

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

revisão

## RESUMO

A neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (NEM-2) é uma síndrome tumoral hereditária que compreende: carcinoma medular de tireóide, hiperparatiroidismo primário, feocromocitoma e outras doenças 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 nos quais 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, seqüenciamento e mini-seqüenciamento gênico. Apresentamos uma breve revisão da nossa experiência com seqüenciamento gênico direto do *RET* e DGGE. Em 50 pacientes com NEM-2 analisados por ambas as técnicas, não encontramos falsos resultados, sugerindo que o DGGE é uma metodologia de rastreamento adequada para mutações no proto-oncogene *RET*. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2006;50/1:7-16**)

**Descritores:** Rastreamento gênico; DGGE; Seqüenciamento gênico; NEM-2; Proto-oncogene *RET*; Carcinoma medular de tireóide

## ABSTRACT

### **Genetic Screening of Multiple Endocrine Neoplasia Type 2: Experience of the USP Endocrine Genetics Unit.**

Multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN-2) is an inherited tumor syndrome that includes medullary thyroid carcinoma (MTC), primary hyperparathyroidism, pheochromocytoma and other non-endocrine diseases. Since the 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. In this paper, 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. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2006;50/1:7-16**)

**Keywords:** Genetic screening; DGGE; Genetic sequencing; MEN-2; *RET* proto-oncogene; Medullary thyroid carcinoma

*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*

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

*Recebido em 18/04/05*

*Revisado em 17/08/05*

*Aceito em 28/10/05*

**A**NEOPLASIA ENDÓCRINA MÚLTIPLA tipo-2 (NEM-2) é herdada por genes autossômicos dominantes e compreende um grupo de doenças, 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 gânglioneuromatose de mucosas. Estas neoplasias neuroendócrinas são oriundas de células da crista neural: células C da tireóide, células cromafins da medula 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 1.

O carcinoma medular de tireóide (CMT) associado à 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, a 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. Calcilose 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 receptora 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).

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

<b>NEM-2A.</b>	Pode apresentar-se sob três formas: <b>a)</b> Famílias com fenótipos de CMT, FEO e HPT; <b>b)</b> Famílias somente com fenótipos de CMT e FEO; <b>c)</b> Famílias somente com fenótipos de CMT e HPT.
<b>NEM-2B.</b>	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 gânglioneuromatoses intestinais.
<b>CMT-F.</b>	Famílias com no mínimo 4 indivíduos apresentando somente fenótipo CMT, estando FEO e HPT ausentes.
<b>Outros:</b>	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.
<b>NEM:</b>	neoplasias endócrinas múltiplas; CMT: carcinoma medular de tireóide; CMT-F: carcinoma medular de tireóide familiar; FEO: feocromocitoma; HPT: hiperparatireoidismo.

**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 $\alpha$ -1/GDNF, GFR $\alpha$ -2/nurturina GFR $\alpha$ -3/artemina, GFR $\alpha$ -4/persepina) 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 códons 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, 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 códons 609, 611, 618, 620, 630 e 634. Pequenas inserções de nucleotídeos nos códons 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 a 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 códons 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 códons 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 códons 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 códons 790, 791, e 891 (1,2,27). Mutações nos códons 630, 790, 791, 891 e a duplicação de 12 pb entre os códons 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 extracelu-

lar 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 ao 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 de 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 o 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 seqüenciamento 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 200 pb (2,33). A tabela 2 apresenta um algoritmo para análise genética do *RET*.

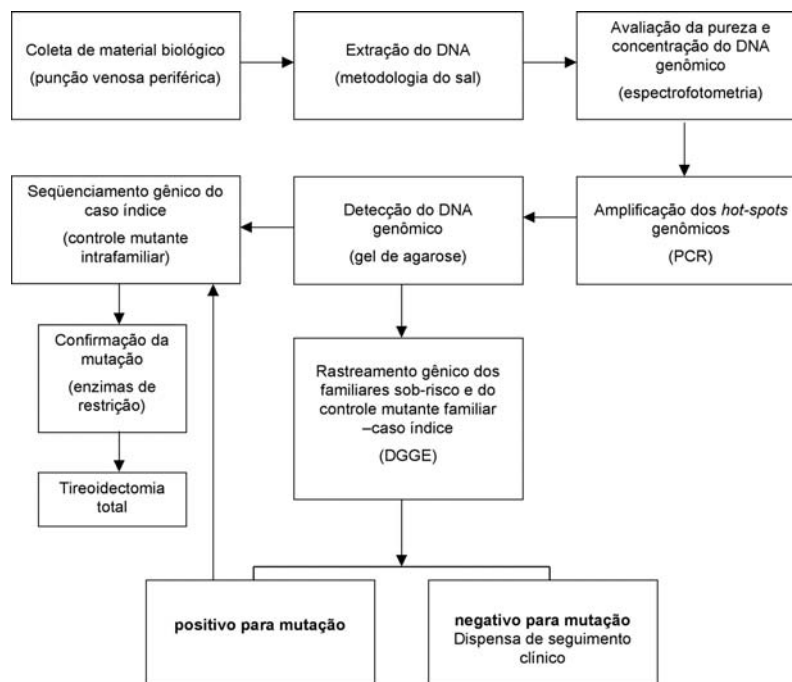
### Rastreamento de mutações no *RET*

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 seqüências flanqueadoras da região

