

SIGGELKOW, H., *et al.* 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, vol. 144, pp. 467- 473.

SIPPLE, JH. The association of pheochromocytoma with carcinoma of the thyroid. *Am J Med.* 1961. vol. 31, pp. 163–166.

SMALLRIDGE, R., *et al.* American Thyroid Association Guidelines for Management of Patients with Anaplastic. For The American Thyroid Association Anaplastic Thyroid Cancer Guidelines Taskforce. *Thyroid.* 2012, vol. 22, no. 11, pp. 1104-1139.

STAMATAKOS, M., *et al.* Medullary thyroid carcinoma: The third most common thyroid cancer reviewed. *Oncol Lett.* 2011, vol. 2, no.1, pp. 49-53.

STATHATOS, N. Medullary thyroid carcinoma: Thyroid Physiology. *Med Clin N Am.* 2012, vol. 96, pp. 165-173

TAKAHASHI, M. The GDNF/RET signalling pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001, vol. 12, pp. 361-373.

TAKAHASHI, M., and COOPER, G. M. RET Transforming Gene Encodes a Fusion Protein Homologous to Tyrosine Kinases. *Mol Cell Biol.* 1987 , vol. 7, no. 4, pp. 1378-1385.

TAKAHASHI, M., RITZ, J., and COOPER, G. M. Activation of a Novel Human Transforming Gene, *ret*, by DNA Rearrangement. *Cell.* 1985, vol. 42, pp. 581-588.

THAKKER, RV. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) and type 4 (MEN4). *Mol Cell Endocrinol.* 2014, vol. 386 no. 1-2, pp. 2-15.

The Human Gene Mutation Database. (s.f.). Recuperado el 5 de Noviembre de 2015, de HGMD: [www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php](http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php)

URIBE, C., OSMA, S., and HERRERA, V. Cancer incidence and mortality in the Bucaramanga metropolitan area 2003-2007. *Colomb Méd.* 2012, vol. 43, no. 4, pp. 290-297.

WALLS, GV. Multiple endocrine neoplasia (MEN) syndromes. *Semin Pediatr Surg.* 2014, vol. 23, no. 2, pp. 96-101.

VAN VEELLEN, W., *et al.* Medullary thyroid carcinoma and biomarkers: past, present and future. *Journal of Internal Medicine*. 2009, vol. 266, pp. 126-140.

WANG, D.G., *et al.* Bcl-2 and c-Myc, but Not Bax and p53, Are Expressed during Human Medullary Thyroid Tumorigenesis. *Am J Pathol*. 1998, vol. 152, no.6, pp. 1407-1413.

WANG, J., *et al.* Screening of RET gene mutations in Chinese patients with medullary thyroid carcinoma and their relatives. *Fam Cancer*. 2016, vol. 15, no. 1, pp. 99-104.

WELLS, SA Jr., *et al.* Multiple Endocrine Neoplasia Type 2 and Familial Medullary Thyroid Carcinoma: An Update. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013, vol. 98, pp. 3149-3164.

WELLS, SA Jr., and FRANZ, C. Medullary Carcinoma of the thyroid gland. *World J Surg*. 2000, vol. 24, pp. 952-956.

WELLS, SA Jr., *et al.* Revised American Thyroid Association Guidelines for the Management of Medullary Thyroid Carcinoma. The American Thyroid Association Guidelines Taskforce. *Thyroid*. 2015, vol. 25, no. 6, pp. 567-610.

WESTERLUND, J., *et al.* Expression of Islet1 in thyroid development related to budding, migration, and fusion of primordia. *Developmental Dynamics*. 2008, vol. 237, pp. 3820-3829.

WHITWAM, J. G. APUD cells and the apudomas. *Anaesthesia*. 1977, vol. 32, pp. 879-888.

WILLIAMS, E. Histogenesis of medullary carcinoma of the thyroid. J Clin Pathol. 1966, vol. 19, pp. 114-118.

WILLIAMS, E., and POLLOCK, D. Multiple mucosal neuromata with endocrine tumours: a syndrome allied to von Recklinhausen's disease. Path Bact. 1966, vol. 91, no. 1, pp. 71-80.

WOLFE, H. J., *et al.* C-Cell Hyperplasia Preceding Medullary Thyroid Carcinoma. N Engl J Med. 1973, vol. 289, no. 9, pp. 437-441.

