

200207091

ALEXANDRE EDUARDO FRANZIN VIEIRA

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**RASTREAMENTO BIOQUÍMICO E
MOLECULAR DE PORTADORES
ASSINTOMÁTICOS DE NEOPLASIA
ENDÓCRINA MÚLTIPLA TIPO 2 A**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área de Patologia Clínica.

Campinas, 11 de setembro de 2001.

Margaret de Castro
Profa. Dra. Margaret de Castro
Orientadora

2001

ALEXANDRE EDUARDO FRANZIN VIEIRA

**RASTREAMENTO BIOQUÍMICO E
MOLECULAR DE PORTADORES
ASSINTOMÁTICOS DE NEOPLASIA
ENDÓCRINA MÚLTIPLA TIPO 2 A**

Dissertação de Mestrado, apresentada à pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração em Patologia Clínica.

ORIENTADORA:

Profa. Dra. MARGARET DE CASTRO

CO-ORIENTADORA:

Profa. Dra. MARICILDA PALANDI DE MELLO

**CAMPINAS
2001**

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	T/ UNICAMP
V	V673r
P	47728
R	837102
C	☐
D	☒
PRECOS	R\$ 11,00
DATA	08-02-02
N.º CPD	

CM00163484-2

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

V673r

Vieira, Alexandre Eduardo Franzin
Rastreamento bioquímico e molecular de portadores
assintomáticos de neoplasia endócrina múltipla tipo 2A /
Alexandre Eduardo Franzin Vieira. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientadores : Margaret de Castro, Maricilda Palandi de
Mello

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Genética Humana. 2. Reação em cadeia da polimerase.
3. Proto-oncogenes. 4. Câncer. 5. Calcitonina. I. Margaret
de Castro. II. Maricilda Palandi de Mello. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV.
Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientadora: *Profa. Dra. Margaret de Castro*

Membros:

1. *Profa. Dra. Margaret de Castro*
2. *Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati*
3. *Profa. Dra. Maria Helena Senger*

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 11/09/2001

À minha esposa *Sandra* e minha filha *Giovanna*,
que partilharam todos os momentos comigo.

Agradecimentos

À *Profa. Dra. Margaret de Castro*, pela amizade, confiança, oportunidade de aprender cada dia algo novo e, além disso, pelo exemplo de profunda humanidade e profissionalismo.

À *Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello*, que soube unir com perfeição o rigor científico do pesquisador com o dom de ensinar do verdadeiro mestre, sem abandonar a atenção e o apoio que só os amigos sinceros podem proporcionar.

À *Prof. Dra. Maria de Fátima Sonati*, pelo carinho e atenção com que sugeriu mudanças e assim contribuiu muito para o texto final da tese.

À *Prof. Dra. Maria Helena Senger*, que acreditou e tudo fez para que esta tese existisse.

À *Profa. Dra. Lucila Leico Kagohara Elias*, pela leitura criteriosa e sugestões valiosas para a elaboração final da tese.

À *Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato* e *Profa. Dra. Christine Hackel*, pela amizade e por enriquecerem minha formação durante estes anos de convivência.

À querida *Sra. Maria Madalena Vasconcelos Rosa (Madá)*, que muito me ensinou no laboratório do CBMEG.

Ao *Prof. Dr. Ayrton Custódio Moreira* e à *Profa. Dra. Léa Maria Zanini Maciel* pelo apoio recebido durante o desenvolvimento da tese.

À *Andrea Michielin Della Colleta*, pela amizade e apoio durante o curso.

Aos docentes da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia da PUC-SP, local que tenho o prazer de trabalhar: *Profa. Magali Zampieri* pela amizade, convívio e confiança; *Prof. Dr. João Carlos Ramos Dias*, meu "irmão mais velho" na disciplina, sempre com conselhos e passando suas vivências; *Profa. Maria Teresa Verrone Quilici* com quem aprendo cada dia mais.

Aos colegas da pós-graduação do CBMEG, pela amizade e agradável convívio durante a realização deste estudo.

Ao realizar o teste funcional descrito na tese, inúmeros obstáculos técnicos precisaram ser transpostos, desde a formação do grupo controle até a separação e estocagem das amostras. Obrigado à *Srta. Maria José Rogick dos Santos*, *Profa. Sara de Jesus Oliveira* e *Prof. Edson Shusaku Shitara*, pelo carinho e determinação em resolver todos aqueles obstáculos.

À *Yvi F. Lau*, do CBMEG e à *Natália Torres*, de Ribeirão Preto, por seu apoio e dedicação.

Aos médicos residentes, que sempre são uma fonte de estímulo.

Às pessoas que participaram do grupo controle.

Aos pacientes e familiares que com coragem e determinação, concordaram com o estudo.

A vida só é possível reinventada.

Cecília Meireles

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	xv
Lista de Quadros	xvi
Lista de Figuras	xvii
RESUMO.....	xix
SUMMARY	xxiii
INTRODUÇÃO	27
OBJETIVOS	51
CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	57
RESULTADOS	77
DISCUSSÃO	91
CONCLUSÕES	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

Lista de Tabelas

Tabela I	Fenótipos encontrados na NEM 2 com suas respectivas frequências e lesões associadas	31
Tabela II	Seqüências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação e sequenciamento.	66
Tabela III	Valores individuais de gastrina em pg/ml, nos indivíduos controles, antes e após o teste de secreção de calcitonina estimulada pelo omeprazol	86
Tabela IV	Valores individuais de gastrina em pg/ml, nos casos índices e nos seus familiares, antes e após o teste de secreção de calcitonina estimulada pelo omeprazol.	87

Lista de Quadros

Quadro 1	Síndromes genéticas com componentes neoplásicos endócrinos	30
Quadro 2	Possíveis produtos do Carcinoma Medular da Tireóide	34
Quadro 3	Alterações encontradas no proto-oncogene <i>RET</i>	44
Quadro 4	Soluções utilizadas para a técnica de extração de DNA de sangue periférico	65
Quadro 5	Solução estoque de TBE 10x	67
Quadro 6	Componentes e condições para verificação da correta amplificação dos fragmentos da PCR	68
Quadro 7	Componentes do seqüenciamento dos produtos de PCR dos exons 10 e 11 do proto-oncogene <i>RET</i>	69

Lista de Figuras

Figura 1	Esquema representando a proteína RET e a associação das mutações com os diferentes fenótipos da NEM.	47
Figura 2	Esquema representando a ativação dependente e independente do ligante	49
Figura 3	Representação esquemática das vias pós-receptor da proteína RET.	51
Figura 4	Heredograma da família 1	60
Figura 5	Heredograma da família 2	63
Figura 6	Demonstrativo de amplificação de fragmento do Exon 10	77
Figura 7	Demonstrativo de amplificação de fragmento do exon 11	78
Figura 8	Fragmento normal do exon 10, da paciente II-7 da família 1, II-6 da família 2 e de um controle	79
Figura 9	Seqüenciamento direto demonstrativo do fragmento do exon 11 de um controle, da paciente II-7, caso índice da família 1	81

Figura 10	Seqüenciamento direto demonstrativo do fragmento do exon 11 de um controle, da paciente II-6, caso índice da família 2.	82
Figura 11	Seqüenciamento automático demonstrativo do fragmento do exon 11 da paciente II-7, caso índice da família 1.	83
Figura 12	Seqüenciamento automático demonstrativo do fragmento do exon 11 da paciente II-6, caso índice da família 2.	84
Figura 13	Teste do omeprazol. Concentrações de Gastrina em pg/ml, nos grupos controle e familiares de pacientes com NEM 2 A.	88

RESUMO

A Neoplasia Endócrina Múltipla (NEM) tipo 2A é caracterizada pela presença de Carcinoma Medular de Tireóide (CMT), feocromocitoma e hiperparatireoidismo. Esta síndrome pode ser diagnosticada em portadores assintomáticos pertencentes a famílias de indivíduos acometidos pela síndrome utilizando-se testes periódicos de estimulação da secreção de calcitonina pela gastrina. Entretanto, a análise do DNA genômico permite a identificação destes indivíduos, possibilitando diagnóstico mais precoce e tratamento preventivo. O objetivo deste trabalho foi analisar dois diferentes testes de rastreamento de CMT, com a finalidade de diagnosticar portadores assintomáticos de famílias com indivíduos com NEM 2A: um teste bioquímico utilizando o omeprazol e a análise molecular do gene do protooncogene RET. Onze indivíduos de duas famílias brasileiras não consanguíneas com NEM 2A foram submetidos ao teste de secreção de calcitonina induzida pelo omeprazol. Calcitonina e gastrina foram determinadas por imunoensaios. DNA genômico foi extraído de sangue total dos 15 indivíduos que concordaram com o estudo. Os exons 10 e 11 foram amplificados por PCR e os produtos analisados por seqüenciamento direto. O teste de estímulo da secreção de calcitonina pelo omeprazol não identificou nenhum portador assintomático. Entre os membros da família 1 encontramos três indivíduos afetados pela mutação germinativa TGC→TAC (C634Y). Dois irmãos apresentavam CMT, sendo que na irmã associavam-se feocromocitoma e hiperparatireoidismo; o filho desta última, de nove anos de idade, apresentava *status* previamente desconhecido. O estudo da família 2 demonstrou a mutação TGC→CGC (C634R) somente no caso-índice. Esta paciente apresentava além do CMT, feocromocitoma, hiperparatireoidismo e líquen amiloidótico cutâneo. Seus pais e seus quatro irmãos, todos assintomáticos, não apresentaram esta mutação, sugerindo que a mutação C634R ocorreu *de novo* nesta paciente. Em conclusão, a especificidade do teste do omeprazol foi limitado e a eficácia deste teste permanece a ser estabelecida. As duas mutações mais freqüentemente encontradas no protooncogene *RET* na NEM 2A, estão presentes em famílias brasileiras. A análise molecular deve ser o procedimento de escolha para o

rastreamento de famílias com NEM 2A, desde que é preciso e dispensa testes bioquímicos repetitivos.

SUMMARY

Patients with MEN type 2A are at risk for early medullary thyroid carcinoma (MTC), which might be diagnosed by periodical gastrin-induced calcitonin tests. However, direct DNA analysis permits the identification of asymptomatic mutant carriers in a family, providing an early and definitive diagnosis. We performed different screening tests for MTC, a recently reported biochemical screening test using omeprazole and DNA analysis. Fifteen members of two non-consanguineous Brazilian families with MEN 2A were submitted to the omeprazole-induced calcitonin stimulation test. Serum calcitonin and gastrin were determined by immunoassays. *RET* proto-oncogene analysis was carried out by direct DNA sequencing of PCR-amplified products for exons 10 and 11. Family 1 showed a TGC→TAC (C634Y) germline mutation in three individuals. Two brothers with symptomatic MTC, one of them also associated with pheocromocytoma and hyperparathyroidism whose son was a nine-year-old boy of previously unknown status. Family 2 showed a TGC→CGC (C634R) mutation only in the index case, who presented cutaneous lichen amyloidosis in addition to MTC, pheocromocytoma and hyperparathyroidism. Neither her parents nor her four brothers showed this genetic mutation. The two most frequent *RET* proto-oncogene mutations in MEN 2A are present in Brazilian families. In addition, the specificity of basal and omeprazole-stimulated calcitonin is rather limited and the efficacy of the omeprazole test still remains to be systematically examined. Therefore, *RET* proto-oncogene analysis must be the first choice for a screening procedure to identify mutant gene carriers in MEN 2A family members and to permit early prophylactic treatment.

INTRODUÇÃO

Desde o início do século XX têm sido descritos casos de indivíduos afetados por diferentes combinações de tumores glandulares endócrinos. A fascinação por este grupo de doenças deriva dos quadros clínicos complexos, caracteristicamente relacionados à produção excessiva de grande variedade de substâncias hormonais. Estes quadros incluem hipercalcemia, hipercorticismo, síndrome carcinóide, úlcera péptica pelo excesso de gastrina, diarreia aquosa causada pelos peptídeos intestinais vasoativos, hiperprolactinemia, acromegalia e hiperinsulinismo, entre outras. Com o tempo, foram observados padrões de associação entre esses tumores, bem como a ocorrência preferencial dessas associações em uma mesma família, emergindo o conceito de desordens clínicas complexas, geneticamente determinadas e potencialmente letais. Previamente foram denominadas Adenopatia Endócrina Múltipla (MEA) e Síndrome Pluriglandular, mas devido ao espectro amplo de achados histopatológicos, variando da hiperplasia ao carcinoma, foi proposto o termo Neoplasia Endócrina Múltipla (NEM) (Thakker, 1998; Hoff et al., 2000). Estas síndromes (Quadro 1) incluem as neoplasias endócrinas múltiplas tipos 1 e 2 (NEM 1 e NEM 2), síndrome von Hippel Lindau (VHL), neurofibromatose tipo 1 (NF1), e o complexo de Carney (Hoff et al., 2000).

A NEM é uma síndrome determinada geneticamente, caracterizada pelo acometimento tumoral de glândulas endócrinas em diferentes combinações. Subdivide-se em NEM tipo 1 e NEM tipo 2.

A NEM tipo 1 foi descrita em 1954 por Wermer, que caracterizou uma família em que o pai e quatro dos nove filhos desenvolveram tumores de pelo menos dois órgãos acometidos nesta síndrome, ou seja, adenomas hipofisários, tumores de paratireóides, insulinomas, gastrinomas, córtex adrenal, angiofibromas e lipomas (Wermer, 1954; 1956).

Quadro 1: Síndromes genéticas com componentes neoplásicos endócrinos múltiplos

Síndrome	Localização dos tumores endócrinos
NEM 1	Hipófise Glândulas paratireóides Ilhotas pancreáticas Córtex adrenal Angiofibromas cutâneos Lipomas
NEM 2A	CMT Medular adrenal (feocromocitoma) Glândulas paratireóides
NEM 2B	Células C da tireóide (CMT) Medular Adrenal (feocromocitoma) Ganglioneuromatose intestinal Características Marfanóides
Von Hippel Lindau	Medular Adrenal (feocromocitoma) Ilhotas pancreáticas SNC (Hemangioblastoma) Angiomas retinianos Carcinoma de células renais Cistos viscerais
Neurofibromatose tipo 1	Neurofibromas Desenvolvimento de tumores endócrinos inconstante Medular adrenal (feocromocitoma) Células C (CMT) Neoplasia de paratireóide Tumores produtores de somatostatina
Complexo de Carney	Hipófise Tireóide Testículo Córtex adrenal Mixomas do coração, mamas e pele Pigmentação cutânea

CMT=carcinoma medular de tireóide

SNC=Sistema nervoso central

A NEM tipo 2 é uma síndrome genética de herança autossômica dominante, com alto grau de penetrância e variabilidade de expressão. Apresenta três fenótipos, todos caracterizados pela presença do Carcinoma Medular de Tireóide (CMT), denominados NEM 2A, Carcinoma Medular de Tireóide Familiar (CMTF) e NEM 2B (Raue *et al.*, 1994). A NEM 2A foi descrita por Sipple em 1961

(Sipple, 1961) e responde por cerca de 60 a 90% dos casos de NEM; apresenta associação do CMT com feocromocitoma e, menos comumente, com hiperparatireoidismo. A NEM 2B foi descrita por William e Pollock, em 1966 (William & Pollock, 1996) e incide em cerca de 5% dos casos de NEM; além do CMT e feocromocitoma ocorrem neuromas mucosos múltiplos e hábito marfanóide, sendo o hiperparatireoidismo incomum. Estas duas formas clínicas podem apresentar assincronia entre os vários componentes da síndrome, ou seja, os tumores característicos da NEM 2A e 2B podem se manifestar em momentos diferentes na vida do paciente. O CMTF se caracteriza pela presença de pelo menos quatro casos de CMT em uma mesma família, na ausência de outros tumores endócrinos associados, como o feocromocitoma ou adenoma/hiperplasia de paratireóides (Eng *et al.*, 1996).

A tabela I apresenta os diferentes fenótipos encontrados na NEM 2, as principais alterações histológicas, suas respectivas freqüências e lesões associadas.

Tabela I: Fenótipos encontrados na NEM 2 com suas respectivas freqüências e lesões associadas.

Fenótipo	Glândulas envolvidas	Freqüência %	Lesões associadas
NEM 2A	Tireóide: CMT	97	Líquen Amilóide Cutâneo
	Paratireóide: Hiperplasia	30	
	Adrenais: Feocromocitoma	50	
NEM 2B	Tireóide: CMT	90	Hábito marfanóide (65%)
	Adrenais: Feocromocitoma	45	Neuromas mucosos múltiplos (100%)
CMTF	Tireóide: CMT	100	

As associações descritas estão relacionadas à origem embriológica das células no CMT, feocromocitoma, neurogangliomas e adenomas de paratireóides, todas derivadas da crista neural (Deftos *et al.*, 1995). A crista neural desenvolve-se na terceira e quarta semanas de idade gestacional, e contém uma população de células migratórias que inicialmente dispõe-se como uma camada celular idêntica ao longo de todo o embrião, mas rapidamente diferencia-se bilateralmente em crista neural cefálica e crista neural truncal (Moore & Persaud, 2000). O segmento cefálico origina a maior parte do mesênquima da cabeça, derivando dela seu esqueleto, tecido conjuntivo, musculatura e as células que formam a bainha do sistema nervoso periférico. Entre os arcos branquiais, por volta da quarta semana de vida, aparecem pares de bolsas que são logo preenchidas pelo endoderma da faringe, denominadas bolsas faríngeas. Existem quatro pares de bolsas faríngeas, o quinto é ausente ou rudimentar. As terceiras e quartas bolsas faríngeas, por volta da sexta semana de idade gestacional, dão origem às glândulas paratireóides. A porção ventral de cada uma das quartas bolsas se desenvolve em um corpo ultimobranquial, estrutura que recebeu este nome por ser a última da série de estruturas derivadas das bolsas faríngeas. O corpo ultimobranquial funde-se com a glândula tireóide e, subsequentemente, dissemina-se para originar as células parafoliculares ou células C (Moore & Persaud, 2000). O segmento truncal desenvolve-se por duas vias denominadas ventral e dorsolateral. Na via ventral, as células da crista migram para o lado e para frente da coluna vertebral (Garcia, 1991), formando os neurônios da cadeia simpática e dos gânglios abdominais intermediários (celíacos, mesentéricos e renais), além de outras estruturas derivadas da crista neural truncal, como as células de Schwann, as da cartilagem dos arcos branquiais, as células satélites dos gânglios, as células cromafins da medula da supra-renal e células pigmentares da pele. Embora as células da crista neural sejam pluripotentes, sucessivas interações com fatores locais dirigem sua diferenciação e migração. Há indícios de que precocemente ocorrem modificações de adesão entre as células da crista neural, com regulação negativa de moléculas como N-CAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*), N-Caderina e E-Caderina, explicando a

característica migratória destas células. A dispersão ocorreria inicialmente por inibição do contato celular, seguida da migração orientada por fatores existentes no próprio embrião, como vasos e axônios. Uma vez no destino, novas mudanças nas proteínas de adesão, com regulação negativa de certas integrinas e reexpressão da NCAM, N- e E- caderina modulariam a parada da migração e o estabelecimento das células, que continuariam seu processo de diferenciação. No caso das células cromafins medulares, a produção de glicocorticóide parece ter influência decisiva.

Das neurocristopatias características da NEM 2, o CMT é a manifestação mais prevalente. Embora na prática clínica seja encontrada em 4 a 12% dos tumores tireoidianos, somente 20 a 25% destes estão relacionados à NEM 2. Origina-se das células parafoliculares, também chamadas células C porque secretam o hormônio calcitonina (Williams, 1966). A Calcitonina é um peptídeo de 32 aminoácidos que embora tenha a propriedade de diminuir a quantidade de cálcio sérico, por inibir a reabsorção óssea e promover a excreção de cálcio, tem papel pouco importante na fisiologia do ser humano. Quantidades inadequadamente elevadas de calcitonina podem ser encontradas em pacientes portadores de CMT, servindo como marcador tumoral (Robinson *et al.*, 1991). Além da calcitonina, outros hormônios e substâncias comumente produzidos por tecidos derivados da crista neural podem ser secretados (Quadro 2), o que diversifica bastante a apresentação clínica dos pacientes portadores de NEM 2.

Quadro 2: Possíveis produtos do Carcinoma Medular da Tireóide

Calcitonina (CT)	Substância P
Cromogranina A	Neurotensina
PKN21 (Katacalcina)	Peptídeo Intestinal Vasoativo
N-Pro CT	CRH
L-Dopa descarboxilase	Peptídeo liberador de gastrina
Histaminase	Fator liberador de prolactina
Serotonina	Fator de Crescimento Nervoso
Protaglandinas	Amilóide
ACTH	Calicreína e cininas
Hormônio estimulador de melanócitos	Enolase neurônio específica
Somatostatina	Sinaptofisina
Melanina	Antígeno Carcinoembrionário
Beta endorfina	Peptídeo relacionado ao gene da Calcitonina

O CMT ocorre como nodulação uni ou bilateral, firme, muitas vezes descoberta ao exame tireoidiano de rotina (Deftos *et al.*, 1995; Raue *et al.*, 1994). Localiza-se preferencialmente na porção superior da tireóide, região onde são encontradas células C em maior densidade (Well *et al.*, 1994). Foi reconhecido inicialmente por Hazard (1959), como uma entidade patológica distinguível de outros tumores tireoidianos pela presença de substâncias amilóides no estroma. Embora o CMT esporádico caracteristicamente apresente-se como foco unilateral, nos casos familiares são multicêntricos, comprometendo ambos os lobos tireoidianos em praticamente 100% dos casos (Raue *et al.*, 1994). As metástases podem estar presentes já no início do quadro e ocorrem para os linfonodos das cadeias centrais do pescoço, mediastino, pulmões, fígado, ossos, pleura, cérebro, supra-renais e ovários. São comuns os distúrbios gastrointestinais como diarreia, principalmente nos portadores de grande carga tumoral (Robbins *et al.*, 1991).

A história natural do CMT varia bastante, mostrando agressividade intermediária entre o carcinoma anaplásico e o papilífero ou folicular, contudo

podem ser rapidamente progressivos e levar à morte em semanas após o diagnóstico (Deftos *et al.*, 1995). A taxa de sobrevivência em 10 anos é aproximadamente 65% (Heshmati *et al.*, 1997). Nos indivíduos com CMT esporádico o diagnóstico geralmente é feito na quinta ou sexta décadas de vida. Em pacientes portadores de NEM 2B, o CMT desenvolve-se em idade mais precoce e tem taxa de mortalidade mais alta que na NEM 2A (Raue *et al.*, 1994) principalmente se acompanhada de doença metastática (Kakudo *et al.*, 1985).

O diagnóstico é realizado pela análise citológica das amostras obtidas pela biópsia aspirativa por agulha fina, rotineiramente utilizada na pesquisa dos casos de nódulos tireoidianos (Franz, 1997). A citologia aspirativa com agulha fina (CAAF) evidencia células parafoliculares agrupadas ou isoladas, amilóide, necrose e células inflamatórias, além de componentes papilares. A imunohistoquímica para calcitonina pode ser utilizada, aumentando a acurácia na determinação deste tumor (Deftos *et al.*, 1995; Maciel, 1992). Ao ultra-som, os focos primitivos e metastáticos podem apresentar aspecto de calcificações densas e irregulares, contrastando com as calcificações homogêneas e tênues (corpos psammomatosos) que podem ser vistas na maioria dos tumores tireoidianos. Este tumor capta ¹³¹Imetaiodobenzilguanidina (MIBG), que tem sido utilizado em estudos cintilográficos.

