Marcelo Augusto Cortina Gonçalves dos Santos

**Detecção e rastreamento de mutações no proto-oncogene
RET em pacientes com neoplasia endócrina múltipla tipo 2
por meio de eletroforese em gel sensível à conformação**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Pereira de Almeida Toledo

São Paulo

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Marcelo Augusto Cortina Gonçalves dos

Detecção e rastreamento de mutações no proto-oncogene RET em pacientes com neoplasia endócrina múltipla tipo 2 por meio de eletroforese em gel sensível à conformação / Marcelo Augusto Cortina Gonçalves dos Santos. -- São Paulo, 2007.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Endocrinologia.

Orientador: Sérgio Pereira de Almeida Toledo.

Descritores: 1.Neoplasias da tireóide/diagnóstico 2.Carcinoma medular/genética 3.Neoplasia endócrina múltipla tipo 2A/genética 4.Neoplasia endócrina múltipla tipo 2B/genética 5.Mutação/genética 6.Proto-oncogenes/genética 7.Análise mutacional de DNA/métodos 8.Reação em cadeia por polimerase/métodos 9.Eletroforese/métodos

USP/FM/SBD-020/07

Dedicatória

Aos meus pais e familiares dedico este trabalho. Agradeço a eles pela educação, exemplo de moral, civismo, convivência, amor e oportunidade de continuação dos meus estudos.

Agradecimentos

Através da pessoa de meu orientador, *Prof. Dr. Sérgio Pereira de Almeida Toledo*, agradeço a todos funcionários e estagiários da *Unidade de Endocrinologia Genética (LIM-25), Endocrinologia, Departamento de Clínica Médica, HC-FMUSP Unidade de Endocrinologia Genética (LIM-25D)* por acreditarem em nosso trabalho de pesquisa, visando trazer para a sociedade a aplicação de uma nova metodologia de diagnóstico com maior rapidez e segurança no diagnóstico de neoplasia endócrina múltipla do tipo 2.

Em especial, agradeço aos apoios tecnológicos oferecidos por *Ivone Izabel Mackowiack da Fonseca* e *Elisangela Pereira de Souza Quedas*, durante a primeira e segunda metade do desenvolvimento deste projeto respectivamente.

A *Profa. Dra. Maria Rita S. Passos Bueno*, responsável pelo *Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências IB-USP* pela colaboração, cedendo espaço físico de seu laboratório.

Ao *Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte*, responsável pelo *Laboratório de Investigações Médicas em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM-56), Departamento de Dermatologia, HC-FMUSP* pela colaboração e integração científica disponibilizando aplicativos de computadores para as análises das seqüências gênicas envolvidas neste estudo.

A todos os profissionais por tornarem direta ou indiretamente possível a realização deste trabalho.

Ao *Grupo PAPAIZ* e ao *CNPq-CAPES* por fornecerem apoio financeiro necessário durante a primeira e segunda metade do projeto de pós-graduação, respectivamente. Apoio este que certamente viabilizou os recursos humanos para realização deste estudo.

A *Elisangela da Silva Delphim* pela convivência, entendimento de minhas inquietações e ausências em momento importante para o sucesso deste projeto.

Finalmente agradeço à sabedoria, força e beleza do *Grande Arquiteto do Universo* por proporcionar mais esta experiência em minha vida.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed.

São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Gráficos

Lista de Siglas

Lista de Símbolos

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Histórico	2
1.2	Eletroforese em gel sensível à conformação (<i>Conformation-sensitive gel electrophoresis</i> - CSGE)	4
2	REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1	Classificação	9
2.2	Fisiopatologia dos elementos fenotípicos de NEM-2	11
2.2.1	Carcinoma medular de tireóide em NEM-2	11
2.2.2	Feocromocitoma em NEM-2	16
2.2.3	Hiperparatireoidismo em NEM-2	18
2.2.4	Neuromatose de mucosa em NEM-2	19
2.2.5	Megacólon congênito em NEM-2	19
2.2.6	Liquem amiloidótico cutâneo	21
2.3	Aspectos Moleculares do <i>RET</i>	22
2.3.1	Descrição do <i>RET</i>	22
2.3.2	Interação entre ligantes, co-receptores e a proteína RET	24
2.3.3	Efeito Transformador de <i>RET</i>	25
2.3.4	Como as mutações ativadoras promovem a oncogene	26
2.3.5	Mecanismos de segundo evento somático em NEM-2	28
2.3.6	Mecanismo de ação das mutações ativadoras e inativadoras presentes em um mesmo indivíduo (NEM-2A/CMT-F/HSCR).	31

2.3.7	Estudos funcionais evidenciando os polimorfismos e sua repercussão no desenvolvimento fenotípico de NEM-2A	32
2.4	Correlação genótipo/ fenótipo em NEM-2	33
2.4.1	Correlação genótipo / fenótipo em NEM-2A	37
2.4.2	Correlação genótipo / fenótipo em NEM-2B	44
2.4.3	Correlação genótipo / fenótipo em CMT-F	45
2.4.4	Correlação genótipo / fenótipo inativador de <i>RET</i>	51
2.5	Tratamento	53
2.5.1	CMT	53
2.5.2	FEO	55
2.5.3	HPT	56
2.5.4	Tratamento para NEM-2 na era pós-molecular	57
3	OBJETIVOS	62
4	MÉTODO	64
4.1	Considerações Éticas	64
4.2	Algoritmo para análise genética do <i>RET</i>	64
4.3	Casuística	67
4.4	Coleta de material biológico	74
4.5	Controle de qualidade	75
4.6	Extração de DNA genômico	75
4.7	Avaliação da qualidade do DNA genômico	76
4.8	Avaliação da concentração do DNA genômico	77
4.9	Amplificação do DNA genômico	77
4.10	Deteção do produto de PCR	80
4.11	Reação de seqüenciamento genético	81
4.12	Purificação do produto após reação de seqüenciamento	82

4.13	Utilização do seqüenciador automático ABI 310	83
4.14	Eletroforese em gel sensível à conformação (<i>Conformation-sensitive gel electrophoresis</i> - CSGE)	84
4.14.1	Lavagem e revestimento das placas	84
4.14.2	Montagem das placas	84
4.14.3	Preparo do MDE gel	85
4.14.4	Aplicação das amostras	85
4.14.5	Coloração do gel	87
4.15	Polimorfismo conformacional de cadeia simples (<i>Single-strand conformation polymorphism</i> - SSCP)	88
5	RESULTADOS	90
5.1	Resultados do seqüenciamento genético	91
5.2	Correlação genótipo-fenótipo	97
5.3	Resultados do CSGE	108
5.4	Resultados do SSCP	109
6	DISCUSSÃO	130
6.1	Correlação genótipo-fenótipo	131
6.1.1	Discussões referentes a cada família	132
6.1.2	Discussões referentes aos polimorfismos	134
6.2	Discussões referentes às metodologias de rastreamento e seqüenciamento genético	137
7	CONCLUSÃO	146
8	REFERÊNCIAS	148
	APÊNDICE	

Listas

Figuras

Figura 1	Representação gráfica da proteína RET, evidenciando a porção extracelular, transmembrana e intracelular	23
Figura 2	Interação entre ligantes e receptores da proteína RET	25
Figura 3	Vias de dimerização do RET e ativações constitutivas	28
Figura 4	Principais éxons afetados para cada subtipo de NEM-2 ...	34
Figura 5	Genealogia da família A portadora de NEM-2A	71
Figura 6	Genealogia da família B portadora de NEM-2A	71
Figura 7	Genealogia da família C portadora de NEM-2A associada ao megacólon (HSCR)	72
Figura 8	Genealogia da família D portadora de CMT-F	72
Figura 9	Genealogia da família E portadora de CMT-F	73
Figura 10	Genealogia da família F portadora de CMT-F	73
Figura 11	Genealogia da família G portadora de NEM-2B	74
Figura 12	Gel de agarose demonstrando a integridade do DNA extraído pela técnica do sal	90
Figura 13	Amplificação gênica dos éxons “ <i>hot-spots</i> ” de <i>RET</i>	91
Figura 14	Substituição de timina por citosina (TGC-CGC) no códon 620 (éxon 10) do <i>RET</i> traduzindo a mutação Cys620Arg .	92
Figura 15	Substituição de timina por citosina (TGC-CGC) no códon 634 (éxon 11) do <i>RET</i> traduzindo a mutação Cys634Arg .	93
Figura 16	Substituição de timina por citosina (TGC-TAC) no códon 634 (éxon 11) do <i>RET</i> traduzindo a mutação Cys634Tyr .	93
Figura 17	Substituição de guanina por adenina (GTC-ATC) no códon 648 (éxon 11) do <i>RET</i> traduzindo a mutação Val648Ile	94

Figura 18	Substituição de guanina por adenina (GGT-AGT) no códon 691 (éxon 11) do <i>RET</i> traduzindo o polimorfismo Gly691Ser	94
Figura 19	Substituição de timina por guanina (CTT-CTG) no códon 769 (éxon 13) do <i>RET</i> traduzindo o polimorfismo Leu769Leu	95
Figura 20	Substituição de guanina por adenina (GTG-ATG) no códon 804 (éxon 14) do <i>RET</i> traduzindo a mutação Val804Met	95
Figura 21	Substituição de citosina por guanina (TCC-TCG) no códon 904 (éxon 15) do <i>RET</i> traduzindo o polimorfismo Ser904Ser	96
Figura 22	Substituição de timina por citosina (ATG-ACG) no códon 918 (éxon 16) do <i>RET</i> traduzindo a mutação Met918Thr .	96
Figura 23	Genealogia da família A portadora de NEM-2A	101
Figura 24	Genealogia da família B portadora de NEM-2A	101
Figura 25	Genealogia da família C portadora de NEM-2A associada ao megacólon (HSCR)	102
Figura 26	Genealogia da família D portadora de CMT-F	102
Figura 27	Genealogia da família E portadora de CMT-F	103
Figura 28	Genealogia da família F portadora de CMT-F	103
Figura 29	Genealogia da família G portadora de NEM-2B	104
Figura 30	Padrão eletroforético diferencial obtido por CSGE de mutação no éxon 10: Não mutante à esquerda e mutante Cys620Arg à direita	111
Figura 31	Padrão eletroforético diferencial obtido por SSCP de mutação no éxon 10: Não mutante à esquerda e mutante Cys620Arg à direita	111
Figura 32	Padrões eletroforéticos diferenciais obtidos por CSGE de mutações no éxon 11: Não mutante à esquerda; Cys634Arg e Cys634Tyr ao centro; Val648Ile à direita ("primers" 11B)	112

Figura 33	Padrões eletroforéticos diferenciais obtidos por SSCP de mutações no éxon 11: Não mutante à esquerda; Cys634Arg e Cys634Tyr ao centro e Val648Ile à direita (“primers” 11B)	112
Figura 34	Padrão eletroforético diferencial obtido por CSGE de polimorfismo no éxon 11: Padrão eletroforético não diferenciado (Não mutante e mutantes) à esquerda e Gly691Ser à direita (“primers” 11A)	113
Figura 35	Padrão eletroforético diferencial obtido por SSCP de polimorfismo no éxon 11: Padrão eletroforético não diferenciado (Não mutante e mutantes) à esquerda e Gly691Ser à direita (“primers” 11A)	113
Figura 36	Padrão eletroforético diferencial obtido por CSGE de polimorfismo no éxon 13: Não polimórfico à esquerda e polimórfico Leu769Leu à direita	114
Figura 37	Padrão eletroforético diferencial obtido por SSCP de polimorfismo no éxon 13: Não polimórfico à esquerda e polimórfico Leu769Leu à direita	114
Figura 38	Padrão eletroforético diferencial obtido por CSGE de mutação no éxon 16: Não mutante à esquerda e mutante Met918Thr à direita	115
Figura 39	Padrão eletroforético diferencial obtido por SSCP de mutação no éxon 16: Não mutante à esquerda e mutante Met918Thr à direita	115
Figura 40	Gel de MDE com padrões diferenciais para o rastreamento de mutação no éxon 10 do <i>RET</i> : As aplicações 1, 3 e 5 representam indivíduos não portadores de mutação no códon 620. As aplicações 2, 4 e 6 representam indivíduos portadores da mutação Cys620Arg rastreados por CSGE	116
Figura 41	Gel de MDE com padrões diferenciais para o rastreamento de mutação no éxon 10 do <i>RET</i> : As aplicações 1, 3 e 5 representam indivíduos não portadores de mutação no códon 620. As aplicações 2, 4 e 6 representam indivíduos portadores da mutação Cys620Arg rastreados por SSCP	117

Figura 42	Gel de MDE com padrões diferenciais para o rastreamento de mutações no éxon 11 do <i>RET</i> : (“ <i>primers</i> ” 11B): As aplicações 1 e 2 representam indivíduos não portadores de mutação no códon 634. A aplicação 3 representa indivíduo portador da mutação Cys634Arg. A aplicação 4 representa indivíduo portador da mutação Cys634Tyr rastreados por CSGE	118
Figura 43	Gel de MDE com padrões diferenciais para o rastreamento de mutações no éxon 11 do <i>RET</i> : (“ <i>primers</i> ” 11B): A aplicação 1 representa indivíduo não portadores de mutação no códon 634. As aplicações 2, 3 e 4 representam indivíduos portadores da mutação Cys634Arg. As aplicações 5 e 6 representam indivíduos portadores da mutação Cys634Tyr rastreados por SSCP.	119
Figura 44	Gel de MDE com padrões diferenciais para o rastreamento de mutação no éxon 11 do <i>RET</i> : (“ <i>primers</i> ” 11B): As aplicações 1, 2, 3 e 4 representam indivíduos não portadores de mutação no códon 634. As aplicações 5, 6, 7 e 8 representam indivíduos portadores da mutação Val648Ile rastreados CSGE	120
Figura 45	Gel de MDE com padrões diferenciais para o rastreamento de mutação no éxon 11 do <i>RET</i> : (“ <i>primers</i> ” 11B): As aplicações 1, 2 e 3 representam indivíduos não portadores de mutação no códon 634. As aplicações 4, 5 e 6 representam indivíduos portadores da mutação Val648Ile rastreados SSCP	121
Figura 46	Gel de MDE com padrões diferenciais para o rastreamento de polimorfismo no éxon 11 do <i>RET</i> : (“ <i>primers</i> ” 11A): As aplicações 1 e 2 representam padrões não diferenciados para o éxon 11 do <i>RET</i> (Não mutante e mutantes) rastreados respectivamente por SSCP e CSGE. As aplicações 3 e 4 correspondem a controles internos para aferir a qualidade do gel e coloração (“ <i>Mass ladder</i> ”). As aplicações 5, 6, 7 e 8 representam indivíduos portadores do polimorfismo Gly691Ser rastreados por SSCP (5 e 7) e CSGE (6 e 8) ..	122
Figura 47	Gel de MDE com padrões diferenciais para o rastreamento de polimorfismo no éxon 13 do <i>RET</i> : As aplicações 1 e 3 representam indivíduos não portadores de polimorfismo no códon 769. As aplicações 2, 4 e 5 representam indivíduos portadores do polimorfismo Leu769Leu rastreados por CSGE	123

Figura 48	Gel de MDE com padrões diferenciais para o rastreamento de polimorfismo no éxon 13 do <i>RET</i> : As aplicações 1 e 3 representam indivíduos não portadores de polimorfismo no códon 769. A aplicação 2 representa indivíduo portador do polimorfismo Leu769Leu rastreados por SSCP	124
Figura 49	Gel de MDE com padrões diferenciais para o rastreamento de mutação no éxon 16 do <i>RET</i> : As aplicações 1, 2, 4, 5 e 6 representam indivíduos não portadores de mutação no códon 918. A aplicação 3 representa indivíduo portador da mutação Met918Thr rastreados por CSGE	125
Figura 50	Gel de MDE com padrões diferenciais para o rastreamento de mutação no éxon 16 do <i>RET</i> : As aplicações 1 e 3 representam indivíduos não portadores de mutação no códon 918. A aplicação 2 representa indivíduo portador da mutação Met918Thr rastreados por SSCP	126

Gráficos

Gráfico 1 – Distribuição percentual da classificação de NEM-2 entre as 7 famílias estudadas	97
Gráfico 2 – Distribuição numérica e percentual da classificação de NEM-2 entre os 35 indivíduos portadores de mutações	98
Gráfico 3 – Distribuição percentual de polimorfismos nos 64 indivíduos estudados	105
Gráfico 4 – Distribuição percentual de polimorfismos nos 35 indivíduos portadores de mutações causadoras de patologia no <i>RET</i>	105
Gráfico 5 – Diferenças entre as temperaturas de “ <i>melting</i> ” (TM) das seqüências não diferenciadas pelo rastreamento genético do <i>RET</i>	144

Siglas

⁹⁹ Tc(v) DMSA	Ácido dimercaptosuccínico
ACTH	Hormônio estimulante do córtex adrenal
APS	Persulfato de amônio
ATP	Trifosfato de adenosina
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
cDNA	DNA complementar
CEA	Anti-antígeno-carcinoembrionário
CMT	Carcinoma medular de tireóide
CMT-F	Carcinoma medular de tireóide familiar
CSGE	Eletroforese em gel sensível à conformação
ddNTPs	Didesoxinucleotídeos
DGGE	Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxinucleotídeos
EDTA	Etileno-diamino-tetra-acético
ER	Enzima de restrição
<i>et al.</i>	e outros
EUA	Estados Unidos da América

FEO	Feocromocitoma
FISH	Análise de hibridização “ <i>in situ</i> ”
GDNF	Fator de crescimento e diferenciação neurotrópico
GFR α	Receptor alfa do fator de crescimento e diferenciação neurotrópico
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCC	Hiperplasia das células C
HC – FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCl	Ácido clorídrico
HPT	Hiperparatireoidismo
HSCR	Hirschsprung
KCl	Cloreto de potássio
LAC	Líquido amiloidótico cutâneo
LOH	Perda de heterozigosidade
MDE	<i>Mutation Detection Enhancement</i>
MIBG	Metaiodobenzilguanidina
NEM-1	Neoplasia endócrina múltipla do tipo 1
NEM-2	Neoplasia endócrina múltipla do tipo 2
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
NaOH	Hidróxido de sódio
NF 1	Neurofibromatose tipo 1

NIH 3T3	Fibroblasto para cultura celular do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América
NTN	Gene codificador de nerturina
PCR	Reação da cadeia de polimerase
PTC	Carcinoma papilífero de tireóide
PTH	Paratormônio
RET	<i>Rearranged during Transfection</i>
RB1	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
SNE	Sistema nervoso entérico
SSCP	Polimorfismo conformacional de cadeia simples
TAE	TrisHCL ácido acético EDTA
TBE	TrisHCL ácido bórico EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEMED	N, N, N, N-Tetrametil-etilenodiamina
TM	Temperatura de “ <i>melting</i> ”
UEG	Unidade de Endocrinologia Genética
VHL	Von Hippel Lindau
VMA	Ácido vanilmandélico

Símbolos

cm	Centímetro
°C	Graus Celsius
g	Grama
Kb	Kilobases
M	Mol
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanomol
Pb	Pares de bases
pH	Ponto hidrogênio
pm	Picomol
rpm	Rotações por minuto
R\$	Reais
U	Unidade
V	Volt
W	Watt
μl	Microlitro
μg	Micrograma

Tabelas

Tabela 1	Famílias portadoras de NEM-2A	9
Tabela 2	Famílias portadoras de NEM-2B	10
Tabela 3	Famílias portadoras de CMT-F	10
Tabela 4	Outras famílias portadoras de CMT	11
Tabela 5	Principais mutações, códons, substituições de nucleotídeos e aminoácidos associados aos respectivos fenótipos de NEM-2	35
Tabela 6	Algoritmo para análise genética do <i>RET</i>	66
Tabela 7	Dados fenotípicos referentes aos 64 indivíduos representando os fenótipos clássicos de NEM-2	69
Tabela 8	Seqüências de “ <i>primers</i> ” ou iniciadores flanqueadores da borda íntron-éxon dos “ <i>hot-spots</i> ” de <i>RET</i>	79
Tabela 9	Correlação genótipo-fenótipo nos indivíduos afetados por mutações causadoras de patologia no <i>RET</i>	100
Tabela 10	Comparativo entre a sensibilidade de detecção das mutações envolvidas neste estudo	128
Tabela 11	Comparativo entre a sensibilidade de detecção dos polimorfismos envolvidos neste estudo	128
Tabela 12	Localização da mutação Val804Met e do polimorfismo Ser904Ser em relação à seqüência total do éxon 14 amplificado. Os “ <i>primers forward</i> ” e “ <i>reverse</i> ” apresentam-se destacados respectivamente em vermelho e azul. O códon mutante ou polimórfico apresenta-se destacado em negrito, itálico e sublinhado	143

Resumo

Santos MA. *Deteção e rastreamento de mutações no proto-oncogene RET em pacientes com neoplasia endócrina múltipla tipo 2 por meio de eletroforese em gel sensível à conformação* [dissertação]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; São Paulo (SP), 2007. 168p.

A neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (NEM-2) é uma síndrome tumoral herdada por mutações germinativas no proto-oncogene RET (*RET*) e transmitida por herança autossômica dominante. Atualmente, a indicação de tireoidectomia total preventiva é recomendada a indivíduos portadores de mutações no *RET*. Analisamos a aplicação do método Eletroforese em Gel Sensível à Conformação (CSGE) no rastreamento de mutações *hot-spots* do *RET*. Sete famílias com NEM-2 foram rastreadas pelo CSGE, seqüenciamento gênico e análise do Polimorfismo Conformacional de Cadeia Simples (SSCP). Usando o CSGE e SSCP, identificamos cinco das seis (83,3%) mutações verificadas pelo seqüenciamento: Cys620Arg, Cys634Arg, Cys634Tyr, Val648Ile e Met918Thr. Foram analisados 128 *amplicons* englobando mutações *hot-spots* do *RET* e 116 dentre 128 (90.6%) concordaram com o seqüenciamento genético. Os polimorfismos 691 e 769 também foram documentados pelo CSGE e SSCP. Os dados obtidos por CSGE e SSCP foram totalmente (100%) concordantes. O CSGE revelou ser metodologia sensível, rápida, fácil de ser executada e de baixo custo na detecção de mutações nos códons 620, 634, 648, e 918, as quais constituem grande maioria (~95%) dos pacientes com NEM-2. Quanto à mutação Val804Met (prevalência na população inferior a 3%), o método necessita ser otimizado. Concluimos que o CSGE é uma metodologia efetiva

para o rastreamento de mutações que mais freqüentemente ocorrem no *RET* como causadora de NEM-2.

Descritores: 1.Neoplasia da tireóide/diagnóstico 2.Carcinoma medular/genética 3.Neoplasia endócrina múltipla tipo 2A/genética 4.Neoplasia endócrina múltipla tipo 2B/genética 5.Mutação/genética 6.Proto-oncogene/genética 7.Analise mutacional de DNA/métodos 8.Reação em cadeia por polimerase/métodos 9.Eletroforese/métodos

Summary

Santos MA. *RET proto-oncogene mutations screening and detection in patients with multiple endocrine neoplasia type 2 using conformation sensitive gel electrophoresis* [dissertation]. "Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo". São Paulo (SP), 2007. 168p.

Multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2) is an autosomal dominant inherited tumor syndrome caused by activating germline mutations in RET proto-oncogene (*RET*). Presently, the prophylactic total thyroidectomy is recommended to all *RET* mutations carriers. Here we tested the Conformation Sensitive Gel Electrophoresis (CSGE) as a screening method for the *RET* hot-spot mutations. Seven MEN2 families were studied by CSGE, as well as by Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) and direct sequencing analysis. Using CSGE and SSCP, we were able to detect five out of the six (83.3%) *RET* mutations verified by direct sequencing analysis: Cys620Arg, Cys634Arg, Cys634Tyr, Val648Ile and Met918Thr. *RET* polymorphisms 691 and 769 were verified by CSGE and SSCP. In our sample, data obtained using CSGE were fully concordant (100%) with SSCP findings. Thus, CSGE showed to be a sensitive, fast, low-cost, and ease procedure to detect *RET* mutations in codons 620, 634, 648, and 918 which are reported as the most prevalent *RET* variants (~95%) in large MEN2 series. As to the Val804Met mutation (prevalence in the population lower than 3%), this method still needs to be optimized. We concluded that CSGE is an effective screening method for the most frequent *RET* hot-spot disease-causing mutations.

Descriptors: 1.Thyroid neoplasia/diagnosis 2.Medullary carcinoma/genetic
3.Multiple endocrine neoplasia type 2A/genetic 4. Multiple endocrine
neoplasia type 2B/genetic 5.Mutation/genetic 6.Proto-oncogene/genetic
7.DNA mutational analyses/methods 8.Polymerase chain reaction/methods
9.Electrophoresis/methods

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A neoplasia endócrina múltipla do tipo 2 (NEM-2) é uma entidade mórbida caracterizada por múltiplos tumores de caráter hereditário. Esta síndrome compreende neoplasias neuroendócrinas de células oriundas do desenvolvimento da crista neural envolvendo: células C da tireóide, cromafins da medula da adrenal, principais e oxifílicas das paratireóides, gânglios simpáticos, parassimpáticos e entéricos, além do trato urogenital.

Entre os portadores de NEM-2, 90% expressam sintomas como carcinoma medular de tireóide (CMT), acompanhado ou não de feocromocitoma (FEO) e hiperparatireoidismo primário (HPT). Laboratorialmente, a maior característica da NEM-2 é a expressão elevada de várias substâncias hormonais e não hormonais produzidas pelas glândulas afetadas (Aliepoulios *et al.*, 1970; Block *et al.*, 1978).

Na população norte-americana, o CMT corresponde a aproximadamente 10% de todos os carcinomas de tireóide, o que representou cerca de 2.300 casos de CMT no ano de 2005 (Hemminki *et al.*, 2001; Maher *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2003; Kouvaraki *et al.*, 2005). Dos

casos de CMT, 75% são esporádicos e 25% hereditários (Eng *et al.*, 1999; Brandi *et al.*, 2001; Marx, 2005).

A NEM-2 é geneticamente transmitida por herança autossômica dominante com incidência de 1:35.000 em adultos e 1:300.000 em recém nascidos, o que perfaz aproximadamente 500 famílias portadoras da doença em todo mundo (Hemminki *et al.*, 2001; Maher *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2003; Kouvaraki *et al.*, 2005; Lakhani *et al.*, 2006).

1.1 Histórico

Horn Jr (1951) descreve sete casos de carcinoma de tireóide com estruturas não usuais, semelhantes a tumores indiferenciados da tireóide, com elevada frequência de metástases em linfonodos locais e à distância. Entretanto, todos estes casos apresentam prognóstico favorável quando comparados aos casos de carcinomas anaplásicos típicos.

Em 1959 Hazard reconhece as estruturas celulares descritas por Horn Jr como carcinoma medular de tireóide (CMT), mediante a revisão de lâminas anátomo-patológicas de 600 pacientes, ao longo de 31 anos (Hazard *et al.*, 1959).

Sipple e colaboradores (1961) descrevem a associação entre CMT, feocromocitoma (FEO) e possível adenoma de paratireóide. Entretanto, somente em 1968 Steiner e colaboradores (1968) diferenciam as síndromes NEM-1 e NEM-2 e caracterizam seus três componentes fenotípicos.

Em 1966 Williams e Pollock descrevem as associações de CMT e FEO com o fenótipo de neuromas de mucosas ou síndrome de Froboese (Williams *et al.*, 1966; Chang *et al.*, 2004).

Em 1973 Wolfe dedica-se aos estudos detalhados de microscopia e descreve a hiperplasia das células C como grupos de células C no parênquima tireoideano (Wolfe *et al.*, 1973).

Chong (1975) denomina como NEM-2B a associação de CMT, FEO e neuromas de mucosas, anteriormente descrita por Williams e Pollock (Chang *et al.*, 2004).

Com a identificação de polimorfismos no ácido desoxirribonucléico (DNA) humano durante a década de 1980, diversos pesquisadores valorizam o estudo do *RET* como bom modelo para análise de polimorfismos devido às extensas e bem caracterizadas famílias (Gagel *et al.*, 1991).

Em 1985 estudos de transfecção com DNA de diferentes linfomas humanos em células NIH 3T3 revelam focos de proliferações neoplásicas com diferentes seqüências genéticas de DNA, onde todos apresentam uma porção gênica comum denominada *RET* (*Rearranged during Transfection*) (Hoff *et al.*, 2000).

Simpson e Mathew (1983) localizam o proto-oncogene RET na sub-banda do cromossomo 10q11.2 (Hoff *et al.*, 2000; Frilling *et al.*, 2003). Três anos mais tarde, a forma natural rearranjada de *RET* é descrita em casos de carcinoma papilífero de tireóide e nomeada PTC (Hoff *et al.*, 2000).

Em 1993 estudos das seqüências de *RET* restringem seu tamanho em aproximadamente 60 Kilobases (Kb), o que compreende 21 éxons com

tamanhos variados entre 60 e 287 pares de bases (pb) cada. A proteína codificada pelo *RET* possui aproximadamente 1.100 aminoácidos (Kwok *et al.*, 1993; Marx, 2005).

No mesmo ano, Mulligan (1993) analisa o DNA complementar (cDNA) de sete tumores originários de seis pacientes portadores de neoplasia endócrina múltipla do tipo 2A (NEM-2A) e descreve mutações do tipo “*missense*” no domínio extracelular do *RET*. Poucos meses mais tarde, Donis-Keller (1993) confirma as mesmas mutações em pacientes com CMT-F. Em ambos estudos, as mutações em questão são oriundas da substituição de uma cisteína por outros aminoácidos (Donis-Keller *et al.*, 1993; Mulligan *et al.*, 1993; Hoff *et al.*, 2000).

1.2 Eletroforese em gel sensível à conformação (*Conformation-sensitive gel electrophoresis* - CSGE)

Segundo alguns autores o CSGE possui sensibilidade teórica 90% para fragmentos até 800pb, sendo superior ao polimorfismo conformacional de cadeia simples (SSCP), cuja confiabilidade pode chegar a 80% para fragmentos menores que 300pb (Ganguly *et al.*, 1993; Korkko *et al.*, 1998; Vianello *et al.*, 2002). O CSGE também apresenta vantagens em relação à eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) por ser de fácil padronização e não necessitar de “*primers*” especiais (Korkko *et al.*, 1998).

Somente um estudo apresenta o CSGE como metodologia de rastreamento para mutações germinativas nos éxons 10, 11, 13 e 16 do *RET* sem evidenciar sua sensibilidade e especificidade (Kambouris *et al.*, 1996). Demais estudos utilizando o CSGE como metodologia de rastreamento para outros genes apontam sensibilidade 97% (32/33 mutações) para receptor do LDL (Fard-Esfahani *et al.*, 2005); 100% (10/10 mutações) para fator X de coagulação (Vianello *et al.*, 2002); e 88% (60/68 mutações) para genes do pró-colágeno (Ganguly *et al.*, 1993).

Ganguly e colaboradores (1993) descrevem a metodologia do CSGE e seus princípios teóricos de formação de heteroduplexes e distorções estruturais na cadeia de DNA mediante uso de solventes fracamente desnaturantes. Visualmente tais alterações são constatadas através das diferenças de padrões migratórios entre os homoduplexes e heteroduplexes mediante eletroforese (Korkko *et al.*, 1998; Ganguly *et al.*, 2002).

Durante a eletroforese, o campo elétrico externo atrai a dupla fita de DNA para os obstáculos fixos na malha do gel, onde a migração depende do peso da molécula de DNA e condutibilidade do vetor polímero utilizado. Entretanto, alterações conformacionais na estrutura dos heteroduplexes são induzidas pela adição de alguns reagentes químicos (Ganguly *et al.*, 1993). Solventes como formamida e etileno glicol em concentrações inferiores às necessárias para a total desnaturação da dupla fita de DNA promovem a alteração conformacional denominada “*bend*”, onde há deslocamento de 20 graus na estrutura da dupla hélice mantendo um dos nucleotídeos do heteroduplexes externo e outro interno em relação à mesma. Com esta

distorção os padrões migratórios eletroforéticos entre heteroduplexes e homoduplexes apresentam-se diferenciados. Outras duas estruturas são favorecidas com o aumento das concentrações das substâncias desnaturantes ou da temperatura do sistema, de maneira que ambos nucleotídeos do heteroduplexes permanecem dentro ou fora da estrutura da dupla hélice, “*bubble*” e “*bulge*” respectivamente. Nestas duas últimas condições não há alterações suficientes para produzir variações consistentes na migração eletroforética em relação ao homoduplexes (Ganguly *et al.*, 1993; Fard-Esfahani *et al.*, 2005).

Alguns fatores inerentes ao sistema ou ao amplificado genômico podem alterar a qualidade e sensibilidade desta técnica. Os fatores inerentes ao sistema são: a) Menor diferença migratória entre os duplexes (heteroduplexes e homoduplexes) mediante maiores concentrações de etileno glicol; b) Menor resolução das bandas eletroforéticas mediante maiores concentrações de formamida; c) Maior condutibilidade do gel, facilitando a migração dos duplexes, mediante N, N, N, N-Tetrametil-etilenodiamina (TEMED). Os fatores inerentes ao amplificado genômico são: a) Menor diferença de migração entre os duplexes quando as mutações estão localizadas nas extremidades dos amplificados genômicos (primeiros 50pb); b) Maiores dificuldades de formação do heteroduplexes em seqüências ricas em guanina e citosina criando maiores temperaturas de anelamento nestas regiões; c) Maior sensibilidade de detecção de deleções e inserções em comparação a mutações de um nucleotídeo (Ganguly *et al.*, 1993; Korkko *et al.*, 1998; Ganguly *et al.*, 2002).

Como são várias as influencias exercidas pelo sistema que compõem o CSGE, dificultando saber quais as concentrações ideais de substâncias que favorecem a detecção do heteroduplexes, há no mercado um gel denominado MDE “*Mutation Detection Enhancement*” que se apresenta como de elevada sensibilidade e simples manuseio.

O uso do CSGE como metodologia de rastreamento para mutações no *RET* torna-se atraente devido: a) Boa sensibilidade da aplicação da metodologia em outros genes; b) Raras publicações referentes à aplicabilidade desta técnica no rastreamento de mutações relacionadas a NEM-2; c) Menor custo laboratorial frente ao seqüenciamento automático; d) Provável maior sensibilidade que outras técnicas de rastreamento (SSCP); e) Fácil padronização; f) Não necessidade de adição de cauda de guanina e citosina a um dos “*primers*” (DGGE); g) Necessidade somente de um sistema simples de eletroforese vertical (Ganguly *et al.*, 1993; Korkko *et al.*, 1998; Vianello *et al.*, 2002).

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Classificação

As classificações das formas hereditárias de CMT têm como base os achados de Sipple (1961), Williams e Pollock (1966), Steiner (1968) e Chong (1975). Os resultados obtidos pelos pesquisadores permitem estabelecer categorias de classificação das famílias portadoras de NEM-2 de acordo com critérios à continuação relatados.

As famílias portadoras de NEM-2A apresentam uma das três formas da doença. A forma NEM-2A(1) apresenta fenótipos de CMT, FEO e HPT. A forma NEM-2A(2) apresenta unicamente os fenótipos CMT e FEO, assim como a forma NEM-2A(3) apresenta unicamente os fenótipos CMT e HPT (Tabela 1).

Tabela 1 – Famílias portadoras de NEM-2A

Grupo familiar	CMT	FEO	HPT
NEM-2A(1)	SIM	SIM	SIM
NEM-2A(2)	SIM	SIM	NÃO
NEM-2A(3)	SIM	NÃO	SIM

Legendas: CMT, Carcinoma Medular de Tireóide; FEO, Feocromocitoma; HPT, Hiperparatireoidismo.

Fonte: Adaptado de Eng, 1999 e Hoff *et al.*, 2000.

As famílias portadoras de NEM-2B apresentam CMT, associados ou não ao FEO, com características clínicas peculiares tais como anormalidades musculares e esqueléticas, neuromas mucosos nos lábios, língua ou conjuntivas palpebrais e ganglioneuromatoses intestinais (Tabela 2).

Tabela 2 – Famílias portadoras de NEM-2B

	Fenótipo		Anomalias
	CMT	FEO	
Grupo familiar	SIM	SIM / NÃO	Musculares e esqueléticas Neuromas mucosos nos lábios, língua ou conjuntivas palpebrais Ganglioneuromatoses Intestinais

Legendas: CMT, Carcinoma Medular de Tireóide; FEO, Feocromocitoma.

Fonte: Adaptado de Eng, 1999 e Hoff *et al.*, 2000.

O grupo familiar composto por no mínimo quatro indivíduos que apresentam unicamente o fenótipo CMT, com ausência de FEO e HPT, são classificadas como CMT-F (Tabela 3).

Tabela 3 – Famílias portadoras de CMT-F

Grupo familiar	CMT	FEO	HPT
	SIM	NÃO	NÃO
Formado por mais de 4 indivíduos	SIM	NÃO	NÃO
	SIM	NÃO	NÃO

Legendas: CMT, Carcinoma Medular de Tireóide; FEO, Feocromocitoma; HPT, Hiperparatireoidismo.

Fonte: Adaptado de Eng, 1999 e Hoff *et al.*, 2000.

O grupo familiar constituído por menos de quatro indivíduos que apresenta o fenótipo de CMT, com ausência de FEO e HPT, é incluso em um quarto grupo específico (Tabela 4). Entretanto, o critério conservador de separarem-se os grupos familiares com menos de quatro indivíduos afetados por CMT apresenta como intuito transferir deliberadamente várias pequenas famílias com CMT-F para a categoria de NEM-2A, evitando-se o risco de não diagnosticar casos de feocromocitomas nestas famílias (Brandi *et al.*, 2001; Lakhani *et al.*, 2006).

Tabela 4– Outras famílias portadoras de CMT

Grupo familiar	CMT	FEO	HPT
Formado por menos de 4 indivíduos	SIM	NÃO	NÃO
	SIM	NÃO	NÃO
	SIM	NÃO	NÃO

Fonte: Adaptado de Eng, 1999 e Hoff *et al.*, 2000.

2.2 Fisiopatologia dos elementos fenotípicos de NEM-2

2.2.1 Carcinoma medular de tireóide em NEM-2

As células C localizam-se preferencialmente nos terços anatômicos médios e superiores dos lobos da tireóide, sendo sua origem embriológica a crista neural.

As células indiferenciadas da crista neural são morfologicamente semelhantes e seguem diferentes caminhos evolucionários dando origem a diversos tipos de células como: células C, medulares adrenais, pigmentares,

neurônios, gânglios sensoriais simpáticos e parassimpáticos, além da cartilagem facial (Martucciello *et al.*, 2000).

De todas as más-formações congênitas descritas na literatura científica, aproximadamente 33% envolvem estruturas provindas da crista neural. Doenças oriundas das células da crista neural possuem apresentações clínicas diversas, como síndromes endócrinas, cutâneas, neurológicas ou digestivas (Martucciello *et al.*, 2000).

Para Aliepoulios e colaboradores (1970) a forma hereditária do CMT caracteriza-se por ser evento clonal, aleatório e multicêntrico, preferencialmente localizado na porção superior da tireóide e acometendo ambas glândulas. Block e colaboradores (1978) evidenciam que vários produtos são secretados pelo CMT, pois as células C possuem grande atividade biossintética e secretam vários hormônios e aminas biogênicas como somatostatina, ACTH, histaminase, CEA, cromogranina A, DOPA descarboxilase e peptídeos vasoativos. Dentre as várias substâncias bioativas secretadas, a calcitonina é a mais importante e apresenta-se como melhor marcador tumoral.

Segundo Hazard e colaboradores (1959) o CMT apresenta-se como tumor multifocal, circunscrito, sólido e não encapsulado, mede entre 1,5 e 8cm e pesa entre 12 e 140g. Sua coloração é branco-acinzentada e pode apresentar aspectos hemorrágicos ou fibróticos. Toledo e colaboradores (1992) afirmam que geralmente a cápsula tireoideana encontra-se intacta, não sendo penetrada diretamente pelo tumor.

Do ponto de vista microscópico o CMT é diagnosticado quando as células C infiltram-se através da membrana basal e destroem os folículos tireoidianos (Lips, 2001). Nestes casos, numerosos grupamentos de células tumorais fusiformes, poligonais, angulares ou circulares com abundante citoplasma eosinófilico e raros grânulos são observados. Os núcleos celulares são excêntricos, onde figuras mitóticas esparsas ou sinais de binucleação podem ser visualizados. A presença de substância amilóide ou fibras de colágeno são comuns em 80% dos tumores medulares. A substância amilóide é caracterizada como pró-hormônio da calcitonina secretado pelas células C. Em 50% dos casos de CMT são encontradas calcificações granulares de calcitonina (Toledo *et al.*, 1992).

Tais calcificações granulares são evidenciadas mediante reações de imuno-histoquímica, onde o uso de anticorpos anti-calcitonina mostra forte padrão de positividade para as células bem diferenciadas e padrões fracos para células C pobremente diferenciadas (Eng *et al.*, 1998; Gonzalez *et al.*, 2003). Diversos autores como Toledo e colaboradores (1992), Eng e colaboradores (1998) e Gonzalez e colaboradores (2003) assinalam que os anticorpos anti-antígeno-carcinoembrionário (CEA) podem ser usados para diferenciação entre células maduras e neoplásicas.

Estágios distintos são propostos para explicar a progressão do processo tumoral do CMT em NEM-2. Inicialmente, é necessária a presença da mutação germinativa em um “*background*” genético para o desenvolvimento de HCC, que mediante eventos somáticos acumulativos expande-se de maneira monoclonal por regiões da glândula. Em seguida,

instalam-se múltiplos focos de crescimento microscópico de carcinoma, micro-carcinoma e carcinoma franco com posteriores metástases (Marsh *et al.*, 2003). Mediante este processo evolucionário, alguns autores consideram o HCC como carcinomas pré-invasivos, isto é, carcinoma localizado em tecido específico, devido casos de micro-carcinomas metastáticos serem descritos em pacientes com HCC (Livolsi, 1997). Para Nunes (2001) a hiperplasia de células C é um evento de extrema importância no desenvolvimento do CMT, caracterizando fase importante no diagnóstico clínico onde a evolução da HCC para hiperplasias nodulares pode ser observada em pacientes com NEM-2 anteriormente aos 30 anos de idade.

O CMT é classificado de acordo com dados patológicos do tumor, nódulos e extensão de metástases (pTNM). O estágio I abrange tumores restritos à tireóide e com diâmetro menor que 1cm. O estágio II abrange tumores localmente invasivos e maiores que 1cm de diâmetro. O estágio III abrange tumores que invadem o sistema linfático glandular, lançando-se para outras porções da própria tireóide (região pericapsular) e linfonodos regionais. O estágio IV abrange tumores com metástases à distância (Lips *et al.*, 2001).

Diversos autores estabelecem que entre os pacientes com nódulos clinicamente palpáveis, 80% apresentam metástases para linfonodos centrais, 75% para linfonodos da região jugular ipsilateral, 47% para linfonodos da jugular contra-lateral e pelo menos 25% apresentam metástases à distância para ossos, cérebro, pulmões e fígado (Niccoli-Sire *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 2000; Quayle *et al.*, 2005).

Para o diagnóstico de CMT, classicamente faz-se a dosagem sérica de calcitonina basal e pós-estímulo com pentagastrina e cálcio. Como interferentes deste exame é possível citar valores elevados de calcitonina correspondente a casos de insuficiência renal severa e mulheres em período de lactação. O teste estimulatório é contra-indicado para grávidas, asmáticos, coronariopatas, hipertensos e portadores de úlcera duodenal. Outro ensaio classicamente recomendado é a biopsia de nódulos da tireóide por punção com agulha fina, onde os esfregaços são corados por rotina e imuno-histoquímica para calcitonina (Leboulleux *et al.*, 2004).

Exames de imagem como cintilografia com ^{131}I -MIBG, ^{99}Tc (v) DMSA, ressonância magnética, tomografia com ou sem emissão de prótons e ultra-sonografia são utilizados para obter imagens anteriores do pescoço e tórax, além de imagens posteriores do abdômen, no auxílio diagnóstico do CMT e metástases (Toledo *et al.*, 1992; Lakhani *et al.*, 2006).

Como aproximadamente 95% das famílias com NEM-2 portam algum tipo de mutação germinativa, a análise genética de *RET* praticamente substitui vários procedimentos bioquímicos. Com isso o aconselhamento genético torna-se de grande importância para estes indivíduos (Skinner, 2003; Marx, 2005).

2.2.2 Feocromocitoma em NEM-2

O FEO desenvolve-se nas células cromafins, localizadas na zona medular das adrenais. São originárias do sistema nervoso simpático, produzem substâncias adrenérgicas e apresentam-se como responsáveis por 0,1% dos casos de hipertensão arterial sistêmica (Bryant *et al.*, 2003; Pacak *et al.*, 2005).

Em 90% dos casos demonstram-se como tumores benignos, com localização predominante nas adrenais (bilateral), podendo ser extra-adrenais em 10% dos casos (Carney *et al.*, 1976; Koch *et al.*, 2001). A maioria dos casos extra-adrenais de FEOs são observados em crianças, com comum envolvimento da região supra-aórtica (Yeung *et al.*, 2002).

Em cortes histológicos é possível notar hiperplasia celular nodular ou difusa com relações córtico-medulares adrenais menores que 10:1, com células cromafins grandes e pleomórficas (Carney *et al.*, 1976; Koch *et al.*, 2001). Grânulos de adrenalina e noradrenalina são demonstrados no interior das células tumorais por microscopia eletrônica (Pacak *et al.*, 2005).

Cerca de 15% dos casos de FEO são hereditários, onde as síndromes do complexo II mitocondrial, VHL, NEM-2 e NF 1 compreendem 50% dos casos mesmos. Os sintomas clínicos gerais de FEO compreendem palpitações, nervosismo, HAS, cefaléia, dores abdominais, náuseas, vômitos, tremores e irritabilidade (Califano *et al.*, 1996).

A idade diagnóstica para FEO associado a NEM-2 varia entre 26 e 46 anos dependendo da mutação segregada associada ao *RET*. Destes casos,

cerca de 35 a 73% são sincrônicos ao CMT (antes dos 30 anos de idade) e de 9 a 27% precedentes ao mesmo (Nguyen *et al.*, 2001; Bryant *et al.*, 2003; Machens *et al.*, 2005).