XING, M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. Nat Rev Cancer. 2013, vol. 13, no. 3, pp. 184-199.

XU, L., *et al.* Family History of Cancer and Risk of Sporadic Differentiated Thyroid Carcinoma. Cancer. 2012, vol. 118, no. 5, pp. 1228-1235.

XUE, F., *et al.* Germline RET mutations in MEN 2A and FMTC and their detection by simple DNA diagnostic tests. Hum Mol Genet. 1994, vol. 3, no. 4, pp. 635-638.

YEGANEH, MZ., *et al.* Skewed mutational spectrum of RET proto-oncogene Exon10 in Iranian patients with medullary thyroid carcinoma. Tumor Biol. 2015, vol. 36, no. 7, pp. 5225-5231.

YIP, L., *et al.* Multiple endocrine neoplasia type 2: evaluation of the genotype-phenotype relationship. Arch Surg. 2003, vol. 138, no. 4, pp. 409-416; discussion pp. 416.

ZABLOTSKA, L., *et al.* Analysis of thyroid malignant pathological findings identified during three rounds of screening (1997-2008) of a Belarusian cohort of children

and adolescents exposed to radioiodines after the Chernobyl accident . *Cancer*.  
2015, vol. 121, no. 3, pp. 457-466.

# ANEXOS

## Anexo A. Declaración de consentimiento informado para mayores de 18 años

### UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

Facultad de Salud, Escuela de Medicina, Departamento de  
Ciencias Básicas

Nombre del estudio: **Tamizaje genético del proto-oncogen *RET*  
en un núcleo familiar del nororiente colombiano afectado  
por carcinoma medular de tiroides familiar: Correlación  
genotípica y fenotípica**

*Investigadores: Álvaro Antonio Herrera Hernández<sup>1</sup>, Herman José  
Arteaga<sup>2</sup>. Adriana Lucia Manosalva-Cortés<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Médico tratante, <sup>2</sup> Personal vinculado al grupo de Inmunología y  
Epidemiología Molecular de la Universidad Industrial de Santander.*

### DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MAYORES DE 18 AÑOS

Basado en la resolución 8430/1993

Autorización voluntaria para mi participación en el siguiente trabajo de investigación

Nombre del estudio: **Tamizaje genético del proto-oncogen *RET* en un núcleo familiar del  
nororiente colombiano afectado por carcinoma medular de tiroides familiar: Correlación  
genotípica y fenotípica**

#### Justificación y objetivos del estudio

El propósito del presente estudio es identificar mediante la realización de pruebas altamente especializadas (moleculares), la presencia de características hereditarias (genotipificación), que confirman una afección de la tiroides que conlleva al desarrollo de cáncer medular de tiroides (variedad familiar), en los miembros de un núcleo familiar afectado por este tipo de trastorno hereditario. Este estudio, se realiza en el núcleo familiar con el cual usted tiene vínculos de consanguinidad directa y en el cual, se han encontrado antecedentes de diagnóstico confirmado de este tipo de enfermedad (diagnóstico histopatológico confirmado).

Nuestro interés en la realización de este estudio se debe a que las investigaciones científicas han demostrado que el diagnóstico de esta afectación realizado a una edad temprana en los miembros de las redes familiares permite un tratamiento preventivo (la tiroidectomía profiláctica o extracción de la glándula tiroides), que disminuye casi por completo el desarrollo de este tipo de tumores, los cuales se presentan más o menos entre los 20 y los 30 años de edad en todas las personas afectadas.

Debido a que se presentan algunas variables de esta afectación (diversas mutaciones), asociadas a distintos grados de severidad y tiempos de desarrollo de los tumores de la glándula tiroides, deseamos realizar un análisis para determinar el tipo específico de la variable de esta afectación (mutaciones), con el fin de determinar la agresividad y el tiempo más apropiado para iniciar el tratamiento preventivo.

<sup>1</sup>

<sup>2</sup>

## Descripción del estudio

En este estudio participaran en lo posible todas las personas de la familia con diagnóstico confirmado de Carcinoma Medular de Tiroides y todos los otros integrantes del núcleo familiar en quienes sea posible tomar una muestra de sangre.

El procedimiento de extracción de la sangre será realizado por personal entrenado. La toma de esta muestra no representa ningún riesgo para el participante y solo en escasas oportunidades si hay alguna ligera dificultad en la toma de muestra, se le formará un pequeño “moretón” que se desvanecerá rápidamente.