A mensuração da quantidade basal de calcitonina é utilizada como marcador da presença do CMT, geralmente encontrando-se valores muito elevados (Melvin *et al.*, 1971; Mayr B. *et al.*, 1999; Cohen, 2000). Contudo, níveis normais de calcitonina basal podem estar presentes, particularmente quando a transformação neoplásica mostra-se na fase de hiperplasia das células parafoliculares, reconhecidamente o estadió precursor do carcinoma (Eng & Mulligan, 1997; Wells *et al.*, 1994). Nestes casos, testes estimulatórios para calcitonina mostram a hiperresponsividade das células anômalas, possibilitando o diagnóstico. Os classicamente utilizados são o da infusão de cálcio e de pentagastrina (Wells *et al.*, 1978; 1994). Estes testes são indicados anualmente em parentes de primeiro grau dos pacientes diagnosticados com NEM 2 (Chi *et al.*, 1992; Wells *et al.*, 1994; Erdogan *et al.*, 1997), particularmente antes dos 40

anos de idade quando, na maioria das vezes, o CMT ainda não se tornou clinicamente evidente. Embora bastante úteis, podem resultar em resultados falso positivo em até 6,6% dos casos (Hernandez *et al.*, 1997; Decker, 1995), desde que a hiperplasia de células C também pode ser observada em pacientes portadores de tireoidite de Hashimoto (Libbei *et al.*, 1989; Libs *et al.*, 1987). Além disso, estes testes não são isentos de outros aspectos negativos, como a necessidade de hospitalização para sua execução. São geralmente indicados a partir dos 3 a 5 anos de idade e repetidos anualmente até os 35 anos, quando a probabilidade de transformação neoplásica limita-se a menos que 5%, possibilitando maior espaçamento entre os testes (Ponder, 1988). Portanto, outro aspecto negativo dos testes bioquímicos é a possibilidade de abandono do acompanhamento, pela recusa da repetição anual do teste nos familiares de pacientes com NEM. Recentemente foi descrito um teste de estímulo para calcitonina utilizando o omeprazol (Erdogan *et al.*, 1997), um derivado benzimidazólico que bloqueia a bomba de prótons, inibindo marcadamente a secreção ácida gástrica basal e estimulada. A gastrina secretada endogenamente, induzida pelo aumento do pH gástrico, pode substituir o teste clássico da pentagastrina.

A associação do CMT ao feocromocitoma foi documentada por Sipple em 1961, que descreveu o caso de um paciente de 33 anos de idade, gravemente hipertenso, no qual foi encontrado um tipo de tumor tireoidiano invasivo, pobremente diferenciado e rico em substância amilóide. Observações posteriores permitiram associar o CMT ao feocromocitoma acometendo vários indivíduos de uma mesma família (Raue *et al.*, 1994). Os feocromocitomas são tumores das células cromafins do eixo simpático adrenomedular, caracterizados pela autonomia na produção de catecolaminas, mais frequentemente adrenalina e/ou noradrenalina (Eisenhofer *et al.*, 1999). Embora seja causa rara de hipertensão arterial, incidindo em menos de 0,1% dos hipertensos diastólicos, sua suspeita diagnóstica tem importância por ser causa curável de hipertensão arterial severa e potencialmente fatal, além de um indício para a presença de NEM 2 (Faïçal & Shiota, 1997; Cryer, 1995; Casanova, 1993). Aproximadamente 80 a 95% dos feocromocitomas ocorrem esporadicamente, os 5 a 20% restantes são associados

a Híppel-Lindau, neurofibromatose tipo 1 e NEM 2A ou 2B, ou simplesmente como uma predisposição familiar para o feocromocitoma (Matias-Guiu *et al.*, 1995).

Ao contrário dos feocromocitomas esporádicos, os associados à NEM 2 podem ocorrer uni ou mais freqüentemente bilateralmente, acometendo cerca de 50% dos portadores de NEM 2A. Quando unilaterais, não é incomum encontramos hiperplasia difusa ou nodular contralateral. Quando o feocromocitoma e o CMT coexistem, este último é geralmente diagnosticado antes, e se ocorrer hiperparatireoidismo associado, geralmente também é descoberto antes do feocromocitoma. O CMT pode anteceder o diagnóstico de feocromocitoma em 20 anos, em alguns casos (Deftos *et al.*, 1995).

Semelhante ao que ocorre no CMT, o feocromocitoma tem um estágio precursor caracterizado pela hiperplasia da medular adrenal, o que pode resultar em um aspecto adenomatoso. Existe, portanto, uma seqüência onde a hipertrofia desenvolve-se em hiperplasia, esta em nodularidade que se transforma em neoplasia, eventos que lembram os que ocorrem com as células parafoliculares e também com as paratireoidianas (Deftos *et al.*, 1995). A transformação maligna é possível, mas menos freqüente que os 10% observados nos casos de feocromocitomas esporádicos.

Os sintomas são de instalação freqüentemente súbita e consequência dos produtos de secreção tumoral, raramente ocorrendo efeitos de massa. Podem incluir cefaléia, palpitações, nervosismo e hipertensão arterial, além de outros sintomas menos comuns como tonturas, palidez cutânea, dor torácica tipo angina, dor abdominal, náusea, vômitos, tremores, nervosismo, ansiedade, dispnéia, poliúria pós-crise, cianose, rubor facial, reação urticariforme e convulsão. Os paroxismos, cuja freqüência varia consideravelmente, duram poucos minutos, mas podem persistir por uma hora ou mais. Como ocorre nos CMT, os feocromocitomas podem produzir outros peptídeos e aminas, incluindo somatostatina, calcitonina, vasopressina, ACTH, histamina e serotonina, mas sua produção geralmente não tem tradução clínica.

O diagnóstico laboratorial é realizado pela dosagem de adrenalina e noradrenalina colhidas em amostra sanguínea (preferencialmente durante uma

crise) ou na urina coletada por 24 horas. A dosagem dos metabólitos das catecolaminas, como o ácido vanilmandélico (VMA), a metanefrina e a normetanefrina, analisadas em urina coletada por 24 horas também são utilizadas como indícios da presença do feocromocitoma, com grande sensibilidade e especificidade (Faíçal & Shiota, 1997). A localização do feocromocitoma auxilia no diagnóstico e possibilita o acesso cirúrgico seguro (Faíçal & Shiota, 1997; Young & Landsberg, 1998). A ultra-sonografia detecta grande parte dos feocromocitomas, entretanto a tomografia computadorizada (TC) pode localizar 90% desses tumores. A ressonância nuclear magnética (RNM) parece identifica-los tão bem quanto a TC, com a vantagem de não submeter o paciente à radiação, além de produzir imagens com sinal hiperintenso em T2, que auxiliam a identificação deste tipo de tumor. A cintilografia usando a ^{131}I metaiodobenzilguanidina (MIBG) tem a vantagem de medir a função, além de possibilitar a visualização de todo o tronco simpático e é de especial importância na pesquisa de recidivas tumorais pós-retirada do feocromocitoma (Quint *et al.*, 1987).

O hiperparatireoidismo primário é o componente menos freqüente da NEM 2A, e ocorre em 30% dos afetados. Desenvolve-se freqüentemente após a terceira década de vida e suas manifestações clínicas não diferem das apresentadas no hiperparatireoidismo primário esporádico. A hiperplasia generalizada e assimétrica das glândulas paratireóides é o achado histológico mais comum (Deftos *et al.*, 1995). Inicialmente interpretados como secundários ao aumento de CT encontrada nos CMT, hoje é visto como mais uma manifestação da neurocristopatia que é a NEM 2A, pois o hiperparatireoidismo não é observado em portadores de NEM 2B ou CMTF, situações em que a hipercalcitoninemia também é evidente. Anualmente os pacientes portadores de NEM 2A devem ter o cálcio sérico medido e, se elevado, é indicada mensuração de PTH intacto (Raue *et al.*, 1994). O encontro de aumento do cálcio e PTH séricos é indicativo de hiperparatireoidismo primário. Aparentemente a existência de hiperplasia é mais comum que adenomas, mas estes podem ser multicêntricos, ou seja, acometer mais de uma glândula simultaneamente, o que deve estar em mente para a abordagem cirúrgica. Não existe, contudo, conduta claramente determinada quanto ao tipo de

procedimento cirúrgico a ser adotado. Em geral leva-se em conta a existência de outros casos de hiperparatireoidismo na família, o nível de cálcio e grau de acometimento das paratireóides para planejamento cirúrgico, que pode incluir paratireoidectomia parcial, paratireoidectomia total com timectomia e transplante autólogo das paratireóides. No caso de baixa probabilidade do envolvimento atual ou futuro das paratireóides, executa-se cirurgia mais conservadora (Raue *et al.*, 1994).

A NEM 2A pode ainda estar acompanhada de lesões cutâneas liquenóides pruriginosas, denominadas líquen amiloidótico cutâneo. O líquen amiloidótico é uma patologia da pele relativamente comum no Sudoeste Asiático, América do Sul e República da China. Muitos destes pacientes têm história de ocorrência familiar das lesões caracterizadas por pápulas hiperkeratóticas pruriginosas castanho-avermelhadas, mais comumente vistas sobre a região pré-tibial, pés e coxas. O surgimento ocorre ao redor da puberdade, com aumento progressivo da afecção com a idade. O líquen na NEM 2A ocorre particularmente na região interescapular, seguindo os dermatômeros de C8-T3 e é associado não apenas à queixa de prurido intenso, mas também à parestesia e à hiperalgesia, sugerindo acometimento idêntico ao da Notalgia Parestética (Chabre, 1992). Isso sugere alteração dos ramos sensitivos dorsais posteriores, derivados da crista neural. A alteração da coloração da pele seria conseqüente à "amiloidose por fricção", ou seja, ocorreria secundariamente ao prurido, com escarificação da pele e depósito amilóide ao longo do tempo (Weyers *et al.*, 1999). A biópsia da pele mostra deposição de amilóide na interface dermo-epidérmica em lesões estabelecidas. Em muitos pacientes serve como um marcador fenotípico de NEM 2A, podendo preceder seu diagnóstico clínico em vários anos (Raue *et al.*, 1994; Gagel *et al.*, 1989; Cecherini *et al.*, 1989).

Embora não faça parte da NEM 2, a Doença de Hirschsprung (HSCR) é uma das condições observadas precocemente em associação tanto com a NEM 2A (Verdy *et al.*, 1982), quanto com a NEM 2B (Mahaffey *et al.*, 1990). Caracteriza-se por perda da inervação autonômica do trato gastrointestinal distal, resultante da falha de migração, diferenciação ou sobrevivência de células

precursoras da crista neural, que deveria ocorrer entre a 5ª e 12ª semanas de idade gestacional (Eng & Mulligan, 1997). Dependendo da extensão do segmento agangliônico, a HSCR é classificada nos subtipos HSCR de segmento curto e HSCR de segmento longo (Takahashi *et al.*, 1999). Geralmente desenvolvem obstrução funcional, resultando em severa constipação e megacólon ainda no período neonatal (Passarge, 1967 ; Cosma *et al.*, 1998). Ocorre em 1/5.000 nascidos vivos. Destes, apenas 10% são hereditários, com transmissão autossômica dominante, autossômica recessiva ou transmissão poligênica, demonstrando ser uma manifestação bastante heterogênea.

A história natural da NEM 2A varia muito. O carcinoma medular de tireóide é manifestação clínica mais freqüente e ocorre em quase todos os casos antes dos 40 anos, concentrando-se mais nas duas primeiras décadas de vida (Worllk *et al.*, 1994). Dos pacientes que se apresentam como casos-índice, 30% morrerão da doença ou apresentarão grande morbidade, sendo estas relacionadas ao feocromocitoma e, principalmente, ao CMT (Raue *et al.*, 1994). É estimado que 90% dos CMT palpáveis já têm metástases regionais (Tissell *et al.*, 1986). Com a introdução dos testes bioquímicos e a estratégia de rastreamento prospectivo em familiares dos portadores, ocorreu enorme impacto na detecção precoce e tratamento da NEM 2A (Easton *et al.*, 1989). Contudo, Telander *et al.*, (1989) reportaram a existência de crianças portadoras de NEM 2A com hiperplasia de células C e CMT em idades tão precoces quanto 18 meses e 2,8 anos respectivamente, mostrando a necessidade de um exame mais sensível, específico e precoce que o teste da pentagastrina na detecção dos portadores de NEM 2A.

Proto-oncogene *RET*

A busca pelo gene responsável pela NEM 2A começou há aproximadamente 20 anos, com estudos de ligação usando marcadores clássicos e análises citogenéticas (Goodfellow, 1994). Foi sugerido por Simpson *et al.*, (1979), que a NEM 2 estaria ligada ao locus HLA, localizado no braço curto do cromossomo 6. Estes mesmos autores publicaram em 1982 (Simpson *et al.*, 1982) um estudo excluindo essa região como candidata à síndrome, o que foi confirmado por Perrier *et al.*, em 1987. Van Dyke *et al.* (1982), observaram pequenas deleções na região 20p12.2 segregando com a NEM 2. Esta mutação já havia sido encontrada por este autor em casos de NEM 2A e NEM 2B (Van Dyke *et al.*, 1981). Estudos posteriores como os de Babu (Babu *et al.*, 1982, 1984 e 1987) pareciam confirmar os achados iniciais de Van Dyke. Contudo, não havia unanimidade. Investigações conduzidas por Gustavson *et al.* (1983), Emmertsen *et al.* (1983), Zatterale *et al.* (1984), Goodfellow *et al.* (1985) e Farrer *et al.* (1987) não conseguiram encontrar a associação descrita por aqueles autores, em suas análises de portadores de NEM 2A e 2B.

A controvérsia renovou o interesse na pesquisa de novas áreas candidatas a abrigar o gene causador da NEM 2A. Cerca de 30% do genoma já havia sido excluído utilizando-se diferentes sondas, quando Simpson *et al.* (1987) estudaram 292 membros de 5 famílias portadoras de NEM 2A, por meio de análise de ligação utilizando duas sondas para o cromossomo 10. Uma destas sondas, a D10S5 era completamente nova e hibridizou com a região 10q11.2, a segunda sonda era a IRBP (interstitial retinol-binding protein), que por sua vez hibridizou com a região 10p11.2→q11.2. Os resultados permitiam afirmar que esses *loci* estavam do mesmo lado do *locus* da síndrome, a 12 centiMorgan (cM) para a D10S5 e a 21 cM da IRBP. Isso abriu caminho para o refinamento das sondas utilizadas o que logo resultou na localização do gene responsável pela MEM2A precisamente na região 10q11.2, a mesma implicada na NEM 2B e CMTF (Lairmore *et al.*, 1991). As semelhanças clínicas entre estas três formas de NEM 2, aliadas ao fato de

estarem relacionadas ao mesmo *locus* gênico levou à especulação que seriam mutações diferentes no mesmo gene (mutação alélica).

Em 1985, época em que os estudos com sondas ainda estavam no início, um evento aparentemente não relacionado à NEM 2 foi observado por Takahashi *et al.* (1985) durante experimentos de transfecção de células NIH 3TC com células de linfoma humano. Neste experimento, o DNA de células NIH 3TC transformadas induziam novas transformações com alta eficiência. A análise dos fragmentos de DNA mostrava dois segmentos cotranscritos nas células NIH 3TC transformadas, mas não em qualquer outra célula humana examinada. A transformação, assim, pareceu ser ativada pela recombinação entre dois segmentos de DNA não semelhantes durante a transfecção, resultando em uma proteína quimérica com alta atividade de transformação. Takahashi denominou estes fragmentos de RET, acrônimo para *REarranged during Transfeccion*. Posteriormente, Ishizaka *et al.*, (1989) usaram clones derivados do proto-oncogene *RET* como sondas para determinar seu *locus* no genoma humano. Através da técnica de fluorescência e hibridização *in situ*, determinou o *locus* do proto-oncogene *RET* na região 10q11. 2. Neste mesmo estudo, o autor sugeriu que o gene *RET* poderia estar relacionado à NEM 2A, pois seu *locus* era coincidente com a região em que estudos de ligação, iniciados por Simpson cerca de dois anos antes, demonstraram íntima associação com a síndrome (Simpson *et al.*, 1987). A identificação do gene responsável pela NEM 2 resultou em enorme impacto sobre a detecção e prognóstico da patologia. Os grupos de Mulligan (Mulligan *et al.* 1993) e Donis-Keller (Donis-Keller *et al.*, 1993), trabalhando independentemente, observaram mutações no proto-oncogene *RET* associadas à NEM 2A e ao CMTF. Estes estudos iniciais foram seguidos de numerosas outras publicações, que buscavam correlacionar alterações genóticas aos fenótipos observados na NEM 2 e suas variantes e condições associadas (Quadro 3).

O gene *RET* possui 21 exons e aproximadamente 60 kb, sem que até o momento se tenha localizado um pseudogene ou genes relacionados. Foi inteiramente clonado por Pasini *et al.* (1995), o que facilitou a pesquisa de correlações genótipo-fenótipo em estudos posteriores. O íntron 1 conta com

aproximadamente 24 Kb, enquanto os exons 2 a 20 estão contidos em aproximadamente 31 Kb (Hoff *et al.*, 2000). A orientação do gene é 5-prime-centromérico/3-prime-telomérico. Sua sequência gênica é denominada proto-oncogene *RET*, pois codifica uma proteína de superfície celular tipo tirosina-quinase que realiza a transdução de sinais de proliferação, diferenciação e crescimento celular (Simpson *et al.*, 1987).

Quadro 3: Alterações encontradas no proto-oncogene *RET*

1. Substituições nucleotídicas (missense/nonsense)

Códon	Mutação	Substituição	Fenótipo	Referência
20	CCG-CTG	Pro-Leu	Doença de Hirschsprung	Angrist <i>et al.</i> , 1995
32	TCG-TTG	Ser-Leu	Doença de Hirschsprung	Edery <i>et al.</i> , 1994
40	CTG-CCG	Leu-Pro	Doença de Hirschsprung	Yin <i>et al.</i> , 1996
77	cCGC-TGC	Arg-Cys	Doença de Hirschsprung	Bolk <i>et al.</i> , 2000
93	cGGC-AGC	Gly-Ser	Doença de Hirschsprung	Angrist <i>et al.</i> , 1995
136	cGAG-TAG	Glu-Term	Doença de Hirschsprung	Edery <i>et al.</i> , 1994
174	TTC-TCC	Phe-Ser	Doença de Hirschsprung	Kusafuka, 1997
180	CGA-CCA	Arg-Pro	Doença de Hirschsprung	Seri, 1997
180	cCGA-TGA	Arg-Term	Doença de Hirschsprung	Edery <i>et al.</i> , 1994
197	TGC-TAC	Cys-Tyr	Doença de Hirschsprung	Kusafuka, 1997
231	CGC-CAC	Arg-His	Doença de Hirschsprung	Attie <i>et al.</i> , 1995
313	CGG-CAG	Arg-Gln	Doença de Hirschsprung	Seri <i>et al.</i> , 1997
330	CGG-CAG	Arg-Gln	Doença de Hirschsprung	Edery <i>et al.</i> , 1994
360	cCGG-TGG	Arg-Trp	Doença de Hirschsprung	Bolk <i>et al.</i> , 2000
365	TCG-TAG	Ser-Term	Doença de Hirschsprung	Yin <i>et al.</i> , 1994
393	TTCa-TTA	Phe-Leu	Doença de Hirschsprung	Edery <i>et al.</i> , 1994
394	AACg-AAG	Asn-Lys	Doença de Hirschsprung	Bolk <i>et al.</i> , 2000
399	CCG-CTG	Pro-Leu	Doença de Hirschsprung	Yin <i>et al.</i> , 1994
541	TGTg-TGA	Cys-Term	Doença de Hirschsprung	Yin <i>et al.</i> , 1994
609	cTGC-CGC	Cys-Arg	NEM 2 A	Kambouris, 1996
609	cTGC-GGC	Cys-Gly	NEM 2 A	Frank-Raue <i>et al.</i> , 1996
609	TGCa-TGG	Cys-Trp	Doença de Hirschsprung	Mulligan <i>et al.</i> , 1994
609	TGC-TAC	Cys-Tyr	Câncer de Tireóide	Blaugrund <i>et al.</i> , 1994
611	cTGC-CGC	Cys-Arg	NEM 2 A	Kambouris <i>et al.</i> , 1996
611	cTGC-GGC	Cys-Gly	Câncer de Tireóide	Oriola <i>et al.</i> , 1998
611	TGC-TTC	Cys-Phe	NEM 2 A	Frank-Raue <i>et al.</i> , 1996
611	cTGC-AGC	Cys-Ser	NEM 2 A	Kambouris <i>et al.</i> , 1996
611	TGCt-TGG	Cys-Trp	NEM 2 A	Donnis-Keller <i>et al.</i> , 1993
611	TGC-TAC	Cys-Tyr	NEM 2 A	Landsvater <i>et al.</i> , 1996
618	gTGC-CGC	Cys-Arg	Câncer de Tireóide	Blaugrund <i>et al.</i> , 1994
618	gTGC-GGC	Cys-Gly	Câncer de Tireóide	Marsh <i>et al.</i> , 1994
618	TGC-TTC	Cys-Phe	NEM 2 A	Kambouris <i>et al.</i> , 1996
618	gTGC-AGC	Cys-Ser	Câncer de Tireóide	Blaugrund <i>et al.</i> , 1994
618	TGC-TCC	Cys-Ser	NEM 2 A	Xue <i>et al.</i> , 1994
618	TGC-TAC	Cys-Tyr	Câncer de Tireóide	Marsh <i>et al.</i> , 1994
620	cTGC-CGC	Cys-Arg	Câncer de Tireóide	Schuffenecker <i>et al.</i> , 1994
620	cTGC-GGC	Cys-Gly	NEM 2 A	Eng <i>et al.</i> , 1997
620	TGC-TTC	Cys-Phe	Câncer de Tireóide	Schuffenecker <i>et al.</i> , 1994
620	TGC-TCC	Cys-Ser	Câncer de Tireóide	Schuffenecker <i>et al.</i> , 1994
620	cTGC-AGC	Cys-Ser	Câncer de Tireóide	Blaugrund <i>et al.</i> , 1994
620	TGCg-TGG	Cys-Trp	NEM 2 A	Decker <i>et al.</i> , 1998