Laboratorialmente, as dosagens de metabólitos urinários, como metanefrina e ácido vanilmandélico (VMA), não demonstram alterações consistentes que justifiquem seus empregos como marcadores no diagnóstico precoce de comprometimento medular adrenal (Koch *et al.*, 2001). Pacientes portadores de FEO associado a NEM-2 apresentam maiores níveis de metanefrina e normetanefrinas plasmáticas e urinárias em comparação aos níveis de adrenalina e noradrenalina, fato que indica a metabolização intratumoral das últimas. As dosagens de normetanefrinas e metanefrinas plasmáticas apresentam sensibilidade de 97%, enquanto os demais testes bioquímicos apresentam sensibilidade entre 47 e 74% (Toledo *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 2000; Pacak *et al.*, 2005). Outros autores sugerem a dosagem de metoxiamina urinária como marcador para FEO (Nguyen *et al.*, 2001).

Exames de imagens associados a cintilografia retroperitoneal com ¹³¹I-MIBG, tais como: tomografia computadorizada, ressonância magnética ou ultra-sonografia possuem sensibilidade de 87%, especificidade de 100% e precisão de 89% na detecção de massas tumorais (Lee *et al.*, 2000; Lakhani *et al.*, 2006).

2.2.3 Hiperparatireoidismo em NEM-2

A doença das paratireóides tem como local de desenvolvimento as células principais, claras ou oxifílicas do parênquima das paratireóides. O processo neoplásico é observado através de hiperplasia celular, que em 68% dos casos apresenta-se nas quatro glândulas, com melhor visualização durante a tireoidectomia ou no estudo patológico das paratireóides (Herfarth *et al.*, 1996). Cerca de 20% dos indivíduos possuem glândula paratireóide na região interna do timo, que também pode apresentar-se hiperplásica (Eng, 2000; Randolph *et al.*, 2000).

A incidência de HPT em NEM-2 é de 20 a 30% com idade diagnóstica de 38 anos e taxa de recorrência pós-cirúrgica de 12% (Frank-Raue *et al.*, 2005). O diagnóstico de HPT é realizado por dosagens séricas anuais de cálcio e PTH, além da pesquisa de sais de cálcio na urina (Eng, 2000). Geralmente os primeiros achados laboratoriais reportam hipercalcemia (Herfarth *et al.*, 1996). Somente 15 a 25% dos casos de HPT associados a NEM-2A apresentam sintomatologia, sendo a calculose renal a mais freqüente (Schuffenecker *et al.*, 1998).

Segundo Eng (2000) a cintilografia com o uso de Sestamibi (^{99m}Tc) é indicada para explorar tumores nas paratireóides.

2.2.4 Neuromatose de mucosa em NEM-2

Os portadores de ganglioneuromatoses de mucosas podem apresentar nódulos pedunculados nas margens das pálpebras, lábios e língua. Formações diverticulares podem ser observadas no esôfago com sintomatologia de intolerância diarréica para alimentos gordurosos (Williams *et al.*, 1966).

Os achados histológicos de biópsias dos neuromas mostram massa tumoral de nervos convolutos não encapsulados e plexiformes. Microscopicamente os neuromas apresentam-se como tumores compostos por fibras nervosas e componentes fibrosos raros. As fibras nervosas são arranjadas em blocos, possuem peri-neurônio e células ganglionares. Na ganglioneuromatose intestinal pode-se notar hiperplasia do plexo submucoso, neurofibromatoses de submucosas, gânglios gigantes e células gângliais heterotópicas na lâmina própria da mucosa (Torre *et al.*, 2002).

2.2.5 Megacólon congênito em NEM-2

A expressão do proto-oncogene RET em estágios iniciais do desenvolvimento do sistema nervoso entérico (SNE) embrionário promove sinais vitais para a sobrevivência dos progenitores da crista neural e auxilia na diferenciação e migração destas células para o interior do mesênquima do trato gastro-intestinal (Hoff *et al.*, 2000).

O megacólon congênito, ou doença de Hirschsprung (HSCR), é caracterizado por desordem no desenvolvimento do SNE nos plexos mioentéricos de Auerbach, submucoso de Meissner, e submucoso profundo de Henle, ao longo de porção variável do intestino distal (Decker *et al.*, 1998; Hoff *et al.*, 2000). Geralmente os casos esporádicos apresentam agangliogênese de segmento curto (reto-sigmóide) e os hereditários de segmento longo (Martucciello *et al.*, 2000; Kapur, 2005).

A etiopatogenia descreve a deficiência da migração crânio-caudal dos neuroblastos oriundos da crista neural e ativação de apoptose inapropriada, que em circunstâncias fisiológicas, devem alcançar o intestino delgado e reto nas sétima e décima segunda semanas do desenvolvimento embriológico respectivamente (Decker *et al.*, 1998).

Devido desorganização ou ausência autônoma da enervação do trato gastro-intestinal, os indivíduos afetados por HSCR geralmente apresentam obstrução intestinal ou constipação severa durante o período neonatal (Torre, 2002).

Estudos genéticos relacionados a HSCR mostram a associação entre pacientes com agangliogênese colônica total e mutações em regiões proximais do cromossomo 10q, elegendo o *RET* como melhor candidato para mutações causadoras de HSCR (Martucciello *et al.*, 2000).

Diferentes autores correlacionam o HSCR à mutações em outros 10 genes candidatos, sendo os mais comuns o fator de crescimento e diferenciação neurotrópico (GDNF), receptor alfa do fator de crescimento e diferenciação neurotrópico (GFR α) e gene codificador de nerturina (NTN)

(Eng *et al.*, 1999; Hoff *et al.*, 2000; Martucciello *et al.*, 2000; Munnes *et al.*, 2000; Kapur, 2005).

Mutações no *RET* são encontradas em até 40% dos casos de HSCR familiares, sendo que as combinações entre diferentes mutações em diversos genes são descritas. O HSCR também apresenta forte correlação com achados polimórficos, produzindo variações nas seqüências gênicas dos genes candidatos, alterando a estabilidade do RNA mensageiro (RNAm) e desregulando a expressão protéica (Eng *et al.*, 1999; Hoff *et al.*, 2000; Martucciello *et al.*, 2000; Munnes *et al.*, 2000; Kapur, 2005; Skaba *et al.*, 2006).

A natureza poligênica do HSCR torna o aconselhamento genético complexo, pois diversas mutações ao longo dos genes candidatos estão associadas a penetrância incompleta de HSCR familiar ou esporádico (Kapur, 2005).

2.2.6 Lliquem amiloidótico cutâneo

As células oriundas da crista neural também são responsáveis pelo desenvolvimento embriológico das fibras sensoriais torácicas (Verga *et al.*, 2003). O liquem amiloidótico cutâneo (LAC) geralmente apresenta-se na região dorsal superior, correspondendo aos dermatômos T2 a T6 (1º a 4º vértebras torácicas). A primeira sintomatologia é caracterizada por intenso prurido intermitente na área interescapular, que aumenta de intensidade

mediante exposição ao sol ou períodos intenso de estresse. Subseqüentemente é possível notar áreas de hiperplasias epidermais com formações papulosas hiperpigmentada de coloração marrom. Esta pigmentação representa a deposição de substâncias amilóides oriundas do processo de apoptose dos queratinócitos na derme superior, que pode ser demonstrada mediante fluorescência para marcadores de amilóides (Tioflavina T). Somente em 1989, a associação entre NEM-2A e LAC é descrita pela primeira vez em um paciente (Verga *et al.*, 2003).

2.3 Aspectos Moleculares do *RET*

2.3.1 Descrição do *RET*

O proto-oncogene *RET* codifica um receptor de superfície celular do tipo tirosina-quinase com 21 éxons, sendo que entre os dois primeiros éxons há um íntron com 24 Kb. O domínio extracelular deste receptor é codificado pelos 10 primeiros éxons e possui 28 resíduos de cisteínas (Frilling *et al.*, 2003). Neste mesmo domínio, há um sítio ligante de cálcio (caderina-símile) que parece auxiliar no processo de linearização da estrutura molecular e dimerização dos monômeros de *RET* durante o processo de sinalização (Anders *et al.*, 2001).

Um único domínio transmembrana é codificado pelo éxon 11, e dois domínios intracelulares tirosina-quinase são codificados pelos 10 éxons restantes (Eng *et al.*, 1999; Hoff *et al.*, 2000).

Pelo menos 10 isoformas de *RET* resultantes de “*splicing*” alternativos no éxon 21 e com funções ainda não bem definidas são descritas. Sabe-se que as isoformas RET-9 e RET-51 são compostas por 1.072 e 1.114 aminoácidos respectivamente. Modelos murinos mostram que somente os camundongos com deleção da isoforma RET-9 demonstram prejuízos no desenvolvimento do sistema nervoso entérico e renal. A isoforma RET-51 está relacionada à sobrevivência e manutenção das células dos túbulos renais em estágios mais tardios do desenvolvimento embrionário (Hoff *et al.*, 2000; Ichihara *et al.*, 2004; Santoro *et al.*, 2004). A Figura 1 representa a proteína RET, evidenciando a porção extracelular, transmembrana e intracelular deste receptor.

Figura 1 – Representação gráfica da proteína RET, evidenciando a porção extracelular, transmembrana e intracelular

Fonte: Adaptado de Eng, 1999.

2.3.2 Interação entre ligantes, co-receptores e proteína RET

Pelo menos quatro tipos de ligantes e seus respectivos co-receptores estão envolvidos na ativação fisiológica do receptor RET. Dentre eles, o mais importante é o fator neurotrópico derivado das células de linhagem glial (GDNF), membro da superfamília beta de fatores de crescimento e transformação. O GDNF sinaliza para o receptor GFR α 1, uma proteína de superfície celular do tipo glicosil-fosfatidilinositol sem domínio transmembrana e citoplasmático (Hoff *et al.*, 2000).

Posteriormente, os genes para os receptores GFR α 2, GFR α 3 e GFR α 4 são clonados e seqüenciados. Segundo revisto por Hoff e colaboradores (2000) o GFR α 2 é receptor principal de nerturina (fator neutrópico com 40% de homologia ao GDNF) e secundário de GDNF; GFR α 3 é receptor exclusivo de artemina (ART) e GFR α 4 de persepina (PSP).

Uma vez que cada ligante e seus respectivos receptores formam complexos, a dimerização dos monômeros do receptor RET é desencadeada mediante ligações das porções de cisteínas extracelulares por pontes dissulfeto que ativam os resíduos internos de tirosina da porção intracelular. Estes resíduos internos fosforilam-se e iniciam um longo processo de sinalização mitótica para o núcleo celular promovendo multiplicação e desenvolvimento celular (Hoff *et al.*, 2000). A Figura 2 representa a interação entre ligantes e receptores da proteína RET.

Figura 2 – Interação entre ligantes e receptores da proteína RET

Fonte: Adaptado de Hoff *et al.*, 2000.

As setas largas indicam a interação favorecida entre ligante/GFRα/RET. As setas menores indicam ligações alternativas ou secundárias.

2.3.3 Efeito transformador de *RET*

O proto-oncogene RET está envolvido de diferentes formas na gênese de tumores medulares e não medulares da tireóide. Em 1990, uma forma de *RET* naturalmente rearranjada foi descoberta em carcinoma papilífero de tireóide e nomeada de oncogene RET-PTC (*RET-PTC*). O carcinoma papilífero de tireóide corresponde de 50 a 70% de todos os tumores malignos da tireóide. Geralmente seu curso é de prognóstico favorável, com proliferação rápida local e baixo grau de invasão à distância

(Gagel, 1996; Eng, 1999; Hoff *et al.*, 2000; Learoyd *et al.*, 2000; Santoro *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2004).

O oncogene RET-PTC possui 8 variedades de translocações gênicas entre as porções 5' dos genes do *PTC* e porção 3' do *RET*, com ponto de quebra genética no íntron 11. As translocações mais comuns são nos genes H4, R1 α ou ELE-1 (*PTC1*, *PTC2* e *PTC3*), sendo PTC-1 e PTC-3 comuns em 60 e 20% dos casos. A proteína híbrida é dimerizada por ação de ligantes específicos que ativam constitutivamente a porção RET, desencadeando formação tumoral em até 40% dos casos (Santoro *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2004; De Groot *et al.*, 2006).

2.3.4 Como as mutações ativadoras promovem a oncogenese

Estudos do potencial de transformação tumoral mediante transfecção das mutações Cys634Arg, Cys634Tyr ou Met918Thr do *RET* em células NIH 3T3 mostram que para o códon mutante 634 há dimerização da proteína RET independente da atividade do ligante. Esta ativação constitutiva do receptor ocorre mediante formação de pontes dissulfeto por resíduos de cisteínas não pareados. Para células expressando mutação no códon 918 há alterações nas afinidades entre substrato e sítio catalítico da porção intracelular do receptor (Xing *et al.*, 1996; Cirafici *et al.*, 1997; Carlomagno *et al.*, 1998; Hoff *et al.*, 2000).

Ainda não existem dados suficientes para afirmar se o fenótipo mais agressivo, NEM-2B, requer hiperativação do receptor RET por concomitante presença da mutação intracelular e ativação extracelular mediada por ligante. Contraditoriamente, estudos “*in vitro*” mostram que células portadoras de mutação no códon 918 possuem índices de tumorigênese inferiores as células portadoras da mutação no códon 634. Entretanto, quando as células portadoras de mutação no códon 918 são estimuladas por ligante GDNF exógeno seus índices de formações de colônias aumentam de 40 para 80%, igualando-se aos das células portadoras de mutações nos códons 634 (Xing *et al.*, 1996; Cirafici *et al.*, 1997; Carlomagno *et al.*, 1998; Hoff *et al.*, 2000). Outro estudo mais recente confirma a hipótese de maior tumorigênese induzida pela mutação no códon 634 e aponta que a mutação no códon 918 está relacionada com mecanismo de supressão de apoptose, o que parcialmente pode influir na diferença dos fenótipos apresentados (Mise *et al.*, 2006). A Figura 3 apresenta as vias de dimerização do RET e ativações constitutivas.

Figura 3 – Vias de dimerização do RET e ativações constitutivas

Fonte; Adaptado de Hoff *et al.*, 2000

A coluna (a) apresenta a dimerização fisiológica mediada pela interação ligante e co-receptor. Na (b) a dimerização patológica é mediada pela presença de mutações no códon 634 do domínio extracelular de *RET*. Finalmente a coluna (c) apresenta a dimerização patológica mediada pela presença de mutações no códon 918 do domínio intracelular de *RET*, onde na primeira via a autofosforilação do receptor RET gera um monômero ativado, e na segunda a ativação do receptor é associada a ação do ligante GDNF ao co-receptor GFR α 1 criando complexo dimérico hiperativo.

2.3.5 Mecanismos de segundo evento somático em NEM-2

Para manifestação de patologia associada ao desenvolvimento de tumores são necessários dois alelos gênicos mutados. A primeira mutação

apresenta-se como herdada (germinativa) e a segunda mutação como adquirida apenas pelo tecido afetado (somática). No caso de tumores esporádicos, ambas mutações apresentam-se nos tecidos afetados como eventos independentes (Marsh *et al.*, 2003).

Apesar da mutação germinativa em *RET* causar HCC, a lesão tumoral e seu desenvolvimento relacionam-se com expansão clonal mediada por eventos somáticos acumulativos, uma vez que porções adjacentes do tecido alvo afetado não desenvolvem tumores (Huang *et al.*, 2000). Neste cenário, onde diversas células com mutação germinativa não desenvolvem tumores, acredita-se haver equilíbrio entre os produtos protéicos dos alelos *RET* mutante e não mutante regulando a ativação mitogênica e exercendo efeito protetor para o não desenvolvimento de tumor. Uma vez que o alelo recessivo não mutante tem expressão protéica diminuída ou nula, a dimerização pelo monômero mutante é favorecida (Koch *et al.*, 2001; Marsh *et al.*, 2003).

Estudos do perfil de heteroziguidade com marcadores polimórficos em amostras tumorais permitem identificar alterações no alelo recessivo não mutante. Mediante perda de heteroziguidade (LOH) são descritos casos com amplas perdas do alelo não mutante, 20Kb envolvendo os éxons 4 a 16, associados à mutação germinativa no códon 634 em pacientes com metástases pulmonares por CMT e ausência de FEO (Quadro *et al.*, 2001).

Eventos de caráter somático para o desenvolvimento de tumores são estudados por PCR quantitativa, densitometria e análise de hibridização (FISH). Em amostras de sangue periférico, a relação entre as intensidades

das bandas referentes aos alelos mutantes e não mutantes para o cromossomo 10 é de 1:1. Em tumores com trissomia somática (ganho de um alelo mutante) esta proporção é de 2:1 (Mihai, 2001).

Outro mecanismo alternativo de segundo evento que apresenta proporções alélicas de 2:1, sem relação com trissomia somática nem perda do alelo recessivo no cromossomo 10, é denominado de hiper-expressão alélica, duplicação randomizada ou “*Tandem duplication*”. Este tipo de duplicação caracteriza-se por repetida transcrição em uma determinada porção do alelo cromossômico mutado, amplificando o sinal mitótico do *RET* mutante com hiper-representação e hiper-expressão do mesmo em tumores associados a NEM-2 (Mihai, 2001).

Demais eventos somáticos de maiores magnitudes que podem ser observados frente às mutações germinativas em NEM-2 são: deleções dos cromossomos 1p (relacionado a NEM-2A e FEO), 3q26.3-q27 (próximo à região codificadora do gene responsável pela síndrome de Von Hippel Lindau), cromossomo 3 (que possui genes codificadores para receptores de cálcio nas células principais claras das paratireóides), alterações alélicas nos cromossomos 13q14.3 (relacionados a retinoblastoma – RB1), alterações nos cromossomos 4 e 9q13-q22 (relacionados aos genes do complexo de receptores da família de fatores neurotróficos derivados das células gliais e seus ligantes) (Marsh *et al.*, 2003).

Em suma, todos mecanismos de segundo evento somático promovem efeito dominante do alelo *RET* mutante (por perda do alelo recessivo,

duplicação do alelo mutado ou hipertranscrição) favorecendo o fenótipo neoplásico (Huang *et al.*, 2000).

2.3.6 Mecanismo de ação de mutações ativadoras e inativadoras presentes no mesmo fenótipo (NEM-2A/CMT-F/HSCR)

Mutações germinativas são localizadas no *RET* para apresentações fenotípicas de NEM-2 e HSCR. Mutações associadas a NEM-2 caracterizam-se por ganho de função com hiperexpressão celular e maior liberação de substâncias hormonais pelas glândulas afetadas. Entretanto, mutações inativadoras (HSCR) acarretam perda de função caracterizando hipoexpressão celular (Eng, 1999).

Estudos bioquímicos e de transfecção da proteína tirosina-quinase mostram diferenças nas quantidades de expressão dos receptores na membrana celular. Os resíduos de cisteínas mutantes proximais à região 5' (códon 609, 611, 618 e 620) apresentam menores expressões numéricas de receptores quando comparados ao códon 634, localizado próximo à porção transmembrana do domínio extracelular. Da mesma forma, mutações próximas à região 5' apresentam diminuições de 3 a 5 vezes no potencial de transformação tumoral quando comparadas ao códon 634 (Decker *et al.*, 1998; Machens *et al.*, 2004). Deve-se considerar ainda a sensibilidade transformadora tecido-específica para presença de mutações como sendo

maior na tireóide, intermediária nas medulas adrenais e diminuta nas paratireóides.

Mediante estes achados, é possível entender os casos de NEM-2A ou CMT-F associados ao HSCR que apresentam mutações nos códons 609, 611, 618 ou 620, onde tais mutações expressam quantidades suficientes de receptores celulares funcionais maduros para o desenvolvimento e transformação tumoral da tireóide e possivelmente da medula adrenal, porém insuficientes para as formações fisiológicas ganglionares nervosas e prevenção de apoptose inapropriada nos plexos mioentérico e submucoso do trato gastro-intestinal, mesmo sob estímulo por GDNF (Eng, 1999; Arighi *et al.*, 2004). Finalmente, não podemos descartar demais eventos genéticos que podem atuar na variabilidade da expressão fenotípica oriunda dos padrões de mutação classicamente descritos.

2.3.7 Estudos funcionais evidenciando os polimorfismos e sua repercussão no desenvolvimento fenotípico de NEM-2

Polimorfismos são definidos como alterações nas seqüências de nucleotídeos em mais de 1% da população saudável, geradoras de proteína RET diferenciada e não causadora de NEM-2 (Cranston *et al.*, 2003). Discutivelmente, alguns autores sugerem que os polimorfismos estão relacionados a alterações no curso fenotípico e são caracterizados como moduladores da morbidez e idade diagnóstica de NEM-2.

Como mecanismo de ação, geram regiões hipermutáveis e novos locais de “*splicing*”, alterando as taxas de eficiência transcricionais da proteína RET (Wiench *et al.*, 2004; Wohllk *et al.*, 2005). Estudos em linhagens murinas sugerem diferentes modulações de penetrância e agressividade do CMT exercidas pelo “*background*” genético. Quando a mutação Cys634Arg é expressa em quatro linhagens murinas diferenciadas (BALB/c, C57BL/6J, FVB/N e CBA/ca), 65% dos modelos desenvolvem CMT entre 6 meses e 2 anos de vida. Após 10 meses de vida, observam-se 98% de penetrância de CMT nos modelos CBA/ca, 64% nos C57BL/6J, 14% nos BALB/c, e em nenhum modelo murino FVB/N (Cranston *et al.*, 2003).

2.4 Correlação genótipo / fenótipo em NEM-2

Com os avanços das pesquisas genéticas, várias mutações são descritas nos anos posteriores aos primeiros relatos de Mulligan e Donis-Keller. O Consórcio Internacional de Mutações em *RET* estima que 95% de todas as famílias portadoras de NEM-2 apresentam mutações neste proto-oncogene, sendo as dos éxons 10, 11 e códon 918 responsáveis por até 95% dos casos hereditários de CMT (Gagel, 1996).

A Figura 4 apresenta os principais éxons afetados para cada subtipo de NEM-2. A Tabela 5 resume as principais mutações, códons, substituições de nucleotídeos e aminoácidos associados aos respectivos fenótipos de NEM-2.

Tabela 5 – Principais mutações, códons, substituições de nucleotídeos e aminoácidos associados aos respectivos fenótipos de NEM-2

Éxon	Códons Afetados	Nucleotídeos (normal - mutante)	Aminoácidos (normal - mutante)	Fenótipos
8	532, 533, 534	ins AGG AGT GTG	ins Glu Glu Cys	CMT-F/HSCR
		GGC-TGC	Gly-Cys	CMT-F
	600	CGG-CAG	Arg-Gly	CMT-F
		TGC-CGC	Cys-Arg	NEM-2A/CMT-F/HSCR
	609	TGC-TAC	Cys-Tyr	NEM-2A/CMT-F/HSCR
		TGC-TCC	Cys-Ser	NEM-2A/CMT-F
		TGC-GGC	Cys-Gly	NEM-2A
	611	TGC-AGC	Cys-Ser	NEM-2A/CMT-F/HSCR
		TGC-TAC	Cys-Tyr	NEM-2A/CMT-F
		TGC-TGG	Cys-Trp	NEM-2A/CMT-F
		TGC-CGC	Cys-Arg	NEM-2A
		TGC-TTC	Cys-Phe	CMT-F
		TGC-GGC	Cys-Gly	CMT-F
10	618	TGC-CGC	Cys-Arg	NEM-2A/CMT-F/HSCR
		TGC-TCC	Cys-Ser	NEM-2A/CMT-F/HSCR
		TGC-AGC	Cys-Ser	CMT-F/HSCR
		TGC-TTC	Cys-Phe	NEM-2A/CMT-F
		TGC-GGC	Cys-Gly	NEM-2A/CMT-F
		TGC-TAC	Cys-Tyr	CMT-F
	620	TGC-CGC	Cys-Arg	NEM-2A/CMT-F/HSCR
		TGC-TGG	Cys-Trp	NEM-2A/HSCR
		TGC-TTC	Cys-Phe	NEM-2A
		TGC-GGC	Cys-Gly	NEM-2A
		TGC-TAC	Cys-Tyr	NEM-2A
		TGC-TTC	Cys-Ser	CMT-F
		TGC-TCC	Cys-Ser	CMT-F
		TGC-AGC	Cys-Ser	CMT-F

(continua)

(continuação)

Éxon	Códons Afetados	Nucleotídeos (normal - mutante)	Aminoácidos (normal - mutante)	Fenótipos
11	630	TGC-TAC	Cys-Tyr	CMT-F
		TGC-TCC	Cys-Ser	CMT-F
		TGC-CGC	Cys-Arg	CMT-F
		TGC-TTC	Cys-Phe	NEM-2A
	634	TGC-GGC	Cys-Gly	NEM-2A/CMT-F
		TGC-TAC	Cys-Tyr	NEM-2A/CMT-F/LAC
		TGC-CGC	Cys-Arg	NEM-2A/LAC
		TGC-TCC	Cys-Ser	NEM-2A/CMT-F
		TGC-TTC	Cys-Phe	NEM-2A/CMT-F
		TGC-TGG	Cys-Trp	NEM-2A/CMT-F
		TGC-AGC	Cys-Ser	NEM-2A
	634 + 640	TGC-CGC + GCC-GGC	Cys-Arg + Ala-Gly	NEM-2A + FEO (Calcitonina)
	634 + 648	TGC-CGC + GTC-ATC	Cys-Arg + Val-Ile	NEM-2A + FEO (ACTH)
	635, 636, 637, 638	ins ACG AGC TGT GCC	ins Thr Ser Cys Ala	NEM-2A
	637, 638, 639	ins TGC CGC ACG	ins Cys Arg Thr	NEM-2A
13	666 + 691	Ins TTCT del G + GGT-AGT	Lys-(Asp+Ser) + Gly-Ser	CMT-F
	768	GAG-GAC	Glu-Asp	NEM-2A/CMT-F
		GAG-GAT	Glu-Asp	CMT-F
	778	GTC-ATC	Val-Ile	CMT-F
	781	CAG-CGG	Glu-Arg	CMT-F
	790	TTG-TTC	Leu-Phe	NEM-2A/CMT-F
14		TTG-TTT	Leu-Phe	NEM-2A/CMT-F
	791	TAT-TTT	Tyr-Phe	NEM-2A/CMT-F
	13+14 778 + 804	GTC-ATC + GTG-ATG	Val-Ile + Val-Met	CMT-F
	13+16 791 + 918	TAT-TTT + ATG-ACG	Tyr-Phe + Met-Thr	NEM-2B
	804	GTG-TTG	Val-Leu	NEM-2A/CMT-F
14		GTG-CTG	Val-Leu	CMT-F
		GTG-ATG	Val-Met	CMT-F
	804 + 806	GTG-ATG + TAC-TGC	Val-Met + Tyr-Cys	NEM-2B
	804 + 844	GTG-ATG + CGG-CTG	Val-Met + Arg-Leu	CMT-F
	852	ATC-ATG	Ile-Met	CMT-F

(continua)

(conclusão)

Éxon	Códons Afetados	Nucleotídeos (normal - mutante)	Aminoácidos (normal - mutante)	Fenótipos
14+15	804 + 904	GTG-ATG + TCC-TGC	Val-Met + Ser-Cys	NEM-2B
15	883	GCT-TTT	Ala-Phe	NEM-2B
		GCT-ACT	Ala-Thr	CMT-F
	886	CGG-TGG	Arg-Trp	CMT-F
	891	TCG-GCG	Ser-Ala	NEM-2A/CMT-F
16	912	CGG-CCG	Arg-Pro	CMT-F
	918	ATG-ACG	Met-Thr	NEM-2B/HSCR
	922	TCC-TAC	Ser-Tyr	NEM-2B

Fonte: Adaptado de Hoff *et al.*, 2000; Peczkowska *et al.*, 2005

2.4.1 Correlação genótipo / fenótipo em NEM-2A

A NEM-2A compreende 75% dos casos totais de MEN-2. É composta pela tríade de patologias clássicas, onde o CMT está presente em virtualmente 100% dos casos, FEO 50% e HPT em aproximadamente 30% dos casos. A média de idade diagnóstica para NEM-2A é de 20 a 40 anos. Entretanto, aproximadamente 30% dos portadores de mutações no *RET* não desenvolvem sintomatologia até 70 anos de idade, sugerindo incompleta penetrância do proto-oncogene mutado e possível manifestação tardia da doença (Eng, 1999; Schuurman *et al.*, 2001; Quayle *et al.*, 2004; Lakhani *et al.*, 2006).

Mutações no *RET* estão presentes em 98% dos casos de NEM-2A, onde as trocas de aminoácidos cisteínas nos códons 609, 611, 618, 620, 630, 634 (éxons 10 e 11) perfazem 95% das mutações encontradas neste

fenótipo (De Groot *et al.*, 2006). Para estes éxons, também podem ocorrer pequenas inserções de nucleotídeos nos códons 635 e 637 (Hoff *et al.*, 2000). Em alguns casos, indivíduos com NEM-2A que não possuem mutações no *RET* apresentam mutações em outros genes, como o ligante GDNF e seu respectivo receptor (Berndt *et al.*, 1998).

A mutação Cys609Ser é associada à presença de FEO anteriormente aos achados de CMT em indivíduos com idades entre 48 e 50 anos. Raramente esta mutação apresenta-se relacionada a casos onde o FEO é caracterizado laboratorialmente em conjunto a HCC e ausência de clínica para CMT (Igaz *et al.*, 2002; Kinlaw *et al.*, 2005). Outro grupo de pesquisadores relata um indivíduo de 5 anos de idade portador de Cys609Gly, sem quaisquer sinais clínicos de CMT e com histologia de micro-carcinoma focal invasivo e HCC (Simon *et al.*, 2002).

A mutação Cys611Tyr é descrita em um paciente com 70 anos de idade que apresenta HCC e FEO extra-adrenal com metástases pulmonares (Schuurman, 2001).

A mutação Cys618Ser é relacionada às baixas incidências de FEO e HPT e maior expectativa de vida quando comparada aos portadores de mutação no códon 634 (Hoff *et al.*, 2000). Contraditoriamente, casos de CMT são descritos aos 7 anos de idade em associação as mutações no códon 618 (Szinnai *et al.*, 2003).

A mutação Cys630Arg apresenta-se associada a NEM-2A em indivíduos expressando CMT e HPT aos 32 anos de idade. Entretanto, existem casos descrevendo HCC aos 5 anos de idade; micro-carcinoma sem

metástases e com metástases locais aos 11 e 15 anos de idade respectivamente e casos de metástases locais por CMT em pacientes com 1 ano de idade sem expressões laboratoriais ou clínicas de FEO e HPT (Machens *et al.*, 2004; Dourisboure *et al.*, 2005).

O códon 634 corresponde a 85% das mutações encontradas na NEM-2A. Destas, 52% correspondem a mutação Cys634Arg e 26% a mutação Cys634Tyr (Eng, 1999; Hoff *et al.*, 2000). A presença de qualquer tipo de mutação neste códon é relacionada a 87% dos casos de FEO e 58% dos casos de HPT (Frank-Raue *et al.*, 1996). As mutações Cys634Arg, Cys634Tyr e demais mutações no códon 634 correspondem respectivamente a 23,1, 17,5 e 17% dos casos de HPT relacionados a NEM-2A. O risco de desenvolvimento de HPT aumenta progressivamente em relação à idade para pacientes portadores de mutações no códon 634, variando entre 14 e 81% para pacientes com 30 e 70 anos de idade respectivamente (Schuffenecker *et al.*, 1998). Segundo Schuffenecker e colaboradores (1998) o desenvolvimento natural do HPT pode ser subestimado nos indivíduos com idades próximas aos 30 anos devido retirada das paratireóides juntamente com a tireóide no mesmo procedimento cirúrgico.

De acordo com Punales e colaboradores (2003) os portadores da mutação Cys634Arg podem desenvolver metástases em linfonodos regionais aos 15 anos de idade, enquanto que metástases à distância são freqüentes em portadores da mutação Cys634Tyr aos 30 anos de idade. Outros casos de CMT associados às mutações no códon 634 são descritos

com metástases aos 6 anos de idade (Szinnai *et al.*, 2003). Ku e colaboradores (2005) evidenciam que a mutação Cys634Tyr pode estar associada a um caso agressivo de NEM-2A em paciente com 21 anos de idade apresentando CMT e FEO maligno com metástases para veia cava e átrio direito (Ku *et al.*, 2005).

Mutações conjuntas no mesmo alelo em heterozigose, Cys634Arg e Ala640Gly, relacionam-se ao CMT e FEO produtor ectópico de calcitonina em paciente com 26 anos de idade (Tessitore *et al.*, 1999). A co-segregação entre as mutações Cys634Ser, Ala641Ser e os polimorfismos Gly691Ser e Ser904Ser são associados a casos de NEM-2A com expressão de CMT e FEO (Poturnajova *et al.*, 2005).

Nunes e colaboradores (2002) descrevem um caso de dupla mutação Cys634Arg e Val648Ile em família portadora de NEM-2A, onde dois dos quatro irmãos são portadores da mutação Val648Ile e não apresentam sintomas associados a NEM-2, diferentemente dos outros irmãos portadores da mutação Cys634Arg que expressam somente o fenótipo de CMT. Os primeiros estudos de Mendonça e colaboradores (1998) apontam síndrome de Cushing e nódulos adrenais bilaterais no caso índice desta família (pai). Após adrenalectomia bilateral constata-se a presença de feocromocitoma bilateral e hiperplasia cortical adrenal. O CMT apresenta evolução branda, sem comprometimento em linfonodos locais, com FEO secretor ectópico de hormônio estimulante do córtex adrenal (ACTH), fenótipo extremamente raro. Nove anos após a cura do CMT, o caso índice falece por isquemia no

miocárdio. Molecularmente, este indivíduo é portador obrigatório das mutações Cys634Arg e Val648Ile em diferentes alelos.

As duplicações de 12pb entre os códons 634 e 635, co-segregadas à mutação Cys634Arg são descritas em familiares com elevada incidência de HPT e ausência de FEO (Hoff *et al.*, 2000).

O LAC apresenta-se associado às mutações Cys634Arg e Cys634Tyr em 100% dos casos (Bugalho *et al.*, 2003; Verga *et al.*, 2003). Um caso de LAC relaciona-se a CMT, HPT, FEO (bilateral e ectópico na cauda do pâncreas) e ganglioneuromatose (na região retroperitoneal proximal ao rim direito) em uma paciente com 34 anos de idade portadora da mutação Cys634Tyr, onde após os procedimentos cirúrgicos a cura foi alcançada (Gullu *et al.*, 2005).

Usualmente as mutações nos códons 609, 768, 804 e 891 não são associadas ao FEO (Brandi *et al.*, 2001; Shapiro *et al.*, 2003). Entretanto, descrevem-se uma paciente com 56 anos portadora da mutação Glu768Asp com exames laboratoriais de catecolaminas dentro dos padrões de normalidade e sintomatologia de hipertensão arterial sistêmica. Neste caso, o CMT e FEO são detectados por tomografia computadorizada, evidenciando-se a indicação de rastreamento de tumores para pacientes portadores de mutações no códon 768 (Aiello *et al.*, 2005).

Mutações nos códons 609, 611, 620, 631, 768, 790, 791 e 804 são usualmente associadas ao feocromocitoma e baixas incidências de HPT (Machens *et al.*, 2005). As mutações nos códons 790 e 791 são descritas na Alemanha como de curso clínico menos agressivo para CMT. Demais casos

de metástases em linfonodos locais são associados aos portadores destas mutações, onde aparentemente a mutação no códon 790 tem maior potencial tumoral maligno quando comparada à mutação no códon 791, sendo as prevalências de metástases locais de 26 e 6% respectivamente (Berndt *et al.*, 1998; Hoff *et al.*, 2000; Gimm *et al.*, 2002).

Mutações no domínio intracelular do *RET* envolvendo os códons 790 e 804 são raramente relacionadas a NEM-2A. Quando presente, a mutação no códon 804 é freqüentemente associada ao curso lento e menos agressivo do CMT devido baixa penetrância e surgimento usualmente tardio (Eng, 1999; Hoff *et al.*, 2000). Em outros casos, a expressão fenotípica relacionada às mutações no códon 804 é altamente variável, sendo descritos pacientes assintomáticos portadores de HCC aos 46 anos de idade; portadores de HCC e micro-carcinomas medulares aos 30 anos; pacientes apresentando CMT não metastático associado a HPT aos 55 anos; portadores de CMT apresentando metástases regionais aos 45 anos de idade e um caso de CMT difusamente metastático aos 6 anos com óbito aos 12 anos de idade (Frohnauer *et al.*, 2000; Gibelin *et al.*, 2004).

A mutação Ser891Ala é relatada em indivíduos assintomáticos aos 55 anos de idade; paciente com calcitonina discretamente acima dos padrões de normalidade em associação aos quadros de HCC e CMT aos 27 anos e indivíduo expressando CMT com metástases locais e FEO aos 52 anos de idade (Jimenez e Habra, 2004).

Os polimorfismos Gly691Ser e Ser904Ser são descritos em co-segregação para pacientes espanhóis portadores de mutação no códon 634.

Discutivelmente, ambos polimorfismos não apresentam relação com a maior ou menor penetrância de CMT, FEO ou HPT (Robledo *et al.*, 2003). Outros autores apontam que portadores destes polimorfismos em homozigose, caracterizam-se riscos 8 vezes maiores de apresentação sintomatológica de CMT por volta dos 20 anos de idade em relação aos indivíduos não-portadores dos mesmos, os quais apresentam o CMT por volta de 30 anos de idade (Robledo *et al.*, 2003). A substituição observada no códon 691 (glicina por serina) parece auxiliar no mecanismo de dimerização através da criação de um novo sitio de fosforilação sensível ao resíduo de serina, desencadeando ativação de novo nível da cascata de sinalização fosforilativa intracelular no processo mitogênico (Robledo *et al.*, 2003). O polimorfismo no códon 904 possivelmente altera a expressão e estabilidade do RNA, gerando diferentes tamanhos de RNA mensageiro (Robledo *et al.*, 2003).

Finalmente, alguns pacientes portadores de mutações menos frequentes são classificados como CMT esporádico devido ao surgimento tardio da doença. Com o decorrer do desenvolvimento fenotípico da NEM-2, estes são re-classificados sob os fenótipos de NEM-2A ou CMT-F, o que evidencia a importância dos rastreamentos clínicos, genéticos e de imagens nos indivíduos portadores ou sob-riscos de NEM-2 (Berndt *et al.*, 1998; Eng, 1999; Gimm *et al.*, 2002).

2.4.2 Correlação genótipo / fenótipo em NEM-2B

A NEM-2B corresponde a aproximadamente 5% de todos os casos de NEM-2, compreendendo a mais distinta e agressiva forma entre todos os fenótipos desta síndrome. Caracteristicamente o CMT é expresso em 95% dos casos, FEO em 45%, ganglioneuromatoses (lábios, língua, pálpebras e trato gastro-intestinal) em 100% e hábitos marfanóides (escoliose, aumento do tamanho de ossos longos e deslizamento da epífise femoral) em 65% dos casos de NEM-2B (Hoff *et al.*, 2000). Alguns achados oftálmicos como conjuntivite, espessamento das pálpebras, tumores nodulares subconjuntivos plexiformes e espessamento dos nervos da córnea são achados comuns para este fenótipo. Particularmente o exame de fundo de olho é uma boa indicação para suspeita de NEM-2B, pois o aumento do número de células de Schwann está relacionado ao espessamento da córnea (Eter *et al.*, 2001).

O maior fator diferencial da NEM-2B é a baixa idade de surgimento da patologia. Usualmente os casos de NEM-2B são descritos antes dos 10 anos de idade. Entretanto, são descritos casos não associados a metástases em indivíduos com 1 ano de idade e metástases nodais e a distância em indivíduos com 5 anos de idade (Machens *et al.*, 2003; Brauckhoff *et al.*, 2004). Mutações “*de novo*” podem ser detectadas em aproximadamente 50% dos casos (Punales, 2002).

As mutações Ala883Phe e Met918Thr, no domínio tirosina-quinase do proto-oncogene RET, estão presentes em 4 e 95% dos casos de NEM-2B respectivamente (Eng, 1999; Hoff *et al.*, 2000).

Casos atípicos de NEM-2B ou pseudo NEM-2B são descritos em pacientes com associação das mutações Val804Met e Ser904Cys no mesmo alelo. Nestes casos há apresentação de neuromas na língua e CMT multifocal com metástases linfonodais locais aos 34 anos de idade. Outros 2 casos da mesma família (34 e 39 anos) portam a dupla mutação sem expressão de neuromas. Todos os indivíduos não apresentam FEO ou demais sintomas como habitus marfanóides e ganglioneuromatoses intestinais (Menko *et al.*, 2002).

Mais recentemente, um grupo tcheco demonstra casos de NEM-2B com mutações Met918Thr e Tyr791Phe em pacientes com média de idade diagnóstica de 20 anos para CMT e 37 anos para FEO, sugerindo que a segunda mutação modula o caráter mais agressivo caracterizado pela mutação no códon 918 (Jindrichova *et al.*, 2004).

2.4.3 Correlação genótipo / fenótipo em CMT-F

O CMT-F caracteriza-se por expressão fenotípica de CMT sem qualquer evidência clínica ou laboratorial de FEO e HPT. Este fenótipo compreende 20% dos casos totais de NEM-2. Acredita-se que o prognóstico

de CMT-F seja o mais favorável ao paciente quando comparado a outros tipos de NEM-2 (Pigny *et al.*, 1999; Hoff *et al.*, 2000).

Dentre os casos de CMT-F, 85% apresentam mutações nos éxons 10 (35%) e 11 (50%) do *RET* e somente 10% das mutações para este fenótipo são relacionadas à porção intracelular de *RET* (Frank-Raue *et al.*, 1996; Eng, 1999; Lombardo *et al.*, 2002). Contraditoriamente, o Grupo Francês de Estudos de Calcitonina e Tumores afirma que 50% das mutações deste fenótipo envolvem os resíduos intracelulares (Niccoli-Sire *et al.*, 2001; Lombardo *et al.*, 2002). Provavelmente os casos de CMT-F onde não se encontram mutações no *RET* são relacionados a alterações genéticas em outros éxons ou genes, tais como ligante GDNF e seu receptor (Berndt *et al.*, 1998; Dang *et al.*, 1998).

A mutação Gly533Cys é descrita em portadores de CMT-F de origens espanhola e grega. Esta mutação apresenta quadro heterogêneo de agressividade da doença variando de indivíduos com HCC aos 21 anos de idade; CMT assintomáticos aos 88 anos; metástases locais aos 26 anos e indivíduos apresentando metástases à distância com idades entre 53 e 60 anos (Alvares da Silva, 2003; da Silva *et al.*, 2003; Kaldrymides *et al.*, 2006).

No sul da Espanha, a mutação Arg600Gln (CGG-CAG) associa-se ao CMT-F em indivíduos com idades entre 19 e 73 anos, sem detecção de alterações bioquímicas para CMT (Saez *et al.*, 1999).

As mutações nos códons 609, 611, 618, 620, 630, 790, 791, 768, 804, 891 e a duplicação de 12pb entre os códons 634 e 635 também são associadas ao CMT-F (Eng, 1999; Hoff *et al.*, 2000; Punaes *et al.*, 2003).

Para famílias portadoras da mutação Cys611Tyr, a média de idade diagnóstica para CMT é de 44 anos (Brauckhoff *et al.*, 2004). Entretanto, observam-se variações fenotípica como portadores de mutação sem alterações bioquímica entre 68 e 75 anos de idade; casos com dosagens de calcitoninas basais normais elevadas após estímulos (HCC) e casos de CMT difuso pela glândula (Hasen *et al.*, 2000).

Segundo o Consórcio Internacional de Mutações em *RET* as mutações Cys618Ser e Cys634Tyr estão presentes em 33 e 30% dos casos de CMT-F, com médias de idades diagnósticas de 29 e 27 anos respectivamente (Brauckhoff *et al.*, 2004). A mutação Cys634Trp também é descrita em associação a este fenótipo, diferentemente de sua variante gênica Cys634Arg (Hoff *et al.*, 2000; Bugalho *et al.*, 2003; Jindrichova *et al.*, 2004).

Recentemente, o grupo belga de Vandenbosch e colaboradores (2005) descrevem o caso de um menino de 12 anos de idade submetido a tireoidectomia por CMT com metástases locais. Este quadro associa-se a inserção e deleção no códon 666 (insTTCTdelG), substituindo a lisina do códon 666 por asparagina e serina (AAG-AATTCT) em presença do polimorfismo Gly691Ser. A nova mutação no códon 666 apresenta-se na mãe e avô do caso índice, sem associação ao polimorfismo Gly691Ser, onde não há expressão clínica e laboratorial da patologia. Neste estudo evidencia-se que o polimorfismo no códon 691 é herdado pelo lado paterno do caso índice, sugerindo atividade moduladora no desenvolvimento do CMT (Vandenbosch *et al.*, 2005).

A mutação localizada no éxon 13 do *RET*, Ser777Asp (AAC-AGC), é descrita em uma família italiana com idades entre 15 e 60 anos. Exceto pelo membro mais idoso desta família, nenhum dos demais apresentam sinais clínicos, laboratoriais ou histopatológico de HCC ou CMT caracterizando-se a fraca penetrância desta mutação para o fenótipo (D'Aloiso *et al.*, 2005).

As mutações nos códons 790 e 791 são consideradas como de curso clínico menos agressivo e menor média de idade diagnóstica quando comparada às mutações mais freqüentes deste fenótipo (Berndt *et al.*, 1998; Eng, 1999; Brauckhoff *et al.*, 2004). Devido forte correlação entre a mutação no códon 791 e polimorfismo no códon 769, com elevadas freqüências de achados co-segregados em mesmo alelo, alguns pesquisadores especulam a hipótese deste polimorfismo predispor a ocorrência da mutação 791 (Baumgartner-Parzer *et al.*, 2005).

A mutação Glu781Arg (CAG-CGG) é reportada em um paciente com 71 anos e seu filho, ambos apresentando hipertireoidismo por bócio multinodular. Após cirurgia, o exame histopatológico demonstra HCC e CMT não metastático provando que o CMT pode estar associado com outras patologias da tireóide (Maschek *et al.*, 2002).

Indivíduos portadores de mutações nos códons 768 e 804 apresentam CMT com curso tumoral lento e menos agressivo, provavelmente devido à baixa penetrância destas mutações. Para pacientes portadores de mutações nos códons 768 e 804, as médias de idades diagnósticas para CMT são de 60 e 45 anos respectivamente (Eng, 1999; Antinolo *et al.*, 2002; Lombardo *et al.*, 2002; Brauckhoff *et al.*, 2004; Jindrichova *et al.*, 2004). Entretanto, relata-

se um caso com surgimento precoce de CMT aos 32 anos de idade, onde a mutação Val804Met está associada com polimorfismo no códon 769. A progenitora do caso relatado possui somente a mutação no códon 804, com diagnóstico de CMT por biópsia aos 60 anos de idade (Magalhães *et al.*, 2004).