Los participantes recibirán aclaración de cualquier duda con respecto a los procedimientos. La participación es voluntaria por lo cual en cualquier momento el participante se podrá retirar del estudio, sin que esto impida que continúe con la atención médica corriente establecida para su enfermedad.

Se mantendrá la privacidad del participante y para los investigadores distintos al médico tratante no se suministrará información sobre la identidad del paciente. No se recolectará información ni se realizará ninguna actividad que afecte la privacidad del participante o de su familia.

Los resultados serán entregados directamente al medico tratante, Dr. Álvaro Antonio Herrera Hernández, quien citará a consulta a los pacientes para informar sobre los resultados, recomendará los procedimientos a seguir y realizará interconsultas a los respectivos especialistas en caso de que los pacientes o la familia requieran algún tipo de apoyo medico o profesional de otra índole, incluyendo ayuda sicológica.

Este estudio no generará costos, ni se remunera de ninguna forma a los participantes, los gastos adicionales que surjan serán cubiertos por el proyecto de investigación. Se espera que con los resultados del estudio se favorezca a los participantes y a la comunidad en general. Sin embargo, se aclara que la prueba final confirmatoria debe ser realizada por un laboratorio de referencia y que esta última fase del diagnóstico no será cubierta por el proyecto. Se asegurará el cumplimiento de todas las medidas prácticas de protección de los individuos.

Participante No \_\_\_\_\_

Entiendo lo anteriormente explicado y acepto participar voluntariamente en el estudio de investigación y en constancia,

Yo (Nombres y Apellidos del participante) \_\_\_\_\_ de  
\_\_\_\_\_ con c.c \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_. Firma \_\_\_\_\_ .  
Fecha \_\_\_\_\_.

_____ Nombre del testigo 1	_____ c.c	_____ Firma
_____ Parentesco con el participante	_____ Dirección	_____ Teléfono

Nombre del testigo 2	c.c	Firma
Parentesco con el participante	Dirección	Teléfono

INVESTIGADOR/SUBINVESTIGADOR O PERSONA que toma el consentimiento informado.

Yo, confirmo que personalmente expliqué la naturaleza y el propósito del presente consentimiento, y por tanto, doy fe, que la persona que firma este consentimiento entiende la naturaleza, los beneficios y riesgos de participar en este estudio y que su firma es válida. Ningún problema médico o barrera de lenguaje o educación se ha interpuesto en el entendimiento absoluto de este documento.

Nombre	c.c	Firma	Fecha
--------	-----	-------	-------

En caso de alguna duda favor contactar a: Álvaro Antonio Herrera Hernández al número celular 3002415106.

ORIGINAL \_\_\_\_

COPIA \_\_\_\_

**Contacto en el Comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander:**

Para preguntas, aclaraciones o inquietudes acerca de los aspectos éticos de esta investigación puede comunicarse con el Comité de Ética para la Investigación Científica de la UIS, en horas hábiles al teléfono: 6344000 ext. 3208 o enviar un mensaje por correo electrónico a: [comitedetica@uis.edu.co](mailto:comitedetica@uis.edu.co)

## Anexo B. Declaración de consentimiento informado para menores de 18 años

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**  
Facultad de Salud, Escuela de Medicina, Departamento de  
Ciencias Básicas

Nombre del estudio: **Tamizaje genético del proto-oncogen *RET* en un núcleo familiar del nororiente colombiano afectado por carcinoma medular de tiroides familiar: Correlación genotípica y fenotípica**

*Investigadores: Álvaro Antonio Herrera Hernández<sup>1</sup>, Herman José Arteaga<sup>2</sup>. Adriana Lucia Manosalva-Cortés<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Médico tratante, <sup>2</sup> Personal vinculado al grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular de la Universidad Industrial de Santander.*

### **DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MENORES DE 18 AÑOS**

Basado en la resolución 8430/1993

Autorización voluntaria para mi participación en el siguiente trabajo de investigación

Nombre del estudio: **Tamizaje genético del proto-oncogen *RET* en un núcleo familiar del nororiente colombiano afectado por carcinoma medular de tiroides familiar: Correlación genotípica y fenotípica**

#### **Justificación y objetivos del estudio**

El propósito del presente estudio es identificar mediante la realización de pruebas altamente especializadas (moleculares), la presencia de características hereditarias (genotipificación), que confirman una afección de la tiroides que conlleva al desarrollo de cáncer medular de tiroides (variedad familiar), en los miembros de un núcleo familiar afectado por este tipo de trastorno hereditario. Este estudio, se realiza en el núcleo familiar con el cual usted tiene vínculos de consanguinidad directa y en el cual, se han encontrado antecedentes de diagnóstico confirmado de este tipo de enfermedad (diagnóstico histopatológico confirmado).