620	TGC-TAC	Cys-Tyr	NEM 2 A	Mulligan <i>et al.</i> , 1993
626	cCAG-AAG	Gln-Lys	Doença de Hirschsprung	Auricchio <i>et al.</i> , 1999
630	TGC-TTC	Cys-Phe	NEM 2 A	Eng <i>et al.</i> , 1997
630	TGC-TCC	Cys-Ser	Câncer de Tireóide	Kitamura <i>et al.</i> , 1997
630	TGC-TAC	Cys-Tyr	Câncer de Tireóide	Kitamura <i>et al.</i> , 1997
634	gTGC-CGC	Cys-Arg	NEM 2 A	Donnis-Keller <i>et al.</i> , 1993
634	gTGC-GGC	Cys-Gly	NEM 2 A	McMahon <i>et al.</i> , 1994
634	TGC-TTC	Cys-Phe	NEM 2 A	Marsh <i>et al.</i> , 1994
634	gTGC-AGC	Cys-Ser	NEM 2 A	McMahon <i>et al.</i> , 1994
634	TGC-TCC	Cys-Ser	Câncer de Tireóide	Schuffenecker <i>et al.</i> , 1994
634	TGCc-TGG	Cys-Trp	NEM 2 A	Marsh <i>et al.</i> , 1994
634	TGC-TAC	Cys-Tyr	NEM 2 A	Marsh <i>et al.</i> , 1994
640	GCC-GGC	Ala-Gly	NEM 2 A	Tessitore <i>et al.</i> , 1999
762	aGAG-CAG	Glu-Gln	Doença de Hirschsprung	Yin <i>et al.</i> , 1994
765	cTCC-CCC	Ser-Pro	Doença de Hirschsprung	Romeo <i>et al.</i> , 1994
768	GAGc-GAC	Glu-Asp	Câncer de Tireóide	Eng <i>et al.</i> , 1995
790	TTGt-TTC	Leu-Phe	Câncer de Tireóide	Berndt <i>et al.</i> , 1998
790	TTGt-TTT	Leu-Phe	Câncer de Tireóide	Berndt <i>et al.</i> , 1998
791	TAT-TTT	Tyr-Phe	Doença de Hirschsprung	Seri <i>et al.</i> , 1997
804	cGTG-TTG	Val-Leu	Câncer de Tireóide	Bolino <i>et al.</i> , 1995
804	cGTG-ATG	Val-Met	NEM 2 A	Fattoruso <i>et al.</i> , 1998
891	tTCG-GCG	Ser-Ala	Câncer de Tireóide	Hofstra <i>et al.</i> , 1997
897	CGA-CAA	Arg-Gln	Doença de Hirschsprung	Romeo <i>et al.</i> , 1994
918	ATG-ACG	Met-Thr	NEM 2B	Carlson <i>et al.</i> , 1994
921	tGAA-TAA	Glu-Term	Doença de Hirschsprung	Attie <i>et al.</i> , 1995
922	TCC-TAC	Ser-Tyr	NEM 2B	Kitamura <i>et al.</i> , 1995
942	TGG-TAG	Trp-Term	Doença de Hirschsprung	Attie <i>et al.</i> , 1995
972	gAGG-GGG	Arg-Gly	Doença de Hirschsprung	Romeo <i>et al.</i> , 1994
973	CCA-CTA	Pro-Leu	Doença de Hirschsprung	Yin <i>et al.</i> , 1994
1061	CTC-CCC	Leu-Pro	Doença de Hirschsprung	Geneste <i>et al.</i> , 1999
1064	ATG-ACG	Met-Thr	Doença de Hirschsprung	Attie <i>et al.</i> , 1995

2. Substituições nucleotídicas criando sítios de splicing alternativo

IVS	Doador/receptor	Posição relativa	substituição	Fenótipo	referência
5	ds	+9	G-A	HSCR	Yin <i>et al.</i> , 1994
6	as	-5	C-T	HSCR	Attie <i>et al.</i> , 1995
10	as	+62	C-T	HSCR	Auricchio <i>et al.</i> , 1999
10	as	+68	G-A	HSCR	Salomon <i>et al.</i> , 1996
10	ds	+1	G-A	HSCR	Seri <i>et al.</i> , 1997
12	as	-2	A-G	HSCR	Kusafuka <i>et al.</i> , 1997
12	ds	+13	C-T	HSCR	Seri <i>et al.</i> , 1997
12	ds	+19	C-T	HSCR	Yin <i>et al.</i> , 1994
14	ds	+5	G-A	HSCR	Auricchio <i>et al.</i> , 1999
17	ds	+5	G-A	HSCR	Attie <i>et al.</i> , 1995

- **Substituições nucleotídicas região regulatória**

Sequência	Posição
CAGACCCGCCGGCCCTAGCCGCGAGTCCCTC(C-G)AGCCGTGGCCCCAGCGCGCACGGGCGATGG	-27

Angrist et al., 1995

5. Pequenas inserções

Nucleotídeo	Códon Insertion	Fenótipo	Referência
1678	CAGGCC	HSCR	Attie et al., 1995
3059	T	HSCR	Attie et al., 1995
532	GAGGAGTGT	Câncer de Tireóide	Pigny et al., 1999
635	ACGAGCTGTGCC	NEM 2 A	Hoppner et al., 1997
637	TGCCGCACG	NEM 2 A	Hoppner et al., 1998

- **Pequenas deleções**

Códon	deleção	Fenótipo	Referência
50	CGCCC^TTGCTgtacGTCCATGCCC	HSCR	Svensson et al., 1998
373	GCAGCTG^GCGgTGCTGGTCAA	HSCR	Romeo et al., 1994
401	GCCGGTC^AGCcTGACCTGCC	HSCR	Svensson et al., 1998
611	GCAAC^TGCTTccctgagGAGGAGAAGT	HSCR	Attie et al., 1994
1039	GGAGACA^CCGctggTGGACTGTAA	HSCR	Yin et al., 1996
1058	ATGGATT^GAAaacAAACTCTATG	HSCR	Geneste et al., 1999

- **Rearranjos complexos (incluindo inversões)**

Descrição	Fenótipo	Referência
Dup. 21 bp, Ins. 16 bp, nt. 1677, Del. 15 bp, nt. 1699	HSCR	Angrist et al., 1995
CC-GG nt 2097-2098 C634W R635G	NEM 2 A	Lips et al., 1994
GC-TT cd. 883 A883F	NEM 2B	Gimm et al., 1997

- **Deleções grosseiras**

Descrição	Fenótipo	Referência
Mutação descrita em DNA genômico (gene inteiro)	HSCR	Yin et al., 1996

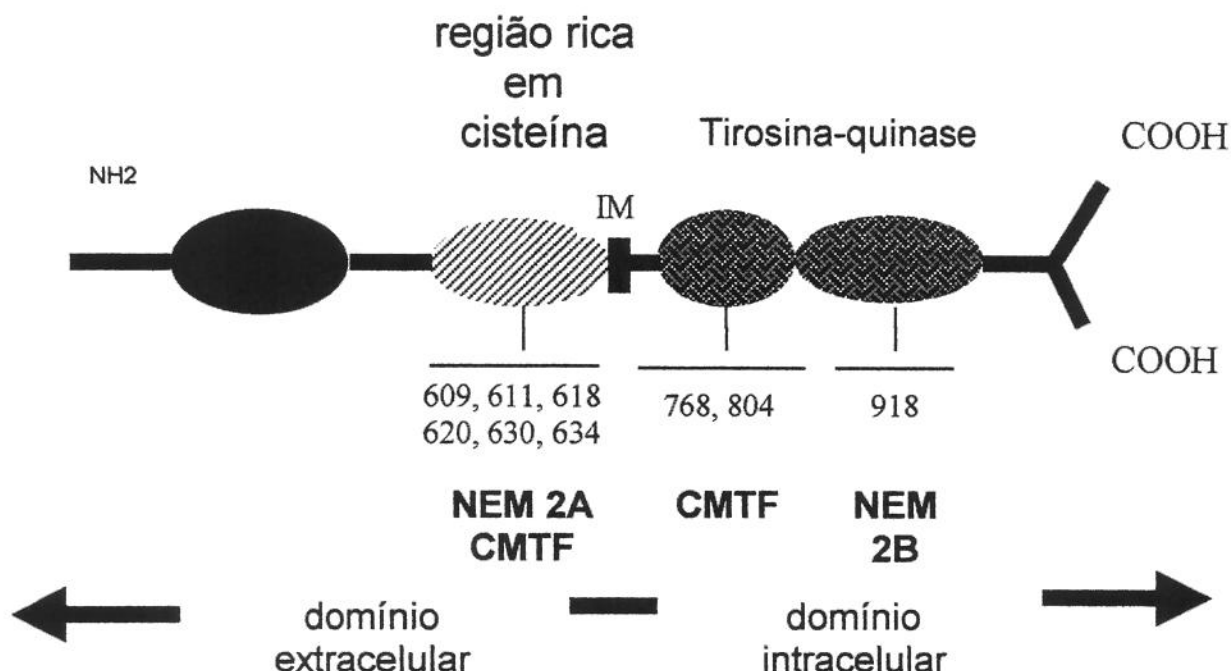


Figura 1: Esquema representando a proteína RET, seus domínios extracelular, intramembrana (IM) e intracelular, bem como a associação das mutações com os diferentes fenótipos da NEM.

As mutações no proto-oncogene *RET* encontradas na NEM 2A geralmente estão localizadas na sequência justa-membranosa, em uma região rica em cisteína (Pasini *et al.*, 1997). Envolve os aminoácidos Cys609, Cys611, Cys618, Cys620, Cys630 e Cys634, que são substituídos por um aminoácido diferente (Donis-Keller, 1995; Mulligan *et al.*, 1993). A figura 1 representa esquematicamente a proteína RET com seus códons mais frequentemente alterados, secundários a mutações no gene *RET* bem como seus fenótipos associados.

Estudos conduzidos por Asai *et al.* (1995) demonstraram que a substituição de uma destas cisteínas causava dimerização independente do ligante, ativando o receptor. Assim, estas cisteínas da porção extramembrana da proteína RET poderiam estar envolvidas na formação de pontes dissulfeto intracadeia, cruciais para a estrutura terciária da proteína. Como as mutações encontradas na NEM 2A levam à perda de um resíduo cisteína, outra cisteína localizada no domínio extracelular pode estar envolvida na formação de pontes dissulfeto intra ou

intermoleculares. Isso explicaria a homodimerização da proteína encontrada por estes autores em células NIH 3TC. Adicionalmente, estas células que expressavam a proteína RET anômala, têm grande atividade tirosina-quinase, podendo colaborar para a sinalização exagerada do receptor anômalo.

Embora desde o início diferentes autores tenham estudado o papel das mutações do proto-oncogene *RET* na síntese de uma proteína alterada com alta atividade transformadora, o papel da proteína normal na fisiologia do ser humano, seus ligantes e a razão de estar tão intimamente relacionado a tecidos da crista neural eram completamente desconhecidos até muito recentemente. A proteína RET conta com pelo menos 10 isoformas resultantes de *splicing* alternativo (Borganzone *et al*, 1993; Kwok *et al*, 1993; Lorenzo *et al*, 1993; Myers *et al*, 1995) e está expressa em tecidos derivados da crista neural, incluindo células C da tireóide, medular adrenal, gânglios simpáticos e parassimpáticos, gânglios entéricos e trato urogenital. É expressa também em células paratireoidianas. Relaciona-se ao trofismo do sistema nervoso central e sua defesa contra injúrias, bem como o desenvolvimento embrionário do aparelho urinário e migração e desenvolvimento de neurônios do trato gastrointestinal.

O primeiro ligante reconhecido da proteína RET foi o fator neurotrófico derivado de célula glial (GDNF), logo seguido pela descrição da neurturina (NRTN), artemina (ARTN) e persefina (PSPN). Este grupo foi denominado de Família de Ligantes do GDNF (GFL). De forma praticamente simultânea foi identificada uma proteína que se ligava ao GDNF com alta afinidade (Treanor, 1996). Esta continha 468 aminoácidos e foi denominada receptor do GDNF-alfa e atualmente é denominada GFRalfa-1. Esse receptor conserva íntima associação com a proteína RET formando um receptor multicomponente, de tal forma que o GFRalfa-1 é o elemento de ligação com as GFLs, e a proteína RET desempenha o importante papel de sinalização transmembrana (Baloh, 2000). A relação entre estes elementos do receptor multicomponente está representada na figura 2.

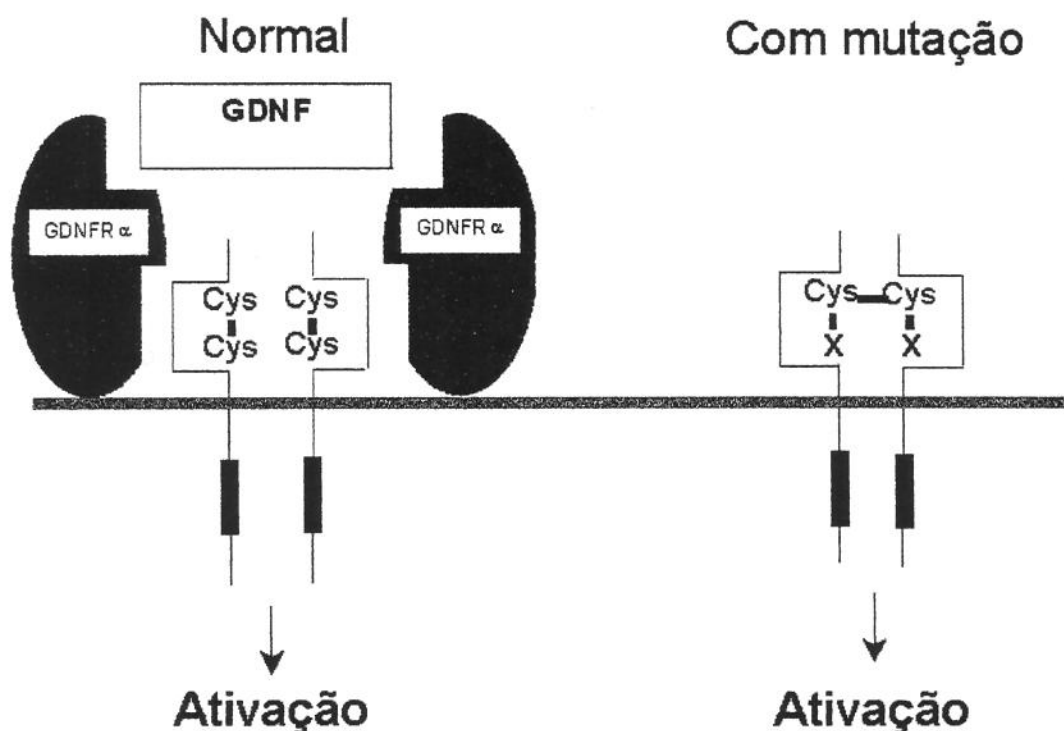


Figura 2: Esquema representando a ativação dependente do ligante no receptor do RET normal à esquerda e um modelo da autofosforilação que ocorre com a substituição de uma das seis cisteínas do domínio extramembrana codificado pelos exons 10 e 11, causando ativação mantida, independente do ligante (adaptado de Takahashi et al., 1999).

Experimentos *in vivo* e *in vitro* apoiam a hipótese que para cada GFL há um receptor GRF-alfa preferencial, ao qual o GFL se liga com maior afinidade e ativa com mais potência a proteína RET. Essas interações preferenciais são GDNF/GFR-alfa1, NRTN/GFR-alfa2 e ARTN/GFR-alfa3. PSPN não se liga ou ativa qualquer GRF alfa de mamíferos e, atualmente, seu receptor só foi identificado em galinhas e é denominado GFR-alfa4 (Baloh, 2000). Baloh *et al.* (2000) demonstraram que o complexo GFR alfa1-RET é o mais inespecífico dos receptores de GFL, sendo capaz de interagir com 3 dos 4 ligantes conhecidos.

Este modelo propõe uma divisão de trabalhos entre as subunidades RET e o GFR alfa, que são interdependentes. Estudos sugerem que para ativação do receptor de GDNF existe a formação de um heterotetrâmero de dois GDNF e dois GDNFR-alfa que induzem alterações espaciais do receptor tirosina-quinase RET, dimerizando-o e transmitindo o sinal através da membrana citoplasmática (Asai *et al.*, 1995).

A sinalização na proteína RET mutante parece agregar o adaptador Grb2 e proteínas de atracção Shc, resultando na ativação sustentada das vias Ras/ERK e Fosfatidil-inositol-3-fosfato (PI3K)/AKT, ativando outros alvos de sinalização, como a fosfolipase C-gama (PLC-gama), que aumenta a transcrição da proteína ligante do elemento de resposta a cAMP (CREB) além da expressão de mRNA da proteína c-fos, condições necessárias para transformação de muitas formas oncogênicas do RET. Estas vias estão representadas esquematicamente na figura 3 (Durbec *et al.*, 1996 ; Treanor *et al.*, 1996 ; Ohiwa *et al.*, 1997 ; Widenfalk *et al.*, 1997 ; Robertson *et al.*, 1997 ; Segouffin-Cariou *et al.*, 2000).

Ativação do Receptor

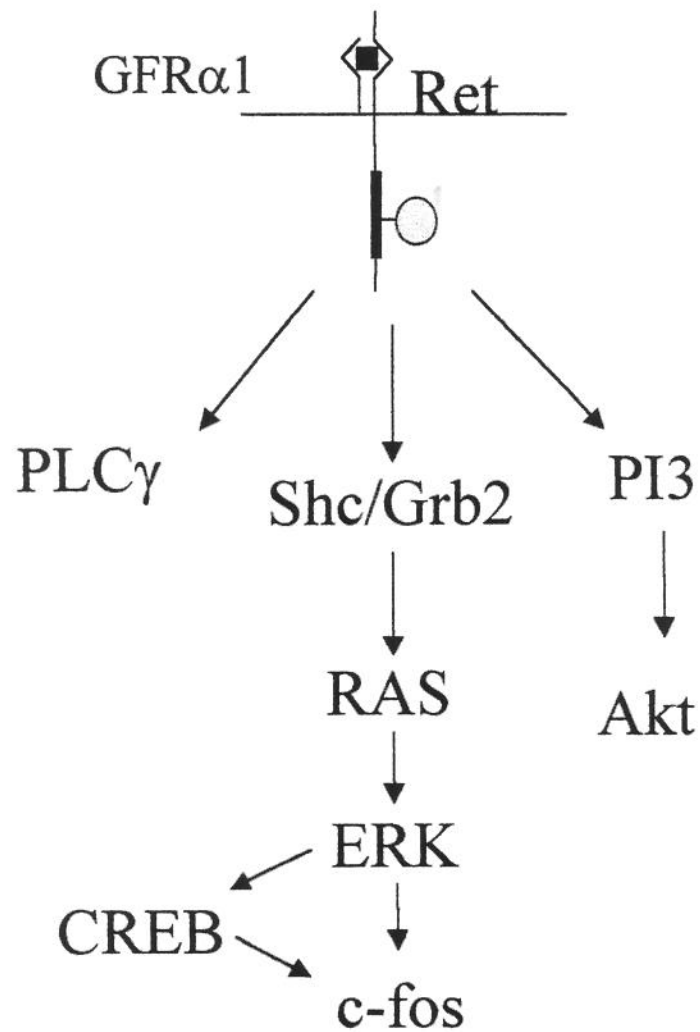


Figura 3: Representação esquemática das vias pós-receptor da proteína RET.

OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos:

1. Avaliação de mutações no proto-oncogene *RET* em famílias que apresentam pelo menos um indivíduo portador de NEM tipo 2A.
2. Avaliação do padrão de resposta da calcitonina a um teste provocativo, teste de estímulo com omeprazol, em famílias que apresentam, pelo menos, um indivíduo portador de NEM tipo 2A.
3. Comparar a eficácia diagnóstica dos testes genético e bioquímico para a identificação dos indivíduos assintomáticos.
4. Através do rastreamento genético, detectar os portadores de mutações, ainda assintomáticos e, portanto, candidatos a tireoidectomia precoce, visando melhorar a morbidade desta síndrome.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente projeto foi elaborado de acordo com as orientações da Declaração de Helsinki (1989), *International ethical guidelines for biomedical research involving human subjects* (CIOMS/WHO, 1993) e Resolução Normativa do Conselho Nacional Saúde (CNS) 196/96, sendo aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (USP). Os indivíduos envolvidos e/ou seus responsáveis, receberam esclarecimentos sobre o projeto e, estando de acordo, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido de participação em pesquisa envolvendo seres humanos. Todos foram identificados por números, para manutenção da privacidade. Os heredogramas foram elaborados de acordo com as recomendações propostas por Bennet *et al.* (1995).

Realizamos seqüenciamento manual e automático de fragmentos amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) dos exons 10 e 11 do proto-oncogene *RET* em membros de duas famílias, com portadores do diagnóstico clínico, laboratorial e com confirmação cirúrgica e anátomo-patológica, de neoplasia múltipla tipo 2A. Procedemos também ao teste de estímulo da secreção de calcitonina com omeprazol, conforme proposto por Erdogan *et al.* (1997) com objetivo de observar a resposta ao teste, tanto nos portadores sintomáticos quanto assintomáticos da síndrome, possibilitando análise comparativa dos métodos de rastreamento bioquímico e molecular.

- **Pacientes**

Duas pacientes afetadas pela NEM 2A, em acompanhamento na Disciplina de Endocrinologia e Metabologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP) e seus familiares foram estudados.

Os casos-índice com suas histórias clínicas e respectivos heredogramas estão mostrados abaixo.

Caso 1

Paciente do sexo feminino, costureira, branca, casada, natural de Santo André(SP) e procedente de Ribeirão Preto (SP), data de nascimento 22 de Agosto de 1956.

Aos 26 anos iniciou com tontura, cefaléia frontal e occipital, epistaxes, tremores, palpitações, sudorese, escotomas e sensação de calor do tórax, pescoço e face, acompanhados de rubor nesta região que a obrigavam a tomar um banho para alívio dos sintomas. Inicialmente eram relacionados aos grandes esforços, passaram a ser mais freqüentes e a ocorrerem inclusive à noite, com duração de 5 minutos. Um ano após o início dos sintomas procurou serviço médico que constatou PA= 270x160 mmHg. Durante a investigação foi identificada massa em adrenal direita e realizada cirurgia para retirada de feocromocitoma com 10,5 x 9,5 x 6 cm e pesando 200 g.

Permaneceu assintomática por cinco anos, quando durante a gestação de seu sexto filho, começou a apresentar os mesmos sintomas. Encaminhada à Clínica Médica do HCFMRP, que requisitou VMA= 21,8 mg/24 horas (1,8 – 7,2), diagnosticando recidiva do feocromocitoma. O ultra-som (US) mostrava massas bilaterais, em topografia adrenal. Adicionalmente, foi identificado um nódulo de 2 cm no lobo direito da tireóide, endurecido, indolor e móvel, sendo realizada citologia aspirativa com agulha fina (CAAF), que resultou no laudo anátomo-patológico de carcinoma medular de tireóide.