As mutações Val804Met e Arg844Leu são descritas em associação no mesmo alelo para 4 indivíduos de uma família portadora de CMT. As idades dos afetados variam entre 56 e 85 anos sugerindo branda evolução fenotípica, exceto por um dos portadores das mutações que apresenta HCC aos 30 anos de idade. Acredita-se que a substituição de arginina por leucina no códon 844 altere a estrutura espacial molecular da porção ligante de ATP do sitio catalítico de *RET*, facilitando o acesso do ATP a este sitio favorecendo a sinalização mitótica (Bartsch *et al.*, 2000).

As mutações Val804Met e Val778Ile associam-se a oftalmopatias características de NEM-2B (espessamento dos nervos da córnea) e CMT diagnosticados aos 35 e 53 anos de idade respectivamente. A progenitora deste caso índice não desenvolve sintomas durante 93 anos de vida. Entretanto, um primo da progenitora apresenta CMT com metástases locais e ósseas. Acredita-se que a mutação no códon 778 seja responsável pelo curso mais agressivo de CMT (no primo da progenitora), além do espessamento dos nervos das córneas que são comuns em NEM-2B, raros em NEM-2A e agora descritos em casos de CMT-F (Kasprzak *et al.*, 2001).

As mutações nos códons 804 e 806 são descritas em uma paciente com 23 anos de idade expressando CMT metastático local com sintomas

clássicos de NEM-2B (ganglioneuromatose de mucosas e espessamento do nervo ótico). O pai e um dos irmãos do caso índice, portadores somente da mutação no códon 806, não apresentam sintomas clínicos ou bioquímicos de CMT. Segundo Miyauchi e colaboradores (2005) a segunda mutação (códon 806) não é patogênica, mas modula a maior agressividade da mutação no códon 804 devido a menor idade do caso índice e presença de metástases.

Casos de mutações germinativas no códon 804 associadas à mutação somática no códon 918 sugerem que o segundo evento é agente transformador tumoral mais potentes quando comparado à existência de perfil homozigoto para mutação no códon 804, comum nos casos de consangüinidade (Eng, 1999; Lecube *et al.*, 2002; Lombardo *et al.*, 2002; Lesueur *et al.*, 2005).

Segundo Elisei e Agate (2004) a mutação Ala883Thr (GCT-ACT) em heterozigose não expressa sintoma nem alterações laboratoriais compatíveis com CMT, diferentemente quando comparada a familiares com perfil homozigoto e presença de CMT aos 56 anos de idade.

A mutação Arg886Trp (CGG-TGG) apresenta-se associada à família portadora de CMT-F, com expressão fenotípica no caso índice aos 44 anos de idade. Entretanto, o filho de 24 anos não apresenta sinais de CMT apontando provável baixa expressão pela mutação (Prazeres *et al.*, 2006)

A mutação Arg912Pro (CGG-CCG) relaciona-se ao CMT com características multifocais e metástases locais em paciente com 44 anos de idade, cujos familiares apresentam CMT de curso indolente (Jimenez e Dang, 2004).

2.4.4 Correlação genótipo / fenótipo inativador de *RET*

A doença de Hirschsprung ou megacólon congênito, acomete 1 em 5.000 recém-nascidos, sendo aproximadamente 80% dos casos esporádicos e 20% familiares (Munnes *et al.*, 2000). Mutações no *RET* correspondem a 40% dos casos de HSCR familiar e 33% dos esporádicos (Borrego, 1999; Eng *et al.*, 1999; Hoff *et al.*, 2000; De Groot *et al.*, 2006; Skaba *et al.*, 2006).

Os portadores de mutações no *RET* estão relacionados ao acometimento de maiores porções do trato gastro-intestinal, quando comparados aos casos hereditários com mutações em outros genes ou esporádicos (Solari *et al.*, 2003).

Em pacientes portadores de HSCR associado a NEM-2A ou CMT-F reportam-se mutações Cys609Tyr, Cys611Ser, Cys618Ser, Cys620Arg, Cys620Trp, co-segregadas ou não a polimorfismos (Romeo *et al.*, 1998; Martucciello *et al.*, 2000; Nishikawa *et al.*, 2003).

Em casos de CMT-F associados ao HSCR relatam-se a duplicação de 9pb após o códon 531, e um caso de mutação Tyr791Phe (Pigny *et al.*, 1999; Skaba *et al.*, 2006).

Casos de agenesia renal esquerda e hipertrofia renal contra-lateral compensatória em indivíduos com megacólon e idades entre 8 e 56 anos são associados a mutação Cys620Arg. Acredita-se que tal associação é sub-diagnosticada, uma vez que os exames de imagens são de maiores custos que os bioquímicos, portanto menos utilizados (Lore *et al.*, 2001).

Casos de megacólon também são relatados em associação a mutação Tyr1062Cys com conseqüente diminuição da função ativadora do *RET* (Wu *et al.*, 2005).

Alguns polimorfismos são reportados como agentes moduladores da penetrância de HSCR (Solari *et al.*, 2003). Os polimorfismos Ala45Ala e Leu769Leu, em heterozigose, apresentam respectivamente associação ao HSCR esporádico nas freqüências de 3,5:1 e 2:1 quando comparados à população não afetada. Outros autores relatam que ambos polimorfismos apresentam-se em semelhantes proporções para indivíduos afetados e não afetados sejam em heterozigose ou homozigose (36%). Já os polimorfismos Gly691Ser e Ser904Ser possuem baixas associações ao quadro de HSCR quando comparados aos indivíduos não afetados pela patologia (Pasini *et al.*, 2002; Borrego *et al.*, 1998; Borrego *et al.*, 1999; Solari *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005).

Polimorfismos menos freqüentes tais como: Leu764Leu, Ala21Ala, Val101Val, Ala432Ala, códons de parada Arg873X e Gly679X, também são descritos em associação ao HSCR (Pasini *et al.*, 2002; Borrego *et al.*, 1998; Borrego *et al.*, 1999; Solari *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005).

2.5 Tratamento

2.5.1 CMT

Brandi e colaboradores (2002) apontam que anteriormente às descobertas moleculares, muitos centros de pesquisas e atendimentos clínicos optaram pela cirurgia profilática indiscriminadamente em parentes de primeiro grau dos casos índices, menores de seis anos de idade, por possuírem 50% de chances de desenvolver CMT. Naquela época, os motivos alegados foram: a) Variada sensibilidade dos testes estimulatórios com pentagastrina em crianças; b) Relatos de CMT com metástases aos 6 anos de idade; c) Elevada resistência tumoral aos tratamentos por radiação; d) Pobre resposta aos quimioterápicos. Como a NEM-2 possui herança autossômica dominante, a cirurgia profilática é de grande valor curativo. Entretanto, torna-se inadequada quando realizada indiscriminadamente (Eng, 1999; Brandi *et al.*, 2001).

Na presença de valores elevados de calcitonina basal ou pós estímulo, o procedimento cirúrgico deve ser compreendido no mínimo por tireoidectomia total e dissecação dos linfonodos centrais. Quando constatado comprometimento em linfonodos bilaterais, a dissecação deve ser mais agressiva. Se os valores de calcitonina basal ou após estímulo mantiverem-se elevados após cirurgia (comum em 83% dos pacientes diagnosticados com nódulos palpáveis) o cirurgião deve avaliar a possibilidade de segunda intervenção mediante localização das metástases.

(Block *et al.*, 1978; Randolph *et al.*, 2000; Wells Jr *et al.*, 2000; Brandi *et al.*, 2001; Leboulleux *et al.*, 2004).

Mihai (2001) demonstra que 85% dos pacientes apresentam cura ao longo de 20 anos de seguimento pós-cirúrgico quando a decisão cirúrgica tem por base somente alterações do teste de estímulo de liberação de calcitonina por pentagastrina ou calcitonina basal. Com a decisão cirúrgica por base em critérios genéticos, as percentagens de cura tendem a elevar-se acima de 90% em menor tempo de seguimento.

Classicamente a cirurgia preventiva é definida como profilática quando o paciente possui mutação no *RET*, tem menos que 20 anos de idade, não apresenta sintomatologia, o nódulo tumoral (quando presente) é menor que 1cm de diâmetro e sem evidências de metástases (Amosenko *et al.*, 2003; Skinner, 2003; Ukkat *et al.*, 2004). Dois grandes paradigmas surgem a respeito do procedimento cirúrgico profilática: a) Indicação cirúrgica em todas as crianças entre 5 e 7 anos de idade portadoras de mutações no *RET*; b) Indicação cirúrgica após elevação dos testes de calcitonina, onde existe risco de 50% das crianças com testes estimulatório normais portadoras de mutações no *RET* apresentarem sinais microscópicos de CMT (Mihai, 2001).

Para NEM-2B a cirurgia é indiscutivelmente indicada nos primeiros meses de vida, devido à observação de casos com metástases por CMT aos 12 meses de vida (Mihai, 2001). É razoável que como controle de cura pós-cirúrgico, a calcitonina basal e estimulada sejam dosadas durante 5 anos de seguimento e posteriormente em intervalos maiores (Skinner, 2003).

2.5.2 FEO

O rastreamento bioquímico anual para feocromocitoma deve ter início aos 10 anos de idade para carreadores de mutações nos códons 918, 634 e 630 e aos 20 anos para os portadores de demais mutações (Machens *et al.*, 2005).

Todos pacientes com evidências de catecolaminas elevadas devem receber bloqueadores adrenérgicos antes da cirurgia. O mesmo se diz respeito a casos onde há comprovação do tumor com níveis normais de catecolaminas séricas e/ou urinárias (Machens *et al.*, 2005).

O desenvolvimento da laparoscopia possibilita melhores condições para o tratamento de FEO, sendo este o procedimento de escolha em pacientes com acometimento unilateral ou bilateral (Machens *et al.*, 2005).

A adrenalectomia bilateral é indicada mesmo em casos de FEO unilateral, devido ao alto risco de desenvolvimento de FEO na adrenal contralateral após 5 anos do primeiro diagnóstico (Machens *et al.*, 2005).

A maior contra-indicação para este procedimento cirúrgico é a síndrome de Addison, sendo que alguns autores sugerem a preservação do córtex adrenal na cirurgia evitando deficiências hormonais posteriores (Nguyen *et al.*, 2001). Outra possibilidade é adotar como medida de segurança um documento que informe a eventual necessidade de administração parenteral de corticóides em caráter emergencial portadores de FEO operados (Brandi *et al.*, 2001).

2.5.3 HPT

O rastreamento bioquímico anual para HPT deve sistematicamente seguir-se junto à pesquisa de feocromocitoma (Machens *et al.*, 2005).

O HPT quando sintomático apresenta nefrolitíase, dor óssea, fadiga, fraqueza, letargia e mais raramente crise hipercalcêmica compreendida por dor de cabeça severa e náuseas. Há indicação cirúrgica formal nos casos de HPT relacionados a NEM-2 pela significativa perda mineral óssea. Terapia com calcimiméticos, para diminuir a secreção do PTH, também são indicadas (Herfarth *et al.*, 1996; Brandi *et al.*, 2001).

Durante a paratireoidectomia, Herfarth e colaboradores (1996) e Brandi e colaboradores (2001) recomendam que o cirurgião observe se as 4 glândulas estão alteradas, ou sejam hiperplásicas. O procedimento cirúrgico pode ser realizado por paratireoidectomia seletiva com a retirada somente das glândulas afetadas; subtotal com retirada de 3 glândulas e metade da glândula remanescente ou total com enxerto de aproximadamente 50mg da glândula sem sinais hiperplásicos no antebraço não-dominante facilitando o controle de recorrência e suprimindo minimamente as necessidades hormonais. Após a cirurgia o paciente deve receber doses reposicionais de vitamina D e cálcio ao longo de 6 semanas, descontinuando o uso após 8 semanas. Após 10 semanas o cálcio e PTH séricos são dosados para avaliar o sucesso cirúrgico (Herfarth *et al.*, 1996; Brandi *et al.*, 2001).

2.5.4 Tratamento para NEM-2 na era pós molecular

O enfoque molecular tem como importância avaliar riscos, prevenir e aconselhar geneticamente os pacientes e seus familiares. A caracterização do gene responsável pela neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (MEN-2) representa a “pedra angular” para o desenvolvimento da oncogenética clínica, o que torna o estudo da NEM-2 especial e diferenciado de outras patologias. O estudo genético e funcional das neoplasias hereditárias torna-se igualmente capaz de liderar avanços para melhores manuseios clínico e terapêutico destas doenças (Dahia, 2002).

Desde 1997, um dos diversos grupos de estudos de neoplasias endócrinas múltiplas estabelece consenso pelo qual a intervenção cirúrgica deve ter como parâmetro principal os testes genéticos para a identificação de mutações no *RET*, sendo estes preferenciais aos testes bioquímicos devidos: a) Detecção e intervenção precoce poderem alterar o curso clínico do CMT; b) Boa tolerância das crianças à cirurgia; c) Não resultarem em falso-positivos, o que ocorre em até 10% dos testes bioquímicos (Brandi *et al.*, 2001; Frank-Raue *et al.*, 2006).

Os testes baseados em análise de DNA são grandes ferramentas para confirmação do diagnóstico clínicos e laboratoriais tradicionais, além de identificarem os portadores de mutações anteriormente a qualquer alterações clínicas e laboratoriais. Idealmente, o indivíduo pertencente a uma família de risco deve submeter-se ao teste de DNA em idades tenras ou após realização da cirurgia, quando o quadro clínico persistir (Eng, 1999).

Utilizando-se técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR) direcionadas aos éxons alvos, as seqüências genéticas são amplificadas e posteriormente seqüenciadas demonstrando-se presença de mutações no genoma em estudo para indivíduos portadores da síndrome. A ausência de mutações automaticamente exclui 50% dos indivíduos sob teste de acompanhamentos clínico ou laboratoriais subseqüentes.

Com os avanços diagnósticos genéticos e melhores praticas médicas, as taxas de sobrevida dos portadores de NEM-2 apresentam-se em elevação. Kameyama e Takami (2004) relatam 100% de sobrevida em 5 anos de seguimento para portadores de CMT-F, 96,9% para portadores de NEM-2A, 90,8% para portadores de CMT esporádico e 73,8% para portadores NEM-2B.

O consenso internacional para estudos das mutações no *RET* representa a tentativa dos pesquisadores em promover um guia de conduta com base nas experiências acumuladas até o momento (Brandi *et al.*, 2001). Estas recomendações certamente sofrem alterações à medida que novas mutações são descobertas e correlacionadas aos fenótipos de NEM-2 (Jimenez e Gagel, 2004). Atualmente, o consenso classifica-se de acordo com os níveis de riscos de desenvolvimento de formas agressivas de CMT em relação à mutação apresentada no *RET* como demonstrado a seguir:

Nível de risco 3: corresponde risco máximo para desenvolvimento de forma agressiva de CMT. Crianças com NEM-2B ou portadoras de mutações nos códons 883, 918 ou 922, devem ser encaminhadas a tireoidectomia total durante os seis primeiros meses de vida, preferencialmente no primeiro mês,

pois é comum o desenvolvimento metástases durante o primeiro ano de vida. Deve ser realizada limpeza dos linfonodos centrais do pescoço, sendo de maior extensão quando comprovada a existência de metástases.

Nível de risco-2: compreende risco elevado para desenvolvimento de forma agressiva de CMT. Crianças portadoras de mutações nos códons 611, 618, 620 ou 634 devem ser encaminhadas a tireoidectomia total antes dos cinco anos de idade. A cirurgia deve ser associada à remoção da cápsula posterior e dissecação dos linfonodos centrais.

Nível de risco -1: compreende risco moderado para desenvolvimento de forma agressiva de CMT. Crianças portadoras de mutações nos códons 609, 768, 790, 791 804 e 891 devem ser encaminhadas a tireoidectomia total. A idade para indicação de cirurgia permanece controversa, podendo ser anterior aos cinco ou 10 anos de idade ou somente após a elevação dos níveis de calcitonina. O comportamento biológico dos tumores relacionados às mutações deste grupo é bastante variável. O CMT associado a estas mutações usualmente apresenta desenvolvimento lento e tardio. Entretanto, metástases e óbitos por CMT são associados à presença de mutações nestes códons (Brandi *et al.*, 2001). Alguns autores mais conservadores defendem a indicação da cirurgia profilática até os 5 anos de idade para este grupo (Learoyd *et al.*, 2005).

É fundamental notar que a presença de mutações nos códons 609, 611, 618 e 620 em pacientes com HSCR familiar sugere fator importante de decisão para o clínico considerar possível tireoidectomia profilática, pois metástases por CMT e mortes foram observadas para todos estes genótipos

(Brandi *et al.*, 2001; Pakarinen *et al.*, 2005; Skaba *et al.*, 2006). Outros grupos acrescentam a mutação no códon 630 como integrada ao nível de risco 2, pois este genótipo associa-se ao micro-carcinoma com metástases locais em indivíduos com menos de 10 anos de idade (Machens *et al.*, 2004; Dourisboure *et al.*, 2005; Machens *et al.*, 2005).

OBJETIVO

3 OBJETIVO

O objetivo do projeto é validar a metodologia da eletroforese em gel sensível à conformação (CSGE) no rastreamento das mutações ao longo dos seis éxons “*hot-spots*” (10, 11, 13, 14, 15 e 16) do proto-oncogene RET comparativamente ao “padrão-ouro” compreendido pelo seqüenciamento genético.

MÉTODO

4 MÉTODO

4.1 Considerações Éticas

O projeto e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram apresentados ao Departamento de Clínica Médica e aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) em sessão de 27 de maio de 2.004 sob o protocolo número 265/04.

4.2 Algoritmo para análise genética do *RET*

No intuito de alcançar o objetivo traçado foi elaborado um algoritmo de trabalho que obedece a seqüência detalhada:

A) Seqüenciamento genético direto dos produtos de DNA amplificados referentes aos éxons “*hot-spots*” do *RET* de 7 indivíduos clinicamente caracterizados como casos-índices (controles mutantes positivos) e 7

indivíduos não portadores de patologia, clinicamente saudáveis, (controles mutantes negativos) compreendendo 84 éxons analisados por seqüenciamento genético;

B) Seqüenciamento genético direto dos produtos de DNA amplificados referentes aos éxons carreadores de mutações e polimorfismos dos demais familiares (casos sob-risco) compreendendo 100 éxons analisados por seqüenciamento genético, o que caracterizou qual destes familiares portaram mutações e/ou polimorfismos segregadas nas respectivas famílias afetadas por NEM-2;

C) Rastreamento mediante eletroforese por CSGE para os produtos de DNA amplificados referentes aos éxons “*hot-spots*” do *RET* carreadores de mutações e/ou polimorfismos, comparativamente aos éxons com padrões genéticos não variantes para cada família (não portadores de mutações ou polimorfismos). As análises por CSGE foram realizadas em duplicada, sendo 128 rastreamentos para mutações e 168 para polimorfismos, perfazendo 296 éxons analisados.

D) Rastreamento mediante eletroforese por SSCP para os produtos de DNA amplificados referentes à seleção de amostragem compreendendo os éxons “*hot-spots*” do *RET* carreadores de mutações, polimorfismos e padrões genéticos não variantes. A amostragem selecionada compreendeu um grupo composto por 38 indivíduos envolvendo os diferentes perfis genotípicos estudados por CSGE.

E) Posterior confronto entre achados referentes ao CSGE, SSCP e seqüenciamento genético. Desta forma o objetivo deste projeto foi validar

uma nova metodologia de rastreamento (CSGE) e melhor caracterizar a relação entre mutações e respectivas expressões fenotípicas. A Tabela 6 apresenta um resumo do algoritmo utilizado neste trabalho para análise genética do *RET*.

Tabela 6 – Algoritmo para análise genética do *RET*

4.3 Casuística

O grupo de indivíduos estudados incluiu pacientes com diagnóstico de CMT e seus parentes em primeiro grau, acompanhados pelo ambulatório da Unidade de Endocrinologia Genética (UEG), Serviço / Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Não houve neste estudo restrição de idade, pois segundo Eng (1999) o gene responsável pelo CMT hereditário é expresso com penetrância incompleta, de modo idade-dependente, onde de 5 a 20% dos pacientes não apresentam sintomas mesmo aos 70 anos de idade.

O presente estudo envolveu 64 indivíduos agrupados em 7 famílias, 26 do sexo masculino (40,63%) e 38 do sexo feminino (59,37%), com idades entre 1 e 82 anos. Dos 64 indivíduos, 7 representaram casos índices e 57 casos sob-risco de portarem mutações no *RET*.

De acordo com os dados apresentados na literatura, os casos-índices foram previamente diagnosticados por procedimentos clínicos e bioquímicos clássicos tais como: dosagens basais e pós-estímulo por cálcio ou pentagastrina da secreção de calcitonina, dosagens de epinefrina e norepinefrina séricas e urinárias, dosagens de PTH e cálcio, imunocitoquímica e histoquímica para calcitonina, além de exames de imagem. Para os pacientes portadores de HSCR, o diagnóstico foi realizado por enema de bário contrastado, manometria anorectal e biópsia. (Aliepoulis *et al.*, 1970; Ezabella *et al.*, 1990; Toledo *et al.*, 1990; Toledo *et al.*, 1992;

Hayashida *et al.*, 1993; Eng *et al.*, 1995; Ezabella *et al.*, 1996; Mendonça *et al.*, 1998; Abelin *et al.*, 1999; Niccoli-Sire *et al.*, 1999; Wells Jr *et al.*, 2000; Brandi *et al.*, 2001; Nunes, 2001; Viegas *et al.*, 2001; Maciel *et al.*, 2002; Maia *et al.*, 2002; Nunes *et al.*, 2002).

Cada caso-índice representou uma família com fenótipo distinto para NEM-2. A Família A representou o fenótipo NEM-2A com 12 indivíduos sob-risco; Família B o fenótipo NEM-2A com 6 casos sob-risco de possuírem mutações no *RET*, além da progenitora da família (I-2) que foi analisada em busca da mutação co-segregada à causadora de patologia nesta família. O caso-índice desta família faleceu em 1997, de forma que o padrão mutante foi representado por outro indivíduo afetado da mesma família; Família C representou o fenótipo NEM-2A associado ao HSCR com 9 indivíduos sob-risco; Família D o fenótipo CMT-F com 9 indivíduos sob risco; Família E o fenótipo CMT-F com 13 indivíduos sob risco; Família F o fenótipo CMT-F com 5 indivíduos sob risco e Família G o fenótipo NEM-2B com 3 indivíduos sob-risco.

A Tabela 7 sumariza o fenótipo apresentado por cada indivíduo envolvido na casuística do presente estudo. As Figuras de 5 a 11 apresentam as genealogias das famílias envolvidas no presente estudo (*Cyrillic Pedigree Drawing Editor Version 1*).

Tabela 7– Dados fenotípicos referentes aos 64 indivíduos representando os fenótipos clássicos de NEM-2

Caso	Família	Genealogia	Idade	Sexo	Afetado	Glândulas Afetadas			Neuromas	Megacólon	Fenótipo
						Tireóide	Adrenais	Paratireóides			
1	A	I-1	70	M	X	X					NEM-2A
2	A	II-1	42	M	X	X	X	X			NEM-2A
3	A	II-3	34	F	X	X	X				NEM-2A
4	A	II-6	32	M	X	X		X			NEM-2A
5	A	II-8	30	M	X	X	X				NEM-2A
6	A	III-1	16	F	X	X					NEM-2A
7	A	III-2	14	M	X	X					NEM-2A
8	A	III-3	10	F							Não Afetado
9	A	III-4	13	M	X	X		X			NEM-2A
10	A	III-5	10	M							Não Afetado
11	A	III-6	12	F	X	X					NEM-2A
12	A	III-7	8	M	X	X					NEM-2A
13	A	III-8	6	F							Não Afetado
14	B	I-2	35	F							Não Afetado
15	B	II-1	17	M							Não Afetado
16	B	II-3	15	F	X	X		X			NEM-2A
17	B	II-5	6	F	X	X					NEM-2A
18	B	II-6	4	F							Não Afetado
19	B	III-1	3	F							Não Afetado
20	B	III-2	1	M							Não Afetado
21	C	II-1	36	F	X	X					NEM-2A
22	C	II-4	30	F	X	X		X			NEM-2A
23	C	III-1	26	F							Não Afetado
24	C	III-2	24	F	X	X					NEM-2A
25	C	III-3	22	M	X	X					NEM-2A
26	C	III-4	19	F							Não Afetado
27	C	III-5	18	M	X					X	NEM-2A+HSCR
28	C	III-6	10	F	X					X	NEM-2A+HSCR

(continua)

(conclusão)

Caso	Família	Genealogia	Idade	Sexo	Afetado	Glândulas Afetadas			Neuromas	Megacólon	Fenótipo
						Tireóide	Adrenais	Paratireóides			
29	C	III-7	7	F							Não Afetado
30	C	III-8	4	M	X	X					NEM-2A
31	D	I-2	55	F	X	X					CMT-F
32	D	II-1	27	M	X	X					CMT-F
33	D	II-3	15	F	X	X					CMT-F
34	D	II-5	12	F	X	X					CMT-F
35	D	II-7	10	M							Não Afetado
36	D	III-1	6	F							Não Afetado
37	D	III-2	4	F							Não Afetado
38	D	III-3	1	M							Não Afetado
39	D	III-4	2	M							Não Afetado
40	D	III-5	1	F							Não Afetado
41	E	II-1	55	F	X	X					CMT-F
42	E	II-2	50	F	X	X					CMT-F
43	E	II-4	40	F	X	X					CMT-F
44	E	III-1	32	F	X	X					CMT-F
45	E	III-2	25	F	X	X					CMT-F
46	E	III-3	21	F	X	X					CMT-F
47	E	III-4	19	M							Não Afetado
48	E	III-5	22	M							Não Afetado
49	E	III-6	20	F	X	X					CMT-F
50	E	III-7	17	F							Não Afetado
51	E	III-8	15	M							Não Afetado
52	E	III-9	12	F							Não Afetado
53	E	III-10	9	F	X	X					CMT-F
54	E	III-11	4	M							Não Afetado
55	F	I-2	82	F	X	X					CMT-F
56	F	II-1	53	M	X	X					CMT-F
57	F	II-2	51	F	X	X					CMT-F
58	F	III-1	30	F							Não Afetado
59	F	III-2	26	M							Não Afetado
60	F	III-3	20	M							Não Afetado
61	G	I-1	50	M							Não Afetado
62	G	I-2	41	F							Não Afetado
63	G	II-1	12	M							Não Afetado
64	G	II-2	9	F	X	X			X		NEM-2B

Legendas: NEM-2A, Neoplasia endócrina múltipla tipo 2A; NEM-2A+HSCR, Neoplasia endócrina múltipla tipo 2A associada ao megacólon (Hirschsprung); CMT-F, Carcinoma medular de tireóide familiar; NEM-2B, Neoplasia endócrina múltipla tipo 2B; M, Masculino; F, Feminino.

Família A (NEM-2A)

Figura 5 – Genealogia da família A portadora de NEM-2A

Família B (NEM-2A)

Figura 6 – Genealogia da família B portadora de NEM-2A

Família C (NEM-2A associado ao HSCR)

Figura 7 – Genealogia da família C portadora de NEM-2A associada ao megacólon (HSCR)

Família D (CMT-F)

Figura 8 – Genealogia da família D portadora de CMT-F

Família E (CMT-F)

Figura 9 – Genealogia da família E portadora de CMT-F

Família F (CMT-F)

Figura 10 – Genealogia da família F portadora de CMT-F

Família G (NEM-2B)

Figura 11 – Genealogia da família G portadora de NEM-2B

Legendas: Os símbolos representam as categorias de indivíduos segundo suas apresentações patológicas nas figuras 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11

- Indivíduos não portadores de mutações no proto-oncogene RET (Não portadores de NEM-2).
- Indivíduos portadores de mutações no proto-oncogene RET (Portadores de NEM-2)
- Indivíduos portadores de mutações no proto-oncogene RET (Portadores de HSCR)
- Indivíduos falecidos

4.4 Coleta de material biológico

Foram coletadas amostras sangue periférico por punção venosa em dois tubos, com 5ml cada, contendo anticoagulante ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA 25mM, pH 8.0). O material coletado foi armazenado no

máximo por 3 dias em temperatura refrigerada (4°C) até o momento da extração do DNA genômico.

4.5 Controle de qualidade

Visando manter padrões de qualidade, a Unidade de Endocrinologia Genética (UEG) distribuiu seus procedimentos em dois ambientes distintos. No primeiro ambiente, denominado de sala de pré-amplificação, somente os materiais biológicos ainda não amplificados foram manipulados. No segundo ambiente, denominado de sala de pós-amplificação, somente os materiais já amplificados foram manipulados. Com este procedimento evitou-se contaminação cruzada entre material biológico ainda não amplificado e material amplificado contendo milhares de cópias de DNA de outro paciente, o que garantiu a confiabilidade da análise genética.

4.6 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído mediante uso do método do sal (Miller *et al.*, 1988). Resumidamente, esta metodologia constou em provocar hemólise por soluções hipotônicas de cloreto de amônia e hidrocarbonato de amônia mediante diferença de concentração entre os meios intracelulares e extracelulares dos eritrócitos (choque osmótico). Em seguida, provocou-se

leucólise mediante solução hipertônica de tris-base ácido clorídrico, que manteve o pH do meio, cloreto de sódio que saturou os leucócitos e EDTA dissódico pH 8,0, responsável pelo seqüestro de cátions bivalentes. Concomitantemente a lise dos leucócitos, o saponáceo SDS promoveu lise das membranas celulares. As proteínas celulares lisadas foram digeridas através de incubação por 18 horas a 37°C com enzima proteinase K. Os degradados celulares, RNA e proteínas foram agregados e precipitados por cloreto de sódio. Após a separação entre lisados celulares e DNA genômico, este último foi precipitado por etanol e suspenso em tampão tris-base ácido clorídrico com EDTA.

4.7 Avaliação da qualidade do DNA genômico

Para confirmar a presença do material genômico extraído foram realizadas eletroforeses a 100V por 30 minutos (*Power PAC 3000, Biorad, EUA*). Aplicaram-se 5µl de DNA extraído acrescidos a 1µl de “*Loading Buffer 6x*” em gel de agarose 1% com tampão TAE 1X (Tris base 0,04M, EDTA dissódico 0,001M, 0,02M de ácido acético glacial) corado por brometo de etídio (0.5µg/ml de gel). Posteriormente, o material genético extraído foi visualizado em transluminador ultravioleta (*Photo Analyst Mini Visionary, Fotodyne, EUA*).

4.8 Avaliação da concentração do DNA genômico

A concentração de DNA extraído, em ng/μl, foi avaliada mediante espectrofotometria com leitura no comprimento de onda de 260nm, assim como a concentração de proteínas a 280nm. A pureza do material extraído foi aferida mediante a relação entre as absorbâncias 260/280nm. O DNA foi considerado livre de impurezas quando a relação apresentou-se maior que 1,8 (*GeneQuant*, *Pharmacia Biotech*, EUA).

4.9 Amplificação do DNA genômico

Os segmentos de interesse no DNA em estudo foram amplificados através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), introduzida por Saiki e colaboradores (1988).

A desnaturação foi realizada em ciclo único a 94°C, por 10 minutos (éxons 10, 11A, 11B, 15 e 16) ou 3 minutos (éxons 13, 14A e 14B). Posteriormente, 38 ciclos com desnaturação, anelamento e extensão foram realizados sendo as seguintes temperaturas: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos (éxons 10 e 15), 1 minuto (éxons 11A, 11B e 16) ou a 62°C por 1 minuto (éxons 13, 14A e 14B) e extensão a 72°C durante 1 minuto. Ao termino das ciclagens, todas as reações foram submetidas a ciclo único com extensão final a 72°C por 4 minutos.

Para amplificação do éxon 14 utilizando os “*primers*” 14C (éxon 14C), a desnaturação foi realizada em ciclo único a 95°C, por 4 minutos, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 65°C por 45 segundos e extensão a 72°C durante 2 minutos. Ao término da ciclagem, a reação foi submetida a ciclo único com extensão final a 72°C por 10 minutos.

As reações de PCR foram realizadas juntamente a controles negativos em termociclador *Minicycler*® (*MJ Research, Waterstone MA, EUA*).

Os “*primers*” foram escolhidos a partir das seqüências flanqueadoras da borda íntron-éxon para o estudo do *RET* (*Invitrogen, Brasil*). A Tabela 8 apresenta as seqüências dos “*primers*” referentes aos éxons “*hot-spots*” do *RET*, respectivas temperaturas de anelamento e tamanho do amplificado. Os “*primers reverses*” 11B e 14B foram desenhados a partir de programa gratuitamente oferecidos pela Internet (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>).

Tabela 8 – Sequências de “primers” ou iniciadores flanqueadores da borda íntron-éxon dos “hot-spots” de *RET*

Éxons	Sequências dos “primers”	Anelamento (°C)	Pb
10	10F: 5’AggCTgAgTgggCTACgTCTg 3’ 10R: 5’gTTgAgACCTCTgTggggCT 3’	60	205
11A	11F: 5’ATgAggCAgAgCATACgCAgCC 3’ 11R: 5’CTTgAAggCATCCACggAgACC 3’	60	332
11B	11F: 5’ATgAggCAgAgCATACgCAgCC 3’ 11R: 5’TTgTgggCAAACCTgTggTA 3’	60	199
13	13F: 5’AACTTgggCAAaggCgATgCA 3’ 13R: 5’AgAACAgggCTgTATggAgC 3’	62	276
14A	14F: 5’CCTggCTCCTggAAgACC 3’ 14R: 5’CATATgCACgCACCTTCATC 3’	62	298
14B	14F: 5’CCTggCTCCTggAAgACC 3’ 14R: 5’CCAggCAAATgAgATgAggT 3’	62	241
14C	14F: 5’gCgCCCCCgCCCCgCCCgCCgCggCgCCg CCCAgggATAgggCCTgggCTTC 3’ 14R: 5’TAACCTCCACCCAAgAgAg 3’	65	395
15	15F: 5’CATggCCTgACgACTCgTgC 3’ 15R: 5’CCTgggAgCCCCgCCTCATC 3’	60	192
16	16F: 5’CTgAAAgCTCAgggATAggg 3’ 16R: 5’TAACCTCCACCCAAgAgAg 3’	60	202

Fonte: Da Silva, 2003; Punales *et al.*, 2003; Solari *et al.*, 2003.

Independente dos “primers” utilizados, as reações de amplificação por PCR foram realizadas segundo protocolo com volume final de 50µl: Tampão comercial 1X (10mM Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl), 0,4mM de solução de

dNTP, 2U de Taq-polimerase por reação (*Invitrogen*, Brasil) e 5% de sulfóxido dimetil (C₂H₆SO) - DMSO (*Sigma*, EUA). As concentrações de cloreto de magnésio e de cada “*primer*” foram respectivamente: éxon 10 (1,76mM; 20pm), éxon 11 (2,40mM; 14pm), éxon 13 e 15 (2,40mM; 20pm), éxon 14 (3mM; 10pm) e éxon 16 (3mM; 20pm). As concentrações de DNA utilizadas nestes ensaios variaram entre 100 e 200ng de DNA genômico por reação.

4.10 Detecção do produto de PCR

A presença de material genômico amplificado foi verificada mediante eletroforeses a 70V por 60 minutos (*Power PAC 3000*, *Biorad*, EUA). Foram aplicados 5µl de amplificado genômico acrescidos a 1µl de “*Loading Buffer* 6x” em gel de agarose 2% com tampão TAE 1X (Tris base 0,04M, EDTA dissódico 0,001M, 0,02M de ácido acético glacial) corado por brometo de etídio (0.5µg/ml de gel). Posteriormente, em transluminador ultravioleta, os tamanhos dos produtos amplificados foram visualizados em comparação ao marcador de peso molecular de 100pb.

4.11 Reação de seqüenciamento genético

O seqüenciamento realizado por terminação de cadeia foi descrito por Sanger em 1975. Sua aplicabilidade é decifrar os nucleotídeos que compõem as fitas de DNA.

Para a reação de seqüenciamento genético utilizou-se tampão comercial e os mesmos “*primers*” da reação de PCR. As reações de seqüenciamento foram realizadas em tubos separados para as fitas “*forward*” e “*reverse*” dos amplificados de DNA e termocicladas. As condições das reações para volume final de 20µl foram: 2µl de “*Big Dye terminator*” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 6 µl de tampão 0,25X (Tris base 0,5M pH 9,0 com 25mM MgCl₂) e 1,60pm do respectivo “*primer*”. As concentrações de DNA amplificado utilizados nestes ensaios variaram entre 5 e 10ng por reação. As temperaturas de ciclagem foram: ciclo único de desnaturação por 2 minutos a 96°C, 40 ciclos de desnaturação por 10 segundos a 96°C, anelamento dos “*primers forward*” ou “*reverse*” durante 20 segundos a 60°C e extensão por 4 minutos a 60°C.

O tampão comercial para seqüenciamento de DNA foi sintetizado contendo enzima Taq-polimerase “*Gold*”, que possui anticorpo monoclonal no sítio catalítico da enzima promovendo maior especificidade na reação de seqüenciamento. Durante a termociclagem, este anticorpo sofreu desnaturação a 96°C e liberou o sítio catalítico para sua atividade, que ocorreu a 60°C, minimizando as reações inespecíficas da enzima em temperaturas inferiores. O tampão também foi composto por

desoxinucleotídeos (dNTPs) e didesoxinucleotídeos (ddNTPs), cuja estrutura química não possui hidroxila no carbono 3. Desta forma, interrompeu-se a ligação entre o hidrogênio restante nesta posição e hidroxila presente no carbono 5 do nucleotídeo seguinte, o que impediu a ligação fosfo-diéster e conseqüentemente o progresso da síntese de nova fita de DNA. Durante a extensão, os análogos de nucleotídeos denominados didesoxinucleotídeos (ddNTPs) foram incorporados randomicamente na fita complementar em formação. As concentrações de desoxinucleotídeos e didesoxinucleotídeos apresentaram-se balanceadas, visando à probabilidade de 50% de incorporação para ddNTPs ou dNTPs em cada posição do fragmento a ser seqüenciado. Estes análogos de nucleotídeos foram marcados com substâncias que emitem fluorescência, permitindo a posterior visualização das bases ligadas.

4.12 Purificação do produto após reação de seqüenciamento

Após a reação de seqüenciamento, o produto do seqüenciamento genético foi purificado para retirada dos reagentes excedentes das reações de PCR e seqüenciamento genético. Mediante adição de 80µl de isopropanol, incubação por 20 minutos em temperatura ambiente e centrifugação a 14.000 rpm por 35 minutos (*Centrifuge 5804R, Eppendorf, EUA*), o produto do seqüenciamento genético foi precipitado e o sobrenadante desprezado. Para lavagem do pellet contendo o amplificado

genômico seqüenciado adicionou-se 250µl de etanol 70%, centrifugou-se a 14.000 rpm durante 10 minutos e posteriormente desprezou-se o sobrenadante. O produto de reação de seqüenciamento genético foi incubado a 60°C em estufa até todo etanol evaporar. Finalmente este produto foi ressuspendido em 2,5µl de tampão (*Template Supression Reagent – TSR, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*), desnaturado por 2 minutos a 90°C em termociclador e conservado no gelo antes da aplicação em polímero desnaturante (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*).

4.13 Utilização do seqüenciador automático ABI 310

A leitura das seqüências genéticas foi realizada em seqüenciador automático (ABI 310 DNA Sequencer - *Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*), onde as moléculas de DNA marcadas com múltiplos corantes fluorescentes, específicos para cada ddNTPs, foram analisadas através de migração eletrofóretica em polímero.

Posteriormente, os eletroferogramas foram editados com auxílio do aplicativo *AB Navigator* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*) e submetidas para análise através de confronto entre os achados das edições gênicas e do banco de dados do “*PubMed*” (acessos números AF032124 e AJ243297).

4.14 Eletroforese em gel sensível à conformação (*Conformation-sensitive gel electrophoresis* - CSGE)

O protocolo do CSGE utilizado para rastreamento genético de mutações no *RET* encontra-se a seguir relatado.

4.14.1 Lavagem e revestimento das placas

Para manuseio e lavagem em água corrente foram utilizadas, para cada placa, esponjas e luvas separadas. Posteriormente, ambas placas foram lavadas com álcool 70% e secas. A placa maior foi recoberta com 5ml de dimetildiclorosilane (*repel-silane*) e seca em temperatura ambiente. A placa menor foi revestida com 5ml de solução de gamma-methacryloxypropyl Termethoxysilane (5ml de álcool etílico absoluto, 150µl de ácido acético glacial 10%, 22µl de gamma-methacryloxypropyl Termethoxysilane) e seca em temperatura ambiente.

4.14.2 Montagem das placas

Os espaçadores foram colocados sobre a placa maior (revestida com *repel-silane*) onde posteriormente a placa menor foi repousada (revestida

com gamma-methacryloxypropyl Trimethoxysilane) e firmemente preza com grampos em suas extremidades.

4.14.3 Preparo do MDE gel

Para a preparação do gel, utilizou-se o seguinte protocolo com volume final de 55ml: MDE 0,5X (*Cambrex Bio Science, Rockland, ME, EUA*), 6% de TBE 10X (8,9M Tris base, 8,9M ácido bórico e 0,1mM EDTA pH 8,0), 2,5% de glicerol. Posteriormente, foi acrescido 220µl de solução de persulfato de amônio (APS) 10% e 22µl de N, N, N, N-Tetrametil-etilenodiamina (TEMED).

Com auxílio de seringa plástica de 60ml, o gel foi aplicado entre as placas, o pente encaixado e o gel polimerizado por 2 horas.

4.14.4 Aplicação das amostras

Antes da aplicação das amostras, o pente foi retirado dentre as placas e o sistema de eletroforese conectado (*Sequencing System Model S2, Life Technologies, Gibco/BRL, Gaithersburg, EUA*). Foi realizada uma pré-eletroforese a 8W por 45 minutos com tampão TBE 0,6X (0,5M Tris base, 0,5M ácido bórico e 0,006mM EDTA pH 8,0). 5µl de amostra (2:1 de amplificado genômico e tampão contendo azul de bromofenol, xileno cianol e

“orange G” 1X) (*Triple Dye Loading Buffer* 6X, Cambrex Bio Science, Rockland, ME, EUA) foram desnaturados e aplicados em gel.

Para análise dos éxons 10, 11A (amplificado com os “*primers*” 11A), 13 e 16, as amostras foram desnaturadas a 94°C durante 5 minutos e incubadas (anelamento) a temperatura ambiente por 40 minutos. Para o éxon 11B (amplificado com os “*primers*” 11B), as amostras foram desnaturadas a 94°C durante 10 minutos e incubadas (anelamento) a temperatura ambiente por 40 minutos para a formação de heteroduplexes.

Primeiramente foram aplicados no gel, com auxílio de ponteiros do tipo “bico de pato”, os éxons de maiores tamanhos (éxons 11A e 13) e submetidos à eletroforese por 1 hora a 15W. Posteriormente, foi aplicado o amplificado genômico do éxon 16 e submetidos à eletroforese por 11 horas a 8W. Os amplificados genômicos dos éxons 10 e 11B foram submetidos à eletroforese por 11 horas a 2W.

Para análise do éxon 14 (amplificados pelos “*primers*” 14A, 14B e 14C) foram testados vários protocolos de formações de heteroduplexes, dentre eles: a) Desnaturação a 94°C durante 5 minutos e anelamento a temperatura ambiente por 40 minutos; b) Desnaturação a 94°C durante 10 minutos e anelamento a 62°C durante 40 minutos; c) Desnaturação a 94°C durante 5 minutos e anelamento a 70°C com decréscimo de 0,3°C a cada 10 segundos até a temperatura ambiente; d) Desnaturação a 94°C durante 5 minutos com decréscimo de 10°C a cada 5 minutos até a temperatura ambiente. Na tentativa de padronização da análise do éxon 14 por CSGE, algumas condições de eletroforese foram também tentadas, dentre elas: a)

Eletroforese por 1 hora a 15W, seguida de 11 horas a 8W; b) Eletroforese por 11 horas a 2W. Para análise do éxon 15 foram testados os seguintes protocolos de formações de heteroduplexes: a) Desnaturação a 94°C durante 5 minutos e anelamento a temperatura ambiente por 40 minutos; b) Desnaturação a 94°C durante 10 minutos e anelamento a 60°C durante 40 minutos. Na tentativa de padronização da análise do éxon 15 por CSGE, algumas condições de eletroforese foram também tentadas, dentre elas: a) Eletroforese por 1 hora a 15W, seguida de 11 horas a 8W; b) Eletroforese por 11 horas a 2W.

4.14.5 Coloração do gel

Ao termino da eletroforese as placas foram desconectadas do sistema de eletroforese e separadas. O gel aderido na placa menor foi submetido a coloração por prata seguindo o seguinte protocolo: 10 minutos em etanol 10%; 3 minutos em solução de ácido nítrico 1%; lavagem em água; 20 minutos em solução de 2 litros de nitrato de prata (2g de nitrato de prata, 3ml de formaldeído 37%) ao abrigo de luz; lavagem em água; revelação com 1 litro de substância reveladora 1 (15g de carbonato de sódio anidro, 1,5ml de formaldeído 37%, q.s.p água gelada) até o revelador ficar marrom; revelação com 1 litro de substância reveladora 2 (15g de carbonato de sódio anidro, 750µl de formaldeído 37%, q.s.p água gelada) observando-se a coloração âmbar das bandas eletroforéticas; 10 minutos em solução de ácido acético

10% (para interromper a coloração); lavagem em água e secagem do gel em temperatura ambiente por 24 horas.

4.15 Polimorfismo conformacional de cadeia simples (Single-strand *conformation polymorphism* - SSCP)

Obedecendo-se as condições previamente descritas de síntese do gel, eletroforese e coloração, foram realizados ensaios com a metodologia do SSCP. Para tanto, variou-se somente o “*Loading Buffer*” (95% de formamida, 10mM NaOH, 0.025% Azul de Bromofenol, 0.025% Xileno cianol) e o repouso em gelo das amostras após desnaturação.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

A Figura 12 exemplifica um gel de agarose após coloração por brometo de etídio, demonstrando a integridade do DNA extraído pela técnica do sal. A Figura 13 exemplifica um gel de agarose após coloração por brometo de etídio, demonstrando a amplificação gênica dos éxons “*hot-spots*” de *RET* após reação de PCR.

