
IMPLICAÇÕES CLÍNICAS DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR NO MANEJO DO CARCINOMA MEDULAR DE TIREÓIDE HEREDITÁRIO

MANAGEMENT OF HEREDITARY MEDULLARY THYROID CARCINOMA: CLINICAL IMPLICATIONS OF MOLECULAR DIAGNOSIS

Marcia Khaled Puñales*, Jorge Luiz Gross*, Ana Luiza Maia*

SINOPSE

O carcinoma medular de tireóide (CMT) hereditário pode apresentar-se como componente das síndromes de Neoplasia Endócrina Múltipla (NEM 2A e 2B) ou Carcinoma Medular de Tireóide Familiar (CMTF). Diferentes mutações no *RET* foram identificadas como responsáveis pelo CMT e estudos recentes sugerem uma correlação entre o genótipo-fenótipo, podendo existir uma grande variabilidade de síndromes clínicas associadas às diferentes mutações. O presente estudo realizou a análise molecular do *RET* em indivíduos com CMT e avaliou a correlação entre fenótipo-genótipo nos afetados e seus familiares. Foram incluídos 57 indivíduos com diagnóstico histopatológico/imunohistoquímico de CMT (10 esporádicos e 47 hereditários, provenientes de 16 famílias). O DNA genômico foi extraído de leucócitos periféricos e os exons 10, 11, 13, 14, 15 e/ou 16 do *RET* amplificados por PCR com *primers* específicos. A presença de mutações foi determinada por SSCP, restrição enzimática e/ou sequenciamento. Das famílias com CMT hereditário, 7 apresentavam NEM 2A, 3 NEM 2A associada à Líquen Amilóide Cutânea (CLA), 3 NEM 2B, 2 CMTF e 1 outras formas hereditárias. Em 6 famílias com NEM 2A, nas 3 com NEM 2A+CLA e nas 2 com CMTF a mutação estava presente códon 634. Enquanto que a outra família com NEM 2A apresentava a mutação no códon 618. Nos indivíduos com NEM 2B foi detectada uma mutação *de novo* no códon M918T. Na família classificada como outros, a mutação também localizava-se no códon 634. O diagnóstico molecular identificou mutações em todos indivíduos com doença hereditária, em 23 indivíduos carreadores sem evidência clínica da neoplasia e em 3 indivíduos com CMT aparentemente esporádico, destacando a importância do rastreamento genético como método diagnóstico.

Unitermos: CMT, proto-oncogene *RET*, NEM 2A, NEM 2B, CMTF.

SUMMARY

Hereditary MTC can occur either alone – familial MTC (FMTC) – or as the thyroid manifestation of multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN 2) syndromes (MEN 2A and MEN 2B) or others. Three phenotypic subtypes have been reported. MEN 2A(1), MEN 2A(2) and MEN 2A(3). Germline mutations in the *RET* proto-oncogene cause MEN 2 and recent studies suggest a relationship between specific mutations and different phenotypes in MEN 2 syndromes. The purpose of this study was to identify *RET* proto-oncogene mutations and analyze a possible relationship between genotype-phenotype in Brazilian kindred with MTC. A total of 57 patients with histopathological and immunohistochemistry diagnosis of MTC were included. This sample was formed from index cases and affected members of 16 families with hereditary MTC and 10 individuals with sporadic tumors. DNA was extracted from leukocytes of the affected individuals and relatives. Exons 10, 11, 13, 14, 15 and 16 were amplified by PCR, using specific primers. The presence of mutation was determined by SSCP, enzymatic restriction analysis and/or automatic sequencing. The phenotypes of hereditary MTC were as follows: 7 MEN 2A, 3 MEN 2A associated with CLA, 3 MEN 2B, 2 FMTC and 1 other forms. We identified mutations at codon 634 in 6 families with MEN 2A, only one kindred had the mutation at codon 618. The 3 kindred with MEN 2A+CLA, both cases of FMTC and the only

family classified as other hereditary forms of the MTC presented the mutation in codon 634. A mutation at codon M918T was identified in the 3 individuals with MEN 2B. The genetic screening was able to identify 23 asymptomatic carriers and determine the hereditary MTC pattern in 3 individuals with apparently sporadic tumors. In conclusion, genetic testing can identify affected and asymptomatic individuals with hereditary disease, allowing early diagnosis and treatment.

Keywords: MTC, proto-oncogene *RET*, MEN 2A, MEN 2B, FMTC.

* Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Correspondência: Profa. Dra. Ana Luíza Maia - Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil, Fone / fax: 51-3332-5188 ; e-mail: almaia@vortex.ufrgs.br.

Título Abreviado: Mutações no Proto-oncogene *Ret*.

Suporte Financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e FIPE - HCPA, Brasil.

INTRODUÇÃO

O Carcinoma Medular de Tireóide (CMT), neoplasia das células C ou parafoliculares da tireóide, é responsável por aproximadamente 5 a 8% de todos os tumores malignos da tireóide (1). A apresentação do CMT pode ser esporádica ou hereditária (1,2). A forma esporádica ou não hereditária é a mais comumente encontrada, sendo responsável por aproximadamente 75-80% dos casos. O restante (20-25%) corresponde a forma hereditária, podendo apresentar-se como parte das síndromes genéticas: Neoplasia Endócrina Múltipla (NEM) 2A e 2B ou Carcinoma Medular de Tireóide Familiar (CMTF) ou outras formas hereditárias (2,3).

A síndrome genética NEM 2A se caracteriza por CMT (95%), feocromocitoma (30 – 50%) e hiperparatireoidismo (10 – 20%) (4,5). A doença adrenomedular é usualmente multicêntrica e bilateral, geralmente detectada após o aparecimento de CMT, com taxa de malignidade inferior a 10% (6). O hiperparatireoidismo ocorre em aproximadamente 10 a 20% dos indivíduos com NEM 2A, acometendo geralmente todas as glândulas paratireóides (7). A lesão histológica mais comumente observada