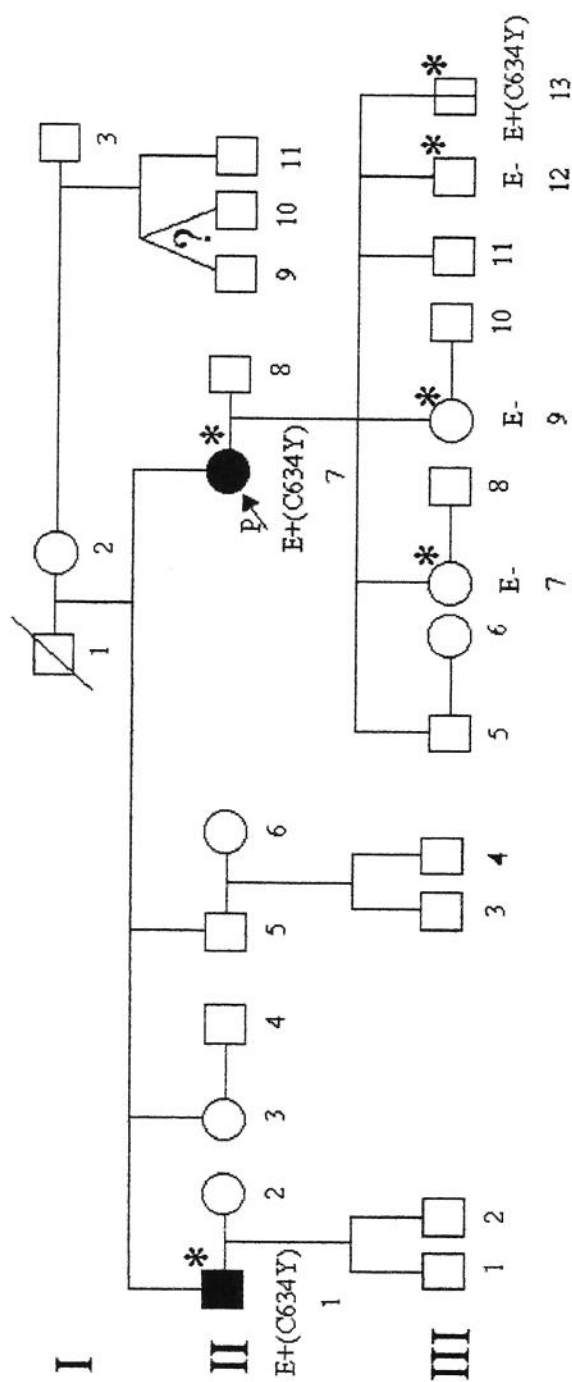
Foi, portanto, diagnosticada como portadora de NEM 2A e submetida a adrenalectomia bilateral no segundo trimestre da gestação, após terapêutica prévia com prazosin. Manteve-se normotensa e não apresentou intercorrências pós ou intra-operatórias. A seguir foi realizada tireoidectomia total com paratireoidectomia inferior esquerda, evidenciando-se hiperplasia do tecido paratirodiano ao anátomo-patológico.

Seis anos após evoluiu com nova recidiva do feocromocitoma, em topografia de adrenal direita. Foi submetida a uma nova cirurgia, com retirada de massa esférica, de 5 cm de diâmetro. No acompanhamento ambulatorial a calcitonina sérica de 671 pg/mL (normal até 5 pg/mL) levantou suspeita de

metástase do CMT. Esta se localizava na região anterior do pescoço, além de uma possível metástase no lobo direito do fígado, sugerida pelo mapeamento com ¹³¹Imetaiodobenzilguanidina (MIBG), que mostrava também área captante em topografia de adrenal direita. Está em uso de L-tiroxina (200 mcg/dia) e acetato de cortisona (25 mg/dia).

A paciente refere que seu pai foi a óbito aos 40 anos por tumor em região cervical anterior. A mãe é viva e portadora de câncer de cólon, com metástases pulmonares. Dos seus 13 irmãos, cinco morreram nos primeiros meses de vida. Refere, ainda, a morte de uma irmã aos 18 anos por suicídio, que apresentava queixas de tonturas, nervosismo e síncope. Outro irmão falecido aos 40 anos por trauma cranioencefálico, apresentava epilepsia. Apresenta ainda o antecedente familiar de um irmão alcoólatra que faleceu aos 30 anos por infarto agudo do miocárdio. O indivíduo II-1, com 51 anos apresentou CMT diagnosticado aos 40 anos, sem manifestações de feocromocitoma ou hiperparatireoidismo.

Dos seus seis descendentes, todos assintomáticos clinicamente, apenas 4 concordaram com este estudo e o heredograma está apresentado na figura 4.



Legenda

- NEM2A assintomático
- NEM2A afetado
- P Probando
- * Estudado
- E- estudo de mutação negativo
- E+(C634Y) estudo de mutação positivo
- G→A no codon 634

Figura 4: Heredograma da Família 1

Caso 2

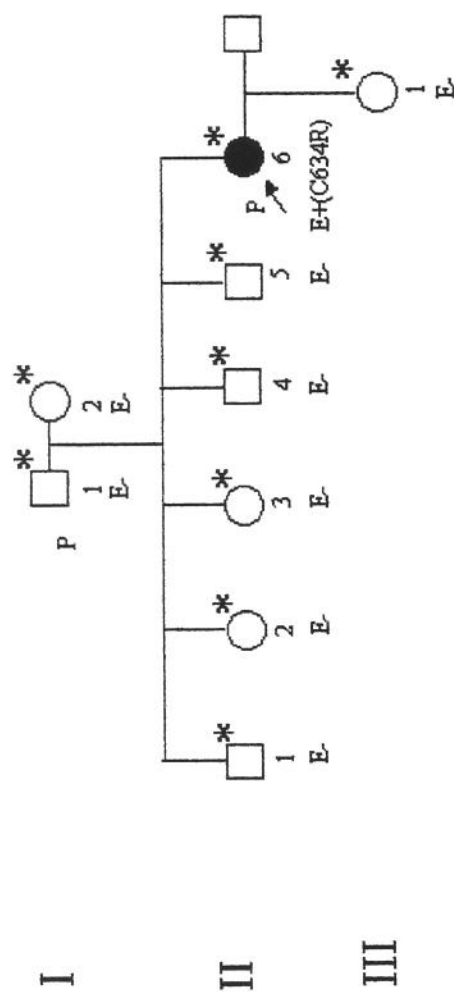
Paciente do sexo feminino, do lar, branca, casada, natural e procedente de Ribeirão Preto (SP), data de nascimento 26 de fevereiro de 1975.

Há 4 anos, durante a consulta pré-natal de sua primeira filha, queixou-se de escotomas e epigastralgia há 2 meses. Ao exame clínico foi percebida PA=210x150 mmHg e frequência cardíaca de 108 bpm. Não havia sofrimento fetal e a paciente foi internada para controle pressórico. Inicialmente foi diagnosticada como Doença Hipertensiva Específica da Gestação, evoluindo com edema agudo de pulmão e, durante sua internação, relatou que sentia episódios súbitos de taquicardia e sudorese. Foi requisitado U.S. obstétrico que evidenciou gestação tópica de 31 semanas e massas adrenais heterogêneas, bilateralmente, suspeitando-se, então, de feocromocitoma. Foi pedida avaliação da endocrinologia, que também identificou um nódulo tireoidiano de 1,5 cm de diâmetro palpado no lobo direito. A citologia aspirativa de tireóide com agulha fina evidenciou CMT. Foi tratada previamente com prazosin e submetida à cesárea com 38 semanas de gestação, com o nascimento de uma menina de 1.210g e 37 cm que evoluiu bem. Neste mesmo ato anestésico foi realizada adrenalectomia bilateral, com retirada de feocromocitomas de 320 g na adrenal esquerda e 200 g na adrenal direita. Dois meses depois foi submetida a tireoidectomia total com retirada adicional de 2 paratireóides esquerdas. A calcitonina sérica pré-operatória era de 1.650 pg/mL (normal até 5 pg/mL) e havia aumento do cálcio sérico total, em algumas dosagens. Ainda nesta internação foi percebida lesão pruriginosa no dorso, que foi biopsiada, resultando no diagnóstico de líquen amiloidótico. O anátomo-patológico da tireoidectomia demonstrou o carcinoma medular de tireóide com metástase em cadeia linfonodal cervical. Evoluiu com necessidade de reposição com L-tiroxina (200 mcg/dia) e acetato de cortisona (12,5 mg, duas vezes ao dia).

Os seus pais e irmãos, todos assintomáticos clinicamente, concordaram com este estudo. Seu descendente direto, com 1 ano de idade, também participou do estudo após consentimento de seus representantes legais. Durante a evolução deste estudo e antes que pudéssemos oferecer aconselhamento genético, a

paciente engravidou pela segunda vez. O heredograma do caso índice da família 2 está apresentado na figura 5.

Família 2



Legenda

□	MEN 2A assintomático	P	Probando	E-	Estudo de mutação negativo
●	MEN 2A afetado	*	Examinado	E+(C634R)	Estudo de mutação positivo T→C no primeiro nucleotídeo códon 634

Figura 5: Heredograma da Família 2

1- ANÁLISE MOLECULAR

Obtenção das amostras de sangue:

As amostras sangüíneas para análise de DNA foram obtidas por coletas isoladas, em dias diferentes do teste de provocação para liberação de calcitonina.

Amostras de DNA genômico foram extraídas a partir de sangue total dos pacientes e de seus familiares, coletadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Foram colhidos de 10 a 20 ml de sangue periférico em tubos cônicos, contendo 1,0 ml de EDTA (etilenediaminotetracetato dissódico 2H₂O) a 10 % pH 8,0 como anticoagulante.

Extração de DNA genômico a partir de sangue total

A extração de DNA genômico foi realizada pelo método previamente utilizado por Araújo *et al.* (1996). As soluções utilizadas estão indicadas no Quadro II. Adicionou-se Solução A ao sangue coletado até o volume de 50 ml e manteve-se o tubo a 4°C por 30 minutos, para lise das hemácias. Centrifugou-se a 2.000 rpm, 4°C por 10 minutos. Ressuspendeu-se o precipitado ('pellet') em 20 ml de Solução A. Após a repetição da operação o precipitado foi ressuspenso em 1 ml de Solução B diluída para 1x. Acrescentaram-se 250 µl de Solução C, contendo Proteinase K.

Incubou-se a mistura sob leve agitação a 37°C, durante um período de aproximadamente 18 horas, ou a 65°C, por 2 horas. Para a extração do DNA, adicionaram-se 1,25 ml de TE 1x (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e igual volume de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 (Applied Biosystems). Homogeneizou-se a mistura por inversão cuidadosa do tubo durante 5 minutos, após o qual centrifugou-se a 2.500 rpm por 15 minutos, à temperatura ambiente, para separação e recuperação da fase aquosa (superior). À fase aquosa, acrescentou-se novamente igual volume de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 seguido de centrifugação, repetindo-se o procedimento duas vezes com

solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1; v:v:v) e, por último, com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1; v:v). Para a precipitação do DNA, acrescentou-se 1/10 do volume obtido de acetato de sódio 3 M e 2,5x ao volume de etanol absoluto gelado. O DNA precipitado foi recuperado com o auxílio de uma haste plástica esterilizada e lavado com etanol 70% antes de ser ressuspenso em volume que variou de 200-500 µl de TE 1x. A concentração de DNA obtida foi calculada através de leitura de absorbância a 260 nm em espectrofotômetro, sendo a integridade do DNA testada em de gel de eletroforese.

Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase - PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

As seqüências de oligonucleotídeos, apresentadas na tabela II, foram utilizadas como inicializadores da reação de PCR e sintetizados a partir da seqüência normal do proto-oncogene *RET* (Siegelman *et al.*, 1997).

Quadro 4: Soluções utilizadas para a técnica de extração de DNA de sangue periférico

<u>Solução A</u>	<u>Solução B</u> (estoque 2x)	<u>Solução C</u> (recém-preparada)
[] final	[] final	[] final
MgCl ₂ 5 mM	Na ₂ EDTA.....20 mM	SoluçãoB 0,5x
Sacarose.....0,32 M	NaCl.....20 mM	SDS.....5 %
Tris-HCl pH 8,0....10 mM	Tris-HCl, pH 8,0.....20 mM	Proteinase K..... .1 mg/ml
Triton-X 100..... 1 %		

A amplificação dos fragmentos de DNA foi obtida utilizando um aparato de ciclo térmico para o processamento da PCR (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). Para os exons 10 e 11 foram realizados 40 ciclos, cada um consistindo de incubações de 60s a 95°C para desnaturação, 60s a 65°C para anelamento e 60s a 72°C para extensão do primer. O período inicial de desnaturação foi de 5 min a 95°C. A extensão final foi de 10 minutos a 72°C. A reação teve volume final de 25µl, contendo 50-100ng do DNA, 30 pmol de cada primer sense e anti-sense, tampão de PCR contendo 2,0 mM de MgCl₂ para os exons 10 e 11.

Tabela II: Seqüências dos 'Primers' utilizados para amplificação e seqüenciamento. A amplificação dos fragmentos foi testada em gel de agarose 1,5%. s: sense; as: antissense; pb: pares de base.

'Primer'	Seqüência	T anelamento (°C)	Tamanho de fragmento
Exon 10 s	GGG-GCA-GCA-TTG-TTG-GGG-GAC	68	142 pb
Exon 10 as	CGT- GGT-GGT-CCC-GGC-CGC-C		
Exon 11 s	CCT-CTG-CGG-TGC-CAA-GCC-TC	65	92 pb
Exon 11 as	GAA-GAG-GAC-AGC-GGC-TGC-GAT		

- **Gel de Eletroforese**

As verificações da qualidade do DNA genômico extraído, bem como da correta amplificação de produto de PCR, foram feitas a partir da realização de eletroforese em gel de agarose 0,8% (DNA genômico) ou 1,5% (produto de PCR) em TBE 1x, preparado segundo protocolo descrito em Sambrook *et al.* (1989). A Solução estoque de tampão utilizado na corrida eletroforética e preparação do gel está mostrado no Quadro 5.

Quadro 5 – Solução estoque de TBE 10x

ácido bórico	55,0 g
trizma-base	108 g
EDTA 0,2 M, pH 8,0	100 ml
H ₂ O	q.s.p. 1.000 ml

Aplicou-se a amostra no gel juntamente com 1/10 do volume de tampão de corrida (0,25% de Azul de Bromofenol; 50% glicose). As condições de corrida variaram de 60 a 100 V. O marcador de peso molecular utilizado foi o DNA 'ladder' de 100 pb (Gibco BRL), utilizando-se 5 µl de solução estoque de 40 ng/µl (Quadro 6). Corou-se o gel em solução diluída de Brometo de Etídeo (0,5 µg/ml) durante 10 minutos, sendo posteriormente visualizado em transluminador de luz ultravioleta (UV trasluminator, Fotodyne) e fotografado com câmera Polaroid.

Quadro 6 – Componentes e condições para verificação da correta amplificação dos fragmentos da PCR

	Volume []
Gel de agarose	1,5%
Eletroforese 60 a 100 volts e 80 μ A	
Ladder 100pb	2 μ l
Produto de PCR	5 μ l
Azul de Bromofenol	2 μ l

- **Análise dos Fragmentos de DNA por Seqüenciamento Direto**

Para o seqüenciamento direto do produto de PCR procedeu-se com um pré-tratamento do mesmo com as enzimas Exonuclease I e Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP – “Shrimp Alkaline Phosphatase”) no intuito de remover o DNA de fita simples residual e os dNTPs remanescentes (PCR product pre-sequencing kit – Amersham/Pharmacia). As condições da reação estão representadas abaixo:

Produto de PCR (~20 ng/ μ l).....	5 μ l
Exonuclease I (10 U/ μ l).....	1 μ l
SAP (2 U/ μ l).....	1 μ l
Volume final.....	7 μ l
Tempo de reação: 37°C.....	15 minutos
80°C.....	15 minutos

O método selecionado para o seqüenciamento tem como princípio à utilização dos quatro terminadores dideoxynucleotídeos (ddNTPs) marcados com o

isótopo α - ^{33}P . Desta forma, ao final da reação apenas estarão marcados os DNAs de fita simples que resultarem de polimerização e terminação da cadeia por um ddNTP, evitando a marcação de fitas simples resultantes de terminação prematura.

Utilizamos o “Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit” da Amersham/Pharmacia. As condições da reação estão descritas no Quadro 7.

Quadro 7 – Condições da reação de seqüenciamento dos produtos de PCR dos exons 10 e 11 do proto-oncogene *RET*

	Volume	[] final
Tampão de reação 10x	2 μl	1 x
Produto de PCR Pré-tratado	7 μl	50-500 ng
‘primer’ sense/antisense (20 pmoles/ μl)	1 μl	2 pmoles
<i>Thermo Sequenase polimerase</i> (4 U/ μl)	2 μl	8U
H ₂ O	q.s.p. 20 μl	

Após incubação de 30 min, transferiu-se 4,5 μl da reação para quatro tubos, cada um contendo 0,06 μM de um dos ddNTP (α - ^{33}P) e 6 μM de mistura de dNTPs, num volume final de 7 μl . Submeteu-se a reação a 40 ciclos em um termociclador: 95°C, 30 segundos/ 68 ou 65°C, 30 segundos/ 72°C, 1 minuto.

Ao final da reação acrescentaram-se 4 μl de Solução de Terminação contendo 95% de formamida, 0,05% de Azul de bromofenol e 20 mM de EDTA.

Gel de Seqüenciamento

A reação de seqüenciamento foi submetida à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 7%, contendo Uréia 7 M, preparado como descrito abaixo, com variação de espessura de 0,1- 0,4 mm.

	Volume	[] final
Acrilamida:Bisacrilamida (19:1) 40%	17,5 ml	7%
TBE 10x	10 ml	1x
Uréia	106 g	7 M
Água	q.s.p. 100 ml	

Os parâmetros para eletroforese foram 2000 V, 50 mA a 50 W, por tempos que variaram de 2 a 3 horas para o exon 10 e 1 a 2 horas para o exon 11. Após secagem adequada, o gel foi exposto a filme de raios-X sensíveis à emissão de radiação do nucleotídeo marcado (por exemplo, Kodak X-Omat AR), por tempo variável (3 dias), à temperatura de -70°C. A revelação do filme foi realizada de acordo com as indicações do fabricante.

Seqüenciamento Automático de DNA

O produto da PCR foi purificado com o objetivo de remover os dNTPs e *primers* em excesso, como previamente descrito para o seqüenciamento manual. Para a reação de seqüenciamento utilizamos o kit "ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit" (PE Applied Biosystem CA, USA). Resumidamente, foram adicionados à mistura do tampão de reação os nucleotídeos marcados com Fluoresceína e Rodamina com diferentes energias de excitação, o produto purificado da PCR e o *primer* específico, além da Amplitaq DNA polimerase. Esta solução foi submetida a 25 ciclos em um termociclador, com temperatura de desnaturação de 96°C por 10 minutos, anelamento a 50°C por 5 minutos e extensão 60°C por 10 minutos. A seguir, a solução foi purificada

utilizando-se colunas de separação "Centri-Sep™ spin columns" (Princeton, USA). Finalmente, a reação foi submetida ao seqüenciador automático ABI Prism 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystem CA, USA).

2- ANÁLISE BIOQUÍMICA -TESTE DE ESTÍMULO COM OMEPRAZOL

Pacientes

Foram estudados, além dos casos-índices com diagnóstico de NEM2A apresentando manifestações clínicas, 9 familiares, sendo 3 da família 1 e 6 da família 2. Estudamos ainda como grupo controle, 11 indivíduos (8 mulheres e 3 homens) sem passado familiar de qualquer patologia relacionada à tireóide ou NEM ou outras doenças gástricas ou endócrinas. Todos os indivíduos eram saudáveis e não utilizavam nenhuma medicação durante o período do estudo.

Protocolo de Estudo

Após colheita de sangue às 8 horas, em jejum de 12 horas, para determinação basal de calcitonina (CT) e gastrina (GT), os pacientes foram orientados a ingerirem 20 mg de omeprazol (Losec®, Asta-Zeneca, Brasil) duas vezes ao dia por 3 dias, iniciando às 8 horas da manhã. As amostras sanguíneas foram novamente coletadas para a determinação de CT e GT após estímulo, no quarto dia às 8 horas, 12 horas após a última dose da medicação. As amostras foram centrifugadas a 4°C, 3500 rpm e guardadas a -20 °C até serem submetidas aos radioimunoensaios específicos para quantificação de gastrina e calcitonina.

Radioimunoensaio

As concentrações plasmáticas de GT foram determinadas por RIA em duplicata, utilizando ensaio de duplo anticorpo disponível comercialmente (DPC Diagnostic Products Corporations, CA, USA). Todas as amostras foram dosadas na mesma oportunidade.

O ensaio de CT foi realizado por IRMA em duplicata, através de kit comercial (Diagnostic Systems Laboratories, Texas, USA) e todas as amostras foram processadas no mesmo ensaio.

Análise Estatística

Foram utilizados testes não paramétricos devido à natureza das variáveis estudadas. A Prova de Mann-Whitney para duas amostras independentes foi usada para comparar os grupos controle e o de indivíduos das famílias portadoras de NEM 2 A e o Teste de Wilcoxon para duas amostras relacionadas, quando se comparou os dados dos grupos nos momentos basal e pós-teste para os ensaios de GT e CT. Níveis indetectáveis de GT e CT foram considerados como iguais às doses mínimas de cada método (25 pg/ml e 10 pg/ml, respectivamente). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

1- ANÁLISE MOLECULAR

Amplificação por PCR

Os fragmentos dos exons 10 e 11 foram adequadamente amplificados nos dois pacientes e em todos os familiares estudados. As figuras 6 e 7 apresentam demonstrativos da amplificação dos exons 10 e 11 nos casos índices e em 3 familiares. Observamos que os fragmentos apresentam o tamanho esperado.

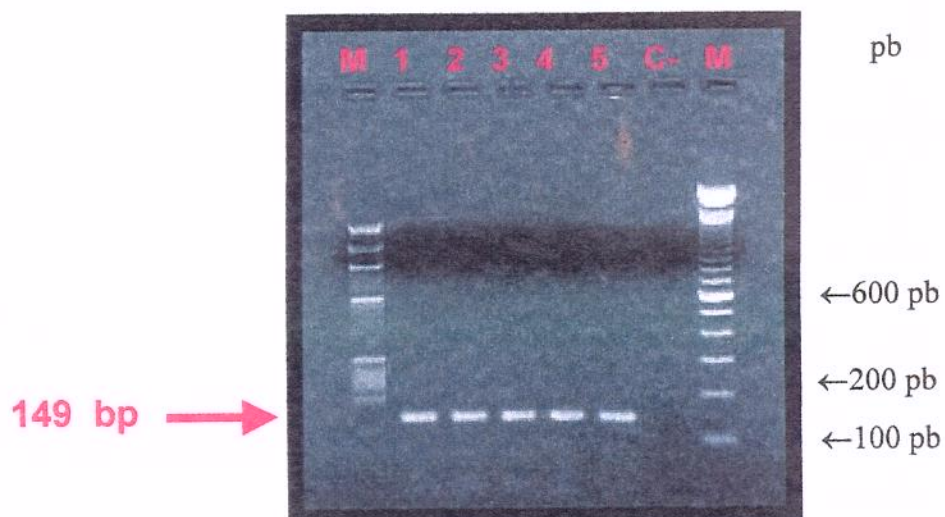


Figura 6: Gel de agarose 1,5% demonstrativo de amplificação de fragmento do Exon 10 dos casos-índices das famílias 1 e 2 (linhas 1 e 2) , 3 familiares da família 1 (linhas 3, 4 e 5) e um controle negativo (linha 6). M: marcadores de peso molecular ϕ X174 (esquerda) e 100bp ladder (direita).

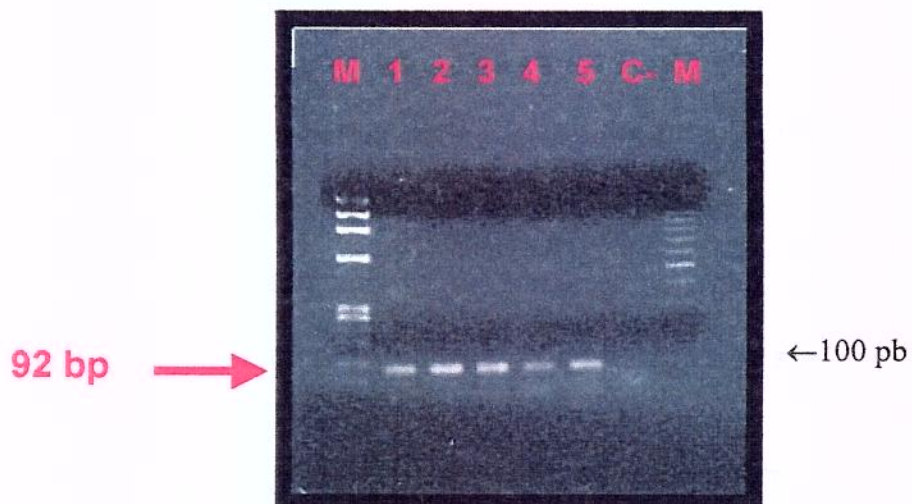


Figura 7: Gel de agarose 1,5% demonstrativo de amplificação de fragmento do exon 11 dos casos-índices (linha 1 e 2), 3 familiares da família 1 (linhas 3, 4 e 5) e um controle negativo (linha 6). M: marcadores de peso molecular ϕ X174 (esquerda) e 100bp ladder (direita).

