

## **Rastreamento Genético do Carcinoma Medular de Tireóide: Identificação de Mutações no Proto-Oncogene *Ret***

**Marcia Khaled Puñales**  
**Hans Graf**  
**Jorge Luiz Gross**  
**Ana Luiza Maia**

*Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS; e Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Paraná (SEMPR) (HG), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.*

### RESUMO

O carcinoma medular de tireóide (CMT) pode apresentar-se na forma esporádica (75%) ou hereditária (25%) como componente das síndromes de neoplasia endócrina múltipla (NEM2A e 2B), carcinoma medular de tireóide familiar (CMTF) ou outros. Diferentes mutações no proto-oncogene *Ret* foram identificadas e estudos recentes sugerem uma correlação entre o genótipo-fenótipo. O presente estudo realizou a análise molecular do *Ret* em indivíduos com CMT e avaliou a correlação genótipo-fenótipo nos afetados e seus familiares. Foram incluídos 48 indivíduos com diagnóstico histopatológico e imunohistoquímico de CMT, sendo 7 esporádicos e 41 hereditários, provenientes de 14 famílias independentes. DNA genômico foi extraído de leucócitos periféricos e os exons 10, 11, 13, 14 e/ou 16 do *Ret* amplificados por PCR. As mutações foram identificadas por SSCP, restrição enzimática, e/ou seqüenciamento. Das famílias com CMT hereditário, 7 apresentavam NEM2A, 2 NEM2A associada à líquen amilóide cutâneo (CLA), 2 NEM2B, 2 CMTF e 1 como outros. Em 6 famílias com NEM2A, a mutação estava presente no codon 634, troca de TGC→CGC ou TGC→TAC. Uma família com NEM2A apresentava mutação no codon 618 (TGC→CGC). Ambas famílias com CMTF e nos casos de NEM2A+CLA, a mutação também ocorreu no codon 634 (TGC→CGC). Nos indivíduos afetados com NEM2B foi detectada uma mutação *de novo* no códon 918 (ATG→ACG). Na família classificada como outros, a mutação localizava-se no códon 634 (TGC→TAC). O diagnóstico molecular identificou mutações em todos os indivíduos com história de doença hereditária, em 8 carreadores sem evidência clínica de neoplasia, e em 2 indivíduos com CMT aparentemente esporádico. Nossos resultados confirmam dados da literatura e demonstram que o rastreamento genético é fundamental na conduta terapêutica. (Arq Bras Endocrinol Metab 2002;46/6:632-639)

**Descritores:** Carcinoma medular de tireóide; Proto-oncogene *ret*; MEN 2A; MEN 2B; CMTF

### ABSTRACT

#### **Molecular Screening of Medullary Thyroid Carcinoma: Identification of *Ret* Proto-Oncogene Mutations.**

Medullary carcinoma of the thyroid (MTC) may occur either as sporadic (75%) or hereditary (25%) disease. Hereditary MTC can occur either alone – familial MTC (FMTC) – or as the thyroid manifestation of multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2) syndromes (MEN2A and MEN2B) or others. Germline mutations in the *Ret* proto-oncogene cause MEN2 and recent studies suggest a relationship between specific mutations and different phenotypes in MEN2 syndromes. The purpose of this study was to identify *Ret* mutations and analyze the relationship between genotype-phenotype. A total of 48 individuals with MTC were enrolled in this study, 7 with apparent sporadic carcinoma and 41 from 14 separate hereditary MTC families. DNA was extracted from leukocytes and exons 10, 11, 13, 14 and 16 were amplified by PCR. The mutation was deter-

Recebido em 16/04/02  
Aceito em 12/07/02

mined by SSCP, enzymatic restriction analysis and/or sequencing. The phenotypes of hereditary MTC were as follows: 7 MEN2A, 2 MEN2A+CLA, 2 MEN2B, 2 FMTC and 1 other forms. We identified mutations at codon 634 (TGC→CGC or TGC→AAC) in 6 of the 7 families with MEN2A. One kindred had the mutation in codon 618 (TGC→CGC). The 2 kindred with MEN2A+CLA presented the mutation in codon 634 (TGC→CGC). In both cases of FMTC the mutation was also found in the codon 634 (TGC→CGC). A mutation at codon 918 (ATG→AGC) was identified in the 2 subjects with MEN2B, whereas in the other hereditary forms of the MTC, we identified a mutation at codon 634 (TGC→AAC). The genetic screening was able to identify mutations in all individuals with a hereditary pattern, in 8 asymptomatic carriers and in 2 subjects with apparently sporadic tumors. Our results confirm the literature in that genetic testing is a fundamental tool for the management of hereditary MTC. (Arq Bras Endocrinol Metab 2002; 46/6:632-639)