Figura 12 – Gel de agarose demonstrando a integridade do DNA extraído pela técnica do sal

Figura 13 – Amplificação gênica dos éxons “hot-spots” de *RET*

5.1 Resultados do seqüenciamento genético

Realizamos o seqüenciamento genético para mutações no *RET* em 184 éxons compreendendo os éxons “hot-spots” dos casos índices e de um indivíduo sob-risco não afetado por NEM-2 em cada família (controle não portador de mutação), além do seqüenciamento genético dos éxons específicos que segregaram mutações e/ou polimorfismos nos demais 50 indivíduos sob risco. As seguintes mutações foram encontradas: a) Éxon 10, Cys620Arg (TGC-CGC) em 5 casos com NEM-2A, 2 casos com NEM-2A associada ao HSCR e 4 casos com CMT-F; b) Éxon 11, Cys634Arg (TGC-CGC) em 12 casos com NEM-2A; c) Éxon 11, Cys634Tyr (TGC-TAC) em 8

casos com CMT-F; d) Éxon 11, Val648Ile (GTC-ATC) em 2 indivíduos onde até o momento a mutação não foi confirmada como causadora de patologia; e) Éxon 14, Val804Met (GTG-ATG) em 3 pacientes com CMT-F; f) Éxon 16, Met918Thr (ATG-ACG) em 1 paciente com NEM-2B.

Polimorfismos nos códonos 691, 769 e 904 foram observados em heterozigose para indivíduos carreadores e não carreadores de mutações causadoras de NEM-2.

As Figuras de 14 a 22 apresentam os eletroferogramas das mutações e polimorfismos encontrados na análise pelo seqüenciamento genético.

Figura 14 – Substituição de timina por citosina (TGC-CGC) no códon 620 (éxon 10) do *RET* traduzindo a mutação Cys620Arg

Figura 15 – Substituição de timina por citosina (TGC-CGC) no códon 634 (éxon 11) do *RET* traduzindo a mutação Cys634Arg

Figura 16 – Substituição de timina por citosina (TGC-TAC) no códon 634 (éxon 11) do *RET* traduzindo a mutação Cys634Tyr

Figura 17 – Substituição de guanina por adenina (GTC-ATC) no códon 648 (éxon 11) do *RET* traduzindo a mutação Val648Ile

Figura 18 – Substituição de guanina por adenina (GGT-AGT) no códon 691 (éxon 11) do *RET* traduzindo o polimorfismo Gly691Ser

Figura 19 – Substituição de timina por guanina (CTT-CTG) no códon 769 (éxon 13) do *RET* traduzindo o polimorfismo Leu769Leu

Figura 20 – Substituição de guanina por adenina (GTG-ATG) no códon 804 (éxon 14) do *RET* traduzindo a mutação Val804Met

Figura 21 – Substituição de citosina por guanina (TCC-TCG) no códon 904 (éxon 15) do *RET* traduzindo o polimorfismo Ser904Ser

Figura 22 – Substituição de timina por citosina (ATG-ACG) no códon 918 (éxon 16) do *RET* traduzindo a mutação Met918Thr

5.2 Correlação genótipo-fenótipo

Dos 64 indivíduos, agrupados em 7 famílias que representaram cada fenótipo característico de NEM-2, 20 pertenceram a duas famílias com NEM-2A (famílias A e B), 10 a uma família com NEM-2A associada ao Hirschsprung (família C), 30 a três famílias com CMT-F (famílias D, E e F) e 4 indivíduos a uma família com NEM-2B (família G). 26 indivíduos pertenceram ao sexo masculino (40,63%) e 38 ao sexo feminino (59,37%). O Gráfico 01 apresenta a distribuição percentual da classificação de NEM-2 entre as 7 famílias estudadas.

Gráfico 1 – Distribuição percentual da classificação de NEM-2 entre as 7 famílias estudadas

Quando acrescidos os casos índices, 35 indivíduos portaram mutações causadoras de patologia no *RET* (54,7%), 2 portaram mutações que até o momento não foram confirmados como causadoras de patologia (3,1%) e 27 indivíduos não portaram mutações (42,2%).

Quando separados os casos afetados em função do sexo, 12 homens e 23 mulheres foram afetados por NEM-2, sendo para NEM-2A (7 homens e 5 mulheres), NEM-2A associada ao HSCR (3 homens e 4 mulheres), CMT-F (2 homem e 13 mulheres) e NEM-2B (1 mulher).

Considerando-se os 35 casos portadores de mutações causadoras de patologia no *RET*, 17 apresentaram NEM-2A (48,6%), 2 NEM-2A associada ao HSCR (5,7%), 15 CMT-F (42,9%) e 1 NEM-2B (2,8%). O Gráfico 02 apresenta a distribuição numérica e percentual da classificação de NEM-2 entre os 35 indivíduos portadores de mutações envolvidos neste estudo.

Gráfico 2 – Distribuição numérica e percentual da classificação de NEM-2 entre os 35 indivíduos portadores de mutações

As mutações no *RET* causadoras de patologia foram: a) Éxon 10, Cys620Arg (TGC-CGC) em 5 casos com NEM-2A, 2 casos com NEM-2A associada ao HSCR e 4 casos com CMT-F (31,4% dos portadores de NEM-2); b) Éxon 11, Cys634Arg (TGC-CGC) em 12 casos com NEM-2A (34,3% dos portadores de NEM-2); c) Éxon 11, Cys634Tyr (TGC-TAC) em 8 casos com CMT-F (22,9% dos portadores de NEM-2); d) Éxon 14, Val804Met (GTG-ATG) em 3 pacientes com CMT-F (8,6% dos portadores de NEM-2); e) Éxon 16, Met918Thr (ATG-ACG) em 1 paciente com NEM-2B (2,8% dos portadores de NEM-2).

Polimorfismos foram observados em indivíduos carreadores e não carreadores de mutações causadoras de NEM-2. Todas as mutações e polimorfismos encontrados apresentaram-se em heterozigose.

A Tabela 09 apresenta a correlação genótipo-fenótipo dos indivíduos afetados por mutações causadoras de patologia no *RET*. As Figuras de 23 a 29 apresentam as genealogias referentes às 7 famílias estudadas indicando mutações e polimorfismos encontrados neste estudo. O Gráfico 03 apresenta a distribuição percentual de polimorfismos nos 64 indivíduos aqui estudados. O gráfico 04 apresenta a distribuição percentual de polimorfismos nos 35 indivíduos portadores de mutações causadoras de patologia no *RET*.

Tabela 9 – Correlação genótipo-fenótipo nos indivíduos afetados por mutações causadoras de patologia no *RET*

Caso	Família	Genealogia	Éxon mutado	Fenótipo	Genótipo	Éxon polimórfico	Polimorfismos
1	A	I-1	11	NEM-2A	Cys634Arg		
2	A	II-1	11	NEM-2A	Cys634Arg		
3	A	II-3	11	NEM-2A	Cys634Arg	11 e 15	Gly691Ser e Ser904Ser
4	A	II-6	11	NEM-2A	Cys634Arg	11 e 15	Gly691Ser e Ser904Ser
5	A	II-8	11	NEM-2A	Cys634Arg	11 e 15	Gly691Ser e Ser904Ser
6	A	III-1	11	NEM-2A	Cys634Arg		
7	A	III-2	11	NEM-2A	Cys634Arg		
9	A	III-4	11	NEM-2A	Cys634Arg		
11	A	III-6	11	NEM-2A	Cys634Arg		
12	A	III-7	11	NEM-2A	Cys634Arg		
16	B	II-3	11	NEM-2A	Cys634Arg	11 e 15	Gly691Ser e Ser904Ser
17	B	II-5	11	NEM-2A	Cys634Arg	11 e 15	Gly691Ser e Ser904Ser
21	C	II-1	10	NEM-2A	Cys620Arg	11 e 15	Gly691Ser e Ser904Ser
22	C	II-4	10	NEM-2A	Cys620Arg	11 e 15	Gly691Ser e Ser904Ser
24	C	III-2	10	NEM-2A	Cys620Arg	11 e 15	Gly691Ser e Ser904Ser
25	C	III-3	10	NEM-2A	Cys620Arg	11 e 15	Gly691Ser e Ser904Ser
27	C	III-5	10	NEM-2A+ HSCR	Cys620Arg	11 e 15	Gly691Ser e Ser904Ser
28	C	III-6	10	NEM-2A+ HSCR	Cys620Arg	11, 13 e 15	Gly691Ser, Leu769Leu e Ser904Ser
30	C	III-8	10	NEM-2A	Cys620Arg	11 e 15	Gly691Ser e Ser904Ser
31	D	I-2	10	CMT-F	Cys620Arg		
32	D	II-1	10	CMT-F	Cys620Arg		
33	D	II-3	10	CMT-F	Cys620Arg		
34	D	II-5	10	CMT-F	Cys620Arg		
41	E	II-1	11	CMT-F	Cys634Tyr		
42	E	II-2	11	CMT-F	Cys634Tyr		
43	E	II-4	11	CMT-F	Cys634Tyr		
44	E	III-1	11	CMT-F	Cys634Tyr		
45	E	III-2	11	CMT-F	Cys634Tyr		
46	E	III-3	11	CMT-F	Cys634Tyr		
49	E	III-6	11	CMT-F	Cys634Tyr		
53	E	III-10	11	CMT-F	Cys634Tyr		
54	F	I-2	14	CMT-F	Val804Met	13	Leu769Leu
55	F	II-1	14	CMT-F	Val804Met		
56	F	II-2	14	CMT-F	Val804Met		
64	G	II-2	16	NEM-2B	Met918Thr

Família A (NEM-2A)

Figura 23 – Genealogia da família A portadora de NEM-2A

Família B (NEM-2A)

Figura 24 – Genealogia da família B portadora de NEM-2A

Família C (NEM-2A associado ao HSCR)

Figura 25 – Genealogia da família C portadora de NEM-2A associada ao megacólon (HSCR)

Família D (CMT-F)

Figura 26 – Genealogia da família D portadora de CMT-F

Família E (CMT-F)

Figura 27 – Genealogia da família E portadora de CMT-F

Família F (CMT-F)

Figura 28 – Genealogia da família F portadora de CMT-F

Figura 29 – Genealogia da família G portadora de NEM-2B

Legendas: Os símbolos representam as categorias de indivíduos segundo suas apresentações patológicas nas figuras 23, 24, 25, 26, 27, 28 e 29

- ○ Indivíduos não portadores de mutações no proto-oncogene RET (Não portadores de NEM-2).
- ● Indivíduos portadores de mutações no proto-oncogene RET (Portadores de NEM-2)
- ◻ ◐ Indivíduos portadores de mutações no proto-oncogene RET (Portadores de HSCR)
- ☐ ☒ Indivíduos falecidos

Gráfico 3 – Distribuição percentual de polimorfismos nos 64 indivíduos estudados

Gráfico 4 – Distribuição percentual de polimorfismos nos 35 indivíduos portadores de mutações causadoras de patologia no *RET*

A família A (NEM-2A) apresentou substituição de timina por citosina (TGC-CGC) no códon 634, o que traduziu a mutação Cys634Arg em 10 indivíduos (I-1, II-1, II-3, II-6, II-8, III-1, III-2, III-4, III-6, III-7). Os familiares (III-5 e III-8) não apresentaram mutações relativas a NEM-2. Os polimorfismos Gly691Ser e Ser904Ser foram demonstrados pelos indivíduos portadores de mutações no *RET* (II-3, II-6 e II-8) e por não portadores de mutações (III-5 e III-8).

A família B (NEM-2A) apresentou a substituição de timina por citosina (TGC-CGC) no códon 634, o que traduziu a mutação Cys634Arg em dois indivíduos com CMT (II-3 e II-5). Dois outros irmãos que portaram a mutação Val648Ile não apresentaram sintomas associados a NEM-2 (II-1 e II-6). O pai (I-1) era portador obrigatório da dupla mutação Cys634Arg/Val648Ile e os familiares (I-2, III-1 e III-2) não apresentaram mutações relativas a NEM-2. Os polimorfismos Gly691Ser e Ser904Ser foram demonstrados pelos indivíduos portadores de mutações no *RET* (II-3 e II-5) e por não portadores de mutações (I-2, II-6 e III-2).

A família C (NEM-2A associada ao HSCR) apresentou a substituição de timina por citosina (TGC-CGC) no códon 620, o que traduziu a mutação Cys620Arg em 5 portadores de CMT (II-1, II-4, III-2, III-3, III-8) e 2 portadores de megacólon congênito de segmento curto (III-5 e III-6), onde o CMT não foi identificado até o momento. Os familiares III-1, III-4 e III-7 não apresentaram mutações relativas a NEM-2. Os polimorfismos Gly691Ser e Ser904Ser foram apresentados pelos indivíduos portadores de mutações no *RET* (II-1, II-4, III-2, III-3, III-5, III-6 e III-8) e Leu769Leu pelo indivíduo (III-6).

A família D (CMT-F) apresentou a substituição de timina por citosina (TGC-CGC) no códon 620, o que traduziu a mutação Cys620Arg em 4 portadores de CMT (I-2, II-1, II-3 e II-5).

A família E (CMT-F) apresentou a substituição de guanina por adenina (TGC-TAC) no códon 634, o que traduziu a mutação Cys634Tyr em 8 portadores de CMT (II-1, II-2, II-4, III-1, III-2, III-3, III-6 e III-10).

A família F (CMT-F) apresentou a substituição de guanina por adenina (GTG-ATG) no códon 804, o que traduziu a mutação Val804Met em 3 portadores de CMT (I-2, II-1 e II-2). O polimorfismo Leu769Leu foi apresentado pelo indivíduo portador de mutação no *RET* (I-2) e não portador de mutação (III-1).

A família G (NEM-2B) apresentou a substituição de timina por citosina (ATG-ACG) no códon 918, o que traduziu a mutação Met918Thr em 1 portador de CMT (II-2). Os familiares (I-1, I-2 e II-1) não apresentaram mutações relativas a NEM-2. O caso de NEM-2B desta família caracterizou-se como mutação “*de novo*”. Os polimorfismos Gly691Ser e Ser904Ser foram apresentados pelos indivíduos não portadores de mutações no *RET* (I-2 e II-1).

A tireoidectomia total foi indicada para todos os 35 portadores de mutações patogênicas no *RET*. Os demais 27 pacientes que não apresentaram mutação no *RET* foram dispensados de subseqüentes acompanhamentos médicos. Os 2 pacientes portadores da mutação no códon 648, que até o momento não foi caracterizada como causadora de NEM-2, seguem em acompanhamento clínico.

5.3 Resultados do CSGE

Para o rastreamento de mutações no *RET* realizamos 128 análises, sendo 116 (90,6%) concordantes entre dados do CSGE e seqüenciamento genético. As 12 análises (9,4%) não concordantes correspondem ao padrão de mutação sem diferenciação migratória eletroforética (códon 804). Quanto ao rastreamento de polimorfismos realizamos 168 análises, sendo 100 (59,5%) concordantes entre dados do CSGE e seqüenciamento genético. As 68 análises (40,5%) não concordantes correspondem ao padrão polimórfico com baixa reprodutibilidade de diferenciação migratória eletroforética (códon 904).

As seguintes correlações genótipo-fenótipo foram encontradas mediante rastreamento por CSGE: a) Éxon 10, Cys620Arg (TGC-CGC) em 5 casos com NEM-2A, 2 casos com NEM-2A associada ao HSCR e 4 casos com CMT-F; b) Éxon 11, Cys634Arg (TGC-CGC) em 12 casos com NEM-2A; c) Éxon 11, Cys634Tyr (TGC-TAC) em 8 casos com CMT-F; d) Éxon 11, Val648Ile (GTC-ATC) em 2 indivíduos onde até o momento a mutação não foi confirmada como causadora de patologia; e) Éxon 16, Met918Thr (ATG-ACG) em 1 paciente com NEM-2B. Os Polimorfismos Gly691Ser (GGT-AGT) e Leu769Leu (CTT-CTG) foram encontrados em indivíduos portadores de mutações causadoras de patologia (13 pacientes), portadores de mutação não confirmada como causadora de patologia (1 indivíduo) e não portadores de mutações *RET* (7 indivíduos).

A metodologia CSGE para rastreamento de variações genéticas no *RET* apresentou-se sensível e específica para análise dos éxons 10, 11, 13 e 16. Para a mutação Val804Met (éxon 14) não obtivemos padrões migratórios eletroforéticos diferenciáveis entre os códons carreadores ou não de mutação. Da mesma forma, para o polimorfismo Ser904Ser (éxon 15) não obtivemos reprodutibilidade dos padrões eletroforéticos.

5.4 Resultados do SSCP

Para o rastreamento de mutações e polimorfismos no *RET* mediante SSCP selecionamos um grupo composto por 38 indivíduos compreendendo os seguintes perfis genotípicos: 4 indivíduos carreadores da mutação Cys620Arg em conjunto aos polimorfismos Gly691Ser e Ser904Ser; 3 Cys634Arg; 3 Cys634Tyr; 2 Val648Ile; 3 Val804Met; 1 Met918Thr; 3 Leu769Leu e 19 indivíduos controles negativos. Considerando-se a análise de mutações, 16 indivíduos eram portadores das mutações no *RET* e 19 controles não mutantes. Dos 70 éxons analisados, 58 (83%) foram concordantes entre achados do SSCP e CSGE. As 12 análises (17%) não concordantes corresponderam ao padrão de mutação sem diferenciação migratória eletroforética (códon 804). Para o rastreamento de polimorfismos, 4 indivíduos carreadores dos polimorfismos nos códons 691 e 904 foram selecionados, assim como 3 carreadores de polimorfismo no códon 769 e 12 controles saudáveis. Dos 46 éxons analisados, 30 (65%) foram

concordantes entre achados do SSCP e CSGE. As 16 análises (35%) não concordantes correspondem ao padrão de polimorfismo (Ser904Ser) sem reprodutibilidade dos padrões eletroforéticos. As análises realizadas por SSCP apresentaram mesmos padrões migratórios eletroforéticos e 100% de correlações com os resultados obtidos pelo rastreamento por CSGE. As Figuras de 30 a 39 apresentam diferenciações nos padrões migratórios eletroforéticos entre indivíduos portadores e não portadores de mutações e polimorfismos mediante análises por CSGE e SSCP. As Figuras de 40 a 50 apresentam exemplos de géis de CSGE e SSCP em MDE.

Figura 30 – Padrão eletroforético diferencial obtido por CSGE de mutação no éxon 10: Não mutante à esquerda e mutante Cys620Arg à direita

Figura 31 – Padrão eletroforético diferencial obtido por SSCP de mutação no éxon 10: Não mutante à esquerda e mutante Cys620Arg à direita

Figura 32 – Padrões eletroforéticos diferenciais obtidos por CSGE de mutações no éxon 11: Não mutante à esquerda; Cys634Arg e Cys634Tyr ao centro; Val648Ile à direita (“primers” 11B)

Figura 33 – Padrões eletroforéticos diferenciais obtidos por SSCP de mutações no éxon 11: Não mutante à esquerda; Cys634Arg e Cys634Tyr ao centro e Val648Ile à direita (“primers” 11B)

Figura 34 – Padrão eletroforético diferencial obtido por CSGE de polimorfismo no éxon 11: Padrão eletroforético não diferenciado (Não mutante e mutantes) à esquerda e Gly691Ser à direita (“*primers*” 11A)

Figura 35 – Padrão eletroforético diferencial obtido por SSCP de polimorfismo no éxon 11: Padrão eletroforético não diferenciado (Não mutante e mutantes) à esquerda e Gly691Ser à direita (“*primers*” 11A)

Figura 36 – Padrão eletroforético diferencial obtido por CSGE de polimorfismo no éxon 13: Não polimórfico à esquerda e polimórfico Leu769Leu à direita

Figura 37 – Padrão eletroforético diferencial obtido por SSCP de polimorfismo no éxon 13: Não polimórfico à esquerda e polimórfico Leu769Leu à direita

Figura 38 – Padrão eletroforético diferencial obtido por CSGE de mutação no éxon 16: Não mutante à esquerda e mutante Met918Thr à direita

Figura 39 – Padrão eletroforético diferencial obtido por SSCP de mutação no éxon 16: Não mutante à esquerda e mutante Met918Thr à direita

Figura 40 – Gel de MDE com padrões diferenciais para o rastreamento de mutação no éxon 10 do *RET*: As aplicações 1, 3 e 5 representam indivíduos não portadores de mutação no códon 620. As aplicações 2, 4 e 6 representam indivíduos portadores da mutação Cys620Arg rastreados por CSGE

Figura 41 – Gel de MDE com padrões diferenciais para o rastreamento de mutação no éxon 10 do *RET*: As aplicações 1, 3 e 5 representam indivíduos não portadores de mutação no códon 620. As aplicações 2, 4 e 6 representam indivíduos portadores da mutação Cys620Arg rastreados por SSCP

Figura 42 – Gel de MDE com padrões diferenciais para o rastreamento de mutações no éxon 11 do *RET*: (“*primers*” 11B): As aplicações 1 e 2 representam indivíduos não portadores de mutação no códon 634. A aplicação 3 representa indivíduo portador da mutação Cys634Arg. A aplicação 4 representa indivíduo portador da mutação Cys634Tyr rastreados por CSGE

Figura 43 – Gel de MDE com padrões diferenciais para o rastreamento de mutações no éxon 11 do *RET*: (“*primers*” 11B): A aplicação 1 representa indivíduo não portadores de mutação no códon 634. As aplicações 2, 3 e 4 representam indivíduos portadores da mutação Cys634Arg. As aplicações 5 e 6 representam indivíduos portadores da mutação Cys634Tyr rastreados por SSCP

Figura 44 – Gel de MDE com padrões diferenciais para o rastreamento de mutação no éxon 11 do *RET*: (“primers” 11B): As aplicações 1, 2, 3 e 4 representam indivíduos não portadores de mutação no códon 634. As aplicações 5, 6, 7 e 8 representam indivíduos portadores da mutação Val648Ile rastreados CSGE

Figura 45 – Gel de MDE com padrões diferenciais para o rastreamento de mutação no éxon 11 do *RET*: (“*primers*” 11B): As aplicações 1, 2 e 3 representam indivíduos não portadores de mutação no códon 634. As aplicações 4, 5 e 6 representam indivíduos portadores da mutação Val648Ile rastreados SSCP

Figura 46 – Gel de MDE com padrões diferenciais para o rastreamento de polimorfismo no éxon 11 do *RET*: (“*primers 11A*”): As aplicações 1 e 2 representam padrões não diferenciados para o éxon 11 do *RET* (Não mutante e mutantes) rastreados respectivamente por SSCP e CSGE. As aplicações 3 e 4 correspondem a controles internos para aferir a qualidade do gel e coloração (“*Mass ladder*”). As aplicações 5, 6, 7 e 8 representam indivíduos portadores do polimorfismo Gly691Ser rastreados por SSCP (5 e 7) e CSGE (6 e 8)

Figura 47 – Gel de MDE com padrões diferenciais para o rastreamento de polimorfismo no éxon 13 do *RET*: As aplicações 1 e 3 representam indivíduos não portadores de polimorfismo no códon 769. As aplicações 2, 4 e 5 representam indivíduos portadores do polimorfismo Leu769Leu rastreados por CSGE

Figura 48 – Gel de MDE com padrões diferenciais para o rastreamento de polimorfismo no éxon 13 do *RET*: As aplicações 1 e 3 representam indivíduos não portadores de polimorfismo no códon 769. A aplicação 2 representa indivíduo portador do polimorfismo Leu769Leu rastreados por SSCP

Figura 49 – Gel de MDE com padrões diferenciais para o rastreamento de mutação no éxon 16 do *RET*: As aplicações 1, 2, 4, 5 e 6 representam indivíduos não portadores de mutação no códon 918. A aplicação 3 representa indivíduo portador da mutação Met918Thr rastreados por CSGE

Figura 50 – Gel de MDE com padrões diferenciais para o rastreamento de mutação no éxon 16 do *RET*: As aplicações 1 e 3 representam indivíduos não portadores de mutação no códon 918. A aplicação 2 representa indivíduo portador da mutação Met918Thr rastreados por SSCP

Comparando os dados obtidos nas análises realizadas por SSCP e CSGE com o seqüenciamento genético de mutações *RET* observamos que 58 éxons analisados (83%) foram concordantes entre as metodologias. Da mesma forma, para o estudo de polimorfismos observamos que 30 éxons analisados (65%) foram concordantes entre as três metodologias.

Mediante aos rastreamentos por CSGE e SSCP em nossos pacientes, detectamos cinco das seis mutações (83,3%) *RET* verificadas pelo seqüenciamento genético direto.

As tabelas 10 e 11 apresentam um comparativo entre a sensibilidade de detecção das mutações e polimorfismos envolvidos neste estudo.

Tabela 10 – Comparativo entre a sensibilidade de detecção das mutações envolvidas neste estudo

Éxons estudados	Seqüenciamento automático	CSGE	SSCP	Mutações encontradas
10	Sensível	Sensível	Sensível	Cys620Arg
11	Sensível	Sensível	Sensível	Cys634Arg; Cys634Tyr Val648Ile
14	Sensível	Não Sensível	Não Sensível	Val804Met
16	Sensível	Sensível	Sensível	Met918Thr

Tabela 11 – Comparativo entre a sensibilidade de detecção dos polimorfismos envolvidos neste estudo

Éxons estudados	Seqüenciamento automático	CSGE	SSCP	Polimorfismos encontrados
11	Sensível	Sensível	Sensível	Gly691Ser
13	Sensível	Sensível	Sensível	Leu769Leu
15	Sensível	Não Sensível	Não Sensível	Ser904Ser

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O diagnóstico molecular do *RET* promoveu um enorme impacto na conduta clínica para portadores de NEM-2, uma vez que se tornou possível discriminar em fase ultraprecoce portadores e não-portadores de mutações no *RET*. Após a caracterização dos não-portadores de mutações, estes foram liberados do seguimento clínico, enquanto que os portadores de mutações foram direcionados para tireoidectomia total (Toledo *et al.*, 2006).

Desde 1997, consensualmente decidiu-se que a indicação de tireoidectomia total deve ter como base a identificação de mutações no *RET*. Esta conduta alterou profundamente o curso clínico do CMT, levando a cura os casos em que a cirurgia foi realizada anteriormente aos 5 anos de idade. Os pontos importantes para estas recomendações foram: a) Boa tolerância das crianças afetadas à cirurgia; b) Ausência de resultados *RET* falso-positivos, que ocorre em até 10% dos testes bioquímicos (Gagel, 1996; Brandi *et al.*, 2001).

Com o tempo, o diagnóstico molecular tornou-se importante ferramenta no auxílio da redução de morbidade e mortalidade da doença possibilitando a realização da tireoidectomia precoce e investigação de FEO

e HPT. Estas possibilidades consistiram em oferecer tratamento precoce alterando de modo concreto a história natural da doença e sobrevida destes pacientes (Toledo *et al.*, 2006). Estudos japoneses mostraram que as taxas de sobrevida ao longo de 5 anos de acompanhamento pós-cirúrgico em portadores de NEM-2 elevaram-se mediante diagnóstico precoce, sendo 100% para portadores de CMT-F, 96,9% para portadores de NEM-2A, 90,8% para portadores de CMT esporádico e 73,8% para portadores NEM-2B (Kameyama *et al.*, 2004).

Segundo Donis-Keller e colaboradores (1993) e Wells Jr e colaboradores (2000) os fundamentos para o sucesso do rastreamento genético na NEM-2 foram: a) A síndrome foi diretamente causada por mutações no *RET*; b) Estas mutações foram herdadas por todos os membros afetados em uma família; c) Modelos biológicos confirmaram a patogenicidade destas mutações; d) As mutações no *RET* foram agrupadas em seis éxons, criando “*hot-spots*”; e) A cirurgia profilática possuiu morbidade relativamente baixa (Donis-Keller *et al.*, 1993; Wells Jr *et al.*, 2000).

6.1 Correlação genótipo-fenótipo

Quanto à natureza das mutações foi observado que a forma hereditária da NEM-2 apresentou-se geneticamente transmitida por herança autossômica dominante com correlações genótipo-fenótipo concordantes

com os dados da literatura (Frank-Raue *et al.*, 1996; Eng, 1999; Hoff *et al.*, 2000; Brandi *et al.*, 2001; Hemminki *et al.*, 2001; Koch *et al.*, 2002; Lombardo *et al.*, 2002; Maher *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2003).

Para os indivíduos envolvidos neste estudo, as mutações nos éxons 10, 11 e 16 do *RET* foram observadas em 91,4% dos portadores de mutações causadoras de patologia, o que se aproximou aos 90% referidos na literatura (Gagel *et al.*, 1996).

6.1.1 Discussões referentes a cada família

A família A apresentou um paciente (I-1) sem sintomatologia nem evidências bioquímicas ou de imagens relacionadas ao CMT até os 70 anos de idade. Neste caso específico, o surgimento tardio de CMT apresentou relação com tumor de biologia indolente. Segundo a literatura aproximadamente 30% dos portadores de mutação no *RET* não desenvolvem qualquer sintomatologia até esta idade, sugerindo penetrância genética incompleta do proto-oncogene mutado. Segundo alguns autores outros agentes moduladores da expressão fenotípica de NEM-2, além dos polimorfismos observados nos éxons “*hot-spots*”, podem alterar o curso biológico do CMT levando a penetrância incompleta do *RET* mutado e expressão tardia da doença (Eng, 1999; Schuurman *et al.*, 2001; Quayle *et al.*, 2004).

A família B apresentou desenvolvimento clássico de NEM-2, exceto por dois parentes sob-risco (II-1 e II-6) que portaram a mutação Val648Ile e não desenvolveram sintomas associados a NEM-2. O pai, caso índice (I-1), era portador obrigatório da dupla mutação Cys634Arg/Val648Ile, sendo a primeira mutação que segregou a doença nesta família. Os relatos iniciais referentes ao caso índice foram colhidos em 1988, onde constataram síndrome de Cushing e nódulos adrenais bilaterais. Este paciente foi submetido a adrenalectomia bilateral, onde se observou presença de feocromocitoma bilateral e hiperplasia cortical adrenal. O desenvolvimento do CMT no paciente (I-1) mostrou evolução relativamente branda com FEO secretor ectópico de hormônio estimulante do córtex adrenal (ACTH), fenótipo extremamente raro que discutivelmente pode ser atribuído à atividade moduladora da segunda mutação no códon 648. Nove anos depois, o caso índice faleceu por isquemia no miocárdio.

A família C apresentou 2 portadores de megacólon congênito de segmento curto (III-5 e III-6) sem evidências de CMT. Entretanto, ambos pacientes foram encaminhados para o grupo de cirurgia de cabeça e pescoço levando-se em conta o enquadramento nos critérios do consenso para tireoidectomia total profilática, por apresentarem idades de 18 e 10 anos respectivamente e carregarem a mutação Cys620Arg.

A família D apresentou 4 indivíduos portador de CMT com mutação no *RET* (I-2, II-1, II-3 e II-5) e idades diagnósticas de 55, 27, 15 e 12 anos respectivamente. Da mesma forma, a família E apresentou 8 indivíduos

portadores de CMT com mutação no *RET* (II-1, II-2, II-4, III-1, III-2, III-3, III-6 e III-10) e idades diagnósticas entre 55 a 4 anos.

A família F demonstrou curso tumoral lento e menos agressivo, provavelmente devido à baixa penetrância da mutação no códon 804, onde os indivíduos afetados foram diagnosticados aos 82, 53 e 51 anos em acordo com demais autores (Eng, 1999; Antinolo *et al.*, 2002; Lombardo *et al.*, 2002; Brauckhoff *et al.*, 2004; Jindrichova *et al.*, 2004).

A família G apresentou somente um indivíduo portador de CMT com mutação no *RET* (II-2) cuja paternidade foi confirmada. O caso de NEM-2B desta família caracterizou-se como mutação “*de novo*”, segundo descrito na literatura em até 50% dos casos de NEM-2B (Brandi *et al.*, 2001; Punales *et al.*, 2002). Segundo o consenso para este fenótipo a importância do rastreamento genético reside principalmente no diagnóstico precoce dos casos sob-risco e tratamento cirúrgico profilático antes dos 6 meses de vida (Brandi *et al.*, 2001).

6.1.2 Discussões referentes aos polimorfismos

Os polimorfismos discutivelmente interagem alterando o curso do fenótipo, morbidez e idade de surgimento da NEM-2 (Robledo *et al.*, 2003; Wiench *et al.*, 2004; Baumgartner-Parzer *et al.*, 2005; Cebrian *et al.*, 2005; Wohllk *et al.*, 2005).

Neste estudo foram observados polimorfismos em indivíduos afetados ou não por mutações em *RET*. Nas famílias portadoras de NEM-2A (famílias A e B) e NEM-2B (família G), os polimorfismos Gly691Ser e Ser904Ser apresentaram-se segregados em conjunto pelo lado materno. Para a família C ambos polimorfismos apresentaram-se segregados em conjunto à mutação no códon 620.

Estudos espanhóis relataram que os polimorfismos nos códons 691 e 904 independem quanto à expressão do CMT, FEO ou HPT. Segundo Elisei e Bottici (2004) o polimorfismo no códon 691 apresentou maior frequência em portadores de CMT (27,83%) quando comparado à população controle (18,86%). O polimorfismo no códon 691 pareceu auxiliar na dimerização através da criação de sitio de fosforilação sensível ao resíduo de serina, desencadeando um estágio de fosforilação da cascata intracelular de sinalização no processo mitogênico. Mediante modelos computacionais, outros autores propuseram que a mudança de aminoácido trouxe modificações na distribuição numéricas de ligações alfa-hélices e cadeia beta protéica, diminuindo as proporções de resíduos hidrofílicos (Cebrian *et al.*, 2005).

Demais autores creditaram o surgimento de patologia 10 anos antes para portadores de polimorfismos em homozigose quando comparados aos portadores de polimorfismos em heterozigose ou não portadores (Robledo *et al.*, 2003; Wiench *et al.*, 2004; Baumgartner-Parzer *et al.*, 2005). Esta relação não foi avaliada neste estudo, devido apresentação de polimorfismos em heterozigose. Outros autores mais extremistas afirmam que o polimorfismo

no códon 691 não possui relação com a frequência de CMT (Wohlk *et al.*, 2005).

Magalhaes e colaboradores (2004) sugeriram que o polimorfismo Leu904Leu modulou a maior penetrância da mutação no codon 804 devido expressão de CMT-F em paciente aos 32 anos de idade. Em nossa paciente (Família F, I-2) o CMT apresentou expressão tardia aos 82 anos de idade. Segundo Wiench e colaboradores (2001) os pacientes com CMT diagnosticados antes dos 30 anos de idade apresentaram maiores frequências de polimorfismo no códon 769 (36%) quando comparados aos pacientes com CMT diagnosticado mais tardiamente (15%), sugerindo que esta variante polimórfica poderia modular a apresentação fenotípica em indivíduos com predisposição genética para CMT. Robledo e colaboradores (2003) afirmaram que o polimorfismo no códon 904 possivelmente alterou a expressão e estabilidade do RNA, gerou diferentes tamanhos de RNA mensageiro e alterou a expressão fenotípica da NEM-2. Para Baumgartner-Parzer e colaboradores (2005) o polimorfismo no códon 904 foi mais comumente descrito em associação a mutações no códon 791.

A paciente com HSCR (família C; III-6) apresentou os polimorfismos Gly691Ser, Leu769Leu e Ser904Ser. Neste caso, o polimorfismo no códon 769 foi oriundo do lado paterno não afetado por CMT. Alguns autores reportam que o polimorfismo nos códon 769 apresenta-se com o dobro da frequência quando comparado à população não afetada por NEM-2 (Borrego *et al.*, 1998; Borrego *et al.*, 1999; Pasini *et al.*, 2002; Solari *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005). Outro paciente portador de HSCR desta família (III-5)

apresentou os polimorfismos Gly691Ser e Ser904Ser, que foram descritos como fracamente associados ao HSCR (Borrego *et al.*, 1998; Borrego *et al.*, 1999; Pasini *et al.*, 2002; Solari *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005). Entretanto, os pacientes portadores de mutações no códon 620 apresentaram polimorfismos nos códons 691 e 904 co-segregados no mesmo alelo.

Em nossa casuística 33% dos indivíduos estudados apresentaram polimorfismos. Dentre os 35 indivíduos portadores de mutações causadoras de patologia no *RET*, 37% apresentaram polimorfismos. Apesar dos dados literários referentes às correlações genótipo-fenótipo dos polimorfismos serem controversos, diferenças entre “*backgrounds*” genéticos de populações e etnias possivelmente contribuíram com resultados diversos referentes às prevalências e atuações na penetrância do CMT. Portanto, somente estudos de expressões gênicas de polimorfismos associados ou não as mutações e seus respectivos fenótipos em modelos murinos ou em células humanas poderão avaliar a real modulação que os polimorfismos exerceram sobre a NEM-2.

6.2 Discussões referentes às metodologias de rastreamento e seqüenciamento genético

Quanto à escolha da metodologia de rastreamento para mutações genéticas no *RET* foram consideradas a praticidade, custo-benefício, sensibilidade e especificidade do método em comparação ao

seqüenciamento genético direto “padrão-ouro” (Santos *et al.*, 2006). Também analisamos as diferenças entre os custos financeiros referentes à aquisição do seqüenciador (Modelo 310 - R\$ 141.221,28), aplicativos (R\$ 37.781,13) e éxon analisado (R\$ 41,51 por éxon analisado considerando-se somente os gastos com reagentes laboratoriais referentes ao seqüenciamento genético) em comparação aos custos apresentados pelo CSGE (R\$ 1,37 por éxon analisado considerando-se somente os gastos com reagentes laboratoriais referentes ao CSGE). Outra necessidade inerente ao uso do seqüenciador genético foi o treinamento específico, o que poucos centros no Brasil estão capacitados a realizar (Santos *et al.*, 2006).

Considerando estas condições, vários centros de pesquisas desenvolveram protocolos de rastreamento genético. Entre estes, os clássicos são o uso de enzima de restrições (ER), polimorfismo conformacional de cadeia simples (SSCP), eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) e Cromatografia desnaturante líquida de alta performance (DHPLC). (Korkko *et al.*, 1998; Bugalho *et al.*, 2002; Frediani, 2002; Lombardo *et al.*, 2002; Solari *et al.*, 2003).

Estudos apontaram que a metodologia DHPLC, que utiliza o sistema Wave, apresenta sensibilidades entre 95 e 100%, apesar do custo para aquisição do aparelho ser de aproximadamente R\$ 160.000 (Solari *et al.*, 2003). Segundo alguns autores o uso de metodologias como enzima de restrição e SSCP tornaram-se menos confiáveis quando avaliados alguns aspectos teóricos. Os ensaios de enzimas de restrição limitaram-se a confirmação da mutação rastreada uma vez que: a) Necessitam da

existência de sítios de restrições e prévios conhecimentos das mutações específicas que segregam nas famílias; b) Possuíram variações de reprodutibilidade devido a possíveis interferentes como não reconhecimento do sítio de restrição do produto amplificado, separação incompleta ou não separação de fragmentos com tamanhos aproximados resultando em não diferenciação destes fragmentos em gel de agarose (Korkko *et al.*, 1998; Bugalho *et al.*, 2002; Frediani, 2002; Lombardo *et al.*, 2002). Na experiência da UEG, os ensaios com enzimas de restrições apresentaram total correlação com o seqüenciamento genético (Frediani, 2002).

Os mesmos autores reportaram que ensaios de SSCP podem apresentar sensibilidade de aproximadamente 80% para fragmentos menores de 300pb, além de padronização empírica por não haver programas de computadores que predizem o padrão eletroforético durante a corrida eletroforética (Korkko *et al.*, 1998; Bugalho *et al.*, 2002; Frediani, 2002; Lombardo *et al.*, 2002; Balogh *et al.*, 2004). Entretanto, outros estudos utilizando SSCP para rastreamento de mutações nos éxons 10, 11 e 16 do *RET* demonstraram sensibilidades entre 95 e 100% (Siegelman *et al.*, 1997; Gonzalez *et al.*, 2003). Nossos dados mostraram que a metodologia de SSCP apresentou 100% de correlação quando comparada ao CSGE.

Trabalhos mais recentes apresentaram o DGGE como uma metodologia mais sensível e confiável que o SSCP, de protocolo não radioativo que possibilitou pouca manipulação operacional, não necessitou de prévio conhecimento da mutação específica que segrega na família e não dependeu da existência de sítios de restrições. No estudo de Nunes (2001) o

DGGE apresentou total correlação com o seqüenciamento genético. Entretanto, outros autores demonstraram menores sensibilidades (82%) na aplicação desta metodologia (Balogh *et al.*, 2004). Algumas desvantagens referentes ao DGGE foram apontadas tais como: a) Necessidade de análise computacional da temperatura de desnaturação de cada seguimento para correlação com as concentrações desnaturantes de cada éxon em estudo no gel; b) Investimento inicial para aquisição do sistema de eletroforese específico; c) Maiores custos para síntese dos primers especiais com cauda de guanina-citosina; d) Difícil padronização para genes ricos em guaninas e citosinas e não detecção de polimorfismos (Nunes, 2001; Nunes *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2006).

Neste estudo apresentou-se a aplicação do CSGE para o rastreamento de mutações no *RET* em 7 famílias com NEM-2 que representaram os fenótipos e genótipos típicos desta síndrome. Segundo a experiência obtida na análise do CSGE e os achados referidos por Korkko e colaboradores (1998) esta metodologia apresentou como vantagens: a) Boa sensibilidade para detecção de mutações; b) Protocolo não radioativo; c) Possibilitou pouca manipulação operacional; d) Não necessitou de prévio conhecimento da mutação específica que segregou na família; e) Independeu da existência de sítios de restrições; f) Não necessitou de diferentes concentrações de gradiente de desnaturação para cada éxon estudado; g) Não necessitou de aplicativo específico para o cálculo das concentrações desnaturantes em correlação a temperatura de desnaturação da dupla fita; h) Não necessitou da adição de seqüências nitrogenadas

extras aos “*primers*” (cauda GC); i) Necessitou somente de simples aparato de eletroforese vertical; j) Apresentou fácil padronização para mutações localizadas em éxons variando entre 100 e 200pb.

Através do CSGE rastrearam-se 128 éxons para pesquisa de mutações no *RET*, sendo 116 (90,6%) concordantes entre os dados do CSGE e seqüenciamento genético. Para a mutação no códon 804 testamos 3 conjuntos de “*primers*” e vários protocolos para favorecer a formação de heteroduplexes. Ocasionalmente, a mutação em questão no éxon 14 foi detectada mediante uso do DGGE como metodologia de rastreamento (Nunes, 2001; Nunes *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2006).

Quanto ao rastreamento de polimorfismos realizaram-se 168 análises, sendo 100 (59,5%) concordantes entre dados do CSGE e seqüenciamento genético. As 68 análises (40,5%) não concordantes corresponderam ao padrão polimórfico com baixa reprodutibilidade de diferenciação migratória eletroforética (códon 904). É importante ressaltar que no artigo publicado por Kambouris e colaboradores (1996) os éxons 14 e 15 não foram rastreados por CSGE, assim como a sensibilidade do método não foi formalmente reportada. Possivelmente o não rastreamento do éxon 14 no trabalho em questão deveu-se a baixa freqüência da mutação Val804Met na população afetada por NEM-2, aproximadamente 3% segundo a literatura (Eng, 1999; Frohnauer *et al.*, 2000; Hoff *et al.*, 2000; Brandi *et al.*, 2001; Machens *et al.*, 2001).

Segundo Korkko e colaboradores (1998) Ganguly e colaboradores (1993 e 2002) e Fard-Esfahani e colaboradores (2005) alguns dos fatores

que diminuem a sensibilidade do CSGE são: a) Localização dos “*mismatches*” do heteroduplexes ao longo de 50pb das extremidades do amplificado genômico; b) Estarem flanqueados por seqüências ricas em citosina ou guanina causando elevada estabilidade conformacional da região; c) Localizarem-se dentro de domínio de elevada temperatura de “*melting*” (TM). A tabela 12 apresenta a localização da mutação e do polimorfismo com padrões eletroforéticos não diferenciados por CSGE e SSCP. Esta tabela evidencia os “*primers forward*” e “*reverse*”, além da região mutada e polimórfica. É possível observar que as regiões em estudo apresentaram-se fora da porção compreendida pelos 50pb flanqueadores do amplificado genético. O Gráfico 05 apresenta as diferenças entre as temperaturas de “*melting*” (TM) das seqüências não diferenciadas pelo rastreamento genético. É possível notar que a mutação Val804Met localizou-se em uma região de TM intermédio em relação à seqüência completa do amplificado. Da mesma forma, o polimorfismo Ser904Ser apresentou-se em uma região próxima ao aumento do TM do éxon estudado. Segundo os autores acima citados estes fatos apresentaram-se como possíveis motivos para diminuição da sensibilidade ou não detecção destas variações genéticas pelo rastreamento genético.

Em suma, além das qualidades acima apontadas por Korkko e colaboradores (1998), o CSGE apresentou-se como metodologia útil no rastreamento de mutações nos éxons “*hot-spot*” do *RET*, considerando-se os seguintes pontos: a) Mediante uso do CSGE, rastreamos cinco das seis mutações *RET* compreendida por nossos pacientes; b) Estas cinco

mutações detectadas por CSGE são descritas como responsáveis por aproximadamente (95%) das mutações causadoras de patologia em diferentes casuísticas de NEM-2; c) Houve correlação total (100%) entre os dados rastreados por CSGE e SSCP.

Tabela 12 – Localização da mutação Val804Met e do polimorfismo Ser904Ser em relação à sequência total do éxon 14 amplificado. Os “*primers forward*” e “*reverse*” apresentam-se destacados respectivamente em vermelho e azul. O códon mutante ou polimórfico apresenta-se destacado em negrito, itálico e sublinhado

Éxon 14: Val804Met (GTG-ATG)

CCTGGCTCCTGGAAGACCCAAGCTGCCTGACCCGCACGCCCAAGGGCC
CCCTCTCTCCGCCCCCAGGCCCGCTCCTCCTCATC**GTG**GAGTACGCCA
AATACGGCTCCCTGCGGGGCTTCCTCCGCGAGAGCCGCAAAGTGGGG
CCTGGCTACCTGGGCAGTGGAGGCAGCCGCAACTCCAGCTCCCTGGA
CCACCCGGATGAGCGGGCCCTCACCATGGGCG**ACCTCATCTCATTGCTG**
CTGGCCAGATCTCACAGGGGATGCAGTATCTGGCCGA**GATGAAGGTGCG**
TGCATATG

Éxon 15: Ser904Ser (TCC-TCG)

CATGGCCTGACGACTCGTGCTATTTTTCTACAGCTCGTTCATCGGGAC
TTGGCAGCCAGAAACATCCTGGTAGCTGAGGGGCGGAAGATGAAGATT
TCGGATTTCGGCTTGTCCCGAGATGTTTATGAAGAGGAT**TCC**TACGTGA
AGAGGAGCCAGGTGCCAGTCCCGGG**GATGAGGCGGGCTCCAGG**

Gráfico 5 – Diferenças entre as temperaturas de “melting” (TM) das seqüências não diferenciadas pelo rastreamento genético do RET (WinMelt ver 2.0.13 Bio-Rad, Hercules, CA, EUA)

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

O CSGE apresentou sensibilidade de 90,6% para o rastreamento das mutações tipicamente associadas a NEM-2 e 59,5% para polimorfismos. Quando comparado ao CSGE, o SSCP detectou as mesmas mutações e polimorfismos com 100% de correlação. Ambas metodologias mostraram-se eficazes para o rastreamento das mutações nos éxons 10, 11 e 16 do *RET*, assim como para os polimorfismos nos éxons 11 e 13. A mutação não padronizada (éxon 14) apresenta-se como rara na literatura internacional, compreendendo 3% dos pacientes portadores de NEM-2.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

Abelin NM, Gomes S, Ivanoff MT, Ezabella MC, Hayashida CY, Toledo SP. Abordagem clínica e laboratorial do bócio uni-nodular sólido: vantagens da determinação da calcitonina sérica por métodos distintos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 1999;43(2):104-13.