Seqüenciamento Manual e Automático

As seqüências do gene do proto-oncogene *RET* foram baseadas nas seqüências descritas por Takahashi (Takahashi, 1988) e por Cecherini *et al.* (1993). Os fragmentos amplificados foram seqüenciados pelos 2 métodos, automático e confirmados pelo seqüenciamento manual.

- **Exon 10**

Não foram observadas mutações no exon 10 ao sequenciamento manual nas duas pacientes-índice (II-7 da família 1 e II-6 da família 2). A figura 8 mostra o sequenciamento destas duas pacientes e um controle normal.

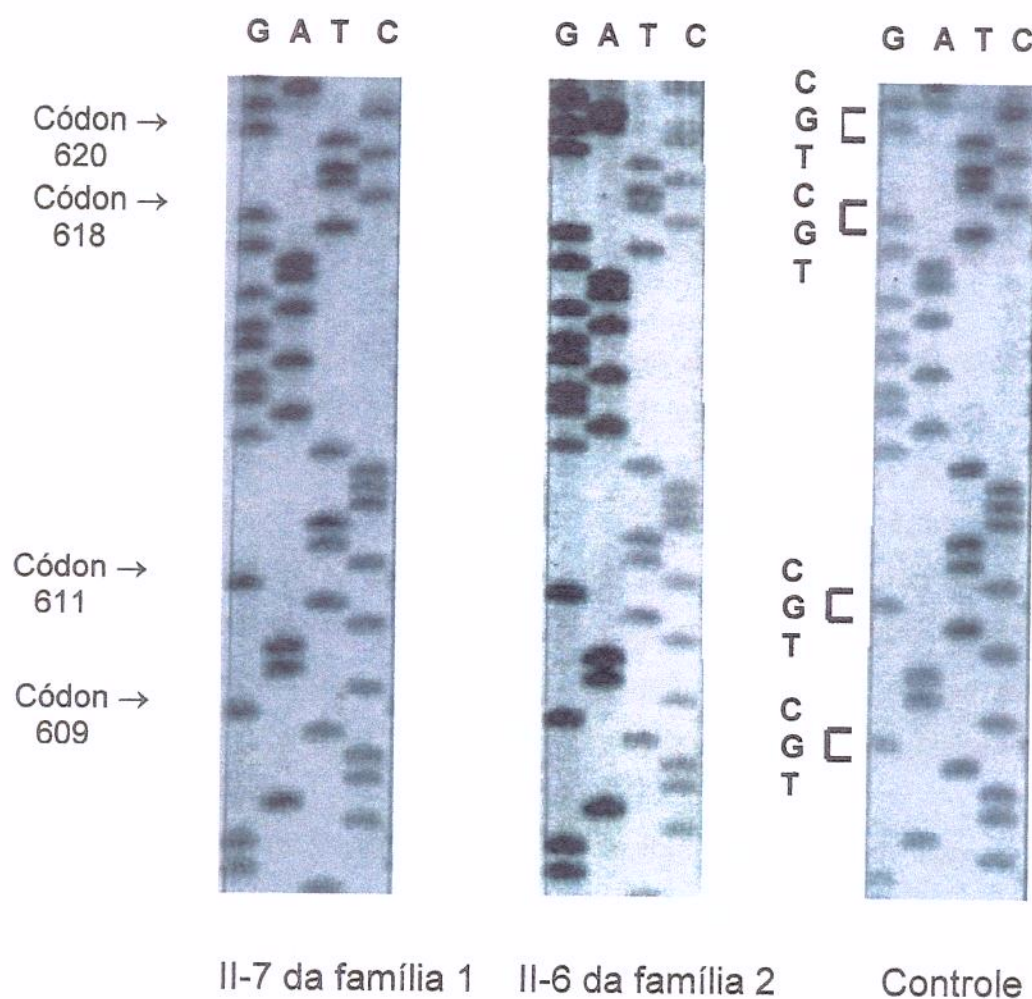


Figura 8: Fragmento normal do exon 10, códons 609, 611, 618 e 620 da paciente II-7 da família 1, II-6 da família 2 e de um controle. Sequenciamento direto com *primer* sense (Exon 10s).

• Exon 11

Observamos na paciente-índice (II-7) da família 1 uma mutação em heterozigose no codon 634, trocando G por A (TGC→TAC), resultando em uma substituição do aminoácido cisteína por uma tirosina (C634Y). O irmão da paciente (II-1), portador sintomático de CMT, apresenta a mesma mutação. Dos seis filhos da paciente II-7, quatro participaram do estudo e em apenas um (III-13) a mutação C634Y estava presente (figura 4). Este paciente era assintomático do ponto de vista clínico e não apresentava alterações à ultra-sonografia. Entretanto, devido à presença da mutação detectada pelo rastreamento genético, o mesmo foi submetido a tireoidectomia e o estudo anátomo-patológico revelou hiperplasia de células C.

Posteriormente, os filhos do paciente II-1 também foram submetidos ao rastreamento com a detecção da mesma mutação no indivíduo III-1, que apresenta 19 anos de idade e embora se encontre assintomático, devido à presença da mutação detectada pelo rastreamento genético foi submetido à tireoidectomia e o estudo anátomo-patológico revelou CMT. Cabe salientar que o indivíduo II-9 é um dos três filhos do segundo casamento da paciente I-2, e todos são negativos para a mutação. A figura 9 apresenta o seqüenciamento de um controle, do indivíduo II-7, caso índice da família 1 e seu filho III-13, portador assintomático.

Observamos na paciente índice (II-6) da família 2 uma mutação em heterozigose no códon 634, trocando T por C (TGC→CGC), resultando em uma substituição do aminoácido cisteína por uma arginina (C634R). Toda sua família, incluindo seus pais, cinco irmãos e sua filha menor, concordou com o estudo (figura 5). A mutação C634R não foi observada em nenhum dos indivíduos, sugerindo que a mutação C634R nesta paciente seria uma mutação *de novo*. Cabe salientar que a paternidade foi confirmada. Os resultados do sequenciamento manual de um indivíduo controle, do indivíduo afetado e de um dos familiares normais da família 2 estão apresentados na figura 10.

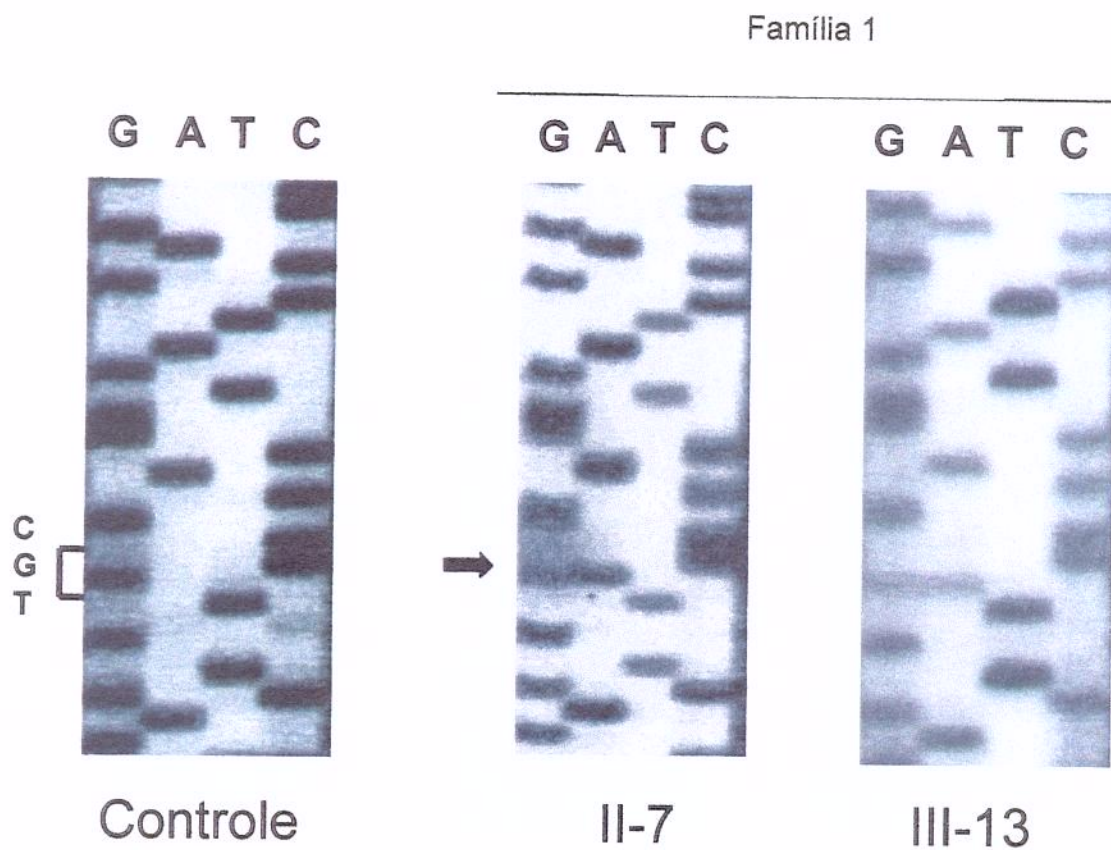


Figura 9: Seqüenciamento direto com *primer* sense (Exon 11s), demonstrativo do fragmento do exon 11 de um controle, da paciente II-7, caso índice da família 1, e seu filho III-13, portador assintomático. A seta indica heterozigose no segundo nucleotídeo do códon 634 (G→A) resultando na substituição do aminoácido CISTEÍNA (C) por TIROSINA (Y).

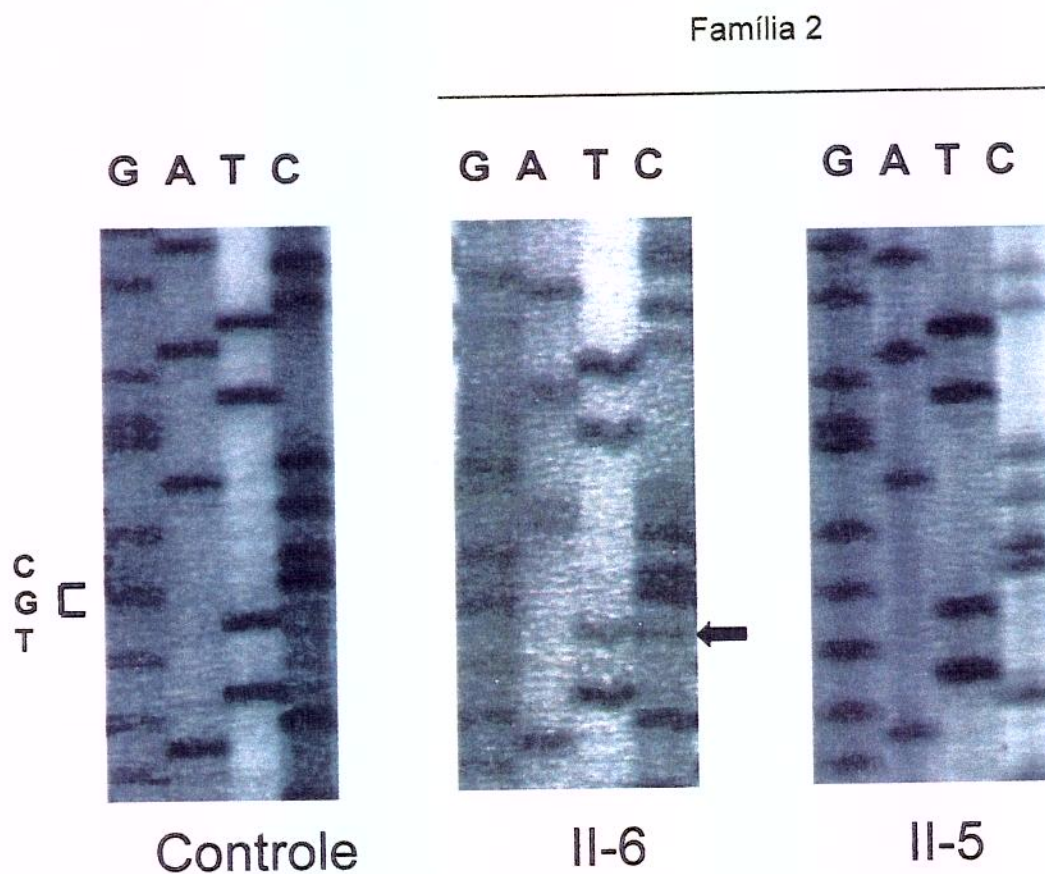


Figura 10: Seqüenciamento direto com primer sense (Exon 11s) , demonstrativo do fragmento do exon 11 de um controle, da paciente II-6, caso índice da família 2, e seu irmão normal II-5. A seta indica heterozigose no primeiro nucleotídeo do códon 634 (T→C) resultando na substituição do aminoácido CISTEÍNA (C) por ARGININA (R).

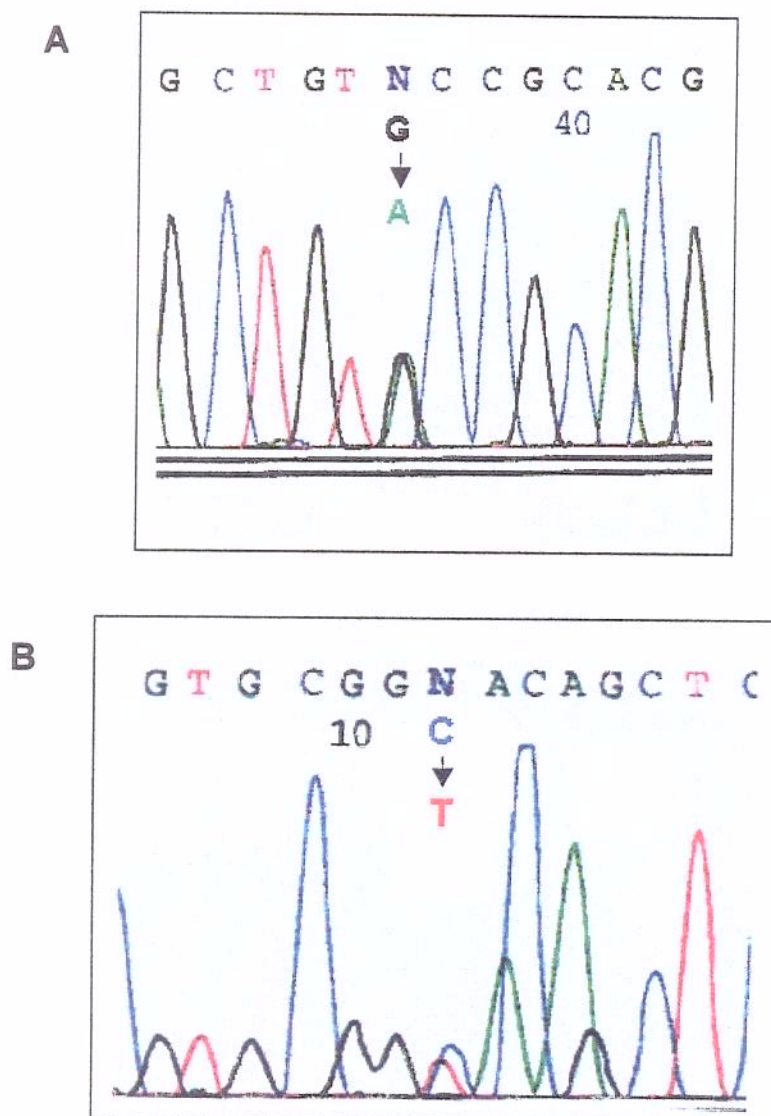


FIGURA 11: Seqüenciamento automático com primer sense (Exon 11s), demonstrativo do fragmento do exon 11 da paciente II-7, caso índice da família 1. (A) primer sense: Seta indica heterozigose no segundo nucleotídeo do códon 634 (G→A). (B) primer anti-sense: Seta indica heterozigose no segundo nucleotídeo do códon 634 (C→T). A troca resulta na substituição do aminoácido CISTEÍNA (C) por TIROSINA (Y).

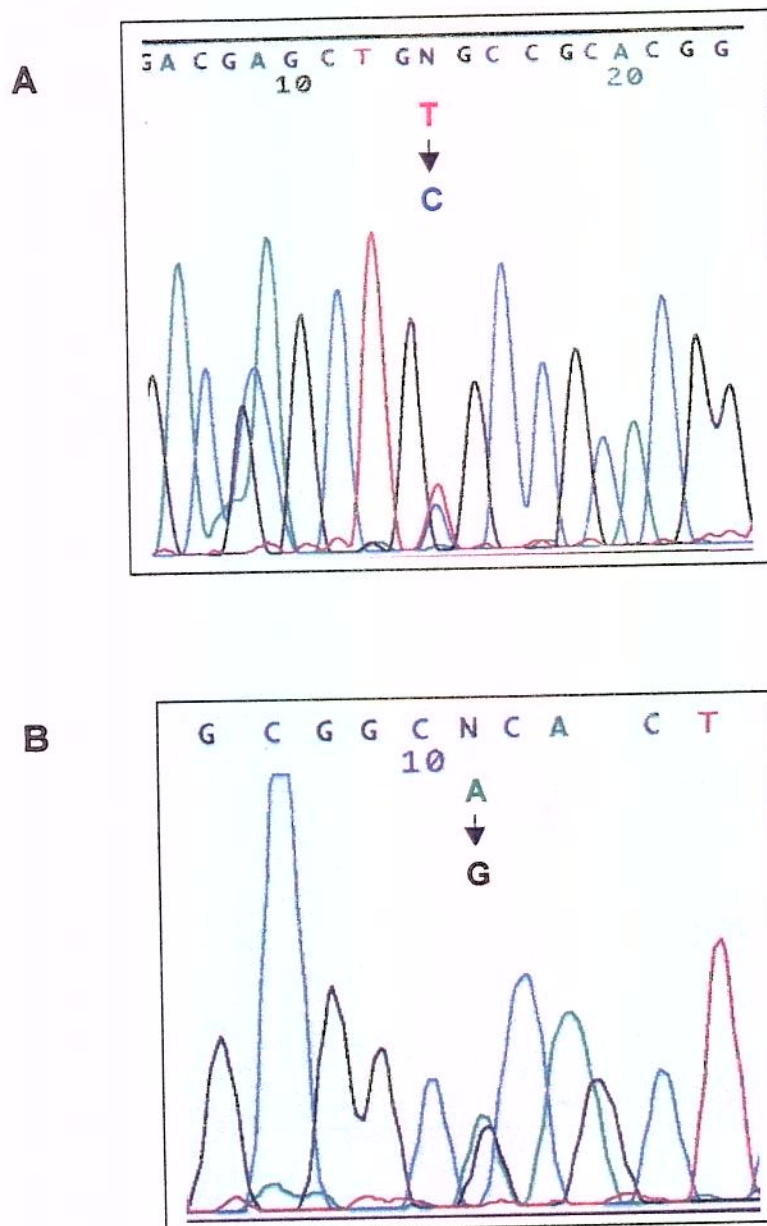


FIGURA 12: Seqüenciamento automático com primer sense (Exon 11s) demonstrativo do fragmento do exon 11 da paciente II-6, caso índice da família 2. (A) primer sense: Seta indica heterozigose no primeiro nucleotídeo do códon 634 (T→C) (B) primer anti-sense: Seta indica heterozigose no segundo nucleotídeo do códon 634 (A→G). A troca resulta na substituição do aminoácido CISTEÍNA por ARGININA (R).

2- ANÁLISE BIOQUÍMICA-TESTE DE ESTÍMULO COM OMEPRAZOL

O teste de estímulo da secreção de calcitonina estimulado pelo omeprazol foi realizado em 11 indivíduos normais, nos casos-índice das famílias 1 e 2 e nos seus familiares.

A Tabela III apresenta os valores individuais, a média e o desvio padrão da média de gastrina, em pg/ml, nos indivíduos controles, antes e após o teste de secreção de calcitonina estimulada pelo omeprazol, enquanto a Tabela IV apresenta os valores observados nos indivíduos das famílias com portadores de NEM 2A. Os dados para gastrina estão apresentados graficamente na figura 13.

As concentrações de gastrina basais nos grupos controles e familiares de pacientes com NEM 2A ($31,7 \pm 12,8$ e $40,2 \pm 15,2$ pg/ml, respectivamente) aumentaram significativamente após o estímulo com omeprazol tanto no grupo controle ($90,6 \pm 44,9$ pg/ml, $p=0,005$) quanto nos portadores assintomáticos ($117,7 \pm 66,9$ pg/ml, $p=0,003$). Os valores individuais de gastrina nas pacientes 1 e 2 também apresentaram elevação após o omeprazol. Não há diferenças quando se associam os casos índices ao grupo de familiares quer nas concentrações basais ou estimuladas ($38,7 \pm 14,0$ e $111,3 \pm 61,6$ pg/ml, respectivamente). Os valores de gastrina observados antes do estímulo (basal) não foram diferentes entre os grupos controle e familiares de NEM 2A ($p=0,2$). O mesmo foi observado após o estímulo com omeprazole ($p=0,3$) (Tabela IV).

As concentrações de calcitonina nos indivíduos controles e nos familiares foram indetectáveis no tempo basal (<10 pg/ml, valor este compatível com a dose mínima detectável do método) e não se elevaram após o estímulo com omeprazol.

Entretanto, a paciente II-7 da família 1 apresentou concentrações basais aumentadas de calcitonina (135 pg/ml), que não se elevaram após o teste com omeprazol (140 pg/ml). O mesmo foi observado com a paciente II-6 da família 2, cujos valores de calcitonina foram 64 e 68 pg/ml, no basal e após estímulo com omeprazol, respectivamente.

Tabela III: Valores individuais de gastrina em pg/ml, nos indivíduos controles, antes e após o teste de secreção de calcitonina estimulada pelo omeprazol.

Controles	Amostra Pré Omeprazol	Amostra Pós Omeprazol
Controle 1	25	45
Controle 2	30	163
Controle 3	39	61
Controle 4	25	67
Controle 5	25	98
Controle 6	25	68
Controle 7	25	129
Controle 8	29	132
Controle 9	26	34
Controle 10	68	146
Controle 11	32	54
Média	31,7	90,6
Desvio Padrão	±12,8	±44,9

Tabela VI: Valores individuais de gastrina em pg/ml, nos casos índices e ns seus familiares, antes e após o teste de secreção de calcitonina estimulada pelo omeprazol.