**Keywords:** Medullary thyroid carcinoma; Proto-oncogene *Ret*; MEN 2A; MEN 2B; FMTC

**O** CARCINOMA MEDULAR DE TIREÓIDE (CMT), neoplasia das células C ou parafoliculares da tireóide, é responsável por aproximadamente 5 a 8% de todas as neoplasias malignas da tireóide. O CMT pode apresentar-se na forma esporádica (75-80%) ou hereditária (20-25%). O CMT hereditário é componente das síndromes genéticas de neoplasia endócrina múltipla (NEM) 2A, 2B ou CMT Familiar (CMTF) ou outras formas hereditárias (1,2).

A NEM 2A é caracterizada pela presença de CMT (95%), feocromocitoma (30-50%) e hiperparatireoidismo (10-20%). A síndrome NEM 2A é ainda subdividida em três subtipos fenotípicos (3,4): a) NEM 2A(1), indivíduos que apresentam os três componentes da síndrome; b) NEM 2A(2), indivíduos com CMT e feocromocitoma; c) NEM 2A(3), indivíduos com CMT e hiperparatireoidismo. Outras associações raras com NEM 2A incluem a presença de líquen amilóide cutâneo (CLA) (5) ou doença de Hirschsprung (6). A síndrome NEM 2B caracteriza-se por CMT (90%), ganglioneuromatose (100%) e hábitos marfanóides (65%) e feocromocitoma (45%). O CMTF consiste na presença de CMT isolado em pelo menos quatro membros da mesma família. As outras formas de CMT hereditário consistem no acometimento de dois ou três membros da mesma família com CMT, sem a presença de feocromocitoma ou hiperparatireoidismo (1-4).

Os primeiros estudos para identificação da mutação genética causadora do CMT foram realizados

em 1970 (7-10) e o proto-oncogene *Ret* foi identificado como o gene causador em 1993 (11,12). O proto-oncogene *Ret* apresenta 21 exons e codifica um receptor tirosino-quinase expresso nas células derivadas da crista neural (13), incluindo tumores originados dessas células como CMT e feocromocitoma. As mutações descritas estão localizadas basicamente nos exons 10, 11 e 16 (14-22), embora sejam identificadas mutações, com menor frequência, nos exons 13, 14 e 15 (14,21,23). A proteína *Ret* apresenta um domínio extracelular com uma estrutura homóloga ao gene da família da *cadherin* e outro domínio rico em cisteína, com papel importante na conformação e dimerização das proteínas; além desse domínio, o *Ret* apresenta ainda um domínio transmembrana e dois domínios intracelulares citoplasmáticos tirosino-quinase (TK1 e TK2), cujo ligante é o denominado *glial derived neurotrophic factor* (GDNF), que atua via receptores aGDNF (13,24).

Alguns estudos têm demonstrado a associação entre mutações específicas e as diferentes síndromes clínicas associada à NEM (3,4,25). Em um estudo multicêntrico, que avaliou 477 famílias com NEM2 acompanhadas em 18 centros de referência, foi observada a associação de determinadas mutações com a presença ou não dos diferentes componentes da NEM2 (4). Mutações no códon 634 (exon 11), por exemplo, foram associadas à presença de feocromocitoma e hiperparatireoidismo, sendo que a substituição da cisteína (TGC) por arginina (CGC), que ocorre de modo mais freqüente na NEM 2A, não foi detectada em nenhum caso de CMTF. Por outro lado, mutações nos códons 768 (exon 13) e 804 (exon 14) foram identificadas unicamente em casos de CMTF, enquanto que as descritas no códon 918 (exon 16) são específicas para a NEM 2B (4). Na rara síndrome de NEM 2A associado ao líquen amilóide cutâneo (CLA) (4), a mutação ocorreu no códon 634 em todos os casos relatados até o momento e na NEM 2A associada à doença de Hirschsprung os códons afetados estão localizados no exon 10 (618 e 620) (4).