Nuestro interés en la realización de este estudio se debe a que las investigaciones científicas han demostrado que el diagnóstico de esta afectación realizado a una edad temprana en los miembros de las redes familiares permite un tratamiento preventivo (la tiroidectomía profiláctica o extracción de la glándula tiroides), que disminuye casi por completo el desarrollo de este tipo de tumores, los cuales se presentan más o menos entre los 20 y los 30 años de edad en todas las personas afectadas.

Debido a que se presentan algunas variables de esta afectación (diversas mutaciones), asociadas a distintos grados de severidad y tiempos de desarrollo de los tumores de la glándula tiroides, deseamos realizar un análisis para determinar el tipo específico de la variable de esta afectación (mutaciones), con el fin de determinar la agresividad y el tiempo más apropiado para iniciar el tratamiento preventivo.



Nombre del testigo 2	c.c	Firma
Parentesco con el participante	Dirección	Teléfono

INVESTIGADOR/SUBINVESTIGADOR O PERSONA que toma el consentimiento informado.

Yo, confirmo que personalmente expliqué la naturaleza y el propósito del presente consentimiento, y por tanto, doy fe, que la persona que firma este consentimiento entiende la naturaleza, los beneficios y riesgos de participar en este estudio y que su firma es válida. Ningún problema médico o barrera de lenguaje o educación se ha interpuesto en el entendimiento absoluto de este documento.

Nombre	c.c	Firma	Fecha
--------	-----	-------	-------

En caso de alguna duda favor contactar a: Álvaro Antonio Herrera Hernández al número celular 3002415106.

ORIGINAL \_\_\_\_

COPIA \_\_\_\_

**Contacto en el Comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander:**

Para preguntas, aclaraciones o inquietudes acerca de los aspectos éticos de esta investigación puede comunicarse con el Comité de Ética para la Investigación Científica de la UIS, en horas hábiles al teléfono: 6344000 ext. 3208 o enviar un mensaje por correo electrónico a: [comitedetica@uis.edu.co](mailto:comitedetica@uis.edu.co)

## Anexo C. Declaración de asentimiento para menores de 18 y mayores de 7 años

### UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

Facultad de Salud, Escuela de Medicina, Departamento de Ciencias Básicas

Nombre del estudio: **Tamizaje genético del proto-oncogen *RET* en un núcleo familiar del nororiente colombiano afectado por carcinoma medular de tiroides familiar: Correlación genotípica y fenotípica**

*Investigadores: Álvaro Antonio Herrera Hernández<sup>1</sup>, Herman José Arteaga<sup>2</sup>, Adriana Lucia Manosalva-Cortés<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Médico tratante, <sup>2</sup>Personal vinculado al grupo de investigación Inmunología y Epidemiología Molecular de la Universidad Industrial de Santander.*

### DECLARACIÓN DE ASENTIMIENTO PARA MENORES DE 18 MAYORES DE 7 AÑOS

Basado en la resolución 8430/1993

Autorización voluntaria para mi participación en el siguiente trabajo de investigación

Nombre del estudio: **Tamizaje genético del proto-oncogen *RET* en un núcleo familiar del nororiente colombiano afectado por carcinoma medular de tiroides familiar: Correlación genotípica y fenotípica**

#### Por que queremos estudiar tu sangre?

La razón por la que queremos estudiar tu sangre es porque hemos observado que muchos de tus familiares sufren de una enfermedad que afecta un órgano localizado en el cuello que se conoce con el nombre de “tiroides”. Nosotros sabemos que esta enfermedad se transmite de los padres a los hijos como se trasmite el color de los ojos o del cabello. Aunque una madre de ojos claros puede tener varios hijos con ojos claros no todos los hijos de esta madre necesariamente tienen ojos claros. De la misma manera, no todos los hijos de padres que tengan esta enfermedad de la “tiroides” van a heredar la enfermedad, pero después de haber observado muchas familias a las que las afecta esta enfermedad, los médicos saben que la mitad de los hijos de un padre con esta enfermedad, también van a padecer la enfermedad cuando sean adultos. Nosotros podemos averiguar en nuestros laboratorios estudiando tu sangre, si desarrollarás o no la enfermedad en tu vida adulta.