Familiares	Amostra Pré Omeprazol	Amostra Pós Omeprazol
Família 1 III-9	39	174
Família 1 III-12	25	214
Família 1 III-13	30	179
Família 2 I-1	62	162
Família 2 I-2	43	26
Família 2 II-1	40	73
Família 2 II-2	26	83
Família 2 II-3	30	40
Família 2 II-4	67	108
Média	40,2	117,7
Desvio Padrão	±15,2	66,9
Família 1paciente II-7	35	84
Família 2 paciente II-6	29	81

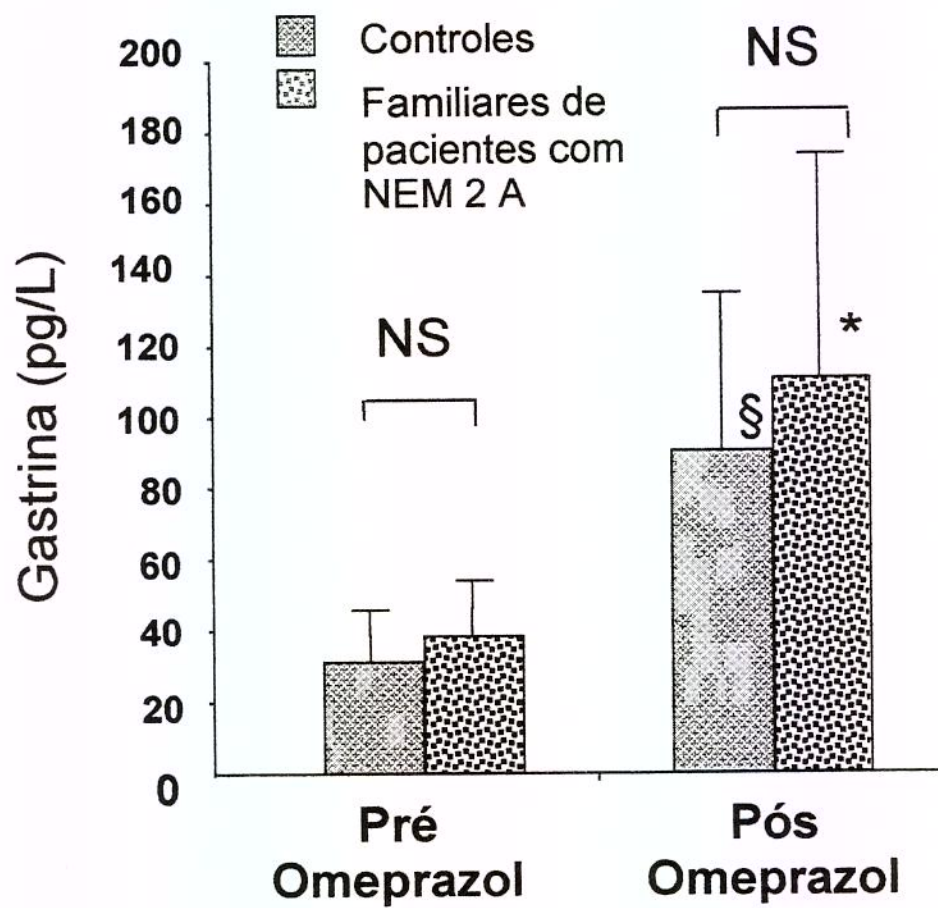


Figura 13: Teste do omeprazol. Concentrações de Gastrina em pg/ml, nos grupos controle e familiares de pacientes com NEM 2 A. § $p=0.005$
* $p=0.003$.

DISCUSSÃO

A frequência de NEM 2A é geralmente subestimada e isso explica as altas taxas de morbidade e mortalidade relacionadas a esta síndrome, especialmente quando o diagnóstico é realizado tardiamente. Este fato enfatiza a necessidade da detecção precoce de portadores assintomáticos de NEM 2A. Portanto, na tentativa de prevenir o CMT em membros de famílias afetadas por esta síndrome, estudos têm sido realizados nos últimos 30 anos utilizando testes bioquímicos, como o estímulo com a pentagastrina ou com a combinação de pentagastrina e cálcio. Estes testes visam detectar anormalidades precoces da secreção de calcitonina e, conseqüentemente, identificar a hiperplasia das células C ou o CMT microscópico, com a possibilidade de indicação de uma terapêutica mais precoce, diminuindo a morbidade desta doença (Chi *et al.*, 1994). Contudo, estes procedimentos de rastreamento bioquímico requerem testes repetidos anualmente, apresentam efeitos colaterais desagradáveis e são caros do ponto de vista econômico. Adicionalmente, não é claro se estes testes podem identificar todos os pacientes com anormalidades das células C antes do desenvolvimento das metástases, não podendo, portanto, serem considerados “gold standard” ou “padrão ouro” para diagnóstico precoce de portadores assintomáticos de NEM. Cabe salientar que, de qualquer forma, muitos pacientes se beneficiaram destes testes, nas últimas décadas, demonstrando o impacto positivo destes esforços de rastreamento na NEM 2A (Gagel, 1998).

A pentagastrina, substância mais estudada como secretagogo de calcitonina, foi retirada de comercialização em muitos países, no final de 1999, dificultando ainda mais a manutenção de testes bioquímicos como a primeira opção no rastreamento de indivíduos portadores de NEM 2A assintomáticos. No final de 1997, Erdogan *et al.*, padronizaram um teste bioquímico para rastreamento de pacientes assintomáticos utilizando o omeprazol, um bloqueador da bomba de prótons, que diminui a secreção de ácido clorídrico, com conseqüente aumento da gastrina endógena que, por sua vez, estimularia a secreção de calcitonina. Neste estudo os autores demonstraram a elevação de calcitonina em três pacientes assintomáticos de famílias com um membro afetado pela NEM 2A, sugerindo que este teste poderia ser utilizado na clínica. Entretanto,

os próprios autores discutem a necessidade de um maior número de casos estudados, para que a sensibilidade e a especificidade do mesmo fossem melhor definidas.

No presente estudo, nós avaliamos 11 controles e 11 membros de duas famílias brasileiras não relacionadas, afetadas pela NEM 2 A. Estes indivíduos foram submetidos ao teste de estímulo de secreção de calcitonina pelo omeprazol. Nós observamos a elevação dos níveis de gastrina, após o tratamento com omeprazol, a valores similares aos reportados na literatura por Erdogan *et al.* (1997), o que indicaria a eficiência do estímulo para secreção de calcitonina em indivíduos com hiperplasia de células C. Cabe ressaltar que tanto no estudo de Erdogan como neste, o estímulo da gastrina endógena não foi suficiente para induzir secreção de calcitonina em controles normais. Contudo, em nosso estudo os membros assintomáticos e os portadores de CMT também não apresentaram o aumento de calcitonina após o teste, enquanto Erdogan *et al.* (1997) demonstraram elevação de calcitonina em três pacientes assintomáticos pertencentes a famílias com pelo menos um membro afetado pela NEM 2A. Mais recentemente, Viégas *et al.* (2000) estudaram um grande número de controles, de pacientes com CMT curados, pacientes com CMT não curados e suas respectivas famílias, utilizando o teste de estimulação de calcitonina induzida pelo omeprazol em paralelo com o teste de infusão de cálcio. Os autores demonstraram que o teste do omeprazol apresentou resultado falso negativos e também concluíram que este teste não foi sensível para diagnosticar CMT assintomáticos. É importante salientar que os diferentes resultados observados neste trabalho e no de Viégas *et al.* (2000) comparados aos de Erdogan *et al.* (1997) podem ser atribuídos aos diferentes ensaios utilizados para mensuração de CT, isto é, IRMA no presente estudo e no de Viégas *et al.* (2000), cujo ensaio é específico para calcitonina humana intacta e RIA no último, que reconhece muitas formas circulantes de CT. Estudos futuros utilizando grandes séries e correlação com achados histopatológicos serão necessários para avaliar a eficácia do teste de estímulo de secreção de calcitonina com omeprazol no diagnóstico precoce de portadores assintomáticos de CMT.

O rastreamento genético para famílias com pacientes apresentando mutações no proto-oncogene *RET*, iniciado em meados da década de 90, tem provado ser útil para identificar portadores assintomáticos de NEM 2A. O rastreamento genético tem se baseado no uso de técnicas de biologia molecular como a PCR e o seqüenciamento de genes. No presente estudo, nós avaliamos do ponto de vista genético, duas famílias brasileiras que apresentavam um caso-índice e histórias clássicas de NEM 2A e observamos mutações no proto-oncogene *RET*. As mutações observadas nas duas famílias brasileiras estão localizadas no códon 634. A paciente-índice da família 1 apresentou mutação em heterozigose no segundo nucleotídeo do códon 634, resultando em TGC→TAC, com substituição do resíduo cisteína por tirosina (C634Y). A família 2 apresentou a troca do primeiro nucleotídeo deste mesmo códon, resultando em TGC→CGC, levando a uma substituição de uma cisteína por arginina (C634R).

Mutações missense em um dos seis códons com cisteína (609, 611, 618 e 620 no exon 10 e códons 630 e 634 no exon 11) são detectáveis em 95% dos casos de NEM 2A (Mulligan, 1995; Eng, 1996). Estudos realizados pelo International *RET* Mutation Consortium, com participação de 18 centros de referência ao redor do mundo e 477 famílias independentes, portadoras de NEM 2A, mostraram que 85% dos casos de NEM 2A tinham mutação no códon 634. A mutação mais freqüentemente encontrada neste códon foi a C634R, ocorrendo em 52% dos casos de NEM 2A, mutação esta observada na família 2; enquanto a segunda mais freqüente, a C634Y, encontrada em 26% dos casos (Eng, 1996) estava presente na família 1. Segundo este mesmo grupo, as mutações no exon 10 afetando o códon 620 ocorreriam em 6 a 8% dos casos, tornando-o o segundo códon mais acometido por mutações na NEM 2A. Menos de 5% dos casos são mutações observadas nos códons 609, 611 e 618 do exon 10 e cerca de 1% estão códon 630 do exon 11 (Mulligan, 1995). Assim, as duas famílias com NEM 2A estudadas apresentam as trocas de aminoácidos, codificadas pelo códon 634 do exon 11 do proto-oncogene *RET*, mais frequentemente encontradas na literatura. Um dado interessante é o fato de que a mutação germinativa C634Y foi observada com maior prevalência em pacientes com NEM 2A, em populações da Espanha

(Sanchez *et al.*, 1999). Estes autores encontraram a mutação C634Y em 73% das 30 famílias portadoras de NEM 2A estudadas, diferindo dos achados do *RET International Consortium*. Os dados de Sanchez *et al.* (1999) foram observados anteriormente em outro estudo espanhol (Oriola *et al.*, 1996), porém em um número menor de portadores de NEM 2A. Estes autores não conseguiram descartar um efeito fundador na população espanhola, provavelmente, esta população foi derivada de ancestrais diferentes daqueles da população retratada no *RET Consortium* (Sanchez *et al.*, 1999).

A mutação C634Y foi detectada na paciente índice da família 1, que apresentava CMT, feocromocitoma e hiperparatiroidismo, e em seu irmão que apresentava apenas CMT. Eles provavelmente herdaram o alelo com mutação de seu pai, que deve ter apresentado CMT não diagnosticado, desde que faleceu de um tumor invasivo no pescoço aos 40 anos de idade. Esta informação é reforçada pelo fato da mãe não apresentar o alelo afetado. O propósito da família 1 transmitiu o alelo mutado para seu filho mais novo, clinicamente assintomático e com teste não responsivo ao estímulo de secreção de calcitonina com omeprazol. Entretanto, baseado no rastreamento genético positivo para a mutação C634Y, esse menino foi submetido a tireoidectomia total, aos nove anos de idade, como preconizado na literatura (Gagel *et al.*, 1988, 1995; Easton *et al.*, 1989; Lips *et al.*, 1994; Wells *et al.*, 1994; Decker *et al.*, 1995). A análise histológica mostrou tecido tireoidiano dentro dos padrões da normalidade, apresentando vários focos microscópicos de proliferação de células C, positivas para calcitonina, confirmando achados da literatura onde as lesões histológicas mais freqüentes nos indivíduos submetidos à cirurgia precoce eram a hiperplasia de células C e CMT microscópico. Em geral, a abordagem genética e a tireoidectomia precoce evitam a doença metastática, reduzem a morbidade e a mortalidade e nesta criança, em particular, foi curativa. A remoção da tireóide, mesmo em indivíduos muito jovens, é bem tolerada e não apresenta complicações maiores do que a necessidade de reposição hormonal adequada, que é simples, fácil, efetiva e de custo aceitável.

O caso índice da família 2 foi o único indivíduo da família a apresentar a mutação C634R, sugerindo uma mutação *de novo* no proto-oncogene *RET*, desde

que a paternidade foi confirmada. Clinicamente, esta paciente apresentava o CMT, feocromocitoma, hiperparatireoidismo, e o raro líquen amiloidótico cutâneo, descrito em associação com a NEM 2A em cerca de 18 famílias. O líquen cutâneo amilóide tem sido associado à NEM 2A, apenas em casos de portadores de mutações no códon 634. Esta mesma mutação (C634Y) já foi demonstrada em membros afetados em uma família portadora de NEM 2A e líquen amiloidótico cutâneo (Ceccherini *et al.*, 1994). Em nosso meio, foi previamente descrita a co-segregação entre o CMT e uma lesão de pele interescapular, característica de líquen amiloidótico cutâneo, em uma outra família brasileira não relacionada (Abrão *et al.*, 1998). A análise por seqüenciamento direto do proto-oncogene *RET* demonstrou a mesma mutação (TGC para CGC no códon 634) observada na paciente-índice da família 2 em nosso estudo. Lee *et al.* (1996) procurando alterações do proto-oncogene *RET* em 7 famílias chinesas portadoras de líquen amiloidótico familiar, mas sem quadro clínico de NEM 2, não mostraram correlação entre o líquen e a região pericentromérica do cromossomo 10. Hofstra *et al.* (1996) também não encontraram mutações no proto-oncogene *RET* em famílias portadoras de líquen amiloidótico cutâneo, concluindo que a amiloidose cutânea encontrada na NEM 2A e o líquen amiloidótico cutâneo familiar são condições diferentes.

Estudos têm sugerido que o códon da modificação nucleotídica parece ser o fator mais importante na determinação do fenótipo que o aminoácido substituído. Existem vários estudos que associam a presença de mutação no códon 634 à presença de feocromocitoma e hiperplasia/adenoma de paratireóides (Eng, 1996). Embora seja menos prevalente que o CMT, o feocromocitoma foi encontrado como achado clínico inicial nos casos-índice das duas famílias. Calmettes *et al.*, em 1992, estudaram 35 famílias francesas com NEM 2A, encontrando o feocromocitoma como primeira manifestação clínica em 30% dos afetados pela síndrome. Embora seja relativamente mais raro, sua presença pode ser um indicativo da presença do CMT, indicando a necessidade de exame físico detalhado da tireóide em pacientes com feocromocitoma e, caso confirmado o CMT, o rastreamento familiar é mandatório.

As mutações observadas na NEM 2 resultam em quadros autossômicos dominantes caracterizados pelo aumento da expressão do gene, em contraste com as mutações relacionadas à Doença de Hirschsprung que, embora sejam dominantes, determinam a perda de expressão do *RET* no tecido nervoso entérico. Enquanto as mutações no códon 634 apresentam forte associação com feocromocitoma, mutações nos códons 609, 618 e 620 estão associadas com CMTF e são observados em dois terços destes pacientes. As famílias que apresentam o fenótipo de Doença de Hirschsprung têm mutações afetando o exon 10, nos códons 609, 618 e 620, com predominância deste último (Eng *et al.*, 1996; Decker *et al.*, 1998; Caron *et al.*, 1996; Bidaud *et al.*, 1997; Reynolds, 1995). Há evidências que as mutações destas cisteínas prejudicam a maturação do receptor e seu transporte para a superfície celular, impedindo sua expressão e explicando seu papel potencial na doença de Hirschsprung, por impedir a expressão na superfície de neurônios entéricos durante a embriogênese. Chakravarti *et al.* (1996) estimaram que as mutações do RET estão presentes em 50% dos casos de HSCR. Sijmons *et al.* (1998) investigaram a possibilidade de pacientes com Doença de Hirschsprung apresentando mutações germinativas no proto-oncogene *RET*, terem risco aumentado de desenvolverem características clínicas da NEM 2A e concluíram que se uma mutação tipo NEM 2A for detectada há necessidade de se proceder à pesquisa dos tumores componentes desta síndrome.

Análises das mutações do *RET* demonstram que alteração no resíduo da cisteína do códon 634 é a que provoca maior atividade transformante, quando comparadas às alterações dos códons 609, 611, 618, 620 e 630, que possuem cerca de 3 a 5 vezes menos atividade transformante *in vitro* (Asai *et al.*, 1995). Resíduos cisteína 634 estão localizados no domínio rico em cisteína na região extramembrana e levam à dimerização e autofosforilação dos resíduos tirosina, além da fosforilação de outras proteínas celulares (Asai *et al.*, 1995 ; Santoro *et al.*, 1995). Outras mutações localizadas nesta região podem ativar quinases intracelulares causando autofosforilação do receptor, na ausência de dimerização (Asai *et al.*, 1995; Santoro *et al.*, 1995). A sinalização na proteína RET mutante resultando na ativação sustentada das vias Ras/ERK e PI3K/AKT, ativa outros

alvos de sinalização, como a fosfolipase C-gama, aumentando a transcrição de fator CREB e da expressão de mRNA c-fos, condições necessárias para transformação de muitas formas oncogênicas do *RET*. Portanto, as mutações observadas na NEM 2 resultam em aumento da expressão do gene que codifica o receptor tirosina-quinase RET, ativando o receptor de forma constitutiva (Baloh *et al.*, 2000 ; Durbec *et al.*, 1996 ; Treanor *et al.*, 1996 ; Ohiwa *et al.*, 1997 ; Widenfalk *et al.*, 1997 ; Robertson *et al.*, 1997)

Os testes provocativos de secreção de calcitonina, utilizados isoladamente, quando apresentam resultados não responsivos adicionam pouca informação quanto ao prognóstico individual de um paciente. Entretanto, dois testes genéticos separados e independentes (coleta de duas amostras sanguíneas e duas reações de PCR) excluem a predisposição genética (Gagel, 1998). A acurácia diagnóstica é próxima a 100%, quando as técnicas de PCR e seqüenciamento são realizadas de forma adequada. Deve-se ressaltar que pode ocorrer resultado falso negativo quando da existência de polimorfismos que impeçam a correta amplificação do DNA mutante (Wohlk, 1996). É ainda fundamental a recomendação de se repetir o exame em caso positivo, evitando a possibilidade de erros na identificação dos pacientes (Wells, 1994; Chi, 1994) ou contaminação das amostras de DNA.

O impacto da abordagem genética no diagnóstico precoce e no acompanhamento de CMT é inegável, pois indicando a tireoidectomia precoce evitaremos a doença metastática, reduzindo a morbidade e a mortalidade desta doença (Skinner, *et al.*, 1997; Laimore *et al.*, 1996). O impacto do rastreamento genético sobre o diagnóstico e acompanhamento dos outros componentes da síndrome de NEM 2A, como o feocromocitoma e o hiperparatireoidismo, está relacionado à exclusão dos 50% de membros da família que apresentam o proto-oncogene *RET* normal. Neste caso tornam-se desnecessários rastreamentos bioquímicos periódicos (Wohlk, 1996). Entretanto, nos indivíduos com mutação positiva os testes funcionais para diagnóstico de feocromocitoma e hiperparatireoidismo ainda deverão ser realizados anualmente ou a cada 2 anos, com o intuito de diagnóstico precoce, evitando-se as morbidades cardiovascular e

osteo-metabólica, secundárias à presença do feocromocitoma e do hiperparatireoidismo de longa evolução.

CONCLUSÕES

- O teste de estímulo de calcitonina induzido pelo omeprazol, recentemente relatado na literatura, ainda é controverso; sugerindo baixa sensibilidade para o rastreamento de portadores assintomáticos de CMT. Estudos avaliando maior número de indivíduos, correlação com outros testes bioquímicos classicamente descritos na literatura, além de correlação com os resultados histopatológicos ainda serão necessários para melhor avaliar a aplicabilidade deste teste.
- Em contraste, o rastreamento de mutações no proto-oncogene *RET* é uma ferramenta diagnóstica poderosa para detecção de portadores assintomáticos de CMT, permitindo tireoidectomia profilática em indivíduos carreadores de mutações, em um estágio clínico precoce, diminuindo a morbidade e a mortalidade secundárias ao CMT.
- O rastreamento genético na NEM tipo 2A promove um dramático exemplo do impacto que a biologia molecular tem sobre o diagnóstico e o seguimento de algumas doenças genéticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGRIST, M. ; BOLK, S. ; THIEL, B. ; PUFFENBERGER, E. G. ; HOFSTRA, R. M. ; BUYS, C. H. ; CASS, D. T. ; CHAKRAVARTI, A. - Mutation analysis of the RET receptor tyrosine kinase in Doença de Hirschsprung. **Hum Mol Genet** .v. 4, n 5, p.821-30, 1995.

ARAÚJO, M. ; SANCHES, M. R. ; SUZUKI, L. A. ; GUERRA, JR G. ; FARAH, S. B. ; MELLO, M. P. - Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. **Braz J Med Biol Res**. v. 29, n.1, p.1-13, 1996.

ASAI, N. ; IWASHITA, T. ; MATSUYAMA, M. & TAKAHASHI, M. - Mechanism of activation of the *RET* proto-oncogene by multiple endocrine neoplasia 2 A mutations. **Molecular Cell Biol** . v. 15, p. 1613-1619, 1995.

ATTIE, T. ; PELET, A. ; EDERY, P. ; ENG, C. ; MULLIGAN, L. M. ; AMIEL, J. ; BOUTRAND, L. ; BELDJORD, C. ; NIHOUL-FEKETE, C. ; MUNNICH, A. *et al* - Diversity of *RET* proto-oncogene mutations in familial and sporadic Doença de Hirschsprung. **Hum Mol Genet**. v. 4, n. 8, p. 1381-6; 1995.

AURICCHIO, A. ; GRISERI, P. ; CARPENTIERI, M. L. ; BETSOS, N. ; STAIANO, A. ; TOZZI, A. *et al* - Double heterozygosity for a *RET* substitution interfering with splicing and an EDNRB missense mutation in Doença de Hirschsprung. **Am J Hum Genet**. v. 64, n. 4, p. 1216-21; 1999.

BABU, V. R. ; JACKSON, C. E. ; VAN DYKE, D. L. - Chromosome 20 deletion in multiple endocrine neoplasia syndrome types 2 A and 2B. **Clin. Res**. v.30, p. 489 only, 1982.

BABU, V. R. ; VAN DYKE, D. L. ; FLEJTER, W. L. ; JACKSON, C. E. - Chromosome 20 deletion in multiple endocrine neoplasia type 2: expanded double-blind studies. **Am. J. Med. Genet**. v. 27, p. 739-748; 1987.

BABU, V. R. ; VAN DYKE, D. L. ; JACKSON, C. E. - Chromosome 20 deletion in human multiple endocrine neoplasia types 2 A and 2B: a double-blind study. **Proc Nat. Acad. Sci.** v. 81, p. 2525-2528, 1984.

BALOH, R.H. ; TANSEY, M.G. ; JOHNSON JR , E. M. ; MILBRANDT, J. - Functional mapping of receptor specificity domains of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) family ligands and production of GFRalpha1 RET-specific agonists. **J Biol Chem.** v. 275, n. 5, p. 3412-20, 2000.