A importância do rastreamento genético para o manejo adequado do carcinoma está bem determinada na literatura (26-29). Recentemente, o diagnóstico molecular do carcinoma medular de tireóide foi implementado no nosso serviço e no presente trabalho relatamos os resultados de 21 famílias avaliadas até o momento, descrevendo o tipo de mutação e a correlação dessas com os diferentes fenótipos nos indivíduos afetados e seus familiares.

## MATERIAL E MÉTODOS

A população em estudo incluiu os pacientes com diagnóstico histopatológico e imunohistoquímico de carcinoma medular de tireóide e seus familiares de primeiro grau, provenientes de diferentes estados (Alagoas, Rio Grande do Sul, Rio Janeiro e Paraná) e encaminhados aos ambulatórios de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - RS e Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. Foram incluídas no estudo 21 famílias.

Os pacientes e seus familiares foram entrevistados para preenchimento de uma ficha clínica (idade ao diagnóstico e atual, sexo, raça, presença de nódulos, metastases locais e à distância, sinais e sintomas sugestivos de feocromocitoma e/ou hiperparatireoidismo e exames laboratoriais pertinentes). Os pacientes assinaram o termo de consentimento informado e o estudo foi aprovado pela comissão de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Grupo de Pesquisa de Pós-Graduação - PPG nº1991). As informações sobre dados clínicos e laboratoriais, bem como a presença de outras neoplasias associadas ao CMT, feocromocitoma e/ou hiperparatireoidismo, foram obtidas através da revisão de prontuário e/ou informações dos médicos assistentes. O rastreamento e/ou diagnóstico de feocromocitoma foi realizado através da determinação sérica/urinária do ácido vanil-mandélico, catecolaminas e/ou metanefrinas urinárias. O rastreamento e/ou diagnóstico de hiperparatireoidismo foi determinado através da dosagem sérica de cálcio e PTH.

A classificação do CMT utilizada no estudo foi a classificação operacional de acordo com o Comitê Internacional de Mutações do Proto-oncogene Ret (*International Ret Mutation Consortium*).

## Extração DNA e Reação Polimerase em Cadeia (PCR)

O DNA genômico foi extraído de sangue periférico, através da técnica padrão (31). O fragmento de DNA de interesse foi posteriormente amplificado pela técnica de PCR, utilizando *primers* específicos (tabela 1). As condições utilizadas foram as seguintes: 3 min à 94°C seguidos de 35 ciclos (94°C, 1 min, 56-60°C, 30 seg e 72°C, 2 min. Cada reação de PCR foi realizada a partir de 100ng/dl DNA genômico, 20mM tris (pH 8,4), 0,2mM de dNTP, 0,5µ M de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 2,0mMol MgCl<sub>2</sub> e 1U de Taq polimerase em 50µ l de solução final. Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e posteriormente à restrição enzimática e/ou SSCP e/ou seqüenciamento automático, conforme descrito à seguir.

## Identificação das Mutações

A estratégia diagnóstica na identificação das mutações baseou-se inicialmente na busca da mutação no indivíduo índice, de acordo com as mutações mais frequentes descritas na literatura, utilizando a técnica de *single strand conformation polymorphism* (SSCP) e/ou restrição enzimática e/ou seqüenciamento direto. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas.

## SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*)

Para análise pela técnica de SSCP dos exons 10, 11, 13, 14 e 16, os fragmentos de DNA foram previamente desnaturados em formamida e resfriados em gelo antes da aplicação em gel não desnaturante. Utilizou-se gel 8-12% policrilamida, 0,8% bis-acrilamida à 8°, 45°, 30°C ou à temperatura ambiente para os exons 10, 11, 13 e 14, à 200-400mV, durante 2-4

Tabela 1. Seqüência de *primers* e respectivos fragmentos.