Aiello A, Cioni K, Gobbo M, Collini P, Gullo M, Torre GD, Passerini E, Ferrando B, Pilotti S, Pierotti MA, Pasini B. The familial medullary thyroid carcinoma-associated RET E768D mutation in a multiple endocrine neoplasia type 2A case. *Surgery.* 2005;137(5):574-6.

Aliepoulios MA, Rose EH. Specific localization of calcitonin activity in humans' thyroid glands. In: *Calcitonin 1969: Proceedings of the Second International Symposium*, London: Heinemann; 1970. p295-300.

Alvares da Silva AM. Descrição de uma nova mutação de ponto no oncogene RET, exon 8 (Gly533Cys) em uma família com carcinoma medular de tireóide [tese]. São Paulo: Departamento de Ciências Endocrinológicas da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo; 2003.

Amosenko FA, Brzhezovskiy VZH, Lyubchenko LN, Shabanov MA, Kozlova VM, Vanushko VE, Kazubskaya TP, Garkavtseva RF, Kalinin VN. Analysis of mutations of the RET proto-oncogene in patients with medullary thyroid carcinoma. *Genetika.* 2003;39(6):847-54.

Anders J, Kjaer S, Ibanez CF. Molecular modeling of the extracellular domain of the RET receptor tyrosine kinase reveals multiple cadherin-like domains and a calcium-binding site. *J Biol Chem.* 2001;276(300):35808-17.

Antinolo G, Marcos I, Fernandez RM, Romero M, Borrego S. A novel germline point mutation, c.2304 G-T, in codon 768 of the RET proto-oncogene in a patient with medullary thyroid carcinoma. *Am J Med Genet.* 2002;110(1):85-7.

Arancha AC, Ruiz-Llorente S, Cascon A, Osorio A, Martinez-Delgado B, Benitez J, Robledo M. A rapid and easy method for multiple endocrine neoplasia type 1 mutation detection using conformation-sensitive gel electrophoresis. *J Hum Genet.* 2002;47(4):190-5.

Arighi E.; Popsueva, A. Degli'Innocenti D, Borrello MG, Carniti C, Peralá NM, Pierotti MA, Sariola H. Biological effects of the dual phenotypic Janus mutation of ret cosegregating with both multiple endocrine neoplasia type 2 and Hirschsprung's disease. *Mol Endocrinol.* 2004;18(4):1004-17.

Balogh K, Patocs A, Majnik J, Racz K, Hunyady L. Genetic screening methods for the detection of mutations responsible for multiple endocrine neoplasia type 1. *Mol Genet and Metab.* 2004;83(1-2):74-81.

Bartsch DK, Hasse C, Schug C, Barth P, Rothmund M, Hoppner W. A RET double mutation in the germline of a kindred with FMTC. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2000;108(2):128-32.

Baumgartner-Parzer SM, Lang R, Wagner L, Heinze G, Niederle B, Kaserer K, Waldhausl W, Vierhapper H. Polymorphisms in exon 13 and intron 14 of the RET proto-oncogene: Genetic modifiers of medullary thyroid carcinoma? *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(11):6232-6.

Berndt I, Reuter M, Saller B, Frank-Raue K, Groth P, Grubendorf M, Raue F, Ritter MM, Hoppner W. A New hot spot for mutations in the ret protooncogene causing familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2A. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1998;83(3):770-4.

Block MA, Jackson CE, Tashjian JR AH. Management of occult medullary thyroid carcinoma evidenced only by serum calcitonin levels elevations after apparently adequate neck operation. *Arch Surg.* 1978;113(4):368-72.

Borrego S, Eng C, Sanchez B, Saez M, Navarro E, Antinolo G. Molecular analysis of the *RET* and *GDNF* genes in a family with multiple endocrine neoplasia type 2A and Hirschsprung disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(9):3361-4.

Borrego S, Saez M, Ruiz A, Gimm O, Lopez-Alonso M, Antinolo G, Eng C. Specific polymorphisms in the *RET* proto-oncogene are over-represented in patients with Hirschsprung disease and may represent loci modifying phenotypic expression. *J Med Genet*. 1999;36(10):771-4.

Brauckhoff M, Gimm O, Weiss CL, Ukkat J, Sekulla C, Brauckhoff K, Thanh PN, Dralle H. Multiple endocrine neoplasia 2B syndrome due to codon 918 mutation: clinical manifestation and course in early and late onset disease. *World J Surg*. 2004;28(12):1305-11.

Bryant J, Farmer J, Kessler LJ, Townsed RR, Nathanson KL. Pheochromocytoma: the expanding genetic differential diagnosis. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(16):1196-204.

Bugalho MJ, Domingues R, Sobrinho L. The minisequencing method: a simple strategy for genetic screening of MEN 2 families. *BMC Genet*. 2002;3(8). [cited 2006 Mar 1]. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/3/8>.

Bugalho MJ, Domingues R, Sobrinho L. Molecular diagnosis of multiple endocrine neoplasia Type 2. *Expert Rev Mol Diagn*. 2003;3(6):769-79.

Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, Conte-Devolx B, Falchetti A, Cheri RG, Libroia A, Lips CJM, Lombardi C, Manelli M, Pacini F, Ponder BAJ, Raue F, Skogseid B, Tamburrano G, Thanker RV, Thompson NW, Tomassetti P, Tonelli F, Wells Jr AS, Marx SJ, Consensus: guideline for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(12):5658-71.

Califano D, D'Alessio AD, Colucci-D'Amato GL, De Vita G, Monaco C, Santelli G, Di Fiori PP, Vecchio G, Fusco A, Santoro M, Franciscis V. A potential pathogenetic mechanism for multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes involves ret-induced impairment of terminal differentiation of neuroepithelial cells. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1996;93(15):7933-7.

Carlomagno F, Melillo RM, Visconti R, Salvatore G, De Vita G, Lupoli G, Yu Y, Jing S, Vecchio G, Fusco A, Santoro M. Glial cell line-derived neurotrophic factor differentially stimulates RET mutants associated with the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes and Hirschsprung disease. *Endocrinology*. 1998;139(8):3613-9.

Carney JA, Sizemore GW, Sheps SG. Adrenal medullary disease in multiple endocrine neoplasia type 2. Pheocromocytoma and its precursors. *Am J Clin Pathol*. 1976;66(2):279-90.

Cebrian A, Lesueur F, Martin S, Leyland J, Ahmed S, Luccarini C, Smith PL, Luben R, Whittaker J, Pharoah PD, Dunning AM, Ponder BA. Polymorphisms in the initiators of RET (rearranged during transfection) signaling pathway and susceptibility to sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(11):6268-74.

Chang A, Chan WF, Lo CY, Lam KSL. Multiple endocrine neoplasia type 2B in a Chinese patient. *Hong Kong Med J*. 2004;10(3):206-9.

Chong GC, Behars OH, Sizemore GW, Woolner LH. Medullary carcinoma of the thyroid gland. *Cancer*. 1975;35(3):695-704.

Chung KW, Chang MC, Noh DY, Oh SK, Choe KJ, Youn YK. RET oncogene expression of papillary thyroid carcinoma in Korea. *Surg Today*. 2004;34(6):485-92.

Cirafici AM, Salvatore G, De Vita G, Carlomagno F, Dathab NA, Visconti R, Melillo RM, Fusco A, Santoro M. Only the substitution of methionine 918 with a threonine and not with others residues activates RET transforming potential. *Endocrinology*. 1997;138(4):1450-5.

Cohen MS, Moley JF. Surgical treatment of medullary thyroid carcinoma. *J Intern Med*. 2003;253(6):616-26.

Cranston AN, Ponder BA. Modulation of medullary thyroid carcinoma penetrance suggests the presence of modifier genes in a RET transgenic mouse model. *Cancer Res*. 2003;63(16):4777-80.

Dahia P. Descobrendo genes no século XXI: enfoque na área de onco-endocrinologia. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002;46(4):330-40.

D'Aloiso F, Carlomagno F, Bisceglia M, Anaganti S, Ferretti E, Verrienti A, Arturi F, Scarpelli D, Russo D, Santoro M, Filetti S. In vivo and in vitro characterization of a novel germline *RET* mutation associated with low-penetrant non-aggressive familial medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(3):754-9.

Dang CT, Cote GJ, Schultz PN, Khorana S, Decker RA, Gagel RF. A codon 891 exon 15 *RET* proto-oncogene mutation in familial medullary thyroid carcinoma: a detection strategy. *Mol Cell Probes.* 1999;13(1):77-9.

Da Silva AM, Maciel RM, Da Silva MR, Toledo SR, De Carvalho MB, Cerrutti JM. A novel germ-line point mutation in *RET* exon 8 (Gly533Cys) in a large kindred with familial medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(11):5438-43.

Decker RA, Peacock ML, Watson P. Hirschsprung disease in MEN 2A: increased spectrum of *RET* exon 10 genotypes and strong genotype-phenotype correlation. *Hum Mol Genet.* 1998;7(1):129-34.

De Groot JW, Links TP, Plukker JT, Lips CJ, Hofstra RM. *RET* as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocr Rev.* 2006;27(5):535-60.

Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, Howe JR, Moley JF, Goodfellow P, Wells SA Jr. Mutations in *RET* proto-oncogene are associated with MEN2A and FMTC. *Hum Mol Genet.* 1993;2(7):851-6.

Dourisboure RJ, Belli S, Domenichi E, Podesta EJ, Eng C, Solano AR. Penetrance and clinical manifestations of non-hotspot germline *RET* mutation, C630R, in a family with medullary thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2005;15(7):668-71.

Eter N, Klingmuller D, Hoppner W, Spitznas M. Typical ocular findings in a patient with multiple neoplasia type 2B syndrome. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2001;239(5):391-4.

Ezabella MC, Hayashida CY, Bisi H, Leite MO, Borelli A, Abelin NM, Cordeiro AC, Camargo RY, Toledo SP. Early detection of medullary thyroid carcinoma in multiple endocrine neoplasia type II. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1990;45(3):105-9.

Ezabella MC, Hayashida CY, Abelin NM, Toledo SP. Neoplasias endocrinas múltiplas. In: Medeiros-Neto G. ed. *Moléstias Hereditárias do Sistema Tireoideano*. São Paulo:Roca; 1996. p.225-42.

Elisei R, Cosci B, Romei C, Agate L, Piampini P, Miccoli P, Berti P, Basolo F, Ugolini C, Ciamp R, Nikiforov Y, Pinchera A. Identification of a novel point mutation in the RET gene (Ala883Thr), which is associated with medullary thyroid carcinoma phenotype only in homozygous condition. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(11):5823-7.

Elisei R, Cosci B, Romei C, Bottici V, Sculli M, Lari R, Barale R, Pacini F, Pinchera A. RET exon 11 (G691S) polymorphism is significantly more frequent in sporadic medullary thyroid carcinoma than in the general population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(07):3579-84.

Eng C. RET proto-oncogene in the development of human cancer. *J Clin Onco*. 1999;17(1):380-93.

Eng C. Multiple endocrine neoplasia type 2 and the practice of molecular medicine. *Rev Endocr Dis*. 2000;1(4):283-90.

Eng C, Crossey PA, Mulligan LM, Healey CS, Houghton C, Prwose A, Chew SL, Dahia PL, O'Riordan JL, Toledo SP. Mutations in the RET proto-oncogene and the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in sporadic and syndromic pheochromocytomas. *J Med Genet*. 1995;32(12):934-7.

Eng C, Thomas GA, Neuberg DS, Mulligan LM, Healey CS, Houghton C, Frilling A, Raue F, Williams ED, Ponder BAJ. Mutation of the RET proto-oncogene is correlated with RET immunostaining in subpopulations of cells in sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(12):4310-3.

Fard-Esfahani P, Khatamia S, Zeinali C, Taghikhani M, Allahyari M. A modified conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE) method for rapid and accurate detection of low density lipoprotein (LDL) receptor gene mutations in Familial Hypercholesterolemia. *Clin Biochem*. 2005;38(6):579-83.

Frank-Rauer K, Hoppner W, Frilling A, Kotzerke J, Dralle H, Haase R, Mann K, Seif F, Kirchner R, Rendl J, Deckart HF, Ritter MM, Hampel R, Klempa J, Scholz H, Raue F. Mutations of RET protooncogene in German multiple endocrine neoplasia families: relation between genotype and phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81 (5):1780-3.

Frank-Raue K, Rondot S, Hoepfner W, Goretzki P, Raue F, Meng W. Coincidence of multiple endocrine neoplasia type 1 and 2: mutations in the RET proto-oncogene and MEN1 tumor suppressor gene in a family presenting with recurrent primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(7):4063-7.

Frank-Raue K, Buhr H, Dralle H, Klar E, Senninger N, Weber T, Rondot S, Hoppner W, Raue F. Long-term outcome in 46 gene carriers of hereditary medullary thyroid carcinoma after prophylactic thyroidectomy: impact of individual RET genotype. *Eur J Endocrinol*. 2006;155(2):229-36.

Frilling A, Weber F, Tecklenborg C, Broelsch CE. Prophylactic thyroidectomy in multiple endocrine neoplasia: the impact of molecular mechanism of RET proto-oncogene. *Langenbecks Arch Surg*. 2003;388(1):17-26.

Frohnauer MK, Decker RA. Update on the MEN 2A c804 RET mutation: Is prophylactic thyroidectomy indicated? *Surgery*. 2000;128(6):1052-8.

Frediani D. Rastreamento gênico através de enzimas de restrição na forma hereditária do carcinoma medular de tireóide [monografia]. São Paulo: Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002.

Gagel RF. The impact of gene mapping techniques on the management of multiple endocrine neoplasia type 2. *Trends Endocr Metab*. 1991;2(1):19-25.

Gagel RF. *RET* protooncogene mutations and endocrine neoplasia – A story intertwined with neuronal crest differentiation. *Endocrinology*. 1996;137(5):1509-12.

Ganguly A. An update on conformation sensitive gel electrophoresis. *Hum Mutat*. 2002;19(4):334-2.

Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: Evidence for solvent-induced bend in DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(21):10325-9.

Gibelin H, Bezieau S, Misso C, Bouin-Pineau MH, Marechaud R, Kraimps JL. Germline *RET* V804M mutation associated with multiple endocrine neoplasia type 2A. *Br J Surg*. 2004;91(11):1458-9.

Gonzalez B, Salcedo M, Medrano ME, Mantilla A, Quinonez G, Benitez-Bridiesca L, Rodriguez-Cuevas S, Cabrera G, Leon B, Altamirano N, Tapia J, Dawson B. *RET* oncogene mutation in medullary thyroid carcinoma in mexican families. *Arch Med Res*. 2003;34(1):41-9.

Gullu S, Gursov A, Erdogan MF, Dizbavsak S, Erdogan G, Kamel N. Multiple endocrine neoplasia type 2A/localized cutaneous lichen amyloidosis associated with malignant pheochromocytoma and ganglioneuroma. *J Endocrinol Invest*. 2005;28(8):734-7.

Hansford J, Mulligan LM. Multiple endocrine neoplasia type 2 and *RET*: from neoplasia to neurogenesis. *J Med Genet*. 2000;37:817-27.

Hasen HS, Terring H, Godballe C, Jager AC, Nielsen FC. Is thyroidectomy necessary in *RET* mutations carriers of the familial medullary thyroid carcinoma syndrome? *Am Cancer Soc*. 2000;89(4):863-67.

Hayashida CY, Alves VAF, Kanamura CT, Ezabella MCL, Abelin NMA, Nicolau W, Bisi H, Toledo SP. Immunohistochemistry of medullary thyroid carcinoma and C-cell hyperplasia by an affinity-purified anti-human calcitonin antiserum. *Cancer*. 1993;72(4):1356-63.

Hazard JB, Hawk WA, Crile JR G. Medullary (solid) carcinoma of the thyroid: a clinicopathologic entity. *J Clin Endocrinol*. 1959;19(1):152-61.

Hemminki K, Doug C. Population-based study of familial medullary thyroid cancer. *Familial Cancer*. 2001;1(1):45-9.

Herfarth KK, Bartsch D, Doherty GM, Wells SA, Lairmore TC. Surgical management of hyperparathyroidism in patients with multiple endocrine neoplasia type 2A. *Surgery*. 1996;120(6):966-74.

Hoff AO, Cote GJ, Gagel RF. Multiple endocrine neoplasias *Annu Rev Physiol*. 2000. 62:377–411.

Horn RC Jr. Carcinoma of the thyroid: description of a distinctive morphological variant and report of seven cases. *Cancer*. 1951;4:697-707

Huang SC, Koch CA, Vortmeyer AO, Pack SD, Lichtenauer UD, Mannan P, Lubensky IA, Chrousos GP, Pacak K, Gagel RF, Zhuang Z. Duplication of the mutant *RET* allele in trisomy 10 or loss of the wild-type allele in multiple endocrine neoplasia type 2-associated pheochromocytomas. *Cancer Res*. 2000;60(22):6223-6.

Ichihara M, Murakumo Y, Takahashi M. RET and neuroendocrine tumors [letters]. *Cancer*. 2004;204(2):197-211.

Igaz P, Patoc A, Racz K, Klein I, Varadi A, Esik O. Occurrence of pheochromocytoma in a MEN-2A family with codon 609 mutation of the RET protooncogene. *J. Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(6):2992-4.

Jimenez C, Dang GT, Schultz PN, El-Naggar A, Shapiro S, Barnes EA, Evans DB, Vassilopoulou-Sellin R, Gagel RF, Cote GJ, Hoff AO. 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;89(7):3521-6.

Jimenez C, Gagel RF. Genetic testing in endocrinology: lessons learned from experience with multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2). *Growth Horm IGF Res*. 2004;14:(Suppl A):S150-7.

Jimenez C, Habra MA, Huang SCE, El-Naggar A, Shapiro S, Evans DB, Cote GJ, Gagel RF. Pheochromocytoma and medullary thyroid carcinoma: a new genotype-phenotype correlation of the RET protooncogene 891 germline mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(8):4142-5.

Jindrichova S, Vcelak J, Vcek P, Neradilova M, Nemec J, Bendlova B. Screening of six risk exons of the RET proto-oncogene in families with medullary thyroid carcinoma in the Czech Republic. *J Endocrinol.* 2004;183(2):257-65.

Kaldrymides P, Mytakidis N, Anagnostopoulos T, Vassiliou M, Tertipi A, Zahariou M, Rampias T, Koutsodontis G, Konstantopoulou I, Ladopoulou A, Bei T, Yannoukakos D. A rare *RET* gene exon 8 mutation is found in two Greek kindreds with familial medullary thyroid carcinoma: implications for screening. *Clin Endocrinol.* 2006;64(5):561-6

Kambouris M, Jackson CE, Feldman GL. Diagnosis of multiple endocrine neoplasia (MEN) 2A, 2B and Familial Medullary Thyroid Cancer (FMTC) by multiplex PCR and heteroduplex analyses of RET proto-oncogene mutations. *Hum Mutat.* 1996;8(1):64-70.

Kameyama K, Takami H. Medullary thyroid carcinoma: nationwide Japanese survey of 634 cases in 1996 and 271 cases in 2002. *Endocr. J.* 2004;51(5):453-6.

Kapur RP. Multiple endocrine neoplasia type 2B and Hirschsprung's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005;3(5):423-31.

Kasprzak L, Nolet S, Gaboury L, Pavia C, Villabona C, Riviera-Fillat F, Oriola J, Foulkes WD. Familial medullary thyroid carcinoma and prominent corneal nerves associated with the germline V804M and V778I mutations on the same allele of RET. *J Med Genet.* 2001;38(11):784-7.

Kinlaw WB, Scott SM, Maue RA, Memoli VA, Harris RD, Daniels GH, Porter DM, Belloni DR, Spooner ET, Ernesti MM, Noll WW. Multiple endocrine neoplasia 2A due to a unique C609S *RET* mutation presents with pheochromocytoma and reduced penetrance of medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005;63(6):676-82.

Koch CA, Huang SC, Moley JF, Azumi N, Chrousos GP, Gagel RF, Zhuang Z, Pacak K, Vortmeyer AO. Allelic imbalance of the mutant and wild-type RET allele in MEN 2A-associated medullary thyroid carcinoma. *Oncogene*. 2001;20(53): 7809-11.

Koch C, Vortmeyer AH, Huang SC, Alesci S, Zhuang Z. Genetics aspects of pheochromocytoma. *Endoc Regul*. 2001;35(1):43-52. Erratum in: *Endoc Regul*. 2001;35(2):94.

Koch CA, Vortmeyer AO, Zhuang Z, Brouwers FM, Pacak K. New Insights into the Genetics of Familial Chromaffin Cell Tumors. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;970:11-28.

Korkko J, Annunen S, Pihlajamaa T, Prockop DJ, Ala-Kokko L. Conformation sensitive gel electrophoresis for simple and accurate detection of mutations: Comparison with denaturing gradient gel electrophoresis and nucleotide sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(4):1681-5.

Kouvaraki MA, Shapiro SE, Perrier ND, Cote GJ, Gagel RF, Hoff AO, Sherman SI, Lee JE, Evans DB. RET proto-oncogene: A review and update of genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid cancer and associated endocrine tumors. *Thyroid*. 2005;15(6):531-44

Ku CF, Lo CY, Chan WF, Chiu SW, Fan ST, Lam KSL. Resection of pheochromocytoma extending into the right atrium in a patient with multiple endocrine neoplasia type 2A. *Hong Kong Med J*. 2005;11(1):59-62.

Kwok JB, Gardner E, Warner JP, Ponder BA, Mulligan LM. Structural analysis of the human RET proto-oncogene using exon trapping. *Oncogene*. 1993;8(9):2575-82.

Lakhani VT, You YN, Wells SA. The multiple endocrine neoplasia syndromes. *Annu Rev Med*. Oct 5. Epub 2006 Oct 12.

Learoyd DL, Messina M, Zedenius J, Robinson BG. Molecular genetics of thyroid tumors and surgical decision-making. *World J Surg*. 2000;24(8):923-33.

Learoyd DL, Gosnell J, Elston MS, Saurine TJ, Richardson AL, Delbridge LW, Conaglen JV, Robinson BG. Experience of prophylactic thyroidectomy in multiple endocrine neoplasia type 2A kindreds with *RET* codon 804 mutations. *Clin Endocrinol*. 2005;63(6):636-41.

Leboulleux S, Baudin E, Travagli JP, Schlumberger M. Medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol*. 2004;61(3):299-310.

Lecube A, Hernandez C, Oriola J, Galard R, Gemar E, Mesa J, Simo R. V804M *RET* mutation and familial medullary thyroid carcinoma: report of a large family with expression of the disease only in the homozygous gene carriers. *Surgery*. 2002;131(5):509-14.

Lee NC, Norton JA. Multiple endocrine neoplasia type 2B – genetic basis and clinical expression. *Surg Oncol*. 2000;9(3):111-8.

Lesueur F, Cebrian A, Cranston A, Leyland J, Faid TM, Clements MR, Robledo M, Whittaker J, Ponder BA. Germline homozygous mutations at codon 804 in the *RET* protooncogene in medullary thyroid carcinoma/multiple endocrine neoplasia type 2A patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(6):3454-7.

Lips CJ, Hoppener JW, Thijssen JH. Medullary thyroid carcinoma: role of genetic testing and calcitonin measurement. *Ann Clin Biochem*. 2001;38(Pt 3):168-79.

Livolsi VA. C Cell Hyperplasia / Neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(1):39-41.

Lombardo F, Baudin E, Chiefari E, Arturi F, Bardet S, Caillou B, Conte C, Dallapiccola B, Giuffrida D, Bidart JM, Schlumberger M, Filetti S. Familial medullary thyroid carcinoma: clinical variability and low aggressiveness associated with *RET* mutation at codon 804. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(4):1674-80.

Lore F, Talidis F, Di Cairano G, Renieri A. Multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes may be associated with renal malformations. *J Intern Med*. 2002;250(1):37-42.

Maciel RM. Tumorigênese molecular tiroideana: implicações para a prática médica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002;46(4):381-90.

Machens A, Gimm O, Hinze R, Hoppner W, Boehm BO, Dralle H. Genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid carcinoma: oncological features and biochemical properties. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(3):1104-9.

Machens A, Holzhausen HJ, Thanh PN, Dralle H. Malignant progression from C-cell hyperplasia to medullary thyroid carcinoma in 167 carriers of RET germline mutations. *Surgery.* 2003;134(3):425-31.

Machens A, Schneyer U, Holzhausen HJ, Raue F, Dralle H. Emergence of medullary thyroid carcinoma in a family with the Cys630Arg RET germline mutation. *Surgery.* 2004;136(5):1083-7.

Machens A, Ukkat J, Brauckhoff M, Gimm O, Dralle H. Advances in the management of hereditary medullary thyroid cancer. *J Intern Med.* 2005;257(1):50-9.

Magalhaes PK, de Castro M, Elias LL, Soares EG, Maciel LM. Polymorphisms in the RET proto-oncogene and the phenotypic presentation of familial medullary thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2004;14(10):848-52.

Maher ER, Eng C. The pressure rises: update on the genetics of pheochromocytoma. *Hum Mol Genet.* 2002;11(20):2347-54.

Maia FF, Junior HJ, Araujo LR. Neoplasia endócrina múltipla tipo 2 – manejo diagnóstico e terapêutico. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002;46(5):606-10.

Marsh DJ, Theodosopoulos G, Martin-Schulte K, Richardson A, Philips J, Roher H, Delbridge L, Robinson BG. Genome-Wide copy number imbalances identified in familial and sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2003;88(4):1866-72.

Marx SJ. Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(5):367-75.

Maschek W, Pichler R, Rieger R, Weinhausel A, Berg J. A new identified germline mutation of the *RET* proto-oncogene responsible for familial medullary thyroid carcinoma in co-existence with a hyperfunctioning autonomous nodule [Letters]. *Clin Endocrinol*. 2002;56(6):823.

Martucciello G, Ceccherini I, Lerone M, Jasonni V. Pathogenesis of Hirschsprung's disease. *J Pediatric Surg*. 2000;35(7):1017-25.

Mendonca BB, Arnhold IJ, Nicolau W, Avancini VA, Bloise W. Cushing's syndrome due to ectopic ACTH secretion by bilateral pheochromocytomas in multiple endocrine neoplasia type 2A. *N Engl J Med*. 1988;319:1610-1.

Menko FH, van der Luijt RB, Valk IA, Toorians AW, Sepers JM, van Diest PJ, Lips CJ. Atypical MEN Type 2B associated with two germline RET mutations on the same allele not involving codon 918. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(1):393-7.

Mihai R. Molecular influences in thyroid and parathyroid surgery. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2001;15(2):177-88.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.

Mise N, Drosten M, Racek T, Tannapfel A, Putzer BM. Evaluation of potential mechanisms underlying genotype-phenotype correlations in multiple endocrine neoplasia type 2. *Oncogene*. 2006;25(50):6637-47.

Miyauchi A, Futami H, Hai H, Yokozawa T, Kuma K, Aoki N, Kosugi S, Sugano K, Yamaguchi K. Two germline missense mutation at codon 804 and 806 of the RET proto-oncogene in the same allele in a patient with multiple endocrine neoplasia typw 2B without codon 918 mutation. *Jpn J Cancer Res*. 1999;90(1):1-5.

Mulligan LM. Multiple endocrine neoplasia type 2: molecular aspects. In: Dahia PLM, Eng C. eds. *Genetic Disorders of Endocrine Neoplasia*. Front Horm Res. Basel: Karger. 2001: 81-102.

Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, Love DR, Mole SE, Moore JK, Papi L, Ponder MA, Telenius H, Tunnacliffe A, Ponder BA. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature*. 1993;363(6428):458-60.

Munnes M, Fanaei S, Schmitz B, Muiznieks I, Holschneider AM, Doerfler W. Familial form of Hirschsprung disease: Nucleotide sequence studies reveal point mutations in the *RET* proto-oncogene in two of six families but not in other candidate genes. *Am J Med Genet*. 2000;94(1):19-27.

Nishikawa M, Murakumo Y, Imai T, Kawai K, Nagaya M, Funahashi H, Nakao A, Takahashi M. Cys611Ser mutation in RET proto-oncogene in a kindred with medullary thyroid carcinoma and Hirschsprung's disease. *Eur J Hum Genet*. 2003;11(5):364-8.

Nguyen L, Niccoli-Sire P, Caron P, Bastie D, Maes B, Chabrier G, Chabre O, Rohmer V, Lecomte P, Henry JF, Conte-Devolx B, GETC. Pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2 a prospective study. *Eur J Endocrinol*. 2001;144(1):37-44.

Niccoli-Sire P, Murat A, Baudin E, Henry JF, Proye C, Bigorgne JC, Bstandig B, Modigliani E, Morange S, Schlumberger M, Conte-Devolx B. Early or prophylactic thyroidectomy in MEN2/FMTC gene carriers: results in 71 thyroidectomized patients. *Eur J Endocrinol*. 1999;141(5):468-74.

Niccoli-Sire P, Murat A, Rohmer V, Franc S, Chabrier G, Baldet L, Maes B, Savagner F, Giraud S, Bezieau S, Kottler MA, Morange S, Conte-Devolx B, GETC. Familial medullary thyroid carcinoma with noncysteine RET mutations: phenotype-genotype relationship in a large series of patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(8):3746-53.

Nunes AB. Identificação de mutações do proto-oncogene *RET* associadas à forma hereditária do carcinoma medular de tireóide [tese]. Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2001.

Nunes AB, Ezabella MC, Pereira AC, Krieger JE, Toledo SP. A novel Val648Ile substitution in RET proto-oncogene observed in a Cys634Arg multiple endocrine neoplasia type 2A kindred presenting with an adrenocorticotropin-producing pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(12):5658-61.

Pacak K, Ilias I, Adams KT, Eisenhofer G. Biochemical diagnosis, localization and management of Pheochromocytoma: focus on multiple endocrine neoplasia type 2 in relation to other hereditary syndromes and sporadic form of the tumor. *J Intern Med.* 2005;257(1):60-8.

Pakarinen MP, Rintala RJ, Koivusalo A, Heikkinen M, Lindahl H, Pukkala E. Increased incidence of medullary thyroid carcinoma in patients treated for Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 2005;40(10):1.532-4.

Pasini B, Rossi R, Ambrosio MR, Zatelli MC, Gullo M, Gobbo M, Collini P, Aiello A, Pansini G, Trasforini G, Uberti EC. RET mutation profile and variable clinical manifestations in a family with multiple endocrine neoplasia type 2A and Hirschsprung's disease. *Surgery.* 2002;131(4):373-81.

Peczkowska M, Januszewicz A. Multiple endocrine neoplasia type 2. *Fam Cancer.* 2005;4(1):25-36.

Pigny P, Bauters C, Wemeau JL, Houcke ML, Crepin M, Caron P, Giraud S, Calender A, Buisine MP, Kerckaert JP, Porchet N. A novel 9-base pair duplication in *RET* exon 8 in familial medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(5):1700-4.

Poturnajova M, Altanerova V, Kostalova L, Breza J, Altaner C. Novel germline mutation in the transmembrana region of RET gene close to Cys634Ser mutation associated with MEN 2A syndrome. *J Mol Med.* 2005;83(4):287-95.

Prazeres HJ, Rodrigues F, Figueiredo P, Naidenov P, Soares P, Bugalho MJ, Lacerda M, Campos B, Martins TC. Occurrence of the Cys611Tyr mutation and a novel Arg886Trp substitution in the *RET* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 families and sporadic medullary thyroid carcinoma cases originating from the central region of Portugal. *Clin Endocrinol.* 2006;64(6):659-66

Punales MK, Graf H, Gross JL, Maia AL. Rastreamento genético do carcinoma medular de tireóide: identificação de mutações no proto-oncogene *RET*. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002;46(6):632-39.

Punales MK, Graf H, Gross JL, Maia AL. *RET* codon 634 mutations in multiple endocrine neoplasia type 2: variable clinical features and clinical outcome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(6):2644-9.

Quadro F, Fattoruso O, Cosma MP, Verga U, Porcellini A, Libroia A, Colantuoni V. Loss of heterozygosity at the *RET* protooncogene locus in a case of multiple endocrine neoplasia type 2A. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(1):239-44.

Quayle FJ, Benveniste R, De Benedetti MK, Wells SA, Moley JF. Hereditary medullary thyroid carcinoma in patients greater than 50 years old. *Surgery.* 2004;136(6):1116-21.

Quayle FJ, Moley JF. Medullary thyroid carcinoma: including MEN 2A and MEN 2B syndromes. *J Surg Oncol.* 2005;89(3):112-29.

Randolph GW, Maniar D. Medullary carcinoma of the thyroid. *Cancer Control.* 2000;7(3):253-61.

Robledo M, Gil L, Pollan M, Cebrian A, Ruiz S, Azanedo M, Benitez J, Menarguez J, Rojas JM. Polymorphisms G691S/S904S of *RET* as genetic modifiers of MEN 2A. *Cancer Res.* 2003;63(15):1814-7.

Romeo G, Ceccherini I, Celli J, Priolo M, Betsos N, Bonardi G, Seri M, Yin L, Lerone M, Jasonni V, Martucciello G. Association of multiple endocrine neoplasia type 2 and Hirschsprung. *J Intern Med.* 1998;243:515-20.

Saez ME, Ruiz A, Cebrian A, Morales F, Robledo M, Antinolo G, Borrego S. A new germline mutation R600Q, within the coding region of *RET* protooncogene: a rare polymorphism or a MEN 2 causing mutation? *Hum Mutat.* 2000;15(1):122.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn ST, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988;239(4839):487-91.

Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975;94(3):441-8.

Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Fusco A, Vecchio G. Molecular mechanisms of RET activation in Human Cancer. *Ann N. Y. Acad Sci.* 2002;963:116-21.

Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Vecchio G, Fusco A. RET: Minireview normal and abnormal functions. *Endocrinology.* 2004;145(12):5448-51.

Santos MA, Nunes AB, Abelin N, Ezabella MC, Toledo RD, Lourenco Junior D, Hayashida CY, Fonseca II, Toledo SP. Genetic screening of multiple endocrine neoplasia type 2: experience of the USP Endocrine Genetics Unit. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50(1):7-16.

Siegelman M, Mohabeer A, Fahey TJ 3rd, Tomlinson G, Mayambala C, Jafari S, Noll WW, Thibodeau SN, Dawson DB. Rapid, nonradioactive screening for mutations in exons 10, 11, and 16 of the RET protooncogene associated with inherited medullary thyroid carcinoma. *Clin Chem.* 1997;43(3):453-7.

Sipple JH. The association of pheochromocytoma with carcinoma of the thyroid gland. *Am J Med.* 1961;31:163-6.

Skaba R, Dvorakova S, Vaclavikova E, Vlcek P, Frantlova M, Bendlova B. The risk of medullary thyroid carcinoma in patients with Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int.* Oct 5. Epub 2006 Sep 26.

Skinner MA. Management of hereditary thyroid cancer in children. *Surg Oncol.* 2003;12(2):101-4.

Schuffenecker I, Virally-Monod M, Brohet R, Goldgar D, Conte-Devolx B, Leclerc L, Chabre O, Boneu A, Caron J, Houdent C, Modigliani E, Rohmer V, Schlumberger M, Eng C, Guillausseau PJ, Lenoir GM. Risk and penetrance of primary hyperparathyroidism in multiple endocrine neoplasia type 2A families with mutations at codon 634 of the RET proto-oncogene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(2):487-91.

Schuurman B. Unusual clinical presentation of a patient with multiple endocrine neoplasia type 2A. *Neth J Med.* 2001;58:236-40.

Shapiro SE, Cote GC, Lee JE, Gagel RF. The role of genetics in the surgical management of familial endocrinopathy syndromes. *J Am Coll Surg*. 2003;197(5):818-31.

Simon S, Pavel M, Hensen J, Berg J, Hummer HP, Carbon R. Multiple endocrine neoplasia 2A syndrome: surgical management. *J Pediatr Surg*. 2002;37(6):897-900.

Skinner MA. Management of hereditary thyroid cancer in children. *Surg Oncol*. 2003;12(2):101-4.

Solari V, Ennis S, Yoneda A, Wong L, Messineo A, Hollwarth ME, Green A, Puri P. Mutation analysis of the *RET* gene in total intestinal aganglionosis by wave DNA fragment analysis system. *J Pediatr Surg*. 2003;38(3):497-501.

Steiner AL, Goodman AD, Powers SR. Study of a kindred with pheochromocytoma, medullary carcinoma, hyperparathyroidism and Cushing's disease: multiple endocrine neoplasia type 2. *Medicine* (Baltimore). 1968;47(5):371-409.

Szinnai G, Meier C, Komminoth P, Zumsteg UW. Review of multiple endocrine neoplasia type 2A in children: therapeutic results of early thyroidectomy and prognostic value of codon analysis. *Pediatrics* 2003;111(2):E132-9.

Tessitore A, Sinisi AA, Pasquali D, Cardone M, Vitale D, Bellastella A, Colantuni V. A Novel Case of Multiple Endocrine Neoplasia Type 2A Associated with Two *de Novo* Mutations of the RET Protooncogene. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(10):3522-7.

Toledo SP, Ferraz AR. Multiple endocrine type II neoplasm. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1990;45(1):1-2.

Toledo SP, Abelin NM, Ezabella MC, Hayashida CY, Dahia PM. Neoplasias endócrinas múltiplas. In: *Tratado de Endocrinologia Clínica*. Wajchehberg BL. ed. São Paulo: Roca; 1992. p.943-64.

Toledo SP, dos Santos MA, Toledo R de A, Lourenco Junior DM. Impact of RET proto-oncogene analysis on the clinical management of multiple endocrine neoplasia type 2. *Clinics*. 2006;61(1):59-70.

Torre M, Martucciello G, Ceccherini I, Lerone M, Aicardi M, Gambini C, Jasonni V. Diagnostic and therapeutic approach to multiple endocrine neoplasia type 2B in pediatric patients. *Pediatr Surg Int*. 2002;18(5-6):378-83.

Ukkat J, Gimm O, Brauckhoff M, Bilkenroth U, Dralle H. Single center experience in primary surgery for medullary thyroid carcinoma. *World J Surg*. 2004;28(12):1271-4.

Vandenbosch BK, Renard M, Uyttebroeck A, Sciot R, Matthijs G, Legius E. Medullary thyroid carcinoma in a child with a new *RET* mutation and a *RET* polymorphism. *Genet Couns*. 2005;16(1):95-100.

Verga U, Fugazzola L, Cambiaghi S, Pritelli C, Alessi E, Cortelazzi D, Gangi E, Beck-Peccoz P. Frequent association between MEN 2A and cutaneous lichen amyloidosis. *Clin Endocrinol (Oxford)*. 2003;59(2):156-61.

Vianello F, Lombardi AM, Dal Bello F, Zanon E, Cabrio L, Girolami A. Conformation sensitive gel electrophoresis for detection of factor X gene mutations. *Thromb Res*. 2002;107(1-2):51-4.

Viegas TM. Comparação dos testes de estímulo da secreção de calcitonina (omeprazol versus cálcio) no diagnóstico e seguimento de pacientes com carcinoma medular de tireóide [Monografia]. São Paulo: Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2001.

Weber F, Eng C. Germline variants within RET: clinical utility or scientific playtoy? [editorial]. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(11):6334-6.

Wells SA Jr, Franz C. Medullary carcinoma of the thyroid gland. *World J Surg*. 2000;24(8):952-6.

Wiench M, Gubala E, Wloch J, Lisowska K, Krassowski J, Scieglinska D, Fiszer-Kierzkowska A, Lange D, Kula D, Zeman M, Roskosz J, Kukulska A, Krawczyk Z, Jarzab B. Estimation of risk of inherited medullary thyroid carcinoma in apparent sporadic patients. *J Clin Oncol* 2001;19(5):1374-80.

Wiench M, Wloch J, Wygoda Z, Gubala E, Oczko M, Pawlaczek A, Kula D, Lange D, Jarzab B. RET polymorphisms in codon 796 and 836 are not associated with predisposition to medullary thyroid carcinoma. *Cancer Detect Prev.* 2004;28(4):231-6.

Williams ED, Pollock DJ. Multiple mucosal neuromata with endocrine tumors: a syndrome allied to von Recklinghausen's disease. *J Pathol Bacteriol.* 1966;91(1):71-80.

Wolfe HJ, Melvin KE, Cervi-Skinner SJ, Saadi A, Juliar JF, Jackson CE, Tashjian AH. C-cell hyperplasia preceding medullary thyroid carcinoma. *N Eng J Med.* 1973;289(9):437-71.

Wohlk GN, Soto CE, Bravo AM, Becker CP. Polimorfismos G691S, L769L e S836S del proto-oncogene RET no se asocian a mayor riesgo de cancer medular tiroideo esporádico en pacientes chilenos. *Rev Med Chile.* 2005;133(4):397-402.

Wu TT, Tsai TW, Chu CT, Lee ZF, Hung CM, Su CC, Li SY, Hsieh M, Li C. Low RET mutation frequency and polymorphism analysis of the RET and EDNRB genes in patients with Hirschsprung disease in Taiwan. *J Hum Genet.* 2005;50(4):168-74.

Xing S, Smanik PA, Oglesbee MJ, Trosko JE, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Characterization of *ret* oncogenic activation in MEN2 inherited cancer syndromes. *Endocrinology.* 1996;137(5):1512-9.

Yeung LP, Kwan EY, Cheung PT, Low LC. Pheochromocytoma in children. *Hong Kong Med J.* 2002;8(6):452-5.

APÊNDICE

APÊNDICE 1

Rastreamento Gênico da Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 2: Experiência da Unidade de Endocrinologia Genética da USP

Marcelo A. C. G. dos Santos

Adriana Bezerra Nunes

Neusa Abelin

Marilza C. L. Ezabella

Rodrigo de Almeida Toledo

Delmar Lourenço Júnior

Cesar Yoiti Hayashida

Ivone Izabel M. da Fonseca

Sergio P. de Almeida Toledo

Arq Bras Endocrinol Metab. 2006;50(1)

**Rastreamento gênico da neoplasia endócrina múltipla tipo 2: experiência da
Unidade de Endocrinologia Genética da USP**

**Genetic screening of multiple endocrine neoplasia type 2: USP Endocrine
Genetics Unit experience**

Marcelo Augusto Cortina Gonçalves dos Santos. (SANTOS MA)

Adriana Bezerra Nunes. (NUNES AB)

Neusa Abelin. (ABELIN N)

Marilza Cristina Legrazie Ezabella. (EZABELLA MCL)

Rodrigo de Almeida Toledo (TOLEDO RA)

Delmar Lourenço Júnior. (LOURENÇO JRDM)

Cesar Yoiti Hayashida. (HAYASHIDA CY)

Ivone Izabel Mackowiack da Fonseca. (MACKOWIACK II)

Sergio Pereira de Almeida Toledo. (TOLEDO SPA)

Unidade de Endocrinologia Genética, Endocrinologia, Clínica Médica, Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo.

Endocrine Genetics Unit (LIM-25), Endocrinology, Dpt. of Internal Medicine, University of
São Paulo School of Medicine.

Marcelo Augusto Cortina Gonçalves dos Santos.

Unidade de Endocrinologia Genética, Endocrinologia, Clínica Médica, Av. Dr. Arnaldo,
455, 5º andar, São Paulo-SP. Cep: 01246-903 Fone-Fax: (11) 3066-7252

Av. Dr. Arnaldo, 455, 5th floor, São Paulo-SP. ZIP: 01246-903 Phone-Fax: 55.11.3066-7252

Título sumário: Rastreamento gênico em NEM-2

RESUMO

A neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (NEM-2) é uma síndrome tumoral hereditária compreendida por carcinoma medular de tireóide, hiperparatiroidismo primário, feocromocitoma e outras patologias não-endócrinas. Desde a identificação das primeiras mutações *missense* no *RET* associadas ao NEM-2, a detecção de mutações no *RET* adquiriu grande impacto no tratamento clínico da NEM-2, tais como o pronto diagnóstico e tratamento do CMT. Atualmente a tireoidectomia total possibilita real cura dos casos de CMT em que os diagnósticos moleculares foram efetuados precocemente. Depois de identificadas as mutações no *RET*, os demais familiares devem ser rastreados para esta mutação utilizando-se métodos como DGGE, SSCP, enzima de restrição, sequenciamento gênico e mini-sequenciamento. Apresentamos uma breve revisão da nossa experiência com sequenciamento gênico direto do *RET* e DGGE. Em 50 pacientes com NEM-2 analisados por ambas técnicas, não encontramos falso resultados, sugerindo que o DGGE é uma metodologia de rastreamento adequada para mutações no proto-oncogene RET.

Unitermos: rastreamento gênico; DGGE; sequenciamento gênico; NEM-2; proto-oncogene RET; carcinoma medular de tireóide.

ABSTRACT

Multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN-2) is inherited tumor syndrome that includes medullary thyroid carcinoma, primary hyperparathyroidism, pheochromocytoma and other non-endocrine diseases. Since first *RET* missense mutations in association with MEN-2 were identified, *RET* mutation analysis had a great impact in the clinical management of MEN-2, such as in early diagnosis and treatment of MTC. Presently, early total thyroidectomy provides real cure of MTC for cases in which molecular diagnosis has been performed at early ages. After *RET* mutation identification, family members should be screened for this mutation by using methods as DGGE, SSCP, restriction enzyme, genetic sequencing or mini-sequencing. Here, we briefly review our experience with the direct *RET* gene sequencing and DGGE approaches. In 50 typical MEN-2 patients analyzed using both methods, we found no false results suggesting that DGGE is a reliable screening method for RET proto-oncogene mutation analysis.