BENNETT, R. L ; STEINHAUS, K. A. ; UHRICH, S. B. ; O'SULLIVAN, C. K. ; RESTA, R. G. ; LOCHNER-DOYLE, D. *et al.* - Recommendations for standardized human Pedigree Nomenclature. **Am. J. Hum. Genet.** v. 56, p.745-752, 1995.

BERNDT, I. ; REUTER, M. ; SALLER, B. ; FRANK-RAUE, K. ; GROTH, P. ; GRUSSENDORF, M. ; RAUE, F. ; RITTER, M. M. ; HOPFNER, W. - A new hot spot for mutations in the *ret* protooncogene causing familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2 A. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 83, n. 3, p. 770-4, 1998.

BIDAUD, C. ; SALOMON, R. ; VAN CAMP, G. ; PELET, A. ; ATTIE, T. ; ET A. L. - Endothelin3 gene mutations in isolated and syndromic Doença de Hirschsprung. **Eur J. Hum. Gene.** v. 5; p. 247-51, 1997.

BLAUGRUND, J. E. ; JOHNS JR, M. M.; EBY, Y.J. ; BALL, D.W. ; BAYLIN, S.B. ; HRUBAN, R.H. ; SIDRANSKY, D. - *RET* proto-oncogene mutations in inherited and sporadic medullary thyroid cancer. **Hum Mol Genet** . v. 3, n. 10, p. 1895-7, 1994.

BOLINO, A. ; SCHUFFENECKER, I. ; LUO Y. ; SERI, M. ; SILENGO, M. ; TOCCO, T. ; CHABRIER, G. ; HOUDENT, C. ; MURAT, A. ; SCHLUMBERGER, M. et al - *RET* mutations in exons 13 and 14 of FMTC patients. **Oncogene**. v. 10, n. 12, p. 2415-9, 1995.

BOLK, S. ; PELET, A. ; HOFSTRA, R. M. ; ANGRIST, M. ; SALOMON, R. ; CROAKER, D. ; BUYS, C. H. ; LYONNET, S. ; CHAKRAVARTI, I. A. - A human model for multigenic inheritance: phenotypic expression in Doença de Hirschsprung requires both the *RET* gene and a new 9q31 locus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 1, p. 268-73, 2000.

BORGANZONE, I. ; MONZINI, N. ; BORRELLO, C. G. ; CARCANO, C. ; FERRARESI, G. ; ARIGHI, E. ; MONDELLINI, P. ; DELLA PORTA, G. & PIEROTTI, M.A. - Molecular characterization of a thyroid tumor-specific transforming sequence formed by the fusion of RET tyrosine kinase and regulatory subunit RI of cyclic AMP-dependent protein kinase A. **Molecular Cell Biology**. n. 13, p. 358-366, 1993.

BORREGO, S. ; SAEZ, M. E. ; RUIZ, A. ; GIMM, O. ; LOPEZ-ALONSO, M. ; ANTINOLO, G. ; ENG, C. - Specific polymorphisms in the *RET* proto-oncogene are over-represented in patients with Doença de Hirschsprung and may represent loci modifying phenotypic expression. **J Med Genet.**, n. 36, v. 10, p. 771-4, 1999.

BUJ-BELLO, A. ; ADU, J. ; PINON, L. G. ; HORTON, A. ; THOMPSON, J. ; ROSENTHAL, A. ; CHINCHETRU, M. ; BUCHMAN, V. L. ; DAVIES, A. M. - Neurturin responsiveness requires a GPI-linked receptor and the Ret receptor tyrosine kinase. **Nature**. v. 387, n. 6634, p.721-4, 1997.

CALMETTES, C. ; PONDER, B. A. J. ; FISCHER, J. A. ; RAUE, F. - The members of the European Community Concerted Action : Medullary Thyroid

Carcinoma: Early diagnosis of the multiple endocrine neoplasia type 2 syndrome: consensus statement. **Europ. J. Clin. Invest.** v. 22, p. 755-760, 1992.

CARLSON, K. M. ; DOU, S. ; CHI, D.; SCAVARDA, N. ; TOSHIMA, K. ; JACKSON, C. E. ; WELLS, S. A. JR; GOODFELLOW, P. J. ; DONIS-KELLER, H. - Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the *RET* protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. **Proc Natl Acad Sci U S A** . v. 91, n. 4, p. 1579-83, 1994.

CARON, P. ; ATTIE, T. ; DAVID, D. ; AMIEL, J. ; BROUSSET, F. M. ; ROGER, P. ; MUNNICH, A. ; LYONNET, S. - C618R mutation in exon 10 of the *RET* protooncogene in a kindred with multiple endocrine neoplasia type 2 A and Hirschsprung's disease. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 81, n. 7, p. :2731-3,1996.

CARVALHO, C. E. ; CASTRO, M. ; MOREIRA, A. C. & DE MELLO, M. P. - CYP11B1 Mutation and polymorphisms in congenital adrenal hyperplasia due to 11-beta hydroxylase deficiency. **J Endoc Genet.** v. 1, p. 79-86, 1999.

CASANOVA, S. ; ROOSENBER-BOURGIN, M. ; FARKAS, D. ; CALMETTES, C. ; FEINGOLD, N. ; HESHMATI, H. M. ; COHEN, R. ; CONTE-DEVOIX, B. ; GUILLAUSEAU, P. J. ; HOUDENT, C. *et al.*; Pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2 A: survey of 100 cases. **Clin Endocrinol.** v 38; n 5; p 531-7, 1993.

CECCHERINI, I. ; HOFSTRA, R. M. ; LUO, Y. ; STULP, R. P. ; BARONE, V. ; STELWAGEN, T. ; BOCCIARDI, R. ; NIJVEEN, H. ; BOLINO, A. ; SERI, M. *et al.* DNA polymorphisms and conditions for SSCP analysis of the 20 exons of the *ret* proto-oncogene. **Oncogene.** n. 9, v. 10, p. 3025-9,1994.

CECCHERINI, I. ; ROMEI, C. ; BARONE, V. ; PACINI, F. ; MARTINO, E. ; LOVISELLI, A. ; PINCHERA, A. & ROMEO, G. - Identification of the Cys634→Tyr mutation of the *RET* proto-oncogene in a pedigree with multiple endocrine neoplasia type 2 A and localized cutaneous lichen amyloidosis. **J Endoc Invest.** v. 17, p. 201-204. 1994.

CHABRE, O. ; LABAT, F. ; PINEL, N. ; BERTHOD, F. ; TAREL, V. ; BACHELOT, I. - Cutaneous lesion associated with multiple endocrine neoplasia type 2 A: lichen amyloidosis or notalgia paresthetica? **Henry Ford Hosp Med J.** v. 40, n. 3-4, p. 245-8, 1992.

CHAKRAVARTI, A. - Endothelin receptor-mediated signaling in Doença de Hirschsprung. **Hum. Molec. Genet.** v. 5, p. 303-307, 1996.

CHI, D.D. ; TOSHIMA, K. ; DONIS-KELLER, H. ; WELLS, S. A. Jr. - Predictive testing for multiple endocrine neoplasia type 2 A (MEN 2 A) based on the detection of mutations in the *RET* protooncogene. **Surgery.** v. 116, n. 2, p. 124-32; discussion p. 132-3, 1994

COHEN, R. et al. Preoperative Calcitonin Levels Are Predictive of Tumor Size and Postoperativ Calcitonin Normalization in Medullary Thyroid Carcinoma. **J Clin Endoc Metab.** v. 85, p. 919-919, 2000.

COSMA, M. P. ; CARDONE, M. ; CARLOMAGNO, F. ; COLANTUONI, V. - Mutations in the extracellular domain cause RET loss of function by a dominant negative mechanism. **Mol Cell Biol.** v. 18, n. 6, p. 3321-9, 1998.

CRYER, P. E. - Disease of the Sympathochromaffin System. In *Endocrinology and Metabolism*. 3th edition. P Felig; JK Baxter; LA Frohman; Eds.; p. 726-727 **McGraw-Hill; INC.**, 1998.

DECKER, R. A. ; PEACOCK, M. L. ; WATSON, P. - Doença de Hirschsprung in MEN 2A: increased spectrum of *RET* exon 10 genotypes and strong genotype-phenotype correlation. **Hum Mol Genet** . v. 7, n. 1, p. 129-34, 1998.

DECKER, R. A. ; PEACOCK, M. L. ; BORST, M. J. ; SWEET, J. D. & THOMPSON, N. W. (1995) - Progress in genetic screening of multiple endocrine neoplasia type 2 A: is calcitonin testing obsolete? **Surgery**; v. 118; p. 257-63; discussion p. 263-4.

DEFTOS, L. ; CATHERWOOD, B. ; BONE III, H. G. - Multiglandular Endocrine Disorders. In **Endocrinology and Metabolism** . P. Felig; J. D. Baxter; L. A. Frohman Eds. 3th edition. pp 1709-1711. MacGraw-Hill; 1995.

DONIS-KELLER, H. ; DOU, S. ; CHI, D. ; CARLSON, K. M. ; TOSHIMA, K. ; LAIRMORE, T. C. ; HOWE, J. R. ; MOLEY, J. F. ; GOODFELLOW, P. ; WELLS, S. A. Jr - Mutations in the *RET* proto-oncogene are associated with MEN 2 A and FMTC. **Hum Mol Genet** v. 2, n. 7, p. 851-6, 1993.

DONIS-KELLER, H. - The *RET* proto-oncogene and cancer. **J Inter Med** . v. 238, p. 319-325, 1995.

DURBEC, P. ; MARCOS-GUTIERREZ, C. V. ; KILKENNY, C. ; GRIGORIOU, M. ; WARTIOWAARA, K. ; SUVANTO, P. ; SMITH, D. ; PONDER, B. ; COSTANTINI, F. ; SAARMA, M. et al. - GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. **Nature**. v. 381, n. 6585, p. 789-93, 1996.

EASTON, D. F. ; PONDER, M. A. ; CUMMINGS, T. ; GAGEL, R. F. ; HANSEN, H. H. ; REICHLIN, S. ; TASHJIAN, A. H. JR ; TELENIOUS-BERG, M. & PONDER, B. A - The clinical and screening age-at-onset distribution for the MEN-2 syndrome. **Am J Hum Genet**. v. 44, p. 208-15, 1989.

EDERY, P. ; LYONNET, S. ; MULLIGAN, L. M. ; PELET, A. ; DOW, E. ; ABEL, L. ; HOLDER, S. ; NIHOUL-FEKETE, C. ; PONDER, B. A. ; MUNNICH, A. - Mutations of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. **Nature** . v. 367, n. 6461, p. 378-80, 1994.

EISENHOFER, G. ; LENDERS, J. W. ; LINEHAN, W. M. ; WALTHER, M. M. ; GOLDSTEIN, D. S. ; KEISER, H. R. - Plasma normetanephrine and metanephrine for detecting pheochromocytoma in von Hippel-Lindau disease and multiple endocrine neoplasia type 2. **N Engl J Med**. v. 340, n. 24, p.1872-9,1999.

EMMERTSEN, K. ; LAMM, L. U. ; RASMUSSEN, K. Z. ; ELBROND, O. ; HANSEN, H. H. ; HENNINGSEN, K. ; JORGENSEN, J. ; PETERSEN, G. B. - Linkage and chromosome study of multiple endocrine neoplasia IIa. **Cancer Genet. Cytogenet**. v. 9, p. 251-259, 1983.

ENG, C & MULLIGAN, L. M. - Mutations of the *RET* proto-oncogene in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes; related sporadic tumours; and Doença de Hirschsprung. **Hum Mutat** , v. 9, n. 2, p. 97-109, 1997.

ENG, C. ; CLAYTON, D.; SCHUFFENECKER, I. ; LENOIR, G. ; COTE, G. ; GAGEL, R. F. *et al.*- The relationship between specific *RET* proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2: International *RET* mutation Consortium analyses. **J Am Med Assoc**. v. 276, p. 1575-1579, 1996.

ENG, C. ; SMITH, D. P. ; MULLIGAN, L. M. ; HEALEY, C. S. ; ZVELEBIL, M. J. ; STONEHOUSE, T. J. ; PONDER, M. A. ; JACKSON, C. E. ; WATERFIELD, M. D. ; PONDER, B. A. - 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** . v. 10, n. 3, p. 509-13, 1995.

ERDOGAN, M. F. ; GULLU, S. ; BASKAL, N. ; UYSAL, A. R. ; KAMEL, N. & ERDOGAN, G. - Omeprazole: calcitonin stimulation test for the diagnosis follow-up and family screening in medullary thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 82, p. 897-899, 1997.

FAIÇAL, S. & SHIOTA, D. - Feocromocitoma: atualização diagnóstica e terapêutica. **Rev Assoc Med Brasil**; v. 43, n. 3, p. 237-44, 1997.

FARRER, L. A. ; GOODFELLOW, P. J. ; WHITE, B. N. ; HOLDEN, J. J. A. ; KIDD, J. R. ; SIMPSON, N. E. ; KIDD, K. K. - Linkage analysis of multiple endocrine neoplasia type 2 A (MEN-2 A) and three DNA markers on chromosome 20: evidence against syteny. **Cancer Genet. Cytogenet.** v. 27, p. 327-334, 1987.

FATTORUSO, O. ; QUADRO, L. ; LIBROIA, A. ; VERGA, U. ; LUPOLI, G. ; CASCONI, E. ; COLANTUONI, V. - A GTG to ATG novel point mutation at codon 804 in exon 14 of the *RET* proto-oncogene in two families affected by familial medullary thyroid carcinoma. **Hum Mutat.** Suppl 1, p. 167-71, 1998.

FRANK-RAUE, K. ; HOPFNER, W. ; FRILLING, A. ; KOTZERKE, J. ; DRALLE, H. ; HAASE, R. *et al.* - Mutations of the *ret* protooncogene in German multiple endocrine neoplasia families: relation between genotype and phenotype. German Medullary Thyroid Carcinoma Study Group. **J Clin Endocrinol Metab** v. 81, n. 5, p. 1780-3, 1996.

FRANZ, M. G. - Medullary Thyroid Cancer. **Cancer Control.** v. 4, n. 1, p. 25-29, 1997.

FUNDIN, B. T. ; MIKAELS, A. ; WESTPHAL, H. ; ERNFORS, P. - A rapid and dynamic regulation of GDNF-family ligands and receptors correlate with the developmental dependency of cutaneous sensory innervation. **Development.** v. 126, n. 12, p. 2597-610, 1999.

GAGEL, R. F. & COTE, G. J. - Decision making in multiple neoplasia type 2. **Advances in Endocrinology and Metabolism**. v. 5, p.1-18, 1994.

GAGEL, R. F. ; COTE, G. J. ; MARTINS BUGALHO, M. J. ; BOYD, A.E. 3RD ; CUMMINGS, T. ; GOEPFERT, H. ; EVANS, D. B. ; CANGIR, A. ; KHORANA, S. & SCHULTZ, P. N. - Clinical use of molecular information in the management of multiple endocrine neoplasia type 2 A. **Journal of Internal Medicine**. v. 238, p. 333-41, 1995.

GAGEL, R. F. ; LEVY, M. L. ; DONOVAN, D. T. ; ALFORD, B. R. ; WHEELLES, T. & TSCHEN, J. A. - Multiple endocrine neoplasia type 2 A associated with cutaneous lichen amyloidosis. **Annals of Internal Medicine**. v. 111, p. 802-806, 1989.

GAGEL, R. F. ; TASHJIAN, A. H. JR ; CUMMINGS, T. ; PAPATHANASOPOULOS, N. ; KAPLAN, M. M. ; DELELLIS, R. A. ; WOLFE, H. J. & REICHLIN, S. - The clinical outcome of prospective screening for multiple endocrine neoplasia type 2 A. An 18-year experience. **N Engl J Med**. v. 318, p. 478-84, 1988.

GAGEL, R. F. - Multiple endocrine neoplasia. In: Williams Textbook of Endocrinology (ed. J. D. Wilson; D.W. Foster; H.M. Kronenberg & P.R. Larsen). pp. 1627-1649. **WB Saunders**; Philadelphia. 1998.

GARCIA, S. M. L. - Desenvolvimento do sistema nervoso. In Embriologia. SML Garcia; E Jeckel Neto; CG Fernandez Eds. **Artes Médicas**. Porto Alegre; 1991.

GENESTE, O. ; BIDAUD, C. ; DE VITA, G. ; HOFSTRA, R. M. ; TARTARE-DECKERT, S. ; BUYS, C. H. ; LENOIR, G. M. ; SANTORO, M. ; BILLAUD, M. - Two distinct mutations of the RET receptor causing Hirschsprung's disease impair the binding of signalling effectors to a multifunctional docking site. **Hum Mol Genet**. v. 8, n. 11, p. 1989-99, 1999

GIMM, O. ; MARSH, D. J. ; ANDREW, S. D. ; FRILLING, A. ; DAHIA, P. L. ; MULLIGAN, L. M. ; ZAJAC, J. D. ; ROBINSON, B. G. ; ENG, C. - 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** . v. 82, n. 11, p. 3902-4, 1997.

GOODFELLOW, P. J. - Mapping the inherited defects associated with multiple endocrine neoplasia type 2 A; multiple endocrine neoplasia type 2B; and familial medullary thyroid carcinoma to chromosome 10 by linkage analysis. In **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America - Multiple Endocrine Neoplasia**. RF Gagel; Ed.; W B Saunders. v. 23; n1; p 177-185; 1994.

GOODFELLOW, P. J. ; WHITE, B. N. ; HOLDEN, J. J. A. ; DUNCAN, A. M. V ; SEARS, E. V. P. ; WANG, H. S. ; BERLIN, L. ; KIDD, K. K.; SIMPSON, N. E. - Linkage analysis of a DNA marker localized to 20p12 and multiple endocrine neoplasia type 2 A. **Am. J. Hum. Genet.** v. 37, p. 890-897, 1985.

GUSTAVSON, K. H. ; JANSSON, R. ; OBERG, K. - Chromosomal breakage in multiple endocrine adenomatosis (types I and II). **Clin. Genet.** v. 23, p. 143-149, 1983.

HAZARD, J. B. ; HAWK, W. A. ; CRILE, G. J. - Medullary (solid) carcinoma of the thyroid: A clinico-pathologic entity. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 19, p. 152, 1959.

HERNANDEZ, G ; SIMO, R. ; ORIOLA, J. ; MESA, J. - False-positive results of basal and pentagastrin-stimulated calcitonin in non-gene carriers of multiple endocrine neoplasia type 2 A. **Thyroid** .v. 7, n. 1, p. 51-54, 1997.

HESHMATI, H. M. ; GHARIB, H. ; VAN HEERDEN, J. A. ; SIZEMORE, G. W. - Advances and controversies in the diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma. **Am J Med.** 103(1): 60-69, 1997.

HOFSTRA, R. M. ; FATTORUSO, O. ; QUADRO, L. ; WU, Y. ; LIBROIA, A. ; VERGA, U. ; COLANTUONI, V. ; BUYS, C. H. - A novel point mutation in the intracellular domain of the *ret* protooncogene in a family with medullary thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 82, n. 12, p. 4176-8, 1997.

HOFSTRA, R. M. W. ; SIJMONS, R. H.; STELWAGEN, T. ; STULP, R. P. ; KOUSSEFF, B. G. ; LIPS, C. J. M. ; STEIJLEN, P. M. ; VAN VOORST VADER, P. C. ; BUYS, C. H. C. M. - *RET* mutation screening in familial cutaneous lichen amyloidosis and in skin amyloidosis associated with multiple endocrine neoplasia. **J. Invest. Derm.** v. 107, p. 215-218, 1996.

HOPPNER, W. ; DRALLE, H. ; BRABANT, G. - Duplication of 9 base pairs in the critical cysteine-rich domain of the *RET* proto-oncogene causes multiple endocrine neoplasia type 2 A. **Hum Mutat .** Suppl 1: p. 128-30, 1998.

HOPPNER, W. ; RITTER, M. M. - A duplication of 12 bp in the critical cysteine rich domain of the *RET* proto-oncogene results in a distinct phenotype of multiple endocrine neoplasia type 2 A. **Hum Mol Genet .** v. 6, n. 4, p. 587-90, 1997.

ISHIZAKA, Y. ; ITOH, F. ; TAHIRA, T. ; IKEDA, I. ; SUGIMURA, T. ; TUCKER, J. ; FERTITTA, A. ; CARRANO, A. V. ; NAGAO, M. - Human *ret* proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. **Oncogene .** v. 4, p. 1519-1521, 1989.

KAKUDO, K. ; CARNEY, J. A. ; SIZEMORE, G. W. - Medullary carcinoma of thyroid: Biologic behavior of the sporadic and familial neoplasm. **Cancer.** v. 55, p. 2818, 1985.

KAMBOURIS, M. ; JACKSON, C. E. ; FELDMAN, G. L. - Diagnosis of multiple endocrine neoplasia (MEN) 2 A; 2B and familial medullary thyroid cancer (FMTC) by multiplex PCR and heteroduplex analyses of *RET* proto-oncogene mutations. **Hum Mutat.** v. 8, n.1, p. 64-70, 1996.

KITAMURA, Y. ; GOODFELLOW, P. J. ; SHIMIZU, K. ; NAGAHAMA, M. ; ITO, K. ; KITAGAWA W. ; AKASU, H. ; TAKAMI, H. ; TANAKA, S. ; WELLS, S. A. Jr - Novel germline *RET* proto-oncogene mutations associated with medullary thyroid carcinoma (MTC): mutation analysis in Japanese patients with MTC. **Oncogene.** v. 14, n. 25, p. 3103-6, 1997.

KITAMURA, Y. ; SCAVARDA, N. ; WELLS, S. A. JR; JACKSON, C. E. ; GOODFELLOW, P. J. - Two maternally derived missense mutations in the tyrosine kinase domain of the *RET* protooncogene in a patient with de novo MEN 2B. **Hum Mol Genet .** v. 4, n. 10, p. 1987-8, 1995.

KUSAFUKA, T. ; WANG, Y. ; PURI, P. - Mutation analysis of the *RET*; the endothelin-B receptor; and the endothelin-3 genes in sporadic cases of Hirschsprung's disease. **J Pediatr Surg.** v. 32, n. 3, p. 501-4 , 1997.

KWOK, J. B. J. ; GARDNER, E. ; WARNER, J. P. ; PONDER, B. A. J. & MULLIGAN, L. M. - Structural analysis of the human *RET* proto-oncogene by exon trapping. **Oncogene.** v. 8, p. 2572-2582, 1993.

LAIMORE, T. C. ; FRISELLA, M. M. ; WELLS, A. S. Jr. Genetic testing and early thyroidectomy for inherited medullary thyroid carcinoma. **Ann Med .** v. 28, n. 5, p. 401-406, 1996.

LAIRMORE, T. C. ; HOWE, J. R. ; KORTE, J. A. ; DILLEY, W. G. ; AINE, L. ; AINE, E. ; WELLS, S. A. Jr. ; DONIS-KELLER, H. - Familial medullary thyroid carcinoma

and multiple endocrine neoplasia type 2B map to the same region of chromosome 10 as multiple endocrine neoplasia type 2 A. **Genomics** . v.9, p.181-192, 1991.

LANDSVATER, R. M. ; JANSEN, R. P. ; HOFSTRA, R. M. ; BUYS, C. H. ; LIPS C. J. ; PLOOS VAN AMSTEL, H. K. - Mutation analysis of the *RET* proto-oncogene in Dutch families with MEN 2 A; MEN 2B and FMTC: two novel mutations and one de novo mutation for MEN 2 A. **Hum Genet** . v. 97, n. 1, p. 11-4, 1996.