Exon	Primer	Seqüência Sintetizada	Fragmento
10	RET10F	5'- AGG CTG AGT GGG CTA CGT CT G -3'	210 pb
	RET10R	5'- GTT GAG ACC TCT GTG GGG CT -3'	
11	RET11F	5'- ATG AGG CAG AGC ATA CGC AGC C -3'	347 pb
	RET11R	5'- CTT GAA GGC ATC CAC GGA GAC C -3'	
13	INT12F	5'- AAC TTG GGC AAG GCG ATG CA -3'	276 pb
	INT13R	5'- AGA ACA GGG CTG TAT GGA GC -3'	
14	RET14F	5'- AGG ACC CAA GCT GCC TAC -3'	294 pb
	RET14R	5'- GCT GGG TGC AGA GCC ATA T-3'	
16	M2BF	5'- AGG GAT AGG GCC TGG GCT TC -3'	192 pb
	M2BR	5'- TAA CCT CCA CCC CAA GAG AG -3'	

horas num aparelho vertical de eletroforese (32). O gel foi posteriormente corado com nitrato de prata de acordo com a técnica padrão (32). Os fragmentos que apresentavam alteração na migração eram posteriormente submetidos à restrição enzimática e/ou seqüenciamento.

### Restrição Enzimática

A técnica de restrição enzimática foi utilizada para análise das mutações detectadas pelo SSCP, utilizando enzimas de restrição específicas para cada mutação, quando disponíveis (28). Os produtos de PCR foram digeridos com a enzima de restrição apropriada de acordo com as instruções do fornecedor, analisados em eletroforese em gel de agarose à 2% e visualizados por transiluminação ultravioleta (Image Master, Pharmacia).

### Seqüenciamento Direto

O seqüenciamento foi utilizado para determinação das mutações não identificadas por restrição enzimática, SSCP ou para identificar a troca de amino-ácido da mutação, sendo o método utilizado por terminação em cadeia por dideoxinucleotídeos descrito por Sanger (1997) (33), com kit para seqüenciamento *ALFexpress AutoCycle Sequencing Kit* e seqüenciador automático ALF Express (Pharmacia).

## RESULTADOS

### Aspectos Gerais

Das 21 famílias com CMT incluídas no estudo, 12 foram consideradas como portadoras de CMT hereditário com base na história familiar e/ou presença de outras neoplasias, características das síndromes hereditárias e 9 como esporádicos. Após o rastreamento genético, dois indivíduos pré-classificados com CMT esporádico apresentavam a forma hereditária, confirmando então 14 famílias com CMT hereditário e 7 indivíduos com CMT esporádico. Foram analisadas 111 amostras, totalizando 42 indi-

víduos com CMT. Todos os indivíduos com história clínica e/ou laboratorial sugestiva de CMT hereditário, submetidas ao rastreamento molecular do proto-oncogene *Ret*, incluídos em nosso estudo, apresentaram mutações. O rastreamento molecular foi capaz de identificar 8 indivíduos carreadores, ainda sem manifestação clínica da neoplasia.

Das 14 famílias com CMT hereditário, oito referiram história familiar sugestiva de carcinoma medular de tireóide e 2 relataram problemas associados à glândula, sem saber especificar. No entanto, ao serem questionados quanto à presença de história familiar de neoplasias em geral, todas as famílias acompanhadas referiam positividade (neoplasias: mama, osso, garganta, cordas vocais, esôfago, próstata e outras). Houve diferença estatisticamente significativa na média de idade ao diagnóstico dos probandos com CMT hereditário (31,3 anos) e esporádico (63,7 anos). Os dados clínicos e laboratoriais das famílias com CMT hereditário e esporádico estão resumidos na tabela 2.

De acordo com o comitê internacional da classificação operacional da NEM2, os fenótipos encontrados foram: NEM 2A, NEM 2A + CLA, NEM 2B, CMTF e outras formas hereditárias (famílias com menos de 4 membros afetados com CMT, sem evidências de feocromocitoma ou doença paratireoidiana no afetado e nos familiares em risco).

### Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2A:

Das 7 famílias com NEM 2A avaliadas, 3 famílias apresentavam CMT associado a feocromocitoma e hiperparatireoidismo, caracterizando o fenótipo de NEM 2A (1) e 4 famílias apresentavam CMT associado a feocromocitoma sem evidência clínica ou laboratorial sugestivas de hiperparatireoidismo no indivíduo afetado ou nos familiares em risco, caracterizando a síndrome de NEM 2A (2), (tabela 3). Em nosso estudo, seis famílias analisadas apresentavam a mutação TGC→CGC ou TGC→TAC, códon 634 (exon 11) e apenas uma família apresentou a mutação TGC→CGC, códon 618 (exon 10).

Tabela 2. Dados clínicos e laboratoriais dos probandos com CMT.