Keywords: genetic screening; DGGE; genetic sequencing; MEN-2; RET proto-oncogene; medullary thyroid carcinoma.

INTRODUÇÃO

A neoplasia endócrina múltipla tipo-2 (NEM-2) é herdada por genes autossômicos dominantes e compreende um grupo de patologias, tais como: carcinoma medular de tireóide familiar (CMT-F); neoplasia endócrina múltipla tipo-2A (NEM-2A), que apresenta CMT associado a feocromocitoma (FEO) e hiperparatireoidismo primário (HPT); e NEM, tipo-2B (NEM-2B), onde ocorrem CMT, FEO e gânglioneuromatoses de mucosas. Estas neoplasias neuroendócrinas são oriundas de células da crista neural: células C da tireóide; células cromafins da medulas da adrenal; células principais e oxifílicas das paratireóides; gânglios simpáticos, parassimpáticos e entéricos, além do trato urogenital. A NEM-2 apresenta elevada expressão de várias substâncias hormonais e não-hormonais produzidas pelas glândulas afetadas (1-6). As diferentes classificações da NEM-2 encontram-se sumarizadas na tabela 01.

O carcinoma medular de tireóide (CMT) associado a NEM-2 possui incidência de 1: 30.000 indivíduos, ocorrendo expressão de doença em mais de 90% dos portadores de mutações no proto-oncogene *RET* (2, 7, 8). O CMT corresponde a cerca de 10% de todas as patologias malignas que acometem a tireóide, sendo 75% esporádicos e 25% hereditários. Na sua forma hereditária é evento clonal, aleatório, multicêntrico e bilateral (9). Dentre as várias substâncias bioativas secretadas pelas células C, a calcitonina é a mais importante e considerada o seu melhor marcador tumoral (3, 10). A hiperplasia de células C corresponde à fase pré-maligna da forma herdada de CMT; ocorrendo a seguinte seqüência de eventos nas células C: hiperplasias focais, nodulares e difusas que progridem até CMT. Cerca de 50-70% dos pacientes com CMT diagnosticados por meio de hipercalcitoninemia e nódulos

tireoidianos palpáveis, já possuem metástases locais em linfonodos cervicais ou, mais raramente, à distância (pulmões, fígado e ossos) (11).

O feocromocitoma (FEO) associado à NEM-2 representa cerca de 10% do total de FEOs; é benigno em 90% dos casos, localiza-se majoritariamente nas adrenais, sendo bilateral em 50-80% dos pacientes. O diagnóstico de FEO pode preceder, ser sincrônico ao do CMT, ou ser posterior (40-50%) ao achado do CMT (3-17).

O hiperparatireoidismo (HPT) associado à NEM-2 é representado por hiperplasia glandular (85%) ou adenoma (15%); é usualmente subclínico afeta todas as quatro glândulas. Calculoses renal e osteoporose podem ocorrer juntamente à hipercalcemia e níveis elevados de PTH (3, 18).

O megacólon congênito ou doença de Hirschsprung (HSCR) é entidade não-endócrina associada à NEM-2. Caracteriza-se por desordem do desenvolvimento do sistema nervoso entérico (SNE) nos plexos mioentéricos de Auerbach, submucoso de Meissner e submucoso profundo de Henle, e incide ao longo de variável porção do intestino distal. Os indivíduos afetados geralmente apresentam obstrução intestinal ou constipações severas (19).

Aspectos moleculares - Em 1985, estudos de transfecção com DNA de linfoma humano em células NIH-3T3 revelaram foco de proliferação tumoral com presença de diferentes seqüências genéticas de DNA. Entre estas seqüências, uma apresentava-se em comum e foi denominada *RET*-“*Rearranged during Transfection*”. O *RET* foi localizado na sub-banda do cromossomo 10q11.2 em 1987 (1, 20). Em 1993, verificou-se que o proto-oncogene *RET* (*RET*) possui aproximadamente 60 Kilobases (Kb), sendo composto por 21 éxons com tamanhos variando entre 60 e 287

pares de bases (pb) cada. A proteína RET é receptor de membrana do tipo tirosina-quinase, tem 1.100 aminoácidos e apresenta porções extracelular, transmembrana e intracelular. A porção extracelular possui região rica em resíduos cisteínas que exercem importante função na dimerização deste receptor. Mutações *missense* nesta região englobam cerca de 90% de todas as mutações encontradas na NEM-2 (1, 2, 21, 22).

Sinalização molecular - As cisteínas extracelulares influem importantemente na dimerização molecular do receptor. Há pelo menos 10 isoformas de proteínas RET resultantes de sítios de *splicing* alternativos 5' e 3' do éxon 21, com significados funcionais ainda não bem definidos (1, 2). O RET tem importante função na migração e desenvolvimento das células derivadas da crista neural: células C da tireóide; células cromafins das medulas adrenais; gânglios simpáticos, parassimpáticos e entéricos; trato urogenital; e paratireóides (oriundas dos arcos branquiais). Outros receptores e seus respectivos ligantes (GFR α -1/GDNF, GFR α -2/nurturina, GFR α -3/artemina, GFR α -4/persephina) são proteínas que interagem com a porção extracelular do receptor RET (23). Estes fatores auxiliam a sobrevivência e desenvolvimento celular destes tecidos (1). Uma vez acoplados, os ligantes e seus receptores formam um complexo que promove a dimerização dos monômeros do receptor RET, fosforilam os resíduos internos da porção intracelular dos monômeros e iniciam longa cascata de sinalização através de vasta rede de proteína-quinases ativadoras de mitoses (MAPKs) (1, 23-25). Estes sinais amplificados promovem diferenciação neuronal, mobilidade e sobrevivência celular. Dimerização constitutiva (independente da ação do ligante) dos monômeros ocorre na presença de mutações germinativas ativadoras da porção extracelular de RET, favorecendo o fenótipo

neoplásico. Mutações germinativas do *RET* na região intracelular, promovem alterações na afinidade entre substrato e sítio catalítico da proteína, também favorecendo o fenótipo neoplásico (1, 24-26). Estudos bioquímicos e de transfecção da proteína tirosina-quinase mostraram diferenças nas quantidades de expressão dos receptores celulares ao nível da membrana celular. Os resíduos de cisteínas extracelulares do receptor RET derivados de códon mutantes 609 e 611 (próximos à região 5'), usualmente associados ao CMT-F, apresentam menor expressão quantitativa destes receptores em relação aos mutantes no códon 634 (próximo à porção transmembrana) relacionados ao fenótipo NEM-2A. A diferença de potencial neoplásico entre estes dois fenótipos pode ser justificada pela variação da sensibilidade quantitativa de expressão de receptores maduros ao nível da membrana celular, sendo a maior sensibilidade de expressão concorrendo para o acometimento das glândulas tireóide, adrenais e paratireóides (2, 24).

A **NEM-2A** compreende 75% das NEM-2, sendo o CMT presente em virtualmente 100%, FEO em 50% e o HPT entre 20 e 30 % dos casos, com a média de idade ao diagnóstico entre 20 e 40 anos (2). As mutações no *RET* estão presentes em 98% dos casos, sendo que as do tipo *missense* ocorrem mais comumente nos éxons 10 e 11, envolvendo os códon 609, 611, 618, 620, 630 e 634. Pequenas inserções de nucleotídeos nos códon 635 e 637 são mais raras. O códon 634 corresponde a 85% das mutações encontradas, das quais 52% correspondem à mutação Cys634Arg e 26% à mutação Cys634Tyr. Portadores da mutação Cys634Arg podem desenvolver metástases em linfonodos regionais do pescoço aos 15 anos de idade, enquanto que metástases à distância são frequentes em portadores da mutação Cys634Tyr, aos 30 anos de idade (1, 2, 27). Em familiares com elevada

incidência de HPT e ausência de FEO, foram descritas duplicações de 12 pb entre os códon 634 e 635, co-segregadas com a mutação Cys634Arg (1, 2). Em nosso laboratório descrevemos dupla mutação Cys634Arg/Val648Ile em uma família portadora de NEM-2A (6, 14). Dois irmãos com a mutação Val648Ile, não apresentavam sintomas associados à NEM-2. Dois outros irmãos com mutação Cys634Arg expressavam somente o CMT, enquanto que o pai era portador da mutação Cys634Arg e a nova mutação Val648Ile. A evolução do CMT foi relativamente branda, mas ocorreu FEO secretor ectópico de calcitonina, fenótipo extremamente raro (6, 14). Mutações no domínio intracelular do receptor RET envolvendo os códon 790 e 804 são raramente associadas à NEM-2A (1, 2).

O CMT-F compreende 20% do total de casos com NEM-2. Sua caracterização se dá por vários membros de uma família apresentarem CMT, na ausência de FEO e de HPT. O prognóstico tende a ser melhor que o do CMT associado à NEM-2A ou NEM-2B (1, 28). Dos pacientes, 85% apresentam mutações no *RET*, sendo as mais comuns relacionadas aos éxons 10 e 11 (2). Um terço (33%) dos casos de CMT-F apresentam a mutação Cys618Ser e 30%, a Cys634Tyr. A mutação Cys634Arg é rara neste fenótipo (8). Mutações nos códon 609, 611 e 620, assim como no domínio tirosina-quinase Glu768Asp, Val804Leu e Val804Met estão associadas ao CMT-F, apesar de também ocorrerem na NEM-2A. Mutações no domínio tirosina-quinase também foram relatadas nos códon 790, 791, e 891 (1, 2, 27). Mutações nos códon 630, 790, 791, 891 e a duplicação de 12 pb entre os códon 634 e 635 foram descritas em famílias com CMT-F e relacionadas a curso clínico menos agressivo (2). Família com CMT-F possivelmente associado ao HSCR foi descrita portando duplicação de 9 pares de bases no éxon 8 do *RET*, levando à

criação de novo resíduo de cisteína na porção extracelular do receptor. O portador desta inserção não apresentava outras mutações germinativas ou somáticas, confirmando sua patogenicidade (28). Mais recentemente foi descrita mutação Gly533Cys no éxon 8, presente em 76 casos de CMT-F pertencentes a uma família de origem espanhola com 229 indivíduos sob-risco de apresentarem esta mutação (29).

A **NEM-2B** compreende a forma mais distinta e agressiva de CMT hereditário e representa 5% das NEM-2. O aparecimento ultraprecoce do CMT ocorre usualmente antes de 1 ano de idade (2, 8). A mutação Met918Thr ocorre em 95% dos casos, e a mutação Ala883Phe, em cerca de 4% dos pacientes com NEM-2B (1, 2). Mutações menos frequentes como Ser922Tyr e as associações entre mutações no códon 804 com Tyr806Cys no mesmo alelo foram relatadas (1).

Abordagem terapêutica na NEM-2 na era pós-genômica – O impacto na clínica do diagnóstico molecular do *RET* tem sido enorme, uma vez que este permite discriminar em fases precoces portadores de não-portadores de mutações neste gene. Após caracterização de não-portadores, estes são liberados do seguimento médico, enquanto que os portadores da mutação são direcionados para tireoidectomia total. Desde 1997 consensualmente decidiu-se que a indicação de tireoidectomia total deve ter como base a identificação de mutações no *RET*. Esta conduta alterou profundamente o curso clínico do CMT, levando à cura nos casos em que a cirurgia foi realizada precocemente (usualmente abaixo dos 5 anos de idade). A boa tolerância das crianças afetadas à cirurgia e ausência de resultados *RET* falso-positivos, foram pontos importantes para estas recomendações (8, 30). O consenso

internacional sobre NEM (2001) postula haver três grupos de risco baseados nos tipos de mutações no *RET*.

O nível de risco-3 corresponde risco máximo para desenvolvimento de forma agressiva de CMT. Crianças com NEM-2B ou portadoras de mutações nos códons 883, 918 ou 922, devem ser encaminhadas à tireoidectomia total durante os seis primeiros meses de vida; preferencialmente no primeiro mês, pois é comum o desenvolvimento metástases durante o primeiro ano de vida. Deve ser realizada limpeza dos linfonodos centrais do pescoço, sendo de maior extensão quando comprovada a existência de metástases (8).

O nível de risco-2 compreende risco elevado para desenvolvimento de forma agressiva de CMT. Crianças portadoras de mutações nos códons 611, 618, 620 ou 634 devem ser encaminhadas à tireoidectomia total antes dos cinco anos de idade. A cirurgia deve ser associada à remoção da cápsula posterior e dissecação dos linfonodos centrais (8).

O nível de risco-1 compreende risco moderado para desenvolvimento de forma agressiva de CMT. Crianças portadoras de mutações nos códons 609, 768, 790, 791 804 e 891 devem ser encaminhadas para tireoidectomia total. A idade para indicação de cirurgia permanece controversa, podendo ser anterior aos cinco ou 10 anos de idade ou somente após a elevação dos níveis de calcitonina. O comportamento biológico dos tumores relacionados às mutações deste grupo é bastante variável. O CMT associado a estas mutações usualmente apresenta desenvolvimento lento e tardio, entretanto metástases e mortes por CMT já foram associadas às mutações nos códons 609, 768, 804 e 891 (8, 31, 32).

Quanto aos familiares de afetados, a escolha de metodologia de rastreamento de mutações genéticas no *RET* deve considerar a praticidade, custo-benefício, sensibilidade e especificidade do método, em comparação ao sequenciamento genético direto (padrão-ouro). O método de rastreamento deve ainda considerar sua fácil execução e reprodutibilidade. Por exemplo, técnicas como SSCP, além de usarem produtos radioativos podem eventualmente apresentar baixa sensibilidade para amplificadores maiores que 200pb (2, 33). A tabela 02 apresenta um algoritmo para análise genética do *RET*.

RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO *RET*.

Como em toda pesquisa clínica, devemos seguir a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10 de outubro de 1996, dispondo sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Assim, rastreamentos devem ser aprovados pela Comissão de Ética da instituição competente. Após aceitação e assinatura de consentimento livre e esclarecido por parte dos indivíduos envolvidos, coleta-se amostras de sangue periférico mediante punção venosa, em dois tubos de coleta com 5 ml cada, em anticoagulante EDTA. A seguir citamos os métodos envolvidos no rastreamento de mutações do *RET*.

A extração do DNA genômico é realizada em nosso serviço pelo “método do sal” (salting out), por ser um procedimento rápido e de baixo custo (34). Sua quantificação é realizada com auxílio de espectrofotômetro.

A amplificação do DNA genômico de interesse é realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) (35). Os oligonucleotídeos iniciadores (primers) devem conter sequências flanqueadoras da região íntron-éxon para o estudo do *RET* e a um

deles deve ser acoplada cauda guanina-citosina de aproximadamente 50pb (31-38). As seqüências dos *primers* e suas respectivas temperaturas de ciclagem, realizadas por PCR encontram-se na tabela 03.

A eletroforese em gel com gradiente de denaturação (DGGE), é realizada após a reação de PCR com *primers* especiais os quais se acoplaram caudas guanina-citosina de aproximadamente 50pb (31-38). O objetivo é criar domínio com maior temperatura de denaturação, quando comparada à temperatura de denaturação da seqüência de DNA em estudo, prevenindo a total denaturação da dupla fita de DNA, o que acarretaria prejuízo e perda da análise eletroforética. Nesta técnica, os fragmentos de DNA de mesmo tamanho são separados mediante transformação das duplas fitas de DNA em fitas simples, por ação de diferentes concentrações de substâncias químicas denaturantes e calor (44). Nucleotídeos mutados nas seqüências dos DNAs promoverão alterações na temperatura de denaturação da região de mutação, em contraste com a fita de DNA controle, alterando também sua mobilidade através da matriz do gel (44, 45).

O polimorfismo conformacional de cadeia simples (SSCP) é usado por alguns laboratórios de pesquisas para rastrear indivíduos “sob-risco” para mutações do *RET*. Uma fita de DNA simples contendo determinada mutação assume estrutura terciária diferenciada da fita simples não-mutante, induzindo a diferença de mobilidade ao longo do gel não-denaturante. A detecção pode ser realizada por autoradiograma (detecção radioativa), coloração com prata ou uso de *primers* fluorescentes detectáveis em seqüenciador automático (não radioativos). Este método apresenta sensibilidade ao real de 80% para fragmentos menores de 300 pb, significando que a ausência de bandas mutantes em ensaio de SSCP não exclui a

possibilidade do indivíduo carregar mutações, o que pode gerar casos de falso-negativos (46-49).

Na reação de seqüenciamento gênico os segmentos de DNA de interesse são analisados por metodologia enzimática ou de terminação de cadeia, descrita por Sanger (50). Como a maioria das mutações no *RET* são do tipo *missense*, é imprescindível analisar-se separadamente as fitas *sense* e *anti-sense* em estudo, evitando falsos resultados.

O mini seqüenciamento gênico baseia-se na adaptação de kit comercial, onde a reação depende de três *primers* com tamanhos específicos. Cada *primer* deve ter um par de base a menos que o nucleotídeo correspondente ao códon de interesse em pesquisa de mutação. A extensão da reação ocorre mediante incorporação de dideoxynucleotídeo (ddNTP) cuja incorporação depende do genótipo em estudo. Após a incorporação deste nucleotídeo marcado a reação não mais ocorrerá, sendo possível a análise e diferenciação do códon mutado mediante uso de programa de computação (51).

A técnica de enzimas de restrição baseia-se na criação ou destruição dos sítios de reconhecimento para endonucleases provocadas por mutações no *RET*. Isto torna possível a utilização deste método como confirmação de resultados do seqüenciamento gênico direto, DGGE ou SSCP. O produto da digestão deve ser visualizado em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio para posterior visualização em transluminador ultravioleta (14, 52, 53).

EXPERIÊNCIA DA UNIDADE DE ENDOCRINOLOGIA GENÉTICA

Em nossa Unidade, os pacientes com NEM-2 eram inicialmente diagnosticados por procedimentos clínicos e bioquímicos clássicos, tais como: dosagens basais e pós-estímulo por cálcio, pentagastrina ou omeprazol da secreção de calcitonina; dosagens de epinefrina e norepinefrina séricas e urinárias; dosagens de PTH e cálcio; imunocitoquímica e histoquímica para calcitonina; além de exames de imagem (4-16, 26, 54-56). Neste mesmo período nosso grupo avaliou, originalmente no país, a sensibilidade da dosagem de calcitonina em portadores de nódulos tireoidianos por CMT (16). Atualmente, para os casos-índices realizamos o seqüenciamento gênico direto, enquanto que seus parentes sob-risco são submetidos ao rastreamento por DGGE. Estes dados são usualmente confirmados por restrição enzimática.

Recentemente realizamos seqüenciamento gênico direto para os éxons *hot-spots* do *RET* (ABI 310 DNA Sequencer, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), em 50 amostras de DNA previamente analisadas por DGGE em nosso grupo (6, 14). Assim, estudamos cinco famílias portadoras de NEM-2 (50 indivíduos), que sumariamente apresentaram os seguintes achados: 28 portadores de mutação no *RET*, e 22 não-portadores de mutação. Dentre os 28 indivíduos mutados, encontramos as seguintes correlações genótipo-fenótipo: a) éxon 11 do *RET*, Cys634Arg (TGC-CGC) em casos com NEM-2A; b) éxon 10 do *RET*, Cys620Arg (TGC-CGC) em casos com NEM-2A associadas à HSCR; c) éxon 14 do *RET*, Val804Met (GTG-ATG) em pacientes com CMT-F; d) éxon 16 do *RET*, Met918Thr (ATG-ACG) em pacientes com NEM-2B; e) em uma família com fenótipo NEM-2A, ocorreu a dupla mutação Cys634Arg (TGC-CGC) / Val648Ile (GTC-ATC) (6).

Para todos os indivíduos, os nossos dados do seqüenciamento gênico direto do *RET* foram totalmente (100%) compatíveis com os achados anteriores do DGGE. Não foram detectados falso-positivos ou falso-negativos ao utilizarmos o seqüenciamento gênico e o DGGE como método de rastreamento gênico para o *RET*. Estes dados permitem afirmar que a estratégia de rastreamento genético do *RET* usando um dos dois métodos é adequada, por não ter ocorrido falso resultado.

A tireoidectomia total foi indicada nos 28 portadores de mutações no *RET*, seguindo critérios do consenso internacional para estudos do *RET* (8). Outros 22 parentes dos pacientes que não eram portadores de mutação no *RET* foram dispensados do acompanhamento médico. A figura 01 mostra as mutações encontradas na análise por seqüenciamento gênico em nosso estudo (ABI 310 DNA Sequencer, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

CONCLUSÕES

Na fase pré-genômica, parentes de primeiro grau de pacientes com NEM-2, os quais possuem 50% de chance de apresentarem mutações no *RET*, eram rastreados anualmente para CMT, FEO e HPT, por meio de marcadores tumorais. Nesta fase, o diagnóstico do CMT era usualmente tardio, sendo freqüentes as apresentações mais avançadas da doença. Com o diagnóstico gênico da NEM-2, a indicação da tireoidectomia total tornou-se precoce e específica aos portadores de mutação no *RET*, tendo esta cirurgia adquirido grande valor curativo para o CMT (2, 22, 31).

O sucesso do diagnóstico do *RET* na NEM-2 se deve ao fato da doença ter elevada penetrância em familiares de afetados (22, 31). O diagnóstico molecular torna-se então importante não só para a confirmação diagnóstica de indivíduos

sabidamente afetados, como fundamental na conduta médica-cirúrgica de indivíduos assintomáticos portadores de mutações, uma vez que estes deverão ser submetidos à tireoidectomia total profilática, seguindo critérios do consórcio internacional (8).

Neste estudo apresentamos como métodos de rastreamento o seqüenciamento gênico, DGGE, SSCP, enzima de restrição além do mini-seqüenciamento. O seqüenciamento gênico é considerado o “padrão-ouro” da análise molecular, podendo ser de alto custo financeiro ao se rastrear famílias extensas. O mini-seqüenciamento apresenta-se como metodologia de rastreamento segura, de menor custo e mais rápida realização (12 minutos), quando comparado ao seqüenciamento genético tradicional. Como desvantagem, necessita de prévio conhecimento das mutações a serem pesquisadas para a confecção dos três *primers* específicos na análise (51). Tanto o seqüenciamento direto como o mini-seqüenciamento necessitam de treinamento específico e ainda poucos centros no Brasil estão aptos a realizá-los rotineiramente. O custo envolvido na aquisição e manutenção do seqüenciador gênico deve ser também levado em conta. O uso de enzimas de restrição limita-se à confirmação da mutação rastreada, uma vez que sua reprodutibilidade nem sempre é segura, devido a possíveis interferentes tais como: não reconhecimento do sítio de restrição do produto amplificado e conseqüente não visualização destes fragmentos em gel de agarose; separação incompleta ou não separação de fragmentos com tamanhos aproximados.

O DGGE tem se mostrado o método de rastreamento adequado e apresenta excelente correlação com o seqüenciamento gênico do *RET* (100%). Além disto, é altamente sensível, não-radioativo e de pouca manipulação fornecendo resultados rápidos e precisos. Permite rastreamento de grande número de pacientes, uma vez

que 6 éxons *hot-spots* do *RET* podem ser analisados em um único gel. Além disto, não necessita de prévio conhecimento da mutação específica que segrega na família, é mais sensível que outras metodologias como o SSCP e não depende da existência de sítios de restrições. Como desvantagens, o DGGE necessita de análise computacional da temperatura de desnaturação de cada seguimento; envolve investimento inicial para aquisição do sistema de eletroforese específico; maiores custos para confecção dos *primers* especiais (que necessitam da cauda guanina-citosina); difícil padronização da técnica para genes ricos em guaninas e citosinas e uso de formamida (tóxica) no protocolo laboratorial (6, 14). No presente trabalho, estudamos 50 casos com NEM-2 por meio do seqüenciamento gênico direto, os quais já haviam sido anteriormente analisados por DGGE. Não houve casos de falsos-resultados, quando comparados ambos métodos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Grupo PAPAIZ pelo apoio financeiro e por acreditar em nosso trabalho de pesquisa, visando trazer para a sociedade maior rapidez e segurança no diagnóstico de neoplasia múltipla do tipo-2. Ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte responsável pelo Laboratório de Investigações Médicas em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM-56), Departamento de Dermatologia, HC-FMUSP, pela colaboração e integração científica disponibilizando a estrutura de softwares para análises das seqüências gênicas do nosso estudo. Agradecemos a todos os profissionais da Unidade de Endocrinologia Genética (LIM-25), Endocrinologia, Departamento de Clínica Médica, HC-FMUSP, por tornarem direta ou indiretamente possível a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hoff AO, Cote GJ, Gagel RF. Multiple endocrine neoplasias. **Annu Rev Physiol** 2000; 62: 377-400.
2. Eng C. *RET* proto-oncogene in the development of human cancer. **J Clin Oncol** 1999; 17: 390-93.
3. Gimm O. Multiple Endocrine Neoplasia Type 2: Clinical Aspects. In: Dahia PLM, Eng C, editors. **Genetic Disorders of Endocrine Neoplasia**. 1st edition. Front Horm Res Basel:Karger, 2001: 103-30.
4. Toledo SPA, Abelin NMA, Ezabella MCL, Hayashida CY, Dahia PM. Neoplasias Endocrinas Múltiplas. In: Wajchenberg BL, editor. **Tratado de Endocrinologia Clínica**. São Paulo: Roca, 1992: 943-64.
5. Ezabella MCL, Hayashida CY, Abelin NMA, Toledo SPA. Neoplasias Endocrinas Múltiplas. In: Medeiros-Neto G, editor. **Moléstias Hereditárias do Sistema Tireoideano**. 1^o edição. São Paulo:Roca, 1996: 225-42.
6. Nunes AB, Ezabella MCL, Pereira AC, Krieger JE, Toledo SPA. A novel Val648Ile substitution in RET proto-oncogene observed in a Cys634Arg multiple endocrine neoplasia type 2A kindred presenting with an adrenocorticotropin-producing pheochromocytoma. **J Clin Endocrinol Metab** 2002; 87: 5658-61.
7. Maia FFR, Júnior HJ, Araújo LR. Neoplasia endócrina múltipla tipo 2 – manejo diagnóstico e terapêutico. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2002; 46: 606-10.

8. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, et al. CONSENSUS: Guideline for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. **J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86: 5658-71.
9. Eng C, Crossey PA, Mulligan LM, Healey CS, Houghton C, Prowse A, et al. Mutations in the RET proto-oncogene and the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in sporadic and syndromic pheochromocytomas. **J Med Genet** 1995; 32: 934-7.
10. Aliepoulos MA, Rose EH. Specific localization of calcitonin activity in humans' thyroid glands. **Calcitonin Proceedings of the Second International Symposium**. 2nd ed. London:Heinemann, 1970.
11. Maciel RMB. Tumorigênese molecular tiroideana: implicações para a prática médica. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2002; 46: 381-90.
12. Niccoli-Sire P, Murat A, Baudin E, Henry J, Proye C, Bigorgne J, et al. Early or prophylactic thyroidectomy in MEN2/FMTC gene carriers: results in 71 thyroidectomized patients. **Eur J Endocrinol** 1999; 141: 468-74.
13. Wells SAJr, Franz C. Medullary carcinoma of the thyroid gland. **World J Surg** 2000; 24: 952-6.
14. Nunes AB. Identificação de mutações do proto-oncogene *RET* associadas à forma hereditária do carcinoma medular de tireóide. **Tese de Doutorado, LIM-25, HC-FMUSP, 2001**.
15. Hayashida CY, Alves VAF, Kanamura CT, Ezabella MCL, Abelin NMA, Nicolau W, et al. Immunohistochemistry of medullary thyroid carcinoma and C-cell hyperplasia by an affinity-purified anti-human calcitonin antiserum. **Cancer** 1993; 72: 1356 -63.

16. Abelin NMA, Gomes S, Ivanoff MT, Ezabella MCL, Hayashida CY, Toledo SPA. Abordagem clínica e laboratorial do bócio uni-nodular sólido: vantagens da determinação da calcitonina sérica por métodos distintos. **Arq Bras Endocrinol Metab** 1999; 43: 104-13.
17. Carney JA, Sizemore GW, Sheps SG. Adrenal medullary disease in multiple endocrine neoplasia type 2. Pheochromocytoma and its precursors. **Am J Clin Pathol** 1976; 66: 279-90.
18. Herfarth KK, Bartsch D, Doherty GM, Wells SA, Lairmore TC. Surgical management of hyperparathyroidism in patients with multiple endocrine neoplasia type 2A. **Surgery** 1996; 120: 966-74.
19. Martucciello G, Ceccherini I, Lerone M, Jasonni V. Pathogenesis of Hirschsprung's disease. **J Pediatr Surg** 2000; 35: 1017-25.
20. Gagel RF. The impact of gene mapping techniques on the management of multiple endocrine neoplasia type 2. **Trends Endocr Metab** 1991; 2: 19-25.
21. Kwok JB, Gardner E, Warner JP, Ponder BAJ, Mulligan LM. Structural analysis of the human *RET* proto-oncogene using exon trapping. **Oncogene** 1993; 8: 2575-82.
22. Donnis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, et al. Mutation in RET proto-oncogene are associated with MEN2A and FMTC. **Hum Molec Genet** 1993; 2: 851-56.
23. Dahia PL, Toledo SPA, Mulligan LM, Maher ER, Grossman AB, Eng C. Mutation analysis of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), a ligand for the RET/GDNF receptor alpha complex, in sporadic pheochromocytomas. **Cancer Res** 1997; 57: 310-3.

24. Mulligan LM. Multiple Endocrine Neoplasia Type 2: Molecular Aspects. In: Dahia PLM, Eng C, editors. **Genetic disorders of endocrine neoplasia**. 1^o edição. Front Horm Res Basel:Karger, 2001: 81-102.
25. Xing S, Smanik PA, Oglesbee MJ, Trosko JE, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Characterization of *RET* oncogenic activation in MEN2 inherited cancer syndromes. **Endocrinology** **1996**; 137: 1512-19.
26. Eng C, Crossey PA, Mulligan LM, Healey CS, Houghton C, Prowse A, et al. Mutations in the RET proto-oncogene and the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in sporadic and syndromic pheochromocytomas. **J Med Genet** **1995**; 32:934-7.
27. Puñales MK, Graf H, Gross JL, Maia, AL. *RET* codon 634 mutations in multiple endocrine neoplasia type 2: Variable clinical features and clinical outcome. **J Clin Endocrinol Metab**; **2003** 88: 2644-49.
28. Pigny P, Bauters C, Wemeau JL, Houcke ML, Crepin M, Caron P, et al. A novel 9-base pair in *RET* exon 8 in familial medullary thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab** **1999**; 84: 1700-04.
29. Silva AMA, Maciel RMB, Silva MRD, Toledo SRC, Carvalho MB, Cerutti JM. A novel germ-line mutation in *RET* exon 8 (Gly533Cys) in a large kindred with familial medullary thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab** **2003**; 88: 5438-43.
30. Gagel RF. Editorial: *RET* proto-oncogene mutations and endocrine neoplasia – A story intertwined with neuronal crest differentiation. **Endocrinology** **1996**; 137: 509-511.

31. Kahraman T, Groot JWB, Rouwe C, Hofstra RMW, Links TP, Sijmons RH, et al. Acceptable age for prophylactic surgery in children with multiple endocrine neoplasia type 2A. **Eur J Surgical Oncology** **2002**; 29: 331-35.
32. Puñales MK, Rocha PA, Gross JL, Maia AL. Carcinoma medular de tireóide: aspectos moleculares, clínico-oncológicos e terapêuticos. **Arq Bras Endocrinol Metab** **2004**; 48: 137-46.
33. Kärkkö J, Annunen S, Pihlajamaa T, Prockop DJ, Kokko LA. Conformation sensitive gel electrophoresis for simple and accurate detection of mutations: Compararison with denaturing gradient gel electrophoresis and nucleotide sequencing. **Proc Natl Acad Sci (USA)** **1998**; 95: 1681-85.
34. Miller S, Dykes D, Poleski H. A single salting out procedures for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res** **1988**; 16: 1215.
35. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** **1988**; 239: 487-91.
36. Kärkkö J, Annunen S, Pihlajamaa T, Prockop DJ, Kokko LA. Conformation sensitive gel electrophoresis for simple and accurate detection of mutations: Compararison with denaturing gradient gel electrophoresis and nucleotide sequencing. **Proc Natl Acad Sci (USA)** **1998**; 95: 1681-85.
37. Takahashi M, Buma Y, Iwamoto Y, Ikeda H, Hiai H. Cloning and expression of RET proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. **Oncogene** **1988**; 3: 571-8.
38. Takahashi M, Buma Y, Hiai H. Isolation of RET proto-oncogene DNA with an amino-terminal signal sequence. **Oncogene** **1989**; 4: 805-6.

39. Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM. Attachment of a 40-base pair G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. **Proc Natl Acad Sci (USA)** **1989**; 86: 232-36.
40. Mulligan LM, Eng C, Healey CS, Calyton D, Kwok JBJ, Gardner E, et al. Specific mutations of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN2A and FMTC. **Nat Genet** **1994**; 6: 70-4.
41. Blank RD, Skalkr CA, Martin ML. Denaturing gel electrophoresis to diagnose multiple endocrine neoplasia type 2. **Clin Chem** **1996**; 42: 598-603.
42. Ceccherini I, Pasini B, Pacim F, Gullo M, Bongarzone I, Romei C, et al. Somatic in frame deletions not involving juxtamembranous cysteine residues strongly activate the RET proto-oncogene. **Oncogene** **1997**; 14: 2609-12.
43. Decker RA, Peacock ML. Update on the profile of multiple endocrine neoplasia type 2A RET mutations: practical issues and implications for genetic testing. **Cancer** **1997**; 80: 557-68.
44. Wu Y, Hayes VM, Osinga J, Mulder IM, Loomam MWG, Buys CHCM, et al. Improvement of fragment and primer selection for mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Res** **1998**; 26: 5432.
45. Wu Y, Stulp RP, Elfferich P, Osinga J, Buys CHCM, Hofstra RMW. Improvement mutation detection in GC-rich DNA fragments by combined DGGE and CDGE. **Nucleic Acids Res** **1999**; 27: e9i.
46. Hayashi K, Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP? **Hum Mutat** **1993**; 2: 338-46.

47. Puñales MK, Graf H, Gross JL, Maia AL. Rastreamento genético do carcinoma medular de tireóide: identificação de mutações no proto-oncogene *RET*. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2002; 46: 632-39.
48. Berndt I, Reuter M, Saller B, Frank-Raue K, Groth P, Grubendorf M, et al. A new hot spot for mutations in the ret protooncogene causing familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2A. **J Clin Endocrinol Metab** 1998; 83: 770-74.
49. Lombardo F, Baudin E, Chiefari E, Arturi F, Bardet S, Caillou B, et al. Familial medullary thyroid carcinoma: clinical variability and low aggressiveness associated with ret mutation at codon 804. **J Clin Endocrinol Metab** 2002; 87: 1674-80.
50. Sanger F & Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **J Mol Biol** 1975; 94: 444-48.
51. Bugalho MJ, Domingues R, Sobrinho L. The minisequencing method: a simple strategy for genetic screening of MEN 2 families. **BMG Genetics** 2002; 3: 1-5.
52. Frediani D. Rastreamento gênico através de enzimas de restrição na forma hereditária do carcinoma medular de tireóide. **Monografia, LIM-25, HC-FMUSP, 2002.**
53. Toledo SPA, Ezabella MCL, Abelin N, Hayashida CY e Dahia PM. Perda do Sítio de Restrição fok-I no códon 918 do proto-oncogene RET na neoplasia endócrina múltipla tipo 2B. **Arq Brasil Endocrinol Metab** 1997; 41:14-17.

54. Ezabella MC, Hayashida CY, Bisi H, Leite MO, Borelli A, Abelin NM, et al. Early detection of medullary thyroid carcinoma in multiple endocrine neoplasia type II. **Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo 1990**; 45: 105-9.
55. Toledo SPA, Ferraz AR. Multiple endocrine type II neoplasm. **Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo 1990**; 45:1-2.
56. Viégas TMRF. Comparação dos testes de estímulo da secreção de calcitonina (omeprazol versus cálcio) no diagnóstico e seguimento de pacientes com carcinoma medular de tireóide. **Monografia, LIM-25, HC-FMUSP, 2001.**

Tabela 01: Classificação das famílias portadoras de NEM-2, segundo expressão fenotípica (Adaptado das ref. 1 e 2).

NEM-2A: Pode apresentar-se sob três formas. **a)** Famílias com fenótipos de CMT, FEO e HPT; **b)** Famílias somente com fenótipos de CMT e FEO. **c)** Famílias somente com fenótipos de CMT e HPT.

NEM-2B: Famílias com fenótipo de CMT, portando ou não FEO e apresentando características clínicas peculiares tais como anormalidades musculares e esqueléticas, neuromas mucosos nos lábios, língua ou conjuntivas palpebrais e ganglioneuromatoses intestinais.

CMT-F: Famílias com no mínimo 4 indivíduos apresentando somente fenótipo CMT, estando FEO e HPT ausentes.

Outros: Famílias com menos de 4 indivíduos apresentando somente fenótipo de CMT, sendo FEO e HPT ausentes. Neste grupo também se classificam as famílias com documentações, aspectos clínicos ou laboratoriais incompletos que não permitam sua classificação como CMT-F.

NEM: neoplasias endócrinas múltiplas; CMT: carcinoma medular de tireóide; CMT-F: carcinoma medular de tireóide familiar; FEO: feocromocitoma; HPT: hiperparatireoidismo.

Tabela 02: Algoritmo para análise genética do *RET*.

Tabela 03: Sequência dos *primers* acrescidos de caudas GC e respectivas temperaturas de anelamento utilizadas durante o estudo de rastreamento e seqüenciamento gênico do proto-oncogene RET (Adaptado das ref. 37-43).

Éxon 10: (207 pb) 35 ciclos de 95°C por 1 min; 72°C por 1 min, seguidos de um ciclo único a 100°C por 10 min.

RET 10F: 5'GCGCCCCCGCCCCGCCCCGCCCCGCGGCGCCCCAGGAGGCTAGTG 3'

RET 10R: 5'CGTGCTGGTCCCGGCCGCC 3'

Éxon 11: (295 pb) 40 ciclos de 95°C por 1 min; 65°C por 30 seg; 72°C por 1 min, seguidos de um ciclo único a 100°C por 10 min.

RET 11F: 5'GCGCCCCCGCCCCGCCCCGCCCCGCGCGACCTGGTTCTCCATGGAGTC 3'

RET 11R: 5'CCTCACACCACCCCAACCA 3'

Éxon 13: (120 pb) 35 ciclos de 94°C por 1 min; 65°C por 1 min; 72°C por 1 min, seguidos de um ciclo único a 72°C por 10 min.

RET 13F: 5'CTCTCTGTCTGAACTTGGGC 3'

RET 13R: 5'GCGCCCCCGCCCCGCCCCGCGCGTCACCCTGCAGCAGGCCTTA 3'

Éxon 14: (395 pb) 40 ciclos de 95°C por 35 seg; 66°C por 30 seg; 72°C por 35 seg, seguidos de um ciclo único a 100°C por 10 min.

RET 14F: 5'GCGCCCCCGCCCCGCCCCGCGCGCGCGCCAGGGATAGGGCCTGGGCTT
C 3'

RET 14R: 5'TAACCTCCACCCAAGAGAG 3'

Éxon 16: (210 pb) 35 ciclos de 94°C por 1 min; 60°C por 1 min; 72°C por 1 min, seguidos de um ciclo único a 72°C por 10 min.

RET 16F: 5'AGGGATAGGGCCTGGGCTTC 3'

RET 16R: 5'CGCCCGCGCGCCCCGCCCCGCCCCGGAGGGATAGGGCCTGGGTTC 3'

Figura 01: Mutações encontradas na análise por sequenciamento gênico e DGGE de 50 indivíduos portadores de NEM-2 (ABI 310 DNA Sequencer, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Legendas:

a) Substituição de timina por citosina (TGC-CGC) no códon 634 (éxon 11) do *RET*, traduzindo a mutação Cys634Arg. Ao lado exemplificamos corrida do DGGE mostrando a mutação Cys634Arg com padrão eletroforético de 4 bandas e seu alelo recessivo não mutante com 1 banda.

b) Substituição de timina por citosina (TGC-CGC) no códon 620 (éxon 10) do *RET* traduzindo a mutação Cys620Arg.

c) Substituição de guanina por adenine (GTG-ATG) no códon 804 (éxon 14) do *RET* traduzindo a mutação Val804Met.

d) Substituição de timina por citosina (ATG-ACG) no códon 918 (éxon 16) do *RET* traduzindo a mutação Met918Thr.

e) Substituição de guanina por adenina (GTC-ATC) no códon 648 (éxon 11) do *RET* traduzindo a mutação Val648Ile.

a)

b)

c)

d)

e)

APÊNDICE 2

IMPACT OF RET PROTO-ONCOGENE ANALYSIS ON THE CLINICAL MANAGEMENT OF MULTIPLE ENDOCRINE NEOPLASIA TYPE 2

Sergio Pereira de Almeida Toledo

Marcelo Augusto Cortina Gonçalves dos Santos

Rodrigo de Almeida Toledo

Delmar Muniz Lourenço Júnior

***Clinics.* 2006;61(1):59-70**

**Impacto da análise do proto-oncogene RET na conduta clínica da neoplasia
endócrina múltipla tipo 2.**

Marcelo Augusto Cortina Gonçalves dos Santos (Santos, MA) Bacharel em Biomedicina.
(cortina_marcelo@hotmail.com)

Rodrigo de Almeida Toledo (Toledo, RA) Bacharel em Biologia.
(toledorodrigo79@hotmail.com)

Delmar Muniz Lourenço Júnior (Lourenço, DM) Médico Doutor.
(delmarmuniz@hotmail.com)

Sergio Pereira de Almeida Toledo (Toledo, SPA) Médico Doutor e Professor Associado.
(toldo@usp.br)

Unidade de Endocrinologia Genética (LIM-25), Endocrinologia, Departamento de Clínica
Médica, Universidade de São Paulo, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Av.
Dr. Arnaldo, 455, 5º andar, São Paulo, SP. CEP: 01246-903 Fone / Fax: (11)3066-7252.

MACGS e RAT recebem bolsa de aperfeiçoamento da Fundação Faculdade de Medicina
(FFM)/ grupo PAPAIZ, DMLJ recebe bolsa de aperfeiçoamento de pós-doutorando da FFM,
SPAT é pesquisador 1A do CNPq (300346-8-4).

**Impacto da análise do proto-oncogene RET na conduta clínica da neoplasia
endócrina múltipla tipo 2.**

Marcelo Augusto Cortina Gonçalves dos Santos (Santos, MA) Bacharel em Biomedicina.
(cortina_marcelo@hotmail.com)

Rodrigo de Almeida Toledo (Toledo, RA) Bacharel em Biologia.
(toledorodrigo79@hotmail.com)

Delmar Muniz Lourenço Júnior (Lourenço, DM) Médico Doutor.
(delmarmuniz@hotmail.com)

Sergio Pereira de Almeida Toledo (Toledo, SPA) Médico Doutor e Professor associado.
(toldo@usp.br)

Unidade de Endocrinologia Genética (LIM-25), Endocrinologia, Departamento de Medicina
Interna, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Av. Dr. Arnaldo, 455, 5º andar,
São Paulo, SP, CEP 01246-903, Fone / Fax: 11.3066-7252.

MACGS e RAT recebem bolsa de aperfeiçoamento da Fundação Faculdade de Medicina
(FFM)/ grupo PAPAIZ, DMLJ recebe bolsa de aperfeiçoamento de pós-doutorando da FFM,
SPAT é pesquisador 1A do CNPq (300346-8-4).

Impact of RET protooncogene analysis in the clinical management of multiple endocrine neoplasia type 2.

SUMMARY

Multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2) is an autosomal dominant disease characterized by the presence of medullary thyroid carcinoma (MTC), primary hyperparathyroidism (HPT) and pheochromocytoma (PHEO).¹⁻¹² MEN2 still persists as an underdiagnosed and late-diagnosed condition in many geographical areas. Since 1993, when missense RET proto-oncogene (*RET*) mutations were reported in MEN2, up to 46 different *RET* causing-disease mutations were described.¹³⁻¹⁷ As a strong genotype-phenotype correlation there exists in MEN2, the detection of *RET* mutations has presented a major impact in early recognition and treatment of MTC and MEN2. Presently, *RET* mutation analysis should be performed in *all* MEN2 cases and their at risk familial relatives. Further, prophylactic total thyroidectomy is indicated in all cases harboring activating germline *RET* mutations.¹ In most *RET* mutation carriers, this surgical procedure is indicated at ages as early as few months to four years of age, promoting longer survival, and improvement of quality of life or even definitive cure.¹ Here we discuss the large impact of *RET* proto-oncogene analysis in the clinical management of MEN2. Further, early *RET* molecular DNA diagnosis provides clinicians and surgeons with most valuable information, allowing them to indicate early total thyroidectomy.

Keywords: endocrine neoplasia; MEN2; RET protooncogene; pheochromocytoma; hyperparathyroidism; HSCR; MTC; FMTC.

RESUMO

A Neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (NEM2) é caracterizada pela ocorrência do carcinoma medular de tireóide (CMT), hiperparatireoidismo primário (HPT) e feocromocitoma (FEO).¹⁻¹² Desde 1993, quando as primeiras mutações do tipo *missense* no proto-oncogene RET (*RET*) associadas a NEM2 foram identificadas, 46 diferentes mutações causadoras de doenças foram descritas.¹³⁻¹⁷ Como há uma forte correlação genótipo-fenótipo na NEM2, a detecção de mutações no *RET* adquiriu grande impacto no tratamento precoce do CMT e NEM2. A NEM2 persiste uma doença subdiagnosticada e/ou tardiamente diagnosticada em várias áreas geográficas do globo. A análise de mutações do *RET* deve ser realizada em todos os casos de NEM2 e atualmente, a tireoidectomia total profilática é indicada para todos os indivíduos portadores de mutações no *RET*.¹ Para grande maioria dos portadores de mutações gaméticas ativadoras no *RET* este procedimento cirúrgico é indicado nos primeiros anos de vida, promovendo melhora na qualidade de vida, aumento da sobrevida ou mesmo levando à cura definitiva.¹ Discutimos nesta revisão, o impacto da análise do proto-oncogene RET na conduta clínica da neoplasia endócrina múltipla tipo 2. Além disso, o diagnóstico molecular do *RET* promove à clínicos e cirurgiões a mais valiosa informação, permitindo indicação de tireoidectomia total profilática.