#### Como te beneficiarías participando en nuestra investigación?

Si encontramos por el estudio de tu sangre que desarrollarás la enfermedad que afecta la “tiroides” en tu vida adulta, los médicos podrán hacerte un tratamiento el cual reducirá casi por completo el desarrollo de la enfermedad.

Además de la misma manera que con el ejemplo del color de los ojos claros en algunas familias estos pueden ser mas claros que en otras, esta enfermedad puede ser mas grave en algunas familias que en otras. Mediante el estudio de tu sangre nosotros podemos tener información de

que tan grave sería la enfermedad y cual sería la mejor edad para tratar a las personas que están en riesgo de desarrollar la enfermedad.

### Como haremos el estudio?

En este estudio participaran en lo posible todas los miembros de tu familia y todos tus familiares directos, por ejemplo todos tus tíos y primos.

Solo tomaremos un poco de sangre, y esto será realizado por una persona con experiencia. Esta toma de una muestra de sangre no representa ningún peligro para ti, pero sentirás un pequeño “chuzón”. En algunas oportunidades se te podría formar un pequeño “moretón” que se desvanecerá rápidamente.

Tu puedes preguntar lo que desees saber y nosotros estaremos siempre disponibles para aclararte cualquier duda que tengas. Tu participación en este estudio es voluntaria y puedes decidir retirarte del estudio cuando lo desees, pero recuerda que este estudio es muy importante para tu salud y antes de tomar cualquier decisión, te recomendamos que la discutas con tus padres o un adulto responsable de tu familia.

Los resultados del estudio te serán entregados personalmente a ti o a tus padres, pero tu tienes el derecho a que nadie diferente a ti y a tus padres conozca los resultados. Tampoco divulgaremos ninguna información sobre ti y tu familia por ningún medio. Toda la información que tu o tus familiares nos subministren será completamente confidencial.

Sin embargo, los resultados serán entregados inicialmente directamente al medico de tu familia, quien será la persona que te informará sobre los resultados y hará las recomendaciones necesarias y brindará el apoyo que se requiera para los realizar los tratamientos u otros procedimientos que se requieran

Participante No \_\_\_\_\_

Entiendo lo anteriormente explicado y acepto participar voluntariamente en el estudio de investigación y en constancia,

Yo (Nombre del participante)  
en presencia de mi acudiente \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ con c.c \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ . quien es mi (parentesco)

cepto voluntariamente participar en este estudio

Firma del participante \_\_\_\_\_ . Fecha \_\_\_\_\_ .

Firma del acudiente \_\_\_\_\_ . Fecha \_\_\_\_\_ .

Nombre del testigo 1	c.c	Firma
----------------------	-----	-------

Parentesco con el participante	Dirección	Teléfono
--------------------------------	-----------	----------

Nombre del testigo 2	c.c	Firma
----------------------	-----	-------

Parentesco con el participante	Dirección	Teléfono
--------------------------------	-----------	----------

INVESTIGADOR O PERSONA que toma el consentimiento informado.

Yo, confirmo que personalmente expliqué la naturaleza y el propósito del presente consentimiento, y por tanto, doy fe que la persona que firma este consentimiento entiende la naturaleza, los beneficios y riesgos de participar en este estudio y que su firma es válida. Ningún problema médico o barrera de lenguaje o educación se ha interpuesto en el entendimiento absoluto de este documento.

Nombre	c.c	Firma	Fecha
--------	-----	-------	-------

En caso de alguna duda favor contactar a: Álvaro Antonio Herrera Hernández al número celular 3002415106.

ORIGINAL \_\_\_\_

COPIA \_\_\_\_

**Contacto en el Comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander:**

Para preguntas, aclaraciones o inquietudes acerca de los aspectos éticos de esta investigación puede comunicarse con el Comité de Ética para la Investigación Científica de la UIS, en horas hábiles al teléfono 6344000 ext. 3208 o enviar un mensaje por correo electrónico a: [comitedetica@uis.edu.co](mailto:comitedetica@uis.edu.co)

**Anexo D. Certificate of Attendance 15th International Thyroid Congress and 85th Annual Meeting of the American Thyroid Association**