**Tabela 2.** Algoritmo para análise genética do *RET*.



íntron-éxon para o estudo do *RET*, e a um deles deve ser acoplada cauda guanina-citosina de aproximadamente 50 pb (31-38). As seqüências dos *primers* e suas respectivas temperaturas de ciclagem, realizadas por PCR, encontram-se na tabela 3.

A eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) é realizada após a reação de PCR com *primers* especiais, os quais se acoplaram caudas guanina-citosina de aproximadamente 50 pb (31-38). O objetivo é criar domínio com maior temperatura de desnaturação, quando comparada à temperatura de desnaturação da seqüência de DNA em estudo, prevenindo a total desnaturação 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 desnaturantes e calor (44). Nucleotídeos mutados nas seqüências dos DNAs promoverão alterações na temperatura de desnaturação 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-desnaturante. A detecção pode ser realizada por auto-radiograma (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 dideoxinucleotídeo (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).

**Tabela 3.** Seqüência 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).

<b>Éxon 10:</b>	(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.
<b>RET 10F:</b>	5'GCGCCCCCGCCCCCGCCCCGCCCCGCGCGGCCCCAGGAGGCTAGTG 3'
<b>RET 10R:</b>	5'CGTGCTGGTCCCGGCCGCC 3'
<b>Éxon 11:</b>	(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.
<b>RET 11F:</b>	5'GCGCCCCCGCCCCCGCCCCGCCCCGCGCGACCTGGTCTCCATGGAGTC 3'
<b>RET 11R:</b>	5'CCTCACACCACCCCCACCCA 3'
<b>Éxon 13:</b>	(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.
<b>RET 13F:</b>	5'CTCTGTCTGAACTTGGGC 3'
<b>RET 13R:</b>	5'GCGCCCCCGCCCCGCCCCGCGCGTCACCCTGCAGCAGGCCTTA 3'
<b>Éxon 14:</b>	(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.
<b>RET 14F:</b>	5'GCGCCCCCGCCCCGCCCCGCGCGCGGCCCCAGGGATAGGGCCTGGGCTTC 3'
<b>RET 14R:</b>	5'TAACCTCCACCCAAGAGAG 3'
<b>Éxon 16:</b>	(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.
<b>RET 16F:</b>	5'AGGGATAGGGCCTGGGCTTC 3'
<b>RET 16R:</b>	5'CGCCCGCGCGCCCCGCCCCGCCCCGCGAGGGATAGGGCCTGGGCTTC 3'

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

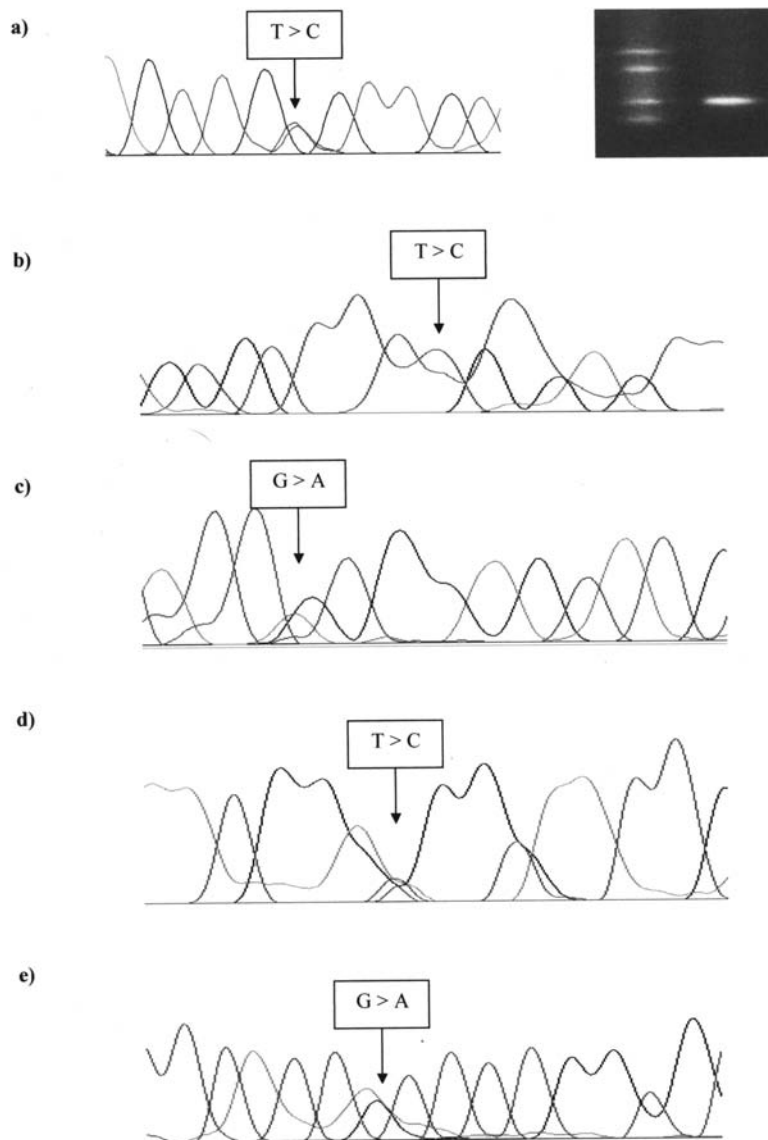
Em nossa Unidade, os pacientes com NEM-2 eram inicialmente diagnosticados por procedimentos clínicos e bioquímicos clássicos, tais como dosagens basais e pós-estímulo por cálcio, pentagastrina ou omeprazol da secreção de calcitonina; dosagens de epinefrina e norepinefrina séricas e urinárias; dosagens 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 1 mostra as mutações encontradas na análise por seqüenciamento gênico em nosso estudo (ABI 310 DNA Sequencer, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).