Unitermos: neoplasia endócrina; NEM2; proto-oncogene RET; feocromocitoma; hiperparatireoidismo; HSCR; CMT; CMT-F.

INTRODUCTION

Multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2) is associated with the occurrence of three inherited endocrine tumors: medullary thyroid carcinoma (MTC), primary hyperparathyroidism (HPT), and pheochromocytoma (PHEO). This disease is transmitted by autosomal dominant pattern gene, which makes necessary the genetic screening of all family members at risk to have inherited predisposition to this condition. The three neoplasias here involved are derived from neural crests, such as C thyroid cells, oxyphilic and main parathyroid cells, and cromaffin cells of the adrenal medulla. Sympathic, parasympathic and enteric ganglia and urogenital tract have been also reported as expressing high levels of several hormonal and non-hormonal substances produced by the affected glands.^{1-13, 18-20}

Despite all effort performed in the management of MEN2, this condition persists as an underdiagnosed and also late-diagnosed disease in many areas of the globe. Presently, molecular DNA diagnosis to identify *RET* mutations is mandatory in all MEN2 cases and their relatives at risk to present predisposition to MEN2. This procedure is turned to be a fundamental tool in early MEN2 diagnosis, allowing correct therapeutic surgical dealing.¹²

MOLECULAR MEDICINE

In 1986, with the identification of DNA polymorphisms in chromosome 10 in large MEN2 genealogies, the study of the RET protooncogene (*RET*) gained further interest.¹⁰ Transfection DNA studies of several MTC tumors revealed important foci of proliferation in NIH-3T3 cells, represented by the presence of different genetic DNA sequences.¹⁰ Among these sequences, one - *RET*,

“*Rearranged during Transfection*”- was present in all tumor specimens. Soon after *RET* sequence was localized in the chromosome band 10q11.2.^{10, 13-15} *RET* gene has 60 kb of the human genome spread through 21 exons, with 60 to 287 base pairs (bp), having a 24kb intron between first and second exons and encoding a protein of approximately 1,100 amino acids.^{13, 16} In 1993, Mulligan et al and Donnis-Keller et al (1993) identified the first missense mutations in the extracellular domain of *RET* in patients with MTC and MEN2.^{21, 22}

RET is the only gene that has been associated with MEN2, and gametic mutation in this protooncogene has been extensively studied. MEN2 disease represents an excellent example on how molecular DNA diagnosis may improve clinical management.^{1, 3, 6, 8, 13, 23}

CLASSIFICATION

Table 01 summarizes the accepted classification of MEN2, as suggested by the international consensus on MEN.¹ This classification is based on clinical pictures of the affected MEN2 patients.

Thyroid cancer is a relatively rare event representing 0.6 and 1.6 % of all carcinomas affecting men and women, respectively.²⁴ MTC corresponds to 10% of all thyroid cancers, presenting as sporadic (75% of cases) or as inherited form (25%). MEN2 has an estimated prevalence of 1 in 30.000 individuals and more than 90% of *RET* carriers will develop MTC.^{1, 8, 25} The international consensus on MEN estimates that 95% of MEN2 patients have a detectable *RET* mutation. Exons 10, 11 and 16 mutations correspond 90 to 95% of cases.¹

MEN2A comprises 75% of all MEN2 cases. In MEN2A, MTC is prevalent in almost 100% of patients, whereas PHEO (50%) and HPT (20-30%) are less frequently expressed. Mean age of clinical diagnosis in MEN2A is 20-40 years old, but in post-genomic era it may decrease as new young *RET* mutation carriers are early recognized and operated on.⁸

The familial form of MTC (FMTC) corresponds to 20% of all MEN2 cases and it is characterized by the presence of MTC in the absence of both PHEO and HPT, both in index cases and affected family members. Usually, MTC in FMTC tends to present a less aggressive behavior and better prognosis than in MEN2A or MEN2B.^{13, 26}

Five percent (5%) of MEN2 cases present the phenotype MEN2B, the most aggressive form of MTC. This form is characterized by the association of MTC, PHEO, marfanoid habitus, and mucosal neuromas (lips, tongue, eyebrows and intestinal tract), whereas presence of HPT is very rare.¹³ MTC in MEN2B usually appears very early, usually under 12 months of age.^{8, 27}

MEDULLARY THYROID CARCINOMA

Affected families usually comprise several MTC cases.⁸ Since molecular diagnosis has been performed, increasing incidences and prevalences of inherited forms of MTC have been reported. Familial forms of MTC are constitutive events which lead to bilateral, multicentric thyroid cancer. Among several bioactive substances secreted by thyroid C-cells, calcitonin is the most representative and the best tumor marker of MTC.^{4, 9}

Thyroid C-cell hyperplasia is usually the earlier histologic abnormality in MTC and represents a pre-malignant stage. It initially occurs as small foci, progressing to nodular diffuse hyperplasias which may finally evolve to focal and lastly metastatic MTC.²⁸⁻³² The usual clinical presentation of MTC is a solitary thyroid nodule.²⁸⁻³² At the stage of palpable thyroid nodules, MTC measures at least 1 cm and 50% of patients already present local neck lymph nodes metastases and more rarely lung, liver and bone metastases.^{33, 34} It has been suggested that routine calcitonin measurements should be performed in all patients with thyroid solid nodules as this procedure would permit pre-surgical diagnosis in sporadic form of MTC as well as in familial MTC index cases, permitting to establish an adequate pre-surgical approach.^{35, 36} Fine needle biopsy followed by immunocytochemistry for calcitonin is also helpful for the pre-surgical diagnosis of MTC.^{1, 11, 12, 37-40} Total thyroidectomy associated with extensive resection of neck lymph nodes is the only effective treatment for MTC, as the tumor is usually resistant to iodo, chemo and radiotherapy.^{1, 11, 12} In early diagnosed cases, C-cell hyperplasia is predominant and neck lymph nodes resection may be less massive.^{1, 11, 12}

In the pre-genomic era mortality rates in MEN2 were up at 20%, after *RET* mutation analysis it lowered down to 5% in some samples.¹

PHEOCHROMOCYTOMA

Five to fifteen percent (5-15%) of all PHEOs are associated to MEN2 and most of them (90%) are benign. PHEOs associated to MEN2 are usually located at the adrenals (90%), however extra-adrenal cases have been reported.¹ Most tumors (50-80%) are bilateral. PHEO/MEN2 cases present a pre-tumoral stage characterized

by nodular or diffuse hyperplasia of chromaffin adrenal cells.^{1, 41-48} The diagnosis of PHEO is usually performed after the recognition of MTC (40-50%), however it may occur before or synchronously with MTC diagnosis.^{1, 41} Thus, RET analysis should be considered in all PHEOs cases.¹

Worthwhile, the possibility of an undiagnosed PHEO must be ruled out in all MTC patients before surgery, to avoid the intra-surgical risk of an adrenal hypertension crisis. As contralateral tumor may appear many years after the first diagnosis, PHEO/MEN2 patients need to be followed-up for a long period. Image studies with MIBG and serum/urinary measurements of catecholamines are useful in this task.^{1, 41}

HYPERPARATHYROIDISM

HPT associated to MEN2 (HPT/MEN2) results of a hyperplastic process of parathyroid chief cells involving the four glands. In most HPT/MEN2 cases (68%), associated adenomas have been also reported.^{1, 49} Primary HPT associated to MEN2 is a mild disease presenting slightly elevated concentrations of PTH and calcium. Several measurements may be needed to perform the biochemical diagnosis of HPT.¹ In early diagnosed MEN2 cases, HPT tended to be asymptomatic. Late diagnosed cases are usually symptomatic and, renal stones are usually reported as the first clinical symptom. Osteoporosis may occur in such cases. During neck surgery for MTC in MEN2 cases, enlarged parathyroid glands are frequently found.¹

Two surgical approaches have been used for HPT in MEN2. One, in which the four parathyroid glands are removed and half of a gland is implanted in the non-dominant forearm. Another, in which three and half glands are removed. Post-

surgical euparathyroidism is less often achieved in HPT/MEN2 compared to sporadic primary HPT, and its recurrence rate may be high.^{1, 49} When HPT is present, parathyroidectomy and total thyroidectomy are usually performed at the same surgical approach.⁵⁰

In the pre-genomic era, before 1993, all at risk individuals were conducted to annual screening (since 6 years of age) for MTC, PHEO and HPT. This procedure usually included measurements of basal and stimulated calcitonin, serum and urinary catecholamines, calcium and PTH. *RET* genetic analysis is indicated to all MTC and PHEOs cases.¹ In apparently sporadic HPT in the absence of other clinical suspicion for hereditary MEN2, routine RET analysis is not usually performed.¹

HIRSCHSPRUNG DISEASE

A non-endocrine entity as congenital megacolon or Hirschsprung disease (HSCR) has been described in association with gametic inactivating *RET* mutations and MEN2 cases. This disorder is due to an embryonic defect in the enteric nervous system. In HSCR associated to MEN2, mioenteric and submucosal plexus are affected in extensive areas of the distal enteric tube. Most patients present with intestinal obstruction and constipation. Colectomy is frequently performed at early ages in order to correct intestinal transit.^{31, 51}

MOLECULAR ASPECTS

RET proto-oncogene (*RET*) codifies for a tyrosine kinase cell membrane receptor. The extracellular RET domain is rich in cysteine residues and it is codified

by the first 10 *RET* exons. Exon 11 codifies for the transmembrane domain, whereas the two intra-cellular RET domains are codified by ten other exons.^{8, 36, 52, 53}

The extracellular domain of RET protein includes a cadherin binding site which is important in the intercellular signaling. Extracellular cysteines play an important role in receptor dimerization. At least 10 RET isoforms have been reported as result of 5' and 3' splicing of exon 21, however their physiological function still partially unknown.^{8, 36, 53}

RET has an important role in embryologic migration and development of neural crest-derived cells, as: thyroid C-cells, chromaffin adrenal cells, sympathetic, parasympathic and enteric ganglia cells, as well as urogenital tract.¹³ *RET* is also expressed in parathyroid cells derived from branchial arches. Binding proteins as GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) and its receptor, GFR α -1 (*GDNF Family Receptor alpha one*) interact with the extracellular RET domain, promoting cell survival of central and peripheral neurons. *RET* also plays an essential role in renal and enteric neural development.^{13, 54, 55}

Once coupled, ligands and their respective receptors give rise to a ligand-receptor complex that promotes RET receptor monomers dimerization through disulfite bonds. Intracellular tyrosine-domain residues are self phosphorylated. This process is followed by a complex signalling pathway in which mitotic-activating protein kinases (MAPKs) amplify signalling pathways to cell nuclei, promoting cell mobility and survival.^{6, 35, 56}

The same dimerization process occurs independently of the ligand binding when activating *RET* germline mutations (constitutive mutation) are present on the extracellular domain RET protein, favoring the development of neoplastic

phenotypes. *RET* mutations codify for the intracellular RET protein domain leading to disturbances in the substrate catalytic core affinity, favoring the appearance of the neoplastic process.^{6, 35, 56}

Biochemical and transfection studies of tyrosine kinase have shown differential RET expressions at the cell membrane level. Thus, cysteine residues next to 5' region (as mutant codons 609 and 611) present lower protein expression compared to codon 634 mutations, located next transmembrane domain. The potency of cell neoplastic transformation of codon 634 *RET* mutations is clearly higher than those occurring in codons 609 and 611. This findings may be due to modulation expressions of mature RET protein receptors at the cell membrane, where most of RET protein expression occurs.^{56, 57} Thus, most MEN2 patients harboring *RET* 634 mutations will have thyroid, adrenals and parathyroid tumors, whereas cases with 609 or 611 mutations will present only thyroid cancer. Further, tissue-specific sensitivity may be also modulated by codon-specific *RET* mutations. Tissue sensitivity is then high in thyroid tissue, intermediary in the adrenals and low in parathyroid glands.³ These observations may also explain why activating *RET* mutations usually lead to MEN2, whereas inactivating *RET* mutations cause HSCR. Mutations in codons 618 and 620 usually result in RET receptor amounts sufficient to transform thyroid and possibly adrenal cells, but insufficient to produce disturbances in normal intestinal gangliogenesis. HSCR may be considered a polygenic disease, as RET, GDNF, endotelin receptor-2 genes and genes located at 9q31 and 22q11 bands are involved.^{6, 8}

GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATION

MEN2A

The genotype-phenotype correlations in MEN-2 are summarized in table 02. The vast majority of MEN2A cases (98%) harbors a missense *RET* mutation, mostly in exon 10 and 11 and basically in codons 609, 611, 618, 620, 630, and 634 comprising a small 25-amino-acid domain.³ Rarely, small insertions in codons 635 and 637 have been reported. Codon 634 corresponds to 85% of MEN2A mutations, 52% out of them have Cys634Arg mutation, and 26% present the Cys634Tyr mutation. Further, MTC tumor aggressiveness induced by these two mutations differ: metastases tend to be more frequently and early found in Cys634Arg cases than in Cys634Tyr patients.^{1, 13, 58, 59}

In patients' relatives presenting increased incidence of HPT and absence of PHEO, a 12 bp duplication was found between codons 634 and 635, corresponding to 4 aminoacids and co-segregated with Cys634Arg mutation.^{8, 13} Recently, Nunes et al, of our laboratory, described a case with double *RET* mutation (Val648Ile/Cys634Arg).^{52, 60} In this family, two siblings were Val648Ile carriers and so far presented neither clinical nor biochemical abnormalities compatible with MEN2A. Other two affected siblings presented the usual Cys634Arg *RET* mutation and early classical MTC presentation. The father presented a MEN2A rare phenotype associated with an ectopic ACTH-producing PHEO. He was an obligatory carrier of the double *RET* mutation. MTC in this specific case had a relatively mild presentation.^{52, 60}

Mutations in the intracellular domain of RET protein receptor in codons 790 and 804 are rarely associated to MEN2A. Mutations associated to codon 804 are

frequent in FMTC. Most of these cases, thyroid tumor tend to present a late-onset, slow course and low aggressiveness, when compared to phenotypes presenting extracellular *RET* mutations. These patients may exhibit incomplete neoplastic transformation induced by the 804 mutation; however aggressive MTC tumors and even death due to MTC were reported in cases harboring codon 804 mutations.^{8, 61}

Hirschsprung disease (HSCR) has been described in association with MEN2A or FMTC cases comprising mutations basically in codons 609, 611, 618 and 620.^{8, 62, 63}

FMTC

Most of FMTC cases (85%) present *RET* mutations in exons 10 and 11. Cys618Ser genotype is found in 33% of cases; Cys634Tyr found in 30% cases, whereas Cys634Arg is rarely associated with this phenotype.^{1, 8} Mutations in codons 609, 611 and 620 and those Glu768Asp, Val804Leu and Val804Met occurring in tyrosine kinase domains are accepted to be related to FMTC, despite that they may also occur in MEN2A. Other mutations in tyrosine kinase RET domains as in codons 790, 791 and 891 have been reported.^{1, 8, 57}

Less frequent hot-spots and mutations as those in codons 630, 790, 791, 891 and a 12 bp duplication between codons 634 and 635 were reported in FMTC families, associated to a indolent form of MTC.^{8, 64}

Further, a 9 bp duplication in *RET* exon 8 creating a new cysteine residue in the extracellular portion of RET protein receptor was reported in a FMTC family, possibly associated to HSCR. The affected case did not present germline mutations

in exons 10, 11, 13, 14 or 15, neither somatic mutations in exons 11, 13, 15 and 16, suggesting the neoplastic activity of this mutation.²⁶

Recently, a new exon 8, Gly533Cys *RET* mutation was reported in 76 FMTC carriers belonging to a family with Spanish extract in which 229 individuals were at risk.⁶⁵

MEN2B

A *RET* intracellular tyrosine kinase domain mutation Met918Thr was reported in 95% of MEN2B cases.⁵⁶ In four MEN2B families from Germany, United Kingdom and Australia, an Ala883Phe substitution in exon 15 was described, comprising 4% of all MEN2B phenotypes so far reported.^{8, 13, 56} Some rare mutations have been described as Ser922Tyr and a double mutation in codon 804 and Tyr806Cys occurring in the same allele was reported in a MEN2B patient.¹³

Genotype-phenotype correlations in MEN2 have a major and prompt impact in clinical medicine, as genetic testing may differentiate *RET* carriers from non-carriers. *RET* carriers should be conducted to total thyroidectomy at ages depending on the mutated codon ^{1, 67}, following the MEN consensus (table 03). Conversely, non-mutation carriers should be ruled out from annual clinical follow-up, an expensive and stressing procedure to the patients. In skillful surgical hands, the risks of neck surgery are minimal even in children. False positives in genetic testing are exceedingly low.^{1, 10} All these data generated an international consensus on MEN based on which MTC patients should be operated on at ages usually lower than 5 years, depending on the mutated codon ^{1, 67} (table 03). Presently, molecular DNA diagnosis in MEN2 became an important tool to; a) confirm clinical and laboratory

diagnosis of MTC; b) identify as early as possible mutant *RET* carriers in pre-malignant stages of the disease; and c) identify non-carrier family members and rule them out of clinical follow-up.³³

MODIFIER GENES IN *RET* EXPRESSION

Transgenic animal models expressing *RET* mutation are used to better address MEN2 MTC tumor aggressiveness. MTC occur in transgenic line with analogous pathology seen in patients with MEN2. When transgene codon 634 mutation was introgressed onto four different genetic backgrounds (BALB/c, C57BL/6J, FVB/N and CBA/ca), 65% of all animal models developed MTC, showing incomplete penetrance. None of FVB/N transgene developed MTC, 14% of transgenic progeny BALB/c, 64% of C57BL/6J and 98% CBA/ca developed thyroid tumors by 10 months of age, indicating that incomplete tumor penetrance could be modulated by genetic background. Furthermore, tumors on the CBA/ca and C57BL/6J backgrounds were significantly larger than those arising in BALB/c transgenic mice. These results are relevant to human MEN2 disease, because this model system may be used to study genes modifying thyroid tumor penetrance in the dominantly inherited human cancer syndrome.⁶⁸

ROUTINE PROCEDURES IN MOLECULAR *RET* DIAGNOSIS

Investigators working on researchers dealing with human beings should follow the Helsinki decisions; thus projects should be approved by local ethic committees and patients involved in research projects should sign a written informed consent, before collecting blood samples for DNA analysis.

For genomic DNA extraction, a salting out method is indicated as it is a simple and low-cost procedure.⁶⁹ For amplification of genomic DNA, fragments of interest are usually amplified using the PCR strategy.⁷⁰ Primers should contain flanking sequences of intron-exon boundaries for adequate *RET* protooncogene analysis, and if one laboratory chooses DGGE strategy for screening mutation analysis, primers may also contain a 50bp GC-clamp coupled in one of the sequences.⁷¹⁻⁷³ The presence of adequate amplified sequences are confirmed using runs in 1% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide. After obtaining PCR products, direct sequencing analysis (the gold-standard method for *RET* mutation diagnosis) should be performed in *all* MEN2 index cases. Once *RET* mutation in the index case is known, it may be used as intra-familial positive control. For at risk family members, screening methods may be used. In this latter alternative, it is possible to use denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), single strand conformation polymorphism (SSCP) or restriction enzyme approaches.⁷²⁻⁷⁷ DGGE and SSCP techniques are based on differential migration mobilities in polyacrilamide gel. Thus, applying these techniques it is possible to discriminate between mutant carriers and non-carriers. Different migration electrophoretic patterns are influenced by denaturant substances, as urea and formamide (in DGGE) or heteroduplex formation (in SSCP). Particularly when screening large MEN2 families, these methods are very useful; for instance, using DGGE one might analyse 16 exons in 24 hours. Restriction enzymes may possibly be useful in genetic screening of *RET* mutations, as mutations create or destroy restriction sites recognizable by endonucleases. However, this method should only be applied to confirm DGGE or SSCP findings, considering that interferences may occur as follows: a) inadequate

recognition of restriction site and consequently no defined band in agarose gel electrophoresis; b) incomplete discrimination of amplified sequences with similar base pair sizes.^{77, 78}

Using direct genetic sequencing analysis (the gold-standard method), DNA fragments of interest are sequenced by enzymatic or chain termination, as described by Sanger in 1977.⁷¹ In this technique, each primer must to be added separately at sense and no-sense reactions tubes, to a commercial buffer (Big Dye Terminator Cycle Sequencing, Applied Biosystems, Foster City, USA) and termocycled. After sequencing reaction, samples should be purified with isopropanol and ethanol and diluted in blue dextran buffer with deionized formamide. The sequencing products are then denaturated at 90 °C per 2 minutes, immediately cooled and applied in specific electrophoresis polymer from DNA sequencer. Using these procedures, good reproductibility is usually obtained, avoiding the need of a confirmation reaction. Figure 01 illustrates examples of electropherograms showing MEN-2 *RET* mutations.

CONCLUSIONS / CONSIDERATIONS

Before *RET* molecular diagnosis (in pre-genomic era), first degree relatives of MEN2 patients (50% chance of being carriers) were clinically and biochemically followed-up each 12 months for MTC, PHEO and HPT. Individuals should be annually reviewed from 6 years of age on. Thus, basal and stimulated calcitonin serum levels were measured in these individuals, as well as serum PTH and calcium and serum/urinary catecholamines.^{8, 22, 67} Sensitivity of these tests was variable and as a consequence, MTC was usually late diagnosed. This prolonged follow-up was

expensive; individuals at risk were maintained in a stressing condition; survival rates were diminished; and due to late MEN2 diagnosis and high prevalence of lymph node metastases, cure was almost always unachieved.^{79, 80}

Presently, as almost 95% of affected MEN2 patients harbor a *RET* mutation, genetic diagnosis of MEN2 became a great success in the management of patients which are *RET* mutation carries.^{67, 81} Direct DNA sequencing is considered the gold-standard method for *RET* mutation analysis and should be performed routinely in all index cases and possibly in all suspected cases. Alternatively, once *RET* mutation is known, screening methods may be used in analyzing family members at risk. Whatever DNA method is used, early *RET* mutation analysis provides information to clinicians and surgeons allowing them to make adequate surgical decision. As a consequence of these procedures, mortality rates in MEN2 have dropped from up to 20% in 1993, to the presently 5%.¹ Finally, early *RET* mutation analysis should be performed to *all* MTC and PHEO cases, as suggested by the MEN consensus.¹

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Papaiz group for supporting this research, aiming to bring to Society a faster, save and accurate diagnosis of multiple endocrine neoplasias. We also thank all the staff members of the Endocrine Genetics Unit (<http://medicina.fm.usp.br/ueg>) for the support.

BIBLIOGRAPHICAL REFERENCES

1. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, et al. CONSENSUS: Guideline for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5658-71.
2. Gagel RF. The impact of gene mapping techniques on the management of multiple endocrine neoplasia type 2. *Trends Endocr Metab* 1991;2:19-25.
3. Marx SJ. Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Nature* 2005;5:367-75.
4. Gimm O. Multiple Endocrine Neoplasia Type 2: Clinical Aspects. In: Dahia PLM, Eng C. *Genetic Disorders of Endocrine Neoplasia*. 1st ed. Philadelphia: Front Horm Res Basel Karger; 2001. p103-30.
5. Toledo SPA, Abelin NMA, Ezabella MCL, Hayashida CY, Dahia PM. Neoplasias Endócrinas Múltiplas. In: Wajchenberg BL. *Tratado de Endocrinologia Clínica*. 1º ed. São Paulo: Roca; 1992. p943-64.
6. Mulligan LM. Multiple Endocrine Neoplasia Type 2: Molecular Aspects. In: Dahia PLM, Eng C. *Genetic Disorders of Endocrine Neoplasia*. 1st ed. Philadelphia: Front Horm Res Basel Karger; 2001. p81-102.
7. Ezabella MCL, Hayashida CY, Abelin NMA, Toledo SPA. Neoplasias Endócrinas Múltiplas. In: Medeiros-Neto G. *Moléstias Hereditárias do Sistema Tiroideano*. 1º ed. São Paulo: Roca; 1996. p225-42.
8. Eng C. RET proto-oncogene in the development of human cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:390-93.

9. Aliepoulios MA, Rose EH. Specific localization of calcitonin activity in humans' thyroid glands. In: Calcitonin Proceedings of the Second International Symposium. 2nd ed. London: Heinemann; 1970 p295-300.
10. Gagel RF. Editorial: RET proto-oncogene mutations and endocrine neoplasia – A story intertwined with neuronal crest differentiation. *Endocrinology* 1996;137:509-11.
11. Block MA, Jackson CE, Tashjian AH Jr. Management of occult medullary thyroid carcinoma evidenced only by serum calcitonin levels elevations after apparently adequate neck operation. *Arch Surg* 1978;113:368-72.
12. Wells SAJr, Franz C. Medullary carcinoma of the thyroid gland. *World J Surg* 2000;24:952-6.
13. Hoff AO, Cote GJ, Gagel RF. Multiple endocrine neoplasias. *Annu Rev Physiol* 2000;62:377-400.
14. Takahashi M, Buma Y, Iwamoto Y, Ikeda H, Hiahi H. Cloning and expression of RET proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. *Oncogene* 1988;3:571-8.
15. Takahashi M, Buma Y, Hiahi H. Isolation of RET proto-oncogene DNA with an amino-terminal signal sequence. *Oncogene* 1989;4:805-6.
16. Kwok JB, Gardner E, Warner JP, Ponder BAJ, Mulligan LM. Structural analysis of the human RET proto-oncogene using exon trapping. *Oncogene* 1993;8:2575-82.

17. Mulligan LM, Eng C, Healey CS, Calyton D, Kwok JBJ, Gardner E, et al. Specific mutations of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN2A and FMTC. *Nat Genet* 1994;6:70-4.
18. Hansford J, Mulligan LM. Multiple endocrine neoplasia type 2 and *RET*: from neoplasia to neurogenesis. *J Med Genet* 2000;37:817-27.
19. Peczkowska M, Januszewicz A. Multiple endocrine neoplasia type 2. *Familial Cancer* 2005;4:25-36.
20. Teh BT. Multiple endocrine neoplasia. *Journal of Internal Medicine* 2003;253:588–89.
21. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993;363:458-60.
22. Donnis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, et al. Mutations in RET proto-oncogene are associated with MEN2A and FMTC. *Hum Molec Genet* 1993;2:851-56.
23. Jimenez C, Gagel RF. Genetic testing in endocrinology: lessons learned from experience with multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2). *Growth Horm & IGF Res* 2004;14:S150-57.
24. Magalhães PKR, Castro M, Elias LLK, Maciel LMZ. Carcinoma Medular de Tireóide: da Definição às Bases Moleculares. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003;47:515-28.
25. Maia FFR, Júnior HJ, Araújo LR. Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2 – Manejo Diagnóstico e Terapêutico. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002;46:606-10.

26. Pigny P, Bauters C, Wemeau JL, Houcke ML, Crepin M, Caron P, et al. A novel 9-base pair in RET exon 8 in familial medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1700-04.

27. Brauckhoff M, Gimm O, Weiss C L, Ukkat J, Sekulla C, Brauckhoff K, 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;28:1305-11.

28. Ezabella MC, Hayashida CY, Bisi H, Leite MO, Borelli A, Abelin NM, et al. Early detection of medullary thyroid carcinoma in multiple endocrine neoplasia type II. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 1990;45:105-9.

29. Toledo SPA, Ferraz AR. Multiple endocrine type II neoplasm. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 1990;45:1-2.

30. Hayashida CY, Alves VAF, Kanamura CT, Ezabella MCL, Abelin NMA, Nicolau W, et al. Immunohistochemistry of medullary thyroid carcinoma and C-cell hyperplasia by an affinity-purified anti-human calcitonin antiserum. *Cancer* 1993;72:1356-63.

31. Livolsi VA. C Cell Hyperplasia / Neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:39-41.

32. Bachelot A, Lombardo F, Baudin E, Bidart JM, Schlumberger M. Inheritable form of medullary thyroid carcinoma. *Biochimie* 2002;89:61-6.

33. Maciel RMB. Tumorigênese Molecular Tiroideana: Implicações Para a Prática Médica. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002;46:381-90.

34. Leboulleux S, Baudin E, Travagli JP, Schlumberger M. Medullary thyroid carcinoma. Clin Endocrinol 2004;61:299-310.
35. Xing S, Smanik PA, Oglesbee MJ, Trosko JE, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Characterization of RET oncogenic activation in MEN2 inherited cancer syndromes. Endocrinology 1996;137:1512-19.
36. Abelin NMA, Gomes S, Ivanoff MT, Ezabella MCL, Hayashida CY, Toledo SPA. Abordagem clínica e laboratorial do bócio uni-nodular sólido: vantagens da determinação da calcitonina sérica por métodos distintos. Arq Bras Endocrinol Metab 1999;43:104-13.
37. Martin RC, Ezabella MC, Toledo SPA. Calcitonin levels in tissue culture of thyroid medullary carcinoma. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo 1985;40:220-2.
38. Martin RC, Toledo SPA. Dynamics of calcitonin secretion in tissue culture of medullary thyroid carcinoma. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo 1989;44:36-9.
39. Randolph GW, Maniar D. Medullary carcinoma of the thyroid. Cancer Control 2000;7: 253-61.
40. Machens A, Gimm O, Hinze R, Höppner W, Boehm BO, Dralle H. Genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid carcinoma: oncological features and biochemical properties. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:1104-9.

41. Carney JA, Sizemore GW, Sheps SG. Adrenal medullary disease in multiple endocrine neoplasia type 2. Pheochromocytoma and its precursors. *Am J Clin Pathol* 1976;66:279-90.

42. Dahia PL, Aguiar RC, Tsanaclis AM, Bendit I, Bydlowski SP, Abelin NM, et al. Molecular and immunohistochemical analysis of P53 in pheochromocytoma. *Br J Cancer* 1995;72:1211-3.

43. Eng C, Crossey PA, Mulligan LM, Healey CS, Houghton C, Prowse A, et al. Mutations in the RET proto-oncogene and the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in sporadic and syndromic pheochromocytomas. *J Med Genet* 1995;32:934-7.

44. Aguiar RC, Dahia PL, Sill H, Toledo SPA, Goldman JM, Cross NC. Deletion analysis of the p16 tumour suppressor gene in pheochromocytomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996;45: 93-6.

45. Dahia PL, Toledo SPA, Mulligan LM, Maher ER, Grossman AB, Eng C. Mutation analysis of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), a ligand for the RET/GDNF receptor alpha complex, in sporadic pheochromocytomas. *Cancer Res* 1997;57:310-3.

46. Duerr EM, Gimm O, Neuberg DS, Kum JB, Clifford SC, Toledo SPA, et al. Differences in allelic distribution of two polymorphisms in the VHL-associated gene CUL2 in pheochromocytoma patients without somatic CUL2 mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3207-11

47. Ichihara M, Murakumo Y, Takahashi M. RET and neuroendocrine tumors. *Cancer Letters* 2004;204:197-211.

48. Dahia PL, Ross KN, Wright ME, Hayashida CY, Santagata S, Barontini M, et al. A HIF1 alpha Regulatory Loop Links Hypoxia and Mitochondrial Signals in Pheochromocytomas. *PLoS Genet* 2005;1:72-80.

49. Herfarth KK, Bartsch D, Doherty GM, Wells SA, Lairmore TC. Surgical management of hyperparathyroidism in patients with multiple endocrine neoplasia type 2A. *Surgery* 1996;120:966-74.

50. Wells SA Jr, Chi DD, Toshimak, et al. Predictive DNA testing and prophylactic thyroidectomy in patients at risk for multiple endocrine neoplasia type 2A. *Ann Surg* 1994;220:237-50.

51. Martucciello G, Ceccherini I, Lerone M, Jasonni V. Pathogenesis of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 2000;35:1017-25.

52. Nunes AB, Ezabella MCL, Pereira AC, Krieger JE, Toledo SPA. A novel Val648Ile substitution in RET proto-oncogene observed in a Cys634Arg multiple endocrine neoplasia type 2A kindred presenting with an adrenocorticotropin-producing pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5658-61.

53. Puñales MK, Rocha PA, Gross JL, Maia AL. Carcinoma Medular de Tireóide: Aspectos Moleculares, Clínico-Oncológicos e Terapêuticos. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2004;48:137-46.

54. Mulligan LM. Multiple endocrine neoplasia type 2: molecular aspects. *Front Horm Res.* 2001;28:81-102.

55. Carlomagno F, Melillio RM, Visconti R, Salvatore G, De Vita G, Lupoli G, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor differentially stimulates ret mutants associated with the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes and hirschsprung disease. *Endocrinology* 1998;139:3613-9.

56. Eng C, Smith DP, Mulligan LM, Nagai MA, Healey CS, Ponder MA, et al. Point mutation within the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B and related sporadic tumours. *Hum Mol Genet* 1994;3:237-41.

57. Puñales MK, Graf H, Gross JL, Maia, AL. RET codon 634 mutations in multiple endocrine neoplasia type 2: Variable clinical features and clinical outcome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2644-49.

58. Niccoli-Sire P, Murat A, Baudin E, Henry J, Proye C, Bigorgne J, et al. Early or prophylactic thyroidectomy in MEN2/FMTC gene carriers: results in 71 thyroidectomized patients. *Eur J Endocrinol* 1999;141:468-74.

59. Puñales MK, Graf H, Gross JL, Maia AL. Rastreamento Genético do Carcinoma Medular de Tireóide: Identificação de Mutações no Proto-oncogene RET. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002;46:632-39.

60. Nunes AB. Identificação de mutações do proto-oncogene RET associadas à forma hereditária do carcinoma medular de tireóide. 2001; Tese de Doutorado, Departamento de Clínica Médica, FMUSP.

61. Lombardo F, Baudin E, Chiefari E, Arturi F, Bardet S, Caillou B, et al. Familial Medullary Thyroid Carcinoma: Clinical Variability And Low

Agressiveness Associated With Ret Mutation At Codon 804. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:1674-80.

62. Edery P, Lyonnet S, Mulligan LM, Pelet A, Dow E, Abel L, et al. Mutations of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. Nature 1994;367:378-80.

63. Eng C, Mulligan LM. Mutations of the RET proto-oncogene in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes, related sporadic tumours, and hirschsprung disease. Hum Mutat 1997;9:97-109.

64. Berndt I, Reuter M, Saller B, Frank-Raue K, Groth P, Grubendorf M, et al. A New Hot Spot For Mutations In The Ret Protooncogene Causing Familial Medullary Thyroid Carcinoma And Multiple Endocrine Neoplasia Type 2A. J Clin Endocrinol Metab 1998;83:770-74.

65. Silva AMA, Maciel RMB, Silva MRD, Toledo SRC, Carvalho MB, Cerutti JM. A Novel Germ-Line Mutation in RET Exon 8 (Gly533Cys) in a Large Kindred with Familial Medullary Thyroid Carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:5438-43.

66. Gimm O, Marsh DJ, Andrew SD, Frilling A, Dahia PL, Mulligan LM, et al. Germline dinucleotide mutation in codon 883 of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B without codon 918 mutation. J Clin Endocrinol Metab 1997;82:3902-4.

67. Kahraman T, Groot JWB, Rouwe C, Hofstra RMW, Links TP, Sijmons RH, et al. Acceptable age for prophylatic surgery in children with multiple endocrine neoplasia type 2A. Eur J Surg Oncol 2002;29:331-35.

68. Cranston AN, Ponder BAJ. Modulation of medullary thyroid carcinoma penetrance suggests the presence of modifier genes in a *RET* transgenic mouse model. *Cancer Research* 2003;63:4777-80.
69. Miller S, Dykes D, Poleski H. A single salting out procedures for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
70. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-91.
71. Sanger F & Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1975;94:444-48.
72. Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM. Attachment of a 40-base pair G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1989;86:232-36.
73. Blank RD, Skalkr CA, Martin ML. Denaturing gel electrophoresis to diagnose multiple endocrine neoplasia type 2. *Clin Chem* 1996;42:598-603.
74. Decker RA, Peacock ML. Update on the profile of multiple endocrine neoplasia type 2A *RET* mutations: Practical issues and implications for genetic testing. *Cancer* 1997;80:557-68.
75. Wu Y, Hayes VM, Osinga J, Mulder IM, Loomam MWG, Buys CHCM, et al. Improvement of fragment and primer selection for mutation

detection by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1998;26:5432.

76. Wu Y, Stulp RP, Elfferich P, Osinga J, Buys CHCM, Hofstra RMW. Improvement mutation detection in GC-rich DNA fragments by combined DGGE and CDGE. *Nucleic Acids Res* 1999;27:e9i.

77. Frediani D. 2002; Rastreamento Gênico através de Enzimas de Restrição na forma Hereditária do Carcinoma Medular de Tireóide. Monografia, Departamento de Clínica Médica, FMUSP.

78. Marsh DJ, Robinson BG, Andrew S, Richardson AL, Pojer R, Schnitzler M, et al. A rapid screening method for the detection of mutations in the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A and familial medullary thyroid carcinoma families. *Genomics* 1994;23:477-9.

79. Eng C. Multiple endocrine neoplasia type 2 and the practice of molecular medicine. *Rev in Endocrinol Dis* 2000;1:283-90.

80. Bugalho MJ, Domingues R, Sobrinho L. Molecular diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 2. *Expert Ver Mol Diagn* 2003;3:769-79.

81. Szinnai G, Meier C, Komminoth P, Zumsteg UW. Review of multiple endocrine neoplasia type 2a in children: therapeutic results of early thyroidectomy and prognostic value of codon analysis. *Pediatric* 2004;111:e132-40.

Table 01: Phenotypic classification of MEN2. Adapted from ref.^{1, 13}

MEN2A (1): Families with MTC, PHEO and HPT phenotype.

MEN2A (2): Families with MTC and PHEO phenotype in at least one at risk relative.

MEN2A (3): Families with MTC and HPT phenotype in at least one at risk relative.

MEN2B: Families with MTC, associated or not with PHEO and muscular / skeletal abnormalities and mucosal neuromas.

FMTC: Families only with MTC phenotype in at least four at risk relatives.

Others: Families with less than four relatives with MTC, PHEO and HPT phenotype. In this group are included partially documented families.

MEN, multiple endocrine neoplasia; MTC, medullary thyroid carcinoma; FMTC, familial medullary thyroid carcinoma; PHEO, pheochromocytoma; HPT, hyperparathyroidism.

Table 02: MEN2 genotype-phenotype correlations. Adapted from ref.¹³

Exon	Affected Codon	Nucleotides (wild-type - mutant)	Amino acid (wild-type - mutant)	Phenotype	MEN2 cases (%)
8	532, 533, 534	Ins AGG AGT GTG	Ins Glu Glu Cys	FMTC/HSCR	Rare
	533	GGC-TGC	Gly-Cys	FMTC	
	609	TGC-CGC TGC-GGC TGC-TAC TGC-AGC TGC-CGC	Cys-Arg Cys-Gly Cys-Tyr Cys-Ser Cys-Arg	MEN2A/ FMTC/HSCR	0-1
	611	TGC-TAC TGC-TTC TGC-TGG TGC-AGC TGC-CGC	Cys-Tyr Cys-Phe Cys-Trp Cys-Ser Cys-Arg	MEN2A/ FMTC	2-3
10	618	TGC-GGC TGC-TAC TGC-TCC TGC-TTC TGC-AGC TGC-CGC	Cys-Gly Cys-Tyr Cys-Ser Cys-Phe Cys-Ser Cys-Arg	MEN2A/ FMTC/HSCR	3-5
	620	TGC-GGC TGC-TAC TGC-TCC TGC-TTC TGC-TGG	Cys-Gly Cys-Tyr Cys-Ser Cys-Phe Cys-Trp	MEN2A/ FMTC/HSCR	6-8
	630	TGC-TAC TGC-TCC TGC-TTC TGC-AGC TGC-CGC TGC-GGC	Cys-Tyr Cys-Ser Cys-Phe Cys-Ser Cys-Arg Cys-Gly	MEN2A/FMTC	0-1
11	634	TGC-TAC TGC-TCC TGC-TTC TGC-TGG	Cys-Tyr Cys-Ser Cys-Phe Cys-Trp	MEN2A/FMTC	80-90
	635 a 638	Ins CG AGC TGT GCC	Ins Thr Ser Cys Ala	MEN2A/FMTC	
	637, 638, 639	Ins TGC CGC ACG	Ins Cys Arg Thr	MEN2A	Rare
	648	GTC-ATC	Val-Ile	MEN2A	
13	768	GAG-GAC	Glu-Asp		
	790	TTG-TTC TTG-TTT	Leu-Phe Leu-Phe	MEN2A/FMTC	Rare
	791	TAT-TTT	Tyr-Phe		
14	804	GTG-ATG GTG-TTG	Val-Met Val-Leu	MEN2A/FMTC	0-1
15	883	GCT-TTT	Ala-Phe	MEN2B	Rare
	891	TCG-GCG	Ser-Ala	MEN2A/FMTC	
16	918	ATG-ACG	Met-Thr	MEN2B/HSCR	3-5
	922	TCC-TAC	Ser-Tyr	MEN2B	Rare

MEN2A, multiple endocrine neoplasia type 2A; MEN2B, multiple endocrine neoplasia type 2B; FMTC, Familial medullary thyroid carcinoma; Ins, insertion.

Table 03: Surgical management of MEN2 based on International MEN

Consensus. Adapted from ref.¹

Risk 3 level: Highest risk of development of an aggressive and early form of MTC. Children with MEN2B or mutation carriers in codons 883, 918 or 922, should be submitted to total thyroidectomy during the first six months of life, preferentially a the first month as microscopic MTC with metastases may occur in the first months of life. Total thyroidectomy should be performed in association with an extensive resection of the neck lymph nodes, mainly including central neck lymph nodes.

Risk 2 level: High risk to present an aggressive form of MTC. Children carrying *RET* mutation in codons 611, 618, 620 or 634 should be submitted to total surgery before 5 years of age. Total thyroidectomy should be performed in association with removal of thyroid posterior capsule and dissection of central lymph nodes.

Risk 1 level: Moderate risk to develop aggressive forms of MTC. Children carrying mutations in codons 609, 768, 790, 791 804 or 891 should be also submitted to total thyroidectomy. There are three alternatives related to ages for surgical procedures. First, some authors indicate patients should be operated before age 5, as in risk 2 level. Others suggest 10 years of age as a cut-off for surgical indication. The third alternative is waiting for abnormal basal or stimulated calcitonin values for indicating surgery. Biological behaviors of these tumors are variable, but frequently present a late and indolent evolution. It is worthwhile to note that metastases or death were reported in patients carrying all these genotypes.

MEN, multiple endocrine neoplasia; CMT, medullary thyroid carcinoma.

Figure 01: Electropherograms performed in our laboratory showing five different types of *RET* mutations in MEN2, using a DNA sequencer (ABI 310 DNA Sequencer - Applied Biosystems, USA).

Legends:

(a) T to C substitution (TGC-CGC) in codon 634 (exon 11) in RET protooncogene, leading to a Cys634Arg mutation.

(b) T to C substitution (TGC-CGC) in codon 620 (exon 10) in RET protooncogene, leading to a Cys620Arg mutation.

(c) G to A substitution (GTG-ATG) in codon 804 (exon 14) in RET protooncogene, leading to a Val804Met mutation.

(d) T to C substitution (ATG-ACG) in codon 918 (exon 16) in RET protooncogene, leading to a Met918Thr mutation.

(e) G to A substitution (GTC-ATC) in codon 918 (exon 11) in RET protooncogene, leading to a Val648Ile mutation.

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

APÊNDICE 3

Instruções para os Autores (ABE&M)

**RET proto-oncogene genetic screening in multiple
endocrine neoplasia type-2 using conformation
sensitive gel electrophoresis (CSGE)**

Marcelo Augusto Cortina Gonçalves dos Santos

Elisangela Pereira de Souza Quedas

Rodrigo de Almeida Toledo

Delmar Lourenço Júnior

Sérgio Pereira de Almeida Toledo

Arq Bras Endocrinol Metab.

(submetido)

ISSN 0004-2730 *printed*
version
ISSN 1677-9487 *online*
version

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Scope and editorial policy](#)
- [Instructions for original articles](#)
- [Instructions for review and mini-review articles](#)
- [Instructions for case reports](#)
- [Special cases](#)
- [Instruction for perspectives section articles](#)
- [Instruction for controversies section articles](#)
- [Submission of manuscripts](#)

Scope and editorial policy

Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia (ABE&M), the official journal of FEBRASEM - Federação Brasileira de Sociedades de Endocrinologia e Metabologia (SBEM, SBD, ABESO e SOBEMOM), accepts contributions in Clinical and Basic Endocrinology and related sciences according to the categories: (1) Original Article, (2) Review and Mini-review Article, (3) Case Reports, (4) Special Case, (5) Perspectives, (6) Controversies, (7) Memories and (8) Letters to Editor.

These contributions must be written in Portuguese or English and comply with the Instructions provided by the International Committee of Medical Journal Editors. The main guidelines are summarized below. For more details see **N Eng J Med** 1997;336[4]:309-15 (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. "International Committee of Medical Journal Editors" (ICMJE).

The manuscripts (MS) should be **typed using double spacing**, on letter-size paper (215 x 28 cm) or A4 (210 x 300 cm), with **margins of at least 25 mm** on each side.

Begin each section on a new page: (A) Title page, (B) Abstract, (C) Abstract (abstract in English), (D) Text, (E) Acknowledgements, (F) References, (G) Tables (each table with title and legend), (H) Figure legends and, (I) Figures. The pages shall be numbered consecutively beginning with the title page.

Instructions for original article

The manuscripts (MS) should be typed using double spacing, on letter-size paper (215 x 28 cm) or A4 (210 x 300 cm), with margins of at least 25 mm on each side.

Begin each section on a new page: (A) Title page, (B) Abstract, (C) Abstract (abstract in English), (D) Text, (E)

Acknowledgements, (F) References, (G) Tables (each table with title and legend), (H) Figure legends and, (I) Figures. The pages shall be numbered consecutively beginning with the title page.

Title page

It should contain: (a) the MS title, (b) name of all authors (first name, initials of middle name and surname of each author); (c) name of Department(s) and Institution(s) where the work was developed; (d) name and complete address of the author responsible for correspondence; (e) "abbreviated title" of no more than 40 characters (count letters and space).

Authorship

All persons designated as authors should qualify for authorship of MS and should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for its content. One or more authors should take responsibility for the integrity of the work as a whole, from inception to published article.

Authorship credit should be based only on substantial contributions related to (a) conception, planning, performance, analysis and interpretation of results; (b) drafting the MS or revising it for important intellectual content; (c) final approval of the version to be published. Participation limited to acquisition of funding, collection of data, general supervision or coordination of a research group does not justify authorship of MS.

Editors may require explanation for inclusion of authors during the process of reviewing the MS, particularly if there are more than six authors.