	CMT Hereditário	CMT Esporádico	p
Idade ao diagnóstico (média)	31,3 ± 12,6 anos	63,7 ± 9,3 anos	<0,001
Nódulo	14 / 14 (100%)	7 / 7 (100%)	
AP (multifocal / multicêntrico)	14 / 14 (100%)	2 / 6 (33,3%)	
Metástases locais	12 / 14 (85,7%)	5 / 7 (71,4%)	
Metástases à distância	7 / 14 (50%)	4 / 7 (57%)	
Rastreamento Calcitonina	1486,2 ± 822,5	2580 ± 1492	

Tabela 3. Características das famílias com Neoplasia Endócrina Múltipla de acordo com o Comitê Internacional.

Síndrome	No (%) Família	Códon / Exon Afetado	Troca Amino-Ácido
NEM 2A(1)	3 (21,4%)	634 / 11	cis →tir cis →arg cis →trp
NEM 2A(2)	3 (21,4%)	634 / 11	cis →tir cis →arg cis →trp
NEM 2A(2)	1 (7,1%)	618 / 10	cis →arg
NEM 2A +CLA	2 (14,3%)	634 / 11	cis →arg
NEM 2B	2 (14,3%)	918 / 16	met →tre
CMTF	2 (14,3%)	634 / 11	cis →arg
Outros	1 (7,4%)	634 / 11	cis →tir

#### Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2A associada à Líquen Amilóide Cutâneo:

Duas famílias apresentavam a rara associação de NEM 2A com líquen amilóide cutâneo (CLA). A CLA é definida como lesão de pele pruriginosa, rica em amilóide, localizada preferencialmente na região interescapular. Nas 2 famílias incluídas em nosso estudo este achado foi confirmado pela biópsia da lesão. Nessas famílias a mutação também localizava-se no domínio extracelular, TGC→CGC, códon 634 (exon 11).

#### Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2B:

Foram incluídos em nosso estudo 2 indivíduos com NEM 2B, cujos pais não apresentavam nenhuma evidência clínica ou laboratorial sugestiva da síndrome, caracterizando uma mutação *de novo*. As características fenotípicas de um dos indivíduos afetados permitiram o diagnóstico da síndrome durante a infância. A ganglioneuromatose intestinal foi observada nos primeiros meses de vida e os neuromas da mucosa oral surgiram aproximadamente aos 8 anos de idade, o CMT e a presença de metástases locais foram diagnosticadas aos 14 anos e aproximadamente aos 16 anos foram observadas metástases à distância (fígado e osso). O outro indivíduo apresentou história de nódulo tireoidiano desde a infância, no entanto o CMT somente foi diagnosticado aos 21 anos, sendo que a presença dos neuromas e a ganglioneuromatose intestinal passaram despercebidos. Em ambos os casos, a mutação identificada se localizava no domínio intracelular tirosino-quinase, ATG→ACG, códon 918 (exon 16).

#### Carcinoma Medular de Tireóide Familiar:

Devido ao rigor dos critérios de classificação do consórcio internacional de NEM2, foram classificadas apenas 2 famílias com a síndrome de CMTF, ou seja, famílias com acometimento com CMT isolado em

pelo menos 4 membros, sem evidências clínicas ou laboratoriais de feocromocitoma ou hiperparatireoidismo. Na primeira família foram diagnosticados 7 indivíduos afetados e na outra 6 indivíduos. A mutação identificada foi T634C (exon 11) em uma das famílias.

#### Outras formas de CMT hereditário:

Uma das famílias que não se enquadrava nas síndromes descritas acima foi classificada como portadora de outras formas de CMT hereditário, ou seja, acometimento por CMT isolado em menos de 4 membros afetados, sem a presença de sinais e/ou sintomas de feocromocitoma e/ou hiperparatireoidismo. A mutação identificada foi TGC→CGC, códon 634 (exon 11).

#### CMT Esporádico

A análise molecular através de SSCP e/ou restrição enzimática não identificou mutações nas células germinativas dos 7 casos de CMT esporádico avaliados. A utilização dessas técnicas permite excluir mais de 95% das mutações descritas.