**Figura 1.** Mutações encontradas na análise por seqüenciamento gênico e DGGE de 50 indivíduos portadores de NEM-2 (ABI 310 DNA Sequencer, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). **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 adenina (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.

## 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 diagnós-

tico 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 de a 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 afeta-

dos, 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, e 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 os 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

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;17:390-3.
3. Gimm O. Multiple endocrine neoplasia type 2: clinical aspects. In: Dahia PLM, Eng C, editors. **Genetic disorders of endocrine neoplasia**. 1<sup>st</sup> ed. Basel: Karger, 2001. pp.103-30.
4. Toledo SPA, Abelin NMA, Ezabella MCL, Hayashida CY, Dahia PM. Neoplasias endócrinas múltiplas. In: Wajchenberg BL, editor. **Tratado de endocrinologia clínica**. São Paulo: Roca, 1992. pp.943-64.
5. Ezabella MCL, Hayashida CY, Abelin NMA, Toledo SPA. Neoplasias endócrinas múltiplas. In: Medeiros-Neto G, editor. **Moléstias hereditárias do sistema tireoideano**. 1<sup>a</sup> edição. São Paulo: Roca, 1996. pp.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-Pecoz 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 SA Jr, 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 is 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. Donniss-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 Mol Genet** 1993;2:851-6.
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**. 1st ed. Basel: Karger, 2001. pp.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;137:1512-9.
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;88:2644-9.
28. Pigny P, Bateurs 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;84:1700-4.
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;137:509-11.
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;29:331-5.
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. Körkkö J, Annunen S, Pihlajamaa T, Prockop DJ, Kokko LA. 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;95:1681-5.
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. 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.
37. Takahashi M, Buma Y, Hiai H. Isolation of RET proto-oncogene DNA with an amino-terminal signal sequence. **Oncogene** 1989;4:805-6.
38. 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;86:232-6.

39. 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.
40. Blank RD, Sklar CA, Martin ML. Denaturing gel electrophoresis to diagnose multiple endocrine neoplasia type 2. **Clin Chem** 1996;42:598-603.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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:e91.
45. Hayashi K, Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP? **Hum Mutat** 1993;2:338-46.
46. 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;46:632-9.
47. 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;83:770-4.
48. Lombardo F, Baudin E, Chiefari E, Arturi F, Bardet S, Cailou 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.
49. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **J Mol Biol** 1975;94:444-8.
50. 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.
51. Frediani D. **Rastreamento gênico através de enzimas de restrição na forma hereditária do carcinoma medular de tireóide**. Monografia, LIM-25, HC-FMUSP, 2002.
52. Toledo SPA, Ezabella MCL, Abelin N, Hayashida CY, Dahia PM. Perda do sítio de restrição fok-I no códon 918 do proto-oncogene RET na neoplasia endócrina múltipla tipo 2B. **Arq Bras Endocrinol Metab** 1997;41:14-7.
53. 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.
54. Toledo SPA, Ferraz AR. Multiple endocrine type II neoplasia. **Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo** 1990;45:1-2.
55. 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.

**Endereço para correspondência:**

Marcelo Augusto Cortina Gonçalves dos Santos  
Unidade de Endocrinologia Genética,  
Disciplina de Endocrinologia, Clínica Médica  
Av. Dr. Arnaldo 455, 5º andar  
01246-903 São Paulo, SP  
Fax: (11) 3066-7252