Abstract

The second page should carry an abstract of **no more than 200 words**, stating the purposes of the investigation, basic procedures, main findings (giving specific data and statistical analysis, if possible), and conclusions. [If written in Portuguese] send an accurate translation in English of the **Abstract** on a separate page.

The Editors highly recommend the authors to show the Abstract to people who master English before submitting it to the journal. In the end of the Abstract the following MS descriptors should be provided: **4 to 6 key words** (in compliance with Index Medicus standard) in order to assist further indexing.

Text

It should be divided into the following sections: (I) Introduction, (II) Material and Methods, (III) Results and (IV) Discussion.

Introduction

It should state the purpose of the work and summarize the rationale for the study. Avoid an extensive review of the subject and do not include data or conclusions from the work being reported.

Material and Methods

It should have a description of the experimental models (patients or laboratory animals), identifying the methods and apparatus (manufacturer's name and/or origin of material, in parentheses), and procedures in sufficient detail to allow others to reproduce the results. Established methods may be cited in references.

Medical Ethics

Indicate that the study was approved by the Ethics Committee of the Hospital or Research Institution where the study was carried out, or if in accordance with the Helsinki Declaration.

Statistics

The statistical methods should be described with enough detail to enable those with access to the original data to verify the results.

Results

They should be presented in logical sequence in the text. Avoid repetition of data presented in tables or figures and emphasize only the most important observations.

Discussion

Focus on the new and important aspects of the study and conclusions drawn from them. Avoid repeating results and information presented in other sections. Emphasize the implications of the findings, their limitations, and recommendations for further research.

Acknowledgements

On a new page, this section may include: (a) contributions that require acknowledgements but do not meet the criteria for authorship; (b) acknowledgements for technical support; (c) acknowledgements for financial and material support, including government and/or pharmaceutical industry support; (d)

financial relations that might represent potential conflict of interests.

References

References should be numbered consecutively in the order they are mentioned in the text. Identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals (in parentheses, not superscript). The titles of journals should be abbreviated according to the style used in Index Medicus.

Avoid mention of abstracts presented in congresses. Papers accepted but not yet published should be included, stating the name of the journal, followed by year and "in press". Use the style of the examples, as follows:

Articles in Journals

(List all authors, but for more than six authors, add et al.):

Taylor AE, Hubbard J, Anderson EJ. Impact of binge eating on metabolic and leptin dynamics in normal young women. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84:428-34.

Chapters in Books

Kane JP, Malloy MJ. Disorders of lipoprotein metabolism. In: Greenspan FS, Strewler GJ, editors. **Basic & Clinical Endocrinology**. 5th edition. London:Prentice Hall, 1997:680-709.

Books

Leder P, Clayton DA, Rubenstein E. **Introduction to Molecular Medicine**. New York:Scientific American Inc, 1994.

Tables

Each table should be printed on a separate sheet of paper, with double spacing, and numbered in Arabic numerals, in the order of citation in the text. Tables should supply a brief title on the heading, and explanatory matter, statistics, etc, should be indicated in footnotes.

Illustrations

Each MS should be submitted with 2 (two) original set of illustrations. The MS copies should have clear photocopies of the illustrations. The figures should be professionally drawn and

photographed. **Do not use colors**, use a light-colored background and apply different textures to highlight contrast.

Instead of original drawings and/or x-ray films, send sharp, glossy, black-and-white photographs, in 12 × 18 cm or 18 × 24 cm.

Letters, numbers, and symbols should be clear and of sufficient size to be legible even after a substantial reduction for publication.

Titles and legends of figures should be provided on a separate piece of paper, and never on these figures themselves.

Each figure should be marked on its back with a blue pencil, indicating the author's name, number of the figure, and orientations to insert it in the text.

Units and Measurements

The measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units (meter, kilogram, and liter) or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius; blood pressure should be given in millimeters of mercury (Hg).

All hematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the traditional metric system.

Instructions for review and mini-review articles

The review and mini-review articles are usually requested by the Editor to authors with proven experience in the field. The journal, however, encourages submission of material not requested, provided published experience of the author is demonstrated and it does not consist only of a literature review.

The instructions for reviews and mini-reviews are the same for original articles, and should include an Abstract, uniterms and keywords.

The mini-reviews should be no longer than 15 pages, including references (no more than 20) and excluding two possible illustrations (tables, figures or charts or a combination of them).

Instructions for case reports

This section is designed for publication of interesting clinical cases that are original or have some curious or not conventional aspect. It should show clinical, laboratory and progression

aspects of interest, and be sufficiently documented.

The instructions are the same mentioned for original articles, including an Abstract, uniterms and keywords.

Special cases

This section provides cases of special interest, that have been appropriately studied and presented in clinical meetings of well-known national Endocrinology centers or services. It should include a general discussion held by the audience, with the complete name and occupation of the participants.

The manuscript should be previously edited by someone in charge of the case or of the meeting. The authors of the MS should limit themselves to presenter and debaters of the case. Information on date and place of presentation and name and address of the person in charge of the MS should be provided.

Instructions for perspectives section articles

The purpose of this section is to be a means of reporting new ideas and concepts in Endocrinology, both in the basic and applied fields, or concerning teaching and training.

The articles could have: (a) Interpretative trials using research data collected by the authors themselves to develop new ideas; (b) Research proposals for collaborative studies among several centers; (c) Innovative trials dealing with interrelation of Endocrinology and other fields; (d) Reports on the Brazilian or international history of Endocrinology supplying critical analysis of events, individuals or institutions.

The instructions are the same mentioned for original articles.

Instruction for controversies section articles

The aim of this section is to report Clinical Endocrinology subjects, particularly related to diagnosis and treatment of frequent endocrine diseases, of which management is not yet sufficiently standardized and, therefore, may have different management options.

The articles provided in this section are requested by the Editorial Board to two or more specialists in the subject, who have different opinions and/or management of the topic chosen.

Therefore, it is expected to provide more information to readers

so that they could make their decision appropriately in similar situations. It is also expected to encourage peer discussion, by means of more Letters to Editor, with standpoints.

Submission of manuscripts

MS of any kind should be submitted in three copies (one original) to ABE&M office, **together with a covering letter** addressed to Dr. Claudio E. Kater, Chief-Editor, and signed by all authors. **Do not send diskettes on first submission of the article.**

All articles submitted to ABE&M will be analyzed as to scientific quality and language plainness by qualified referees of the Editorial Board.

in order to minimize typing and transcription errors and to speed up the process of publication, we require that, once accepted for **publication**, the final MS version be sent in floppy-disks well identified and prepared in Word or WordPerfect editing, in a simple form, with no special format or layout. Figures and illustrations should not be inserted in text files.

For editorial reasons, the Editors are entitled to make some slight graphic or wording modifications in the text, not interfering in its content. After having their article approved for publication, the authors implicitly transfer their copyrights of the article to the "Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia."

[\[Home\]](#) [\[About the journal\]](#) [\[Editorial board\]](#) [\[Subscriptions\]](#)

© 2001-2004 *Federação Brasileira de Sociedades de Endocrinologia e Metabologia*

Rua Botucatu, 572, Conjunto 83
04023-062 São Paulo SP Brasil
Tel./Fax: +55 11 5575-0311 / 5549-9089

abem@uol.com.br

**FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Avenida Dr. Arnaldo, 455 — CEP 01246-903
Caixa Postal 54199 — São Paulo — SP

São Paulo, 12 de janeiro de 2007.

Prof. Dr. Claudio E. Kater

Editor Chefe da revista Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia

Prezado Prof. Cláudio Kater

Estamos submetendo o manuscrito intitulado “SCREENING OF *RET* GENE MUTATIONS IN MULTIPLE ENDOCRINE NEOPLASIA TYPE-2 USING CONFORMATION SENSITIVE GEL ELECTROPHORESIS (CSGE)”, para apreciação nesta revista. Este manuscrito não foi submetido, nem publicado em outras revistas. O trabalho foi realizado de acordo com os princípios éticos.

Estamos a disposição para maiores esclarecimentos

Atenciosamente,

**FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Avenida Dr. Arnaldo, 455 — CEP 01246-903
Caixa Postal 54199 — São Paulo — SP

Marcelo Augusto Cortina Gonçalves dos Santos

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Marcelo Cortina".

Elisangela Pereira Quedas

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Elisangela Quedas".

Rodrigo de Almeida Toledo

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Rodrigo Toledo".

Unidade de Endocrinologia Genética – UEG
Av. Dr. Arnaldo, 455, 4º andar, CEP: 01246-903, São Paulo – SP,
Tel/Fax: 3061-7252

**FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Avenida Dr. Arnaldo, 455 — CEP 01246-903
Caixa Postal 54199 — São Paulo — SP

Delmar Lourenço Júnior

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Delmar Lourenço Júnior', written in a cursive style.

Sergio Pereira de Almeida Toledo

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Sergio Pereira de Almeida Toledo', written in a cursive style.

Unidade de Endocrinologia Genética – UEG
Av. Dr. Arnaldo, 455, 4º andar, CEP: 01246-903, São Paulo – SP,
Tel/Fax: 3061-7252

Screening of *RET* gene mutations in multiple endocrine neoplasia type-2 using conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE).

Rastreamento de mutações do gene *RET* na neoplasia endócrina múltipla tipo-2 por eletroforese em gel sensível à conformação (CSGE).

Marcelo Augusto Cortina Gonçalves dos Santos (SANTOS MA)

Elisangela Pereira de Souza Quedas (QUEDAS EPS)

Rodrigo de Almeida Toledo (TOLEDO RA)

Delmar Lourenço Muniz Júnior (LOURENÇO JRDM)

Sergio Pereira de Almeida Toledo (TOLEDO SPA)

Endocrine Genetics Unit (LIM-25), Endocrinology, Dpt. of Internal Medicine, Hospital das Clínicas and University of São Paulo School of Medicine.

Unidade de Endocrinologia Genética, Endocrinologia, Clínica Médica, Hospital das Clínicas e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Corresponding author:

Sergio P. A. Toledo.

Unidade de Endocrinologia Genética, Endocrinologia, Clínica Médica, Av. Dr. Arnaldo, 455, 5º andar, São Paulo-SP. Cep: 01246-903 Fone-Fax: (11) 3061-7252; toledo@usp.br

Summary title: *RET* mutation screening using CSGE

Título sumário: Rastreamento de mutações no *RET* por CSGE

RESUMO

A neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (NEM2) é uma síndrome tumoral herdada por mutações germinativas no proto-oncogene RET (*RET*) e transmitida por herança autossômica dominante. Atualmente, a indicação de tireoidectomia total preventiva é recomendada a indivíduos portadores de mutações no *RET*. Analisamos a aplicação do método Eletroforese em Gel Sensível à Conformação (CSGE) no rastreamento de mutações *hot-spots* do *RET*. Sete famílias com NEM2 foram rastreadas pelo CSGE, seqüenciamento gênico e análise do Polimorfismo Conformacional de Cadeia Simples (SSCP). Usando o CSGE e SSCP, identificamos cinco das seis (83,3%) mutações verificadas pelo seqüenciamento: Cys620Arg, Cys634Arg, Cys634Tyr, Val648Ile e Met918Thr. Foram analisados 128 *amplicons* englobando mutações *hot-spots* do *RET* e 116 dentre 128 (90.6%) concordaram com o seqüenciamento genético. Os polimorfismos 691 e 769 também foram documentados pelo CSGE e SSCP. Os dados obtidos por CSGE e SSCP foram totalmente (100%) concordantes. O CSGE revelou ser metodologia sensível, rápida, fácil de ser executada e de baixo custo na detecção de mutações nos códons 620, 634, 648, e 918, as quais constituem grande maioria (~95%) dos pacientes com NEM2. Quanto à mutação Val804Met (prevalência na população inferior a 3%), o método necessita ser otimizado. Concluimos que o CSGE é uma metodologia efetiva para o rastreamento de mutações que mais freqüentemente ocorrem no *RET* como causadora de NEM2.

Unitermos: rastreamento gênico; CSGE; SSCP; seqüenciamento gênico; NEM2; proto-oncogene RET.

ABSTRACT

Multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2) is an autosomal dominant inherited tumor syndrome caused by activating germline mutations in RET proto-oncogene (*RET*). Presently, the prophylactic total thyroidectomy is recommended to all *RET* mutations carriers. Here we tested the Conformation Sensitive Gel Electrophoresis (CSGE) as a screening method for the *RET* hot-spot mutations. Seven MEN2 families were studied by CSGE, as well as by Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) and direct sequencing analysis. Using CSGE and SSCP, we were able to detect five out of the six (83.3%) *RET* mutations verified by direct sequencing analysis: Cys620Arg, Cys634Arg, Cys634Tyr, Val648Ile and Met918Thr. *RET* polymorphisms 691 and 769 were verified by CSGE and SSCP. In our sample, data obtained using CSGE were fully concordant (100%) with SSCP findings. Thus, CSGE showed to be a sensitive, fast, low-cost, and ease procedure to detect *RET* mutations in codons 620, 634, 648, and 918 which are reported as the most prevalent *RET* variants (~95%) in large MEN2 series. As to the Val804Met mutation (prevalence in the population lower than 3%), this method still needs to be optimized. We concluded that CSGE is an effective screening method for the most frequent *RET* hot-spot disease-causing mutations.

Keywords: genetic screening; CSGE; SSCP; genetic sequencing; MEN-2; RET proto-oncogene.

INTRODUCTION

Multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2) is an inherited tumor syndrome characterized by the presence of medullary thyroid carcinoma (MTC), primary hyperparathyroidism (HPT), and pheochromocytoma (PHEO). MEN2 is classified in MEN2A (MTC, PHEO, and HPT); MEN2B (MTC, PHEO, and mucosal neuromas); and familial MTC (FMTC) (1-5). The genetic basis of MEN2 is associated with germline activating mutations in the RET proto-oncogene (*RET*). RET gene contains 21 exons, which encode a tyrosine kinase receptor protein with an extracellular domain rich in cysteine residues and an intracellular domain enriched in tyrosine residues (1, 6).

Several Brazilian studies on MEN2 have been recently published in which clinical and genetic aspects of MEN2 were extensively reviewed (2-5, 7-14). All clinical variants of MEN2 have a high penetrance rate for MTC and most (90%) *RET* mutation carriers will exhibit evidences for MTC during life time (15). Briefly, MEN2A comprises 75% of MEN2 cases and most cases (98%) harbor a *RET* mutation in exons 10 or 11 (codons 609, 611, 618, 620, 630 and 634). *RET* variants in codon 634 cause 85% of MEN2A cases, mostly in Cys634Arg and Cys634Tyr mutations (1, 7). Further, most FMTC comprises 20% of MEN2 patients and most of them (85%) have *RET* mutations in codons 10 or 11 (1, 8, 15). Less frequent mutations in codons 609, 611, 768, and 804 are usually associated with FMTC and rarely to MEN2A (1, 7). Met918Thr (exon 16) mutation has been reposted in 95% of MEN2B cases, which comprises 5% of MEN2 cases (1, 15). Rarely, two *RET* variants have been reported co-segregating in MEN2 cases (3, 8). Thus, the vast

majority (95%) of *RET* disease-causing mutations are associated to codons 620, 634, 648, and 918 (15).

Molecular diagnosis of *RET* mutations has become a crucial tool to the management of MEN2 as it may a) identify 1-7% of inherited MTC cases within previously “sporadic” MTC patients; b) identify *RET* mutation carriers in at risk family members and rule out from annual follow up relatives who do not carry *RET* mutations; and finally c) it is the rational basis for indicating preventive total thyroidectomy usually under age of 5 in all *RET* mutation carriers (4, 5, 6, 15) DNA direct sequencing is the gold-standard method for genetic in the detection of disease-causing mutations. However, several genetic screening techniques, as denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), restriction enzymes, single strand conformational polymorphism (SSCP) and denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) have been applied to genetic screening of at risk relatives in families with several inherited diseases (1-8, 15, 16).

Conformation Sensitive Gel Electrophoresis (CSGE) has been shown to be a useful method for mutation detection. CSGE detects the differences in electrophoresis migration patterns of homo- and heteroduplex formations. These diverse bands are caused by structural alterations in DNA double helix which are favored by mild denaturing solvents (16-18). Interestingly, this method presents important advantages comparing to restriction enzymes, SSCP, DGGE (19) and DHPLC technologies. CSGE methodology may present higher sensitivity for 200-800bp PCR fragment size, compared to SSCP sensitivity (16, 20). Comparing to DGGE, CSGE is a feasible method to standardize and does not need a 50bp GC-clamp coupled in one of the sequences (16, 20). Moreover, CSGE does not require an

expensive wave DNA fragment analyzing system, as in DHPLC. Although CSGE has been applied to several inherited conditions, limited information is available on CSGE to identify *RET* mutations (19, 20). Since there is an increasing demand for *RET* genetic diagnosis in the endocrine practice, the optimization of *RET* mutations is a worthwhile effort. Thus, this study aimed to validate CSGE as genetic screening approach for *RET* hot-spot mutations in patients with classical MEN2 phenotype presentations.

MATERIALS AND METHODS

Patients

This study was approved by local ethic committees (CAPPesq - HC-FMUSP, protocol number 265/04). A written informed consent was obtained from all individuals involved in this project. In this study, seven previously identified (clinically and genetically) MEN2 families were included: two with MEN2A; one with MEN2A cosegregating with congenital megacolon; three with FMTC; and one MEN2B (3-5, 8). A total of 64 individuals (7 index cases and 57 at risk family members) were screened by CSGE and a subset group of 38 patients were compared to SSCP screening. Initially, mutation analysis of all index cases was performed by direct sequencing the *RET* hot-spots exons 10, 11, 13, 14, 15, and 16. Other at risk family members were also submitted to DNA sequencing, although only of the specific exon in which the *RET* germline mutation and/or polymorphism were identified. The PCR products of index cases and at risk relatives found to be mutated and/or polymorphic were then screened by CSGE, and a subset of them for SSCP. Samples from 27 at risk family members identified as healthy individuals were used

as control. All individuals have been followed by the out-patient service of the Division of Endocrinology, Hospital das Clínicas, University of Sao Paulo School of Medicine. Index cases were diagnosed by classical clinical, biochemical and genetic parameters (2, 3, 8-12, 15).

Methods

Genomic DNA extraction and PCR

Genomic DNA was extracted using salting out method (21). DNA concentration was measured by spectrophotometry (Pharmacia Biotech, Sweden). Exons 10, 11, 13, 14, 15, and 16 were amplified by PCR (Minicycler - MJ Research, Waterstone, MA, USA) (22), using previously reported primers (7, 13, 23). Other primers were designed specifically for CSGE and SSCP analyses, as shown in Table 01. PCR protocols were optimized as follows: 10mM Tris HCl pH 8.4, 50mM KCl pH 8.4, 0.4mM of dNTPs, 2.0U of Taq-polimerase, 5% of Dimethyl sulfoxide – DMSO. The $MgCl_2$ and primers concentrations were: 1.76mM; 20pm to exon 10; 2.40mM; 14pm to exon 11; 2.40mM; 20pm to exons 13 and 15; 3mM; 10pm to exon 14; and 3mM; 20pm to exon 16. Genomic DNA concentration ranged from 100-200ng. The optimized cycling programs used were: single cycle at 94°C for 10 min. (exons 10, primer setting 11A, 15 and 16) and 3 min. (exons 13, primers settings 14A and 14B); 38 cycles at 94°C for 30 sec. (all exons), annealing for 30 sec. (exons 10 and 15) and 1 min. (primers settings 11A, 11B, 13, 14A, 14B and 16), as indicated in table 01, and extension at 72°C for 1 min. (all exons), followed by an extension cycle at 72°C for 4 min. For exon, 14 amplification with clamp primers (primer setting 14C) cycle temperatures were: single cycle at 95°C for 4 min.; 35 cycles at 94°C for

45 sec., annealing for 45 sec. and extension at 72°C for 10 min. PCR products were confirmed by electrophoresis at 70V for 1 h. (Power PAC 3000, Biorad, USA) in 2% agarose gel with TAE 1X buffer stained with ethidium bromide (0.5µg/ml), where 5µl of genomic amplified material were applied to 1µl of Loading Buffer 6x and visualized in UV transilluminator (Foto Analyst Mini Visionary, Fotodyne, USA).

Sequencing analysis

RET direct sequencing was performed as follows: 2µl of Big Dye terminator buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 6 µl of 0.25% buffer (Tris-HCl 0.5M pH 9.0 with 25mM of MgCl₂), 1.60pm of primer and 5-10ng of amplified DNA, in a total volume of 20µl. Cycle sequencing conditions were: single cycle at 96°C for 2 min.; 40 cycles at 96°C for 10 sec., annealing at 60°C for 20 sec. and extension at 60°C for 4 min. After sequencing, reactions were purified with isopropanol/ethanol according manufacturer instructions, and diluted in 2.5µl of blue dextran buffer with deionized formamide (TSR, Applied Biosystems). Sequencing products were denaturated at 90°C for 2 min. and immediately cooled before applied in an ABI 310 DNA sequencer. Electropherograms were analyzed by AB Navigator software (Applied Biosystems).

CSGE

The MDE gel was prepared to, as follows: MDE 0.5X (Cambrex Bio Science, Rockland, ME, USA), 6% de TBE 10X, 2.5% de glycerol, 220µl of ammonium persulfate 10% and 22µl of N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine. Gel was applied into plates (coated with repel-silane and gamma-methacryloxypropyl Termethoxysilane) and left to polymerize for 2 h. We pre-run the electrophoresis system (Sequencing System Model S2, Life Technologies, Gibco/BRL,

Gaithersburg, USA) for 45 min. at 8W with TBE 0.6X buffer. Temperatures conditions for heteroduplex formation were: single cycle at 94°C for 5 min. (exons 10, primer setting 11A, 13 and 16) or 10 min. for exon 11 (primer setting B), followed by annealing at room temperature for 40 min. (exons 10, primers settings 11A and 11B, 13 and 16). 5µl of sample (2:1 of amplicon and Loading Buffer 1X) (Triple Dye Loading Buffer 6X, Cambrex Bio Science) were loaded the gel and electrophorezed for 1 h. at 15W (exons 11 primer setting A, and exon 13). Subsequently, exon 16 was applied and all exons were electrophorezed at 8W for 11 h. Genomic amplified material from exons 10 and 11 (primer setting B) were electrophorezed for 11 h. at 2W. CSGE gel was silver stained.

SSCP

SSCP gel and electrophoresis conditions were the same as used for CSGE. After desnaturation (same temperatures used in CSGE), amplicons were rested in ice before loading in gel. A loading buffer (95% formamide, 10mM NaOH, 0.025% Bromophenol Blue, 0.025% Xylene Cyanol) was used. SSCP gel was silver stained.

RESULTS

Figure 01 and Table 03 summarizes *RET* mutation findings when CSGE, SSCP, and sequencing methods were applied.

Sequencing analysis

RET hot-spots exons (exons 10, 11, 13, 14, 15 and 16) of all index cases (7 subjects) and in one genetically non-affected at risk member of each family (7 subjects), as healthy normal controls were performed. Other 50 at risk family members were submitted to *RET* sequencing of the specific exons segregating

mutations and/or polymorphisms. Using direct sequencing we totally performed 184 amplicons analysis, and were able to identify mutations at *RET* codons Cys620Arg (TGC-CGC) in 11 MEN2 cases; Cys634Arg (TGC-CGC) in 12 MEN2 cases; Cys634Tyr (TGC-TAC) in 8 MEN2 cases; Val804Met (GTG-ATG) in 3 MEN2 cases; and Met918Thr (ATG-ACG) in a MEN2 case. We also identified 2 other members at risk from a MEN2A family presenting a so far non causing-disease mutation Val648Ile (GTC-ATC), as previously described (2, 8). Some of these *RET* mutations data were partially previously published by us elsewhere (5; Figure 01). Polymorphisms at codons Gly691Ser (GGT-AGT); Leu769Leu (CTT-CTG) and Ser904Ser (TCC-TCG) were also identified. The *RET* Val804Met mutation and the Ser904Ser polymorphism could be identified only by direct sequencing. From the seven MEN2 families here studied, 35 out of 64 individuals (54.7%) were found to be *RET* mutant carriers (causing-disease mutations): 17 out of them (48.6%) were MEN2A cases; 2 cases (5.7%) presented MEN2A disease associated with congenital megacolon; 15 of them (42.9%) were FMTC and 1 patient (2.8%) had MEN2B.

CSGE

For CSGE screening mutation, The PCR products of index cases (7 subjects) and at risk relatives (57 family members) found to be mutated or polymorphic were screened by CSGE and compared to wild-type exons from 27 at risk family members identified as healthy individuals. For CSGE screened mutations, we analyzed 128 amplicons encompassing *RET* hot-spot mutations and 116 which (90.6%) were found to be concordant with DNA sequencing (gold standard). Twelve amplicons (9.4%), all representing the Val804Met mutation (exon 14), the electrophoretic migration pattern could not be standardized even with alternative primer settings (14B and

14C) and electrophoresis conditions. In relation to the polymorphism analysis, we screened 168 amplicons: 100 out of them (59.5%) were concordant by CSGE and DNA sequencing. In 68 (40.5%) of the analyzed amplicons (all representing the Ser904Ser polymorphism), CSGE analysis could not be standardized. Briefly, patients when examined by CSGE presented the following genotype-phenotype correlations: a) *RET* exon 10 Cys620Arg (TGC-CGC) in 5 MEN2A, 2 congenital megacolon and 4 FMTC cases; b) *RET* exon 11 Cys634Arg (TGC-CGC) in 12 MEN2A cases; c) *RET* exon 11 Cys634Tyr (TGC-TAC) in 8 FMTC carriers; d) *RET* exon 11 Val648Ile (GTC-ATC) in 2 clinically so far no affected MEN2A carriers; and, e) *RET* exon 16 Met918Thr (ATG-ACG) in a case presenting MEN2B phenotype. Polymorphisms Gly691Ser (GGT-AGT) and Leu769Leu (CTT-CTG) were found to occur in *RET* mutation (causing and non causing-disease) carriers and no-carriers (13, 1 and 7 subjects, respectively).

SSCP

For *RET* hot-spot screening analysis using SSCP, we selected a subset of 38 subjects comprising all mutations and polymorphisms genotypes here studied: 4 subjects presenting Cys620Arg + Gly691Ser + Ser904Ser; 3 Cys634Arg; 3 Cys634Tyr; 2 Val648Ile; 3 Val804Met; 1 Met918Thr; 3 Leu769Leu and 19 wild-type subjects. Considering SSCP mutations screening, 16 out of 38 subjects were *RET* hot-spot mutants for codons 620, 634, 648, 804 and 918, and nineteen subjects were health controls. As it was noticed when applying CSGE technology, the same 12 amplicons (17%) representing Val804Met mutation (exon 14), could not be also standardized by SSCP. For SSCP polymorphism screening analysis, the subset group (38 subjects) was compound of: four subjects presenting codon 691 + 904

polymorphisms, three 769 polymorphism carriers and twelve health controls subjects. In 16 (35%) of polymorphic analyzed amplicons (Ser904Ser), electrophoretic migration patterns could not be standardized. Patients presented the same genotype-phenotype correlations when screened by either SSCP or CSGE. SSCP screening method showed same migration patterns for all exons either examining *RET* mutations or polymorphisms. Data obtained by CSGE were fully concordant (100%) with those observed when SSCP was applied.

Comparing mutational data obtained in SSCP/CSGE assays with those from genetic sequencing, we documented that 58 analyses (83%) were concordant. Also, comparing polymorphisms data obtained by SSCP/CSGE with those obtained in the genetic sequencing, 30 analyses (65%) were concordant. Using CSGE and SSCP, we were able to detect five out of the six (83.3%) *RET* mutations verified by direct sequencing analysis in our MEN2 patients.

DISCUSSION AND CONCLUSION

Molecular diagnosis offers a specific and highly accurate indication for prophylactic total thyroidectomy in human *RET* mutation carriers, which may alter MEN2 natural course of disease (15, 24). In our MEN2 cases, likely due to the smallness of our sample, Val804Met *RET* mutation was relatively over-represented, 3 individuals out of 35 (8.6%), comparing the to its less than 3% prevalence in large MEN2 series (1, 15).

In the present study, we reported the CSGE application as a *RET* mutation screening technology in typical MEN2 families. It presented a high sensitivity hot-

spot mutations and for polymorphism analyses as no false positive was detected. As to specificity (false negatives), Val804Met mutation could not be detected by this method. Importantly, using the CSGE method we were able to identify *RET* mutations (or polymorphisms) in exons 10, 11, 13 and 16 which are reported to cause the majority of MEN2 cases (15). Val804Met (exon 14) is a rare gene variation representing less than 3% of *RET* disease-causing mutations so far reported in MEN2 cases (1, 15, 25). Occasionally, we have successfully screened Val804Met using DGGE (3, 4, 8).

Direct genetic sequencing is the “gold standard” in genetic mutation analysis. However, for extended genealogies or populations the cost of its procedure may be significantly higher than screening methods. For instance, CSGE has been successfully used in several genetic screenings and may result in costs six times lower than sequencing, considering only reagents. Further, it has been shown that screening technologies as DHPLC (that uses a Wave system analyzer), DGGE, SSCP and restriction enzymes are also adequate alternatives for direct DNA sequencing (4, 8, 16). Each of these methods have advantages and disadvantages, as follows. DHPLC uses an automatic system for reading heteroduplex bands and is a sensitive method (90-95%), although costs with its specific wave analyzer must be considered (23). Restriction enzymes sensitivity and reproduction analysis may present some drawbacks, as: a) inadequate recognition of restriction site and consequently not defined band in agarose gel electrophoresis, and; b) incomplete discrimination of amplified sequences with similar base pair sizes (4, 16, 14, 26). Despite these limitations, a previous study reported total correlation comparing restriction enzymes to direct sequencing (14). SSCP sensitivity usually reaches 80% for PCR fragment

size smaller than 300bp, meaning that no-mutant electrophoresis migration patterns do not exclude the possibility of a mutation carrier (4, 14, 16, 26). According to other studies, SSCP presented an overall sensitivity of 95-100% for *RET* hot-spots mutations analysis (27, 28). Also, DGGE is a highly sensitive method (90-100%) and very useful screening approach for *RET* mutations which we have been using in our laboratory (3, 4, 8). DGGE has several advantages, as: a) sensitivity and reproducibility higher than SSCP; b) a high correlation with direct sequencing; c) non-radioactive protocols; d) allows little operational manipulation; and e) does not need to recognize restriction sites. On the other hand, DGGE has some disadvantages as: a) requires a 50bp GC-clamp coupled in one of the primer sequences; b) each analyzed exon melting temperature need to be addressed to special computer software or hard standardization; c) initial investment at specific electrophoresis system; d) difficult standardization for guanine-cytosine rich sequences; and e) polymorphism analysis may yield false positive results (3, 4, 8).

In the present study, we reported CSGE application as a *RET* screening technology in 7 typical MEN2 families with a sensitivity of 90.6% for hot-spot mutations and 59.5% for polymorphism analyses. According to the MEN Consensus, the Val804Met mutation, which was not detected in our CSGE assay, is a rare gene variation representing less than 3% of *RET* disease-causing mutations (1, 15, 25). Occasionally, we have successfully screened Val804Met using DGGE (3, 4, 8).

Also, we were interested in testing CSGE for detecting *RET* polymorphisms as they may act as epigenetic factors interacting with *RET* mutations and possibly altering the clinical presentation, course and morbidity of MEN2 disease (29-33).

In summary, in our hands CSGE (and SSCP) showed to be a useful method for screening *RET* hot spot mutations, considering the following points: a) using CSGE, we have successfully screened 5 out of 6 *RET* mutations in our cases; b) these five mutations detected by CSGE are reported to be responsible for most (95%) of the disease-causing mutations in different MEN2 samples; c) there was a total correlation (100%) between CSGE and SSCP data; d) CSGE is a low-cost, fast and feasible to standardize method; e) it does not use a radioactive protocol; and f) it allows little operational manipulation which decreases the possible chances of errors. Further, CSGE does not need some requirements, as: a) the recognition of restriction sites; b) different gel concentrations for each studied exon and 50bp GC-clamp coupled in one of the primers sequences; and finally, c) this method do not require the use of specific softwares to analyze each exon melting temperature.

Concluding, CSGE is an effective, rapid and low-cost screening method for the most frequent occurring *RET* mutations in MEN2.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank to Papaiz group and CNPq-CAPES for supporting this research, aiming to bring to Society a faster, save and accurate diagnosis of multiple endocrine neoplasia type-2. We also thank: Adriana B. Nunes, Marilza C. L. Ezabella, Neusa Abelin, Cesar Y. Hayashida, Ivone I. Mackowiack and all the staff members of the Endocrinology Genetics Unit, Endocrinology, University of Sao Paulo, School of Medicine (<http://medicina.fm.usp.br/ueg>). We also thank Prof. Dr Maria Rita S. P. Bueno, responsible for Dept. of Genetic and Evolutive Biology, Institute of Bioscience IB-USP, for laboratory support.

BIBLIOGRAPHICAL REFERENCES

1. Hoff AO, Cote GJ, Gagel RF. Multiple endocrine neoplasias. **Annu Rev Physiol** **2000**; 62: 377-400.
2. Ezabella MCL, Hayashida CY, Abelin NMA, Toledo SPA. Neoplasias Endocrinas Múltiplas. In: Medeiros-Neto G, editor. **Moléstias Hereditárias do Sistema Tireoideano**. 1ª edição. São Paulo:Roca, 1996: 225-42.
3. Nunes AB, Ezabella MCL, Pereira AC, Krieger JE, Toledo SPA. A novel Val648Ile substitution in RET proto-oncogene observed in a Cys634Arg multiple endocrine neoplasia type 2A kindred presenting with an adrenocorticotropin-producing pheochromocytoma. **J Clin Endocrinol Metab** **2002**; 87: 5658-61.
4. Toledo SPA, Santos MA, Toledo RD, Lourenco Junior DM. Impact of RET proto-oncogene analysis on the clinical management of multiple endocrine neoplasia type 2. **Clinics** **2006**; 61: 59-70.
5. Santos MA, Nunes AB, Abelin N, Ezabella MC, Toledo R de A, et al. Genetic screening of multiple endocrine neoplasia type 2: experience of the USP Endocrine Genetics Unit. **Arq Bras Endocrinol Metabol** **2006**; 50: 7-16.
6. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. **Nature** **1993**; 363: 458-60.
7. Pinales MK, Graf H, Gross JL, Maia, AL. *RET* codon 634 mutations in multiple endocrine neoplasia type 2: Variable clinical features and clinical outcome. **J Clin Endocrinol Metab**; **2003** 88: 2644-49.

8. Nunes AB. Identificação de mutações do proto-oncogene *RET* associadas à forma hereditária do carcinoma medular de tireóide. **Tese de Doutorado, LIM-25, HC-FMUSP, 2001.**
9. Maia FFR, Júnior HJ, Araújo LR. Neoplasia endócrina múltipla tipo 2 – manejo diagnóstico e terapêutico. **Arq Bras Endocrinol Metab 2002;** 46: 606-10.
10. Maciel RMB. Tumorigênese molecular tiroideana: implicações para a prática médica. **Arq Bras Endocrinol Metab 2002;** 46: 381-90.
11. Hayashida CY, Alves VAF, Kanamura CT, Ezabella MCL, Abelin NMA, Nicolau W, et al. Immunohistochemistry of medullary thyroid carcinoma and C-cell hyperplasia by an affinity-purified anti-human calcitonin antiserum. **Cancer 1993;** 72: 1356 -63.
12. Abelin NMA, Gomes S, Ivanoff MT, Ezabella MCL, Hayashida CY, Toledo SPA. Abordagem clínica e laboratorial do bócio uni-nodular sólido: vantagens da determinação da calcitonina sérica por métodos distintos. **Arq Bras Endocrinol Metab 1999;** 43: 104-13.
13. Silva AMA, Maciel RMB, Silva MRD, Toledo SRC, Carvalho MB, Cerutti JM. A novel germ-line mutation in *RET* exon 8 (Gly533Cys) in a large kindred with familial medullary thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab 2003;** 88: 5438-43.
14. Frediani D. Rastreamento gênico através de enzimas de restrição na forma hereditária do carcinoma medular de tireóide. **Monografia, LIM-25, HC-FMUSP, 2002.**

15. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, et al. CONSENSUS: Guideline for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. **J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86: 5658-71.
16. Korkko J, Annunen S, Pihlajamaa T, Prockop DJ, Kokko LA. Conformation sensitive gel electrophoresis for simple and accurate detection of mutations: Compararison with denaturing gradient gel electrophoresis and nucleotide sequencing. **Proc Natl Acad Sci (USA)** 1998; 95: 1681-85.
17. Ganguly A, Rock MJ, Prockop, DJ. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: Evidence for solvent-induced bend in DNA heteroduplexes. **Proc Natl Acad Sci USA** 1993; 90: 10325-9.
18. Ganguly A. An update on conformation sensitive gel electrophoresis. **Hum Mutat** 2002; 19: 334-42.
19. Kambouris M, Jackson CE, Feldman GL. Diagnosis of multiple endocrine neoplasia (MEN) 2A, 2B and Familial Medullary Thyroid Cancer (FMTC) by multiplex PCR and heteroduplex analyses of RET proto-oncogene mutations. **Hum Mutat** 1996; 8: 64-70.
20. Vianello F, Lombardi AM, Bello FD, Zanon E, Cabrio L, Girolami A. Conformation sensitive gel electrophoresis for detection of factor X gene mutations. **Thromb Res** 2002; 107: 51-4.
21. Miller S, Dykes D, Poleski H. A single salting out procedures for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res** 1988; 16: 1215.

22. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** **1988**; 239: 487-91.
23. Solari V, Ennis S, Yoneda A, Wong L, Messineo A, Hollwarth ME, et al. Mutation analysis of the *RET* gene in total intestinal aganglionosis by wave DNA fragment analysis system. **J Pediatr Surg** **2003**; 38: 497-501.
24. Kameyama K, Takami H. Medullary Thyroid Carcinoma: Nationwide Japanese Survey of 634 Cases in 1996 and 271 Cases in 2002. **Endocr J** **2004**; 51: 453-56.
25. Frohnauer MK, Decker RA. Update on the MEN 2A c804 *RET* mutation: Is prophylactic thyroidectomy indicated? **Surgery** **2000**; 128: 1052-8.
26. Bugalho MJ, Domingues R, Sobrinho L. The minisequencing method: a simple strategy for genetic screening of MEN 2 families. **BMG Genet** **2002**; 3: 1-5.
27. Siegelman M, Mohabeer A, Fahey TJ 3rd, Tomlinson G, Mayambala C, Jafari S, et al. Rapid, nonradioactive screening for mutations in exons 10, 11, and 16 of the *RET* protooncogene associated with inherited medullary thyroid carcinoma. **Clin Chem** **1997**; 43:453-7.
28. Gonzalez B, Salcedo M, Medrano ME, Mantilla A, Quinonez G, Benitez-Bribiesca L, et al. *RET* oncogene mutations in medullary thyroid carcinoma in Mexican families. **Arch Med Res** **2003**;34:41-9.
29. Robledo M, Gil L, Pollán M, Cebrián A, Ruíz S, Azañedo M, et al. Polymorphisms G691S/S904S of *RET* as genetic modifiers of MEN 2A. **Cancer Res** **2003**; 63: 1814-17.

30. Wiench M, Wloch J, Wygoda Z, Gubala E, Oczko M, Pawlaczek A, et al. *RET* polymorphisms in codon 796 and 836 are not associated with predisposition to medullary thyroid carcinoma. **Cancer Detect Prev** 2004; 28: 231-36.
31. Baumgartner-Parzer SM, Lang R, Wagner L, Heinze G, Niederle B, Kaserer K, et al. Polymorphisms in exon 13 and intron 14 of the RET proto-oncogene: Genetic modifiers of medullary thyroid carcinoma? **J Clin Endocrinol Metab** 2005; 90: 6232-36.
32. Cebrian A, Llorente SR, Cascon A, Osorio A, Delgado BM, Benítez J, et al. Rapid and easy method for multiple endocrine neoplasia type 1 mutation detection using conformation-sensitive gel electrophoresis. **J Hum Genet** 2002; 47: 190-95.
33. Wohllk N, Soto E, Bravo M, Becker P. Polimorfismos G691S, L769L e S836S del proto-oncogene RET no se asocian a mayor riesgo de cancer medular tiroideo esporádico en pacientes chilenos. **Rev Med Chile** 2005; 133: 397-02.

Table 01: Primers sequences and annealing temperatures for *RET* hot-spot exons (Adapted from ref. 7, 13, 23).

Exons	Primers sequences	Annealing (°C)	Bp
10	10F: 5' AggCTgAgTgggCTACgTCTg 3' 10R: 5' gTTgAgACCTCTgTggggCT 3'	60	205
11A	11F: 5' ATgAggCAgAgCATACgCAgCC 3' 11R: 5' CTTgAAggCATCCACggAgACC 3'	60	332
11B	11F: 5' ATgAggCAgAgCATACgCAgCC 3' 11R: 5' TTgTgggCAAACCTTgTggTA 3'	60	199
13	13F: 5' AACTTgggCAAggCgATgCA 3' 13R: 5' AgAACAgggCTgTATggAgC 3'	62	276
14A	14F: 5' CCTggCTCCTggAAgACC 3' 14R: 5' CATATgCACgCACCTTCATC 3'	62	298
14B	14F: 5' CCTggCTCCTggAAgACC 3' 14R: 5' CCAggCAAATgAgATgAggT 3'	62	241
14C	14F: 5' gCgCCCCCgCCCCgCCCgCCgCggCgCCg CCCAgggATAgggCCTgggCTTC 3' 14R: 5' TAACCTCCACCCAAgAgAg 3'	65	395
15	15F: 5' CATggCCTgACgACTCgTgC 3' 15R: 5' CCTgggAgCCCCgCCTCATC 3'	60	192
16	16F: 5' CTgAAAgCTCAgggATAggg 3' 16R: 5' TAACCTCCACCCAAgAgAg 3'	60	202

Table 02: Genotype-phenotype correlation for *RET* mutant carriers screened by CSGE

Cases	Mutated exon	Phenotype	Genotype	Polymorphic exons	Polymorphisms
1	11	MEN2A	Cys634Arg		
2	11	MEN2A	Cys634Arg		
3	11	MEN2A	Cys634Arg	11	Gly691Ser
4	11	MEN2A	Cys634Arg	11	Gly691Ser
5	11	MEN2A	Cys634Arg	11	Gly691Ser
6	11	MEN2A	Cys634Arg		
7	11	MEN2A	Cys634Arg		
8	11	MEN2A	Cys634Arg		
9	11	MEN2A	Cys634Arg		
10	11	MEN2A	Cys634Arg		
11	11	MEN2A	Cys634Arg	11	Gly691Ser
12	11	MEN2A	Cys634Arg	11	Gly691Ser
13	10	MEN2A	Cys620Arg	11	Gly691Ser
14	10	MEN2A	Cys620Arg	11	Gly691Ser
15	10	MEN2A	Cys620Arg	11	Gly691Ser
16	10	MEN2A	Cys620Arg	11	Gly691Ser
17	10	MEN2A+HSCR	Cys620Arg	11	Gly691Ser
18	10	MEN2A+HSCR	Cys620Arg	11-13	Gly691Ser, Leu769Leu
19	10	MEN2A	Cys620Arg	11	Gly691Ser
20	10	FMTC	Cys620Arg		
21	10	FMTC	Cys620Arg		
22	10	FMTC	Cys620Arg		
23	10	FMTC	Cys620Arg		
24	11	FMTC	Cys634Tyr		
25	11	FMTC	Cys634Tyr		
26	11	FMTC	Cys634Tyr		
27	11	FMTC	Cys634Tyr		
28	11	FMTC	Cys634Tyr		
29	11	FMTC	Cys634Tyr		
30	11	FMTC	Cys634Tyr		
31	11	FMTC	Cys634Tyr		
32	16	MEN2B	Met918Thr		

Note: Val804Met mutation and Ser904Ser polymorphism were not included in this Table

Table 03A: Comparative sensitivity in *RET* hot-spot exons mutations presented in the study of *RET* hot-spot mutations

Hot-spot exons	Direct sequencing	CSGE	SSCP	Screened Mutation
10	Sensitive	Sensitive	Sensitive	Cys620Arg
11	Sensitive	Sensitive	Sensitive	Cys634Arg; Cys634Tyr Val648Ile
14	Sensitive	Not sensitive	Not sensitive	Val804Met
16	Sensitive	Sensitive	Sensitive	Met918Thr

Table 03B: Comparative sensitivity in *RET* hot-spot exons polymorphisms presented in our study

Hot-spot exons	Direct sequencing	CSGE	SSCP	Screened polymorphisms
11	Sensitive	Sensitive	Sensitive	Gly691Ser
13	Sensitive	Sensitive	Sensitive	Leu769Leu
15	Sensitive	Not sensitive	Not sensitive	Ser904Ser

Figure 01: *RET* mutation analysis using direct sequencing and CSGE.

Legends:

a) T to C substitution (TGC-CGC) in *RET* codon 620 (exon 10) leading to a Cys620Arg mutation (5). CSGE exon 10 differentiation patterns: lane 1, Cys620; and lane 2, Cys620Arg.

b) (Top) T to C substitution (TGC-CGC) in *RET* codon 634 (exon 11) leading to a Cys634Arg mutation (5); and, (Bottom) G to A substitution (TGC-TAC) in *RET* codon 634 (exon 11) leading to a Cys634Tyr mutation. CSGE exon 11 differentiation patterns (*primers 11B*): lane 1, Cys634; lane 2, Cys634Arg; and lane 3, Cys634Tyr.

c) G to A substitution (GTC-ATC) in *RET* codon 648 (exon 11) leading to a Val648Ile mutation (5). CSGE exon 11 differentiation patterns (*primers 11B*): lane 1, Cys648; and lane 2, Val648Ile.

d) G to A substitution (GGT-AGT) in *RET* codon 691 (exon 11) leading to a Gly691Ser polymorphism. CSGE exon 11 differentiation patterns (*primers 11A*): lane 1, codons 634 and/or 648 not differentiated electrophoretic patterns; and lane 2, Gly691Ser.

e) T to G substitution (CTT-CTG) in *RET* codon 769 (exon 13) leading to a Leu769Leu polymorphism. CSGE exon 13 differentiation patterns: lane 1, Leu769; and lane 2, Leu769Leu.

f) T to C substitution (ATG-ACG) in *RET* codon 918 (exon 16) leading to a Met918Thr mutation (5). CSGE exon 16 differentiation patterns: lane 1, Met918; and lane 2, Met918Thr.

a)

b)

c)

d)

e)

f)