## DISCUSSÃO

O CMT é uma doença autossômica dominante, maligna, de difícil diagnóstico clínico-laboratorial precoce e de alta mortalidade quando diagnosticada tardiamente. A aplicação do rastreamento genético para o manejo adequado da hereditariedade do CMT é de fundamental importância, já que o diagnóstico precoce determina a conduta terapêutica e o prognóstico da doença no indivíduo afetado e em seus familiares. Os nossos resultados confirmam os dados da literatura e indicam que o rastreamento genético é decisivo para realização da conduta terapêutica adequada.

A análise dos aspectos clínicos e laboratoriais das famílias avaliadas foi semelhante à descrita na literatura (2-6). Houve diferença estatisticamente significativa na média da idade de aparecimento do CMT na forma hereditária e esporádica. O perfil agressivo do tumor foi evidenciado pela alta incidência de metástases locais e pela distância ao diagnóstico. De acordo com o esperado, a lesão descrita no exame anatomopatológico de tireóide de todos os casos de CMT hereditário avaliados foi multicêntrica e multifocal. No entanto, em 2 casos sugestivos de doença esporádica, o exame anatomopatológico também revelou a presença de lesão multifocal e multicêntrica, o que levantou a hipótese de CMT hereditário, fato este excluído através da análise molecular.

Antes da disponibilidade das técnicas de biologia molecular, o rastreamento dos familiares em risco de CMT era realizado através de testes de estímulo seriados com pentagastrina ou cálcio (26,27, 29). Além do alto índice de resultados falso-negativos, a presença de efeitos colaterais tornavam-no de difícil realização (26,27). Um estudo comparativo entre o rastreamento clínico e a análise de DNA em famílias com NEM2 demonstrou que o diagnóstico molecular é superior na identificação de indivíduos carreadores do gene mutado e em risco para o desenvolvimento da síndrome (26). O teste genético deve ser indicado em famílias com mutação conhecida no proto-oncogene *Ret*, sendo a identificação de membros não carreadores suficiente para encerrar a investigação desses indivíduos e de seus descendentes (26,29,35).

Quanto à correlação entre genótipo-fenótipo na NEM2, nossos dados estão de acordo com os descritos em outros estudos, que observam que alguns tipos de mutações têm uma probabilidade maior ou menor de apresentar um determinado componente da síndrome (4). Um exemplo dessa associação foi a mutação encontrada no códon 634 (exon 11), com a troca do amino-ácido cisteína por arginina (TGC→CGC), a mais encontrada em todos os indivíduos com CMT, feocromocitoma e/ou hiperparatireoidismo (NEM 2A) e não detectada em nenhum caso de CMTF. Essas mutações no códon 634 apresentam uma frequência maior de hiperparatireoidismo e feocromocitoma do que mutações em outros códons, sendo que o hiperparatireoidismo é mais comum quando a mutação é do subtipo cisteína-arginina (4). Em nosso estudo, a grande maioria das mutações encontradas nas famílias com a síndrome de NEM 2A, inclusive na

variante com CLA e as famílias com CMTF, localizaram-se no códon 634 do exon 11. Nos pacientes com NEM 2B incluídos em nosso estudo, encontramos a mutação mais freqüente descrita, no códon 918 (exon 16), sendo hoje considerada específica para a síndrome de NEM 2B. Em ambos indivíduos afetados com NEM 2B, as mutações foram *de novo*, o que está de acordo com o descrito, atribuindo acima de 50% das mutações à mutação *de novo* nessa forma da síndrome. Nas 2 famílias com a rara síndrome de NEM 2A associada ao líquen amilóide cutâneo (CLA), a mutação identificada foi semelhante à relatada nas outras 19 famílias relatadas na literatura, no códon 634 (TGC→CGC) (5). É interessante observar que famílias com CLA não associado à NEM não apresentam mutações no proto-oncogene *Ret* (34). As outras formas hereditárias (CMTF, NEM 2B e outros) estiveram presentes em menor frequência.

O rastreamento molecular foi capaz de identificar 8 indivíduos carreadores, ou seja, sem evidência clínica de carcinoma, sendo que um destes carreadores assintomáticos já apresentava a presença de hiperplasia celular no resultado do exame anatomopatológico, reforçando o conceito de que muitas vezes o tumor já está evidente muitos anos antes da apresentação clínica. Dados atuais demonstram que a mortalidade nesses casos é inferior a 5%, contrastando com a alta mortalidade do tumor e ressaltando a importância da tireoidectomia total como prevenção (26,29,35).

A avaliação molecular também foi fundamental para a identificação de dois casos encaminhados como CMT esporádico, que posteriormente foram classificados como hereditários. Esses casos ilustram a necessidade de o rastreamento molecular ser indicado nos casos de CMT esporádico para excluir a hereditariedade da doença, confirmando relatos que sugerem que o CMT familiar pode existir em contexto aparentemente esporádico (26).

Em resumo, nossos dados confirmam a importância da aplicação do rastreamento genético para o manejo adequado da hereditariedade do CMT, já que o mesmo permite o diagnóstico precoce, fundamental na conduta terapêutica e no prognóstico da doença no indivíduo afetado e em seus familiares. O rastreamento genético identifica a maioria dos indivíduos com doença hereditária, permitindo o tratamento precoce, através da tireoidectomia. A análise permitiu também o diagnóstico do CMT hereditário em 2 indivíduos previamente encaminhados como portadores de CMT esporádico.

## AGRADECIMENTOS

Suporte Financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.

## REFERÊNCIAS

1. Marsh DJ, Learoyd DL, Robinson BG. Medullary thyroid carcinoma: recent advances and management update. **Thyroid** 1995;5:407-11.
2. Gharib H, McConahew WM, Tiegues RD, Bergstrahl EJ, Goellner JR, Grant CS, et al. Medullary thyroid carcinoma: clinical/pathologic features and long term follow up of 65 patients treated during 1946 through 1970. **Mayo Clin Proc** 1992;67:934-40.
3. Mulligan LM, Marsh DJ, Robinson BG, Schuffenecker I, Zedenius J, Lips CJM, et al. Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2: report of international ret mutation consortium. **J Intern Med** 1995;238:343-6.
4. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, et al. The relationship between specific *ret* proto-oncogene mutation and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. **JAMA** 1996;276: 1575-9.
5. Gagel R, Levy ML, Donovan DT, Alford BR, Wheeler B, Tschen JA. Multiple endocrine neoplasia type 2 associated with cutaneous lichen amiloidosis. **Ann Intern Med** 1989;111:802-6.
6. Eng C, Flier JS, Underhill LH. The *ret* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 and hirsprung's disease. **N Engl J Med** 1996;335:943-51.
7. Kidd KK, Kruger SD, Gerhard DS, Kidd JR, Housman D, Gertner JM, et al. linkage data excluding a locus for multiple endocrine neoplasia type 2 syndrome from the distal part of the short arm of chromosome 11. **Henry Ford Hosp J** 1984;32:262-5.
8. Simpson NE, Kidd KK, Goodfellow PJ, McDerimid H, Myers S, Kidd JR, et al. Assignment of multiple endocrine neoplasia type 2a to chromosome 10 by linkage. **Nature** 1987;328:528-30.
9. Mole SE, Mulligan LM, Healey CS. Localization of the gene for multiple endocrine neoplasia type 2a to 480 kb region in chromosome band 10q112. **Hum Mol Genet** 1987;2:247-51.
10. Mathew CG, Chin KS, Easton DF, Thorpe K, Carter C, Lion GI, et al. A linked genetic marker for multiple endocrine neoplasia type 2a on chromosome 10. **Nature** 1987;328:527-8.
11. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, et al. Germ-line mutation of the *ret* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. **Nature** 1993;363:458.
12. Mulligan LM, Gardener E, Smith BA, Mathew CG, Ponder BA. Genetic events in tumor initiation and progression in multiple endocrine neoplasia type 2. **Genes Chromosom Cancer** 1993;6:166-77.
13. Takahashi M, Cooper GM. Cloning and expression of the *ret* proto-oncogene encoding a tyrosine-kinase with two potencial transmembrane domain. **Oncogene** 1988;3:571-6.
14. Eng C, Smith DP, Mulligan LM, Healey CS, Zvelebil MJ, Stonehouse T, et al. A novel point mutation in the tyrosine kinase domain of the *ret* proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma and in a family with fmtc. **Oncogene** 1995;10:509-13.
15. Mulligan LM, Ponder BAJ. Genetic basis of endocrine disease: multiple endocrine neoplasia type 2. **J Clin Endocrinol Metab** 1995;80:1989-95.
16. Cote G, Wohllk N, Evans D, Helmuth G, Gagel RF. *Ret* proto-oncogene mutations in multiple endocrine neoplasia type 2 and medullary thyroid carcinoma. **Clin Endocrinol Metab** 1995;9:609-30.
17. Eng C, Smith D, Mulligan L, Nagal M, Healy CS, Ponder MA, et al. Point mutation within the tyrosine kinase domain of the *ret* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 b and related sporadic tumors. **Hum Mol Genet** 1994;3:237-41.
18. Hofstra RMW, Landsvater RM, Ceccherini I, Stulp RP, Stelwagen T, Luo Y, et al. A mutation in the *ret* proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2b and sporadic medullary thyroid carcinoma. **Nature** 1994;367:375-6.
19. Gimm O, Marsh DJ, Andrew SD, Frilling A, Dania PL, Mulligan LM. 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.
20. Carlomagno F, Melillo RM, Visconti R, Salvatore G, De Vita G, Vecchio G, et al. GDNF differentially stimulates *ret* mutants associated with the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes and hirschsprung disease. **Endocrinology** 1998;139:3618-25.
21. Mulligan LM, Eng C, Healey CS, Clayton D, Kwok JB, Gardner E, et al. Specific mutation of the *ret* proto-oncogene are related to disease phenotype in men 2a and fmtc. **Nat Genet** 1994;6:70-4.
22. Eng C, Mulligan LM, Smith DP, Mulligan LM, Healey CS, Gardner E, et al. Mutation of the *ret* proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. **Genes Chromosom Cancer** 1995;12:209-13.
23. Bolino A, Schuffenecker I, Lou Y, Seri M, Silengo M, Tocco T, et al. *Ret* mutation in exons 13 and 14 of fmtc patients. **Oncogene** 1995;10:2415-9.
24. Durbec P, Gutierrez MCV, Kilkenny C. GDNF signaling through the *ret* receptor tyrosine kinase. **Nature** 1996;381:789-92.
25. Machens A, Gimm O, Hinze R, Hoppner W, Boehm BO, Dralle H, et al. Genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid carcinoma: oncological features and biochemical properties. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86:1104-9.
26. Lips CJM, Landsvater RM, Hoppener JWM, Geerdink RA, Blijham G, Jansen-Schillhorn van Veen JM, et al. Clinical screening as compared with dna analysis in families with multiple endocrine neoplasia type 2 a. **N Engl J Med** 1994;828-35.

- 
27. Heshmati HM, Gharib H, Heerden JA, Sizemore GW. Advances and controversies in the diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma. **Am J Med** **1997**;103:60-9.
  28. Wohlk N, Cote GJ, Evans DB, Goepfert H, Ordonez NG, Gagel RF. Application of genetic screening information to the management of medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2. **Endocrinol Metab Clin North Am** **1996**;25:1-24.
  29. Brandi ML, Gagel RF, Angelli A, Bilezikian JP, Beck-Pecoz P, Bordi C, et al. Guidelines for diagnosis and therapy of men type 1 and type 2. **J Clin Endocrinol Metab** **2001**;86:5658-71.
  30. Dottorini M, Assi A, Sironi M, Sangalli G, Spreafico G, Colombo L. Multivariate analysis of patients with medullary thyroid carcinoma. **Cancer** **1995**;77:1556-65.
  31. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning. **A Laboratory Manual**. 2<sup>nd</sup> edition **1989**;6:36-49.
  32. Hongyo T, Buzard GS, Calvert RJ, Weghorst CM. "Cold SSCP": a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. **Nucl Acids Res** **1993**;21:3637-42.
  33. Sanger F, Niklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain termination inhibitors. **Proc Nat Acad Sci USA** **1977**;74:5163-9.
  34. Hofstra RMW, Stelwagen T, Stulp RP, Landsvater RM, Ceccherini I, Luo Y, et al. Ret mutations in men 2 associated disease. **Hum Mol Genet** **1994**;3:1771-4.
  35. Modigliane E, Cohen R, Campos J, Conte-Devolx B, Maest B, Boneus A, et al. Prognostic factors for survival and for biochemical cure in medullary thyroid carcinoma: results in 899 patients. **Clin Endocrinol** **1998**;48:265-73.

**Endereço para correspondência:**

Ana Luiza Maia  
Serviço de Endocrinologia  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Rua Ramiro Barcelos, 2350  
90035-003 Porto Alegre, RS  
Fax: (051) 3332-5188  
e.mail: almaia@vortex.ufrgs.br