LEAROYD, L.; MARSH, D.; RICHARDSON, A.; TWIGG, S.M.; DELBRIDGE, L.; ROBINSON, B. G. -Genetic Testing for Familial Cancer. **Arch Surg**. v. 132, n. 9, p. 1022-1025. 1997

LEE, D.D.; HUANG, J.Y.; WONG, C.K.; GAGEL, R.F.; TSAI, S.F.-Genetic heterogeneity of familial primary cutaneous amyloidosis: lack of evidence for linkage with the chromosome 10 pericentromeric region in Chinese families. **J Invest Dermatol**. v. 107, n. 1, p. 30-3, 1996.

LIBBEY, N.P.; NOWAKOWSKI, K.J.; TUCCI, JR. -C-cell hyperplasia of the thyroid in a patient with goitrous hypothyroidism and Hashimoto's thyroiditis. **Am j Surg Pathol**_v. 13, p. 71, 1971.

LIPS, C.J.; LANDSVATER, R.M.; HOPPENER, J.W.; GEERDINK, R.A.; BLIJHAM, G.; VAN VEEN, J.M. *et al.* -Clinical screening as compared with DNA analysis in families with multiple endocrine neoplasia type 2 A. **N Engl J Med**. v. 331, p. 828-835, 1994.

LORENZO, M.J.; ENG, C.; MULLIGAN, L.M.; STONEHOUSE, T.J.; HEALEY, C.S.; PONDER, B.A.J. & SMITH, D.P. - Multiple mRNA isoforms of the human *RET* proto-oncogene generated by alternate splicing. **Oncogene**. v- 10, p. 1377-1383, 1995.

MACIEL, R.M.B. -Câncer da Tireóide. In Tratado de Endocrinologia Clínica. (organização de) BL Wajchenberg Ed.; 1ª edição. **Roca**. São Paulo; 1992.

MAHAFFEY, S. M.; MARTIN, L. W.; MCADAMS, A. J.; RYCKMAN, F. C.; TORRES, M. - Multiple endocrine neoplasia type IIB with symptoms suggesting Hirschsprung's disease: a case report. **J. Pediat. Surg.** v. 25, p. 101-103, 1990.

MARSH, D.J.; ROBINSON, B.G.; ANDREW, S.; RICHARDSON, A.L.; POJER, R.; SCHNITZLER, M.; MULLIGAN, L.M.; HYLAND, V.J. -A rapid screening method for the detection of mutations in the *RET* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 A and familial medullary thyroid carcinoma families. **Genomics**. v. 23, n. 2, p. 477-9, 1994.

MATIAS-GUIU, X.; COLOMER, A.; MATO, E.; CUATRECASAS, M.; KOMMINOTH, P.; PRAT, J.; WOLFE, H. -Expression of the *ret* proto-oncogene in pheochromocytoma. An in situ hybridization and northern blot study. **J Pathol.** v. 176; p. 63-8; 1995.

MAYR, B.; BRABANT, G.; VON ZUR MUHLEN, A. -Incidental detection of familial medullary thyroid carcinoma by calcitonin screening for nodular thyroid disease. **Eur J Endocrinol.** v. 141, n. 3, p. 286-9, 1999.

McMAHON, R.; MULLIGAN, L.M.; HEALEY, C.S.; PAYNE, S.J.; PONDER, M.; FERGUSON-SMITH, M.A.; BARTON, D.E.; PONDER, B.A. -Direct; non-radioactive detection of mutations in multiple endocrine neoplasia type 2 A families. **Hum Mol Genet** . v. 3, n. 4, p. 643-6, 1994.

MELVIN, K.E.W.; MILLER, H.H.; TASHJIAN, A.H.J. - Early diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland by means of calcitonin assay. **N Engl J Med.** v. 285, p. 527, 1987.

MOORE, K.L. & PERSAUD, T.V.N. - O Aparelho Faríngeo. In **Embriologia Básica**. 5th edition. 171-189. DLM Moore & TVN Persaud Eds. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

MULLIGAN, L.M.; ENG, C.; ATTIE T.; LYONNET, S.; MARSH, D.J.; HYLAND, V.J.; ROBINSON, BG; FRILLING, A; VERELLEN-DUMOULIN, C; SAFAR - A Diverse phenotypes associated with exon 10 mutations of the *RET* proto-oncogene. **Hum Mol Genet** . v. 3, n. 12, p. 2163-7, 1994.

MULLIGAN, L.M.; KWOK, J.B.J.; HEALEY, C.S.; ELSDON, M.J.; ENG, C.; GARDNER, E. *et al.* Germline mutations of the *RET* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 A (MEN 2 A). **Nature**. v. 363, p. 458-460, 1993.

MYERS, S.M.; ENC, C.; PONDER, V.A..J. & MULLIGAN, L.M. - Characterization of *RET* proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C-terminal for RET. **Oncogene**. v. 11, p. 2039-2045, 1995.

NAKAMURA, T.; ISHIZAKA, Y.; NAGAO, M.; HARA, M. & ISHIKAWA, T. Expression of the *RET* proto-oncogene product in human normal and neoplastic tissues of neural crest origin. **J Pathol**.v. 172, p. 255-260.1994.

OHIWA, M.; MURAKAMI, H.; IWASHITA, T.; ASAI, N.; IWATA, Y.; IMAI, T.; FUNAHASHI, H.; TAKAGI, H.; TAKAHASHI, M. -Characterization of Ret-Shc-Grb2 complex induced by GDNF; MEN 2 A; and MEN 2B mutations. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 28, v. 237, n. 3, p.747-51, 1997.

ORIOLA, J.; HERNANDEZ, C.; SIMO, R.; *et al.* -Genetic analysis of seven Mediterranean families with multiple endocrine neo-plasia type 2 A. **Clin Endocrinol**. v. 44, p. 207-12,1996.

ORIOLO, J.; PARAMO, C.; HALPERIN, I.; GARCIA-MAYOR, R.V.; RIVERA-FILLAT, F. -Novel point mutation in exon 10 of the *RET* proto-oncogene in a family with medullary thyroid carcinoma. **Am J Med Genet.** v. 78, n. 3, p. 271-3, 1998.

PACINI, F.; MARTINO, E.; ROMEI, C.; CECCHERINI, I.; BASOLO, F.; IACCONI, P.; PINCHERA, A. -Treatment of preclinical medullary thyroid carcinoma in MEN 2 A gene carrier. **Lancet.** v. 344, n. 8929, p. 1084-5, 1994.

PASINI, A.; GENESTE, O.; LEGRAND, P.; SCHLUMBERGER, M.; ROSSEL, M.; FOURNIER, L.; RUDKIN, B.B.; SCHUFFENECKER, I.; LENOIR, G.M.; BILLAUD, M. -Oncogenic activation of RET by two distinct FMTC mutations affecting the tyrosine kinase domain. **Oncogene.** v. 15, p. 393-402, 1997.

PASINI, B.; HOFSTRA, R. M. W.; YIN, L.; BOCCIARDI, R.; SANTAMARIA, G.; GROOTSCHOLTEN, P. M.; CECCHERINI, I.; PATRONE, G.; PRIOLO, M.; BUYS, C. H. C. M.; ROMEO, G. - The physical map of the human *RET* proto-oncogene. **Oncogene.** v. 11, p. 1737-1743, 1995.

PASSARGE, E. -The genetics of Hirschsprung's disease: evidence for heterogeneous etiology and a study of sixty-three families. **N Engl. J. Med.** v. 276, p. 138-143, 1967.

PERRIER, P.; THOMAS, J. L.; BONAÏTI-PELLIE, C.; GAY, G.; LECLERE, J.; STREIFF, F. : Lack of linkage between HLA and multiple endocrine neoplasia type 2 in a French family. **Tissue Antigens.** v. 29, p. 13-17, 1987.

PIGNY, P.; BAUTERS, C.; WEMEAU, J.L.; HOUCKE, M.L.; CREPIN, M.; CARON, P.; GIRAUD, S.; CALENDER, A.; BUISINE, M.P.; KERCKAERT, J.P.; PORCHET, N. - A novel 9-base pair duplication in *RET* exon 8 in familial medullary thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 84, n. 5, p. 1700-4, 1999

PONDER, B.A.; PONDER, M.A.; COFFERY, R.; et al. -Risk estimation and screening in families of patients with medullary thyroid carcinoma. - **Lancet** . v. 1, p. 397, 1988.

QUINT, L.E.; GLAZER, G.M.; FRANCIS, I.R.; et al. - Pheochromocytoma and paragangliomas: Comparison of MR imaging with CT and I-131 MIBG szintigraphy. **Radiology**.p. 165-89, 1987

RAUE, F.; FRANK-RAUE, K.; GRAUER, A. -Multiple endocrine neoplasia type 2 - Clinical features and screening. In **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America - Multiple Endocrine Neoplasia**. Gagel, R.F.; Ed.; W B Saunders Company; v. 23; n.1, p. 137-156, 1994.

REYNOLDS, L.F. & ENG, C. -*Ret* mutation in multiple endocrine neoplasia type 2 and Doença de Hirschsprung. **Curr Opin. Pediatr**, v. 7; p. 702-9, 1995.

ROBERTSON, K.; MASON, I. -The GDNF-RET signalling partnership. **Trends Genet**. v. 13, n. 1, p. 1-3, 1997.

ROBINSON, M.F.; FURST, E.J.; NUNZIATA, V.; BRANDI, M.L.; FERRER, J.P.; MARTINS BUGALHO, M.J.; DI GIOVANNI, G.; SMITH, R.J.; DONOVAN, D.T.; ALFORD, B.R.; et al. -Characterization of the clinical features of five families with hereditary primary cutaneous lichen amyloidosis and multiple endocrine neoplasia type 2. **Henry Ford Hosp Med J**. v. 40, n. 3-4, p. 249-52, 1992.

ROMEO, G.; RONCHETTO, P.; LUO, Y.; BARONE, V.; SERI, M.; CECCHERINI, I.; PASINI, B.; BOCCIARDI, R.; LERONE, M.; KAARIAINEN, H.; et al. - Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the *RET* proto-oncogene in Hirschsprung's disease. **Nature**. v. 367 ,n. 6461, p. 377-8, 1994

RUSO, D.; ARTURI, F.; CHIEFARI, E.; MERINGOLO, D.; BIANCHI, D.; BELLARNOVA, B.; FILETTI, S. -A case of metastatic medullary thyroid carcinoma: early identification before surgery of a *RET* proto-oncogene somatic mutation in fine-needle aspirate specimens. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 82, n.10, p. 3378-3382, 1997.

SALOMON, R.; ATTIE, T.; PELET, A.; BIDAUD, C.; ENG, C.; AMIEL, J.; SARNACKI, S.; GOULET, O.; RICOUR, C.; NIHOUL-FEKETE, C.; MUNNICH, A.; LYONNET, S. -Germline mutations of the RET ligand GDNF are not sufficient to cause Doença de Hirschsprung. **Nat Genet.** v 14, n.3, p. 345-7, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. -Molecular cloning –**A Laboratory Manual**; 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. 1989

SANCHEZ, B.; ROBLEDO, M.; BIARNES, J.; SAEZ, M.E.; VOLPINI, V.; BENITEZ, J. *et al.* -High prevalence of the C634Y mutation in the *RET* proto-oncogene in MEN 2 A families in Spain. **J Med Genet.** v. 36, p. 68-70, 1999.

SANTORO, M.; CARLOMAGNO, F.; ROMANO, A.; BOTTARO, D.P.; DATHAN, N.A.; GRIECO, M.; CUSCO, A.; VECCHIO, G. & MATOSKAVA, V.; DRAUS, M.H.; DI FIORE, P. -Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN 2 A and 2B. **Science.** v. 267, p. 381-383, 1995.

SANTORO, M.; ROSATO, R.; GRIECO, M.; BERLINGIERI, M.T.; LUCCOLUCCI D'AMATO, G.; DE FRANCISCIS, V. & FUSCO, A. -The *ret* proto-oncogene is consistently expressed in human pheochromocytoma and thyroid medullary carcinomas. **Oncogene.** v. 5, p. 1595-1598, 1990.

SCHUFFENECKER, I.; BILLAUD, M.; CALENDER, A.; CHAMBE, B.; GINET, N.; CALMETTES, C.; MODIGLIANI, E.; LENOIR, G.M. -*RET* proto-oncogene

mutations in French MEN 2 A and FMTC families. **Hum Mol Genet.** v. 3, n. 11, p. 1939-43, 1994

SEGOUFFIN-CARIOU, C.; BILLAUD, M. -Transforming ability of MEN2 A-RET requires activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway. **J Biol Chem.** v. 275, n. 5, p. 3568-76, 2000.

SERI, M.; YIN, L.; BARONE, V.; BOLINO, A.; CELLI, I.; BOCCIARDI, R. *et al.* - Frequency of *RET* mutations in long- and short-segment Doença de Hirschsprung. **Hum Mutat.** v. 9, n. 3, p. 243-9, 1997

SIEGELMAN, M.; MOHABEER, A.; FAHEY III, T.; TOMLINSON, G.; MAYAMBALA, C.; JAFARI, S.; NOLL, W.W.; THIBODEAU, S.N.; DAWSON, D.B. - Rapid; nonradioactive screening for mutations in exons 10; 11; and 16 of the *RET* proto-oncogene associated with inherited medullary thyroid carcinoma. **Clin Chem.** v. 43, p. 453-457, 1997.

SIEGELMAN, M.; MOHABEER, A.; FAHEY III, T.; TOMLINSON, G.; MAYAMBALA, C.; JAFARI, S.; NOLL, W.W.; THIBODEAU, S.N.; DAWSON, D.B. - Rapid; nonradioactive screening for mutations in exons 10; 11; and 16 of the *RET* protooncogene associated with inherited medullary thyroid carcinoma. **Clin Chem.** v. 43, n. 3, p. 453-457, 1997.

SIJMONS, R. H.; HOFSTRA, R. M. W.; WIJBURG, F. A.; LINKS, T. P.; ZWIERSTRA, R. P.; VERMEY, A.; ARONSON, D. C.; TAN-SINDHUNATA, G.; BROUWERS-SMALBRAAK, G. J.; MAAS, S. M.; BUYS, C. H. C. M. -Oncological implications of *RET* gene mutations in Hirschsprung's disease. **Gut.** v. 43, p. 542-547, 1998.

SIMPSON, N. E.; FALK, J. -Exclusion of linkage between the loci for multiple endocrine neoplasia type-2 (MEN-2) and HLA. **Hum. Genet.** v. 60, p. 157 , 1982.

SIMPSON, N. E.; FALK, J.; FORSTER-GIBSON, C. J.; GOODALL, J.; SEARS, E.; PARTINGTON, M. W.; GHENT, W. -Possible linkage between the loci for multiple endocrine neoplasias type II (MEN2) and HLA. **Cytogenet. Cell Genet.** v. 25, p. 204 only, 1979.

SIMPSON, N.E.; KIDD ,K.K.; GOODFELLOW, P.J.; MCDERMID, H.; MYERS, S.; KIDD, JR; JACKSON, C.E.; DUNCAN, A.M.; FARRER, L.A.; BRASCH, K.; et al. - Assignment of multiple endocrine neoplasia type 2 A to chromosome 10 by linkage. **Nature.** v. 328, n. 6130, p. 528-30,1987.

SIPPLE ,J.H. -The association of pheochromocytoma with carcinoma of thyroid gland. **Am J Med.** v. 31, p. 163, 1961.

SIPPLE, J.H. -The association of pheochromocytomas with carcinoma of the thyroid gland. **Am J Med.** v. 31, p. 163-166, 1961.

SKINNER, M.A.; WELLS, A.S. Jr. -Medullary carcinoma of the thyroid gland and the MEN 2 syndromes. **Semin Pediatr Surg.** v. 6, n.3 ,p. 134-140, 1997

STEINER, A.L.; GOODMAN, A.D. & POWERS, S.R. -Study of a kindred with pheochromocytoma; medullary thyroid carcinoma; hyperparathyroidism and Cushing's disease: multiple endocrine neoplasia; type 2. **Medicine** (Baltimore), v. 47, p. 371-409, 1968.

TAKAHASHI, M.; ASAI, N.; IWASHITA, T.; MURAKAMI, H.; ITO, S. -Molecular mechanisms of development of multiple endocrine neoplasia 2 by *RET* mutations. **J Intern Med** . v. 243, p. 509-13; 1998.

TAKAHASHI, M.; RITZ, J.; COOPER, G. M. -Activation of a novel human transforming gene; *ret*, by DNA rearrangement. **Cell** , v. 42, p. 581-588, 1985.

TAKKER, R.V. -Multiple Endocrine Neoplasia-Syndromes of the Twentieth Century
J Clin Endocrinol Metab. v. 83, n. 8, 1998.

TANG, M.J.; WORLEY, D.; SANICOLA, M.; DRESSLER, G.R. -The RET-glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) pathway stimulates migration and chemoattraction of epithelial cells. **J Cell Biol.** v. 142, n. 5, p. 1337-45, 1998.

TELANDER , R.L.; ZIMMERMANN, D.; SIZEMORE, G.W. et al. Medullary carcinoma in children. **Arch Surg** . v. 124, p. 841, 1989.

TESSITORE, A.; SINIS, I. A.A.; PASQUALI, D.; CARDONE, M.; VITALE, D.; BELLASTELLA, A.; COLANTUONI, V. -A novel case of multiple endocrine neoplasia type 2 A associated with two de novo mutations of the *RET* protooncogene. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 84, n. 10, p. 3522-7, 1999.

TISSEL, L.; HANSSON, G.; JANSSON, S.; *et al.* -Reoperation in the treatment of asymptomatic metastasizing medullary thyroid carcinoma. **Surgery.** v. 99, p. 60-66, 1986.

TREANOR, J.J.; GOODMAN, L.; DE SAUVAGE, F.; STONE, D.M.; POULSEN, K.T.; BECK, C.D. *et al.* -Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. **Nature.** v. 382, n. 6586, p. 80-3, 1996.

TRUPP, M.; SCOTT, R.; WHITTEMORE, S.R.; IBANEZ, C.F.-Ret-dependent and independent mechanisms of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in neuronal cells. **J Biol Chem.** v. 274, n. 30, p. 20885-94, 1999.

Van DYKE, D. L.; JACKSON, C. E.; BABU, V. R. : Localization of autosomal dominant multiple endocrine neoplasia 2 syndrome (MEN2) to 20p12.2. **Cytogenet. Cell Genet.** 32: p. 324 only, 1982.

Van DYKE, D. L.; JACKSON, C. E.; BABU, V. R. -Multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN-2): an autosomal dominant syndrome with a possible chromosome 20 deletion. **Am. J. Hum. Genet.** v. 33, p. 69A only, 1981.

VERDY, M.; WEBER, A. M.; ROY, C. C.; MORIN, C. L.; CADOTTE, M.; BROCHU, P. : Hirschsprung's disease in a family with multiple endocrine neoplasia type 2. **J. Pediat. Gastroent. Nutr.** v. 1, p. 603-607, 1982.

VIÉGAS, T.M.R.F.; GOMES, S.; EZABELLA, M.; TOLEDO, S.P.A.; ABELIN, N.M.A. Comparação dos testes de estímulo da secreção de calcitonina (omeprazol versus cálcio) no diagnóstico e seguimento dos pacientes com carcinoma medular da tireóide. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 44, n. 5, supl. 1, 2000.

WELLS, S.A. JR; BAYKUB, S. B.; LINEHAN, W. M. -Provocative agents and the diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland. **Ann Surg.**v.. 188: 139-141, 1978.

WELLS, S.A.; JR; BAYLIN, S.B.; LINEHAN, W.M.; et al. Proactive agents and the diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland. **Ann Surg.** v.188, p. 139-141, 1978.

WELLS; S.A. Jr; CHI; D.D.; TOSHIMA; K; DEHNER; LP; COFFIN; CM; DOWTON; SB; IVANOVICH; JL; DEBENEDETTI; MK; DILLEY; WG; MOLEY; JF. Predictive DNA testing and prophylactic thyroidectomy in patients at risk for multiple endocrine neoplasia type 2 A. **Ann Surg** v. 220, p. 237-50, 1994.

WERMER; P. Genetic aspects of adenomatosis of endocrine glands. **Am J Med** v. 16, p. 363, 1954.

WEYERS, W.; WEYERS, I.; BONCZKOWITZ, M.; DIAZ-CASCAJO, C.; SCHILL, W.B. Lichen amyloidosis: a consequence of scratching. **J Am Acad Dermatol** . v. 37, n. 6, p. 923-8, 1997.

WIDENFALK, J.; NOSRAT, C.; TOMAC, A.; WESTPHAL, H.; HOFFER, B.; OLSON, L. -Neurturin and glial cell line-derived neurotrophic factor receptor-beta (GDNFR-beta); novel proteins related to GDNF and GDNFR-alpha with specific cellular patterns of expression suggesting roles in the developing and adult nervous system and in peripheral organs. **J Neurosci**. v. 17, n. 21, p. 8506-19, 1997.

WILLIAMS, E.D. -Medullary carcinoma of the thyroid. **J Clin Patol** v. 19, p. 114; 1966.

WILLIAMS, E.D. & POLLOCK, D.J. -Multiple mucosal neuromata with endocrine tumors. -A syndrome allied to Von Recklinghausen's disease. **J Pathol Bacteriol** .v. 91, n. 71, 1966.

WOHLK, N.; COTE, G.J.; EVANS, D.B.; GOEPFERT, H.; ORDONEZ, N.G. & GAGEL, R.F. -Application of genetic screening information to the management of medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**. v. 25, p. 1-25, 1996.

XUE, F.; YU, H.; MAURER, L.H.; MEMOLI, V.A.; NUTILE-MCMENEMY, N.; SCHUSTER, M.K.; BOWDEN, D.W.; MAO, J.; NOLL, W.W. -Germline RET mutations in MEN 2 A and FMTC and their detection by simple DNA diagnostic tests. **Hum Mol Genet**.v. 3. N. 4, p. 635-8, 1994.

YIN, L.; BARONE, V.; SERI, M.; BOLINO, A.; BOCCIARDI, R.; CECCHERINI, I.; PASINI, B.; TOCCO, T.; LERONE, M.; CYWES, S.; et al Heterogeneity and low

detection rate of *RET* mutations in Doença de Hirschsprung. **Eur J Hum Genet.** v. 2, n. 4, p. 272-80, 1994.

YIN, L.; SERI M; BARONE, V.; TOCCO, T.; SCARANARI, M.; ROMEO, G. - Prevalence and parental origin of de novo *RET* mutations in Hirschsprung's disease. **Eur J Hum Genet.** v. 4, n. 6, p. 356-8, 1996.

YOUNG, J. B. & LANDSBERG, L. -Catecholamines and the adrenal medulla. In **Williams Textbook of Endocrinology.** 9th edition. J.D. Wilson; DW Foster; HM Kronenberg; PR Larsen Eds.; 713-714. W. B. Saunders Company. Philadelphia; Pennsylvania; 1998.

ZATTERALE, A.; STABILE, M.; NUNZIATA, V.; DI GIOVANNI, G.; VECCHIONE, R.; VENTRUTO, V. Multiple endocrine neoplasia type 2 (Sipple's syndrome): clinical and cytogenetic analysis of a kindred. **J. Med. Genet.** v. 21, p. 108-111, 1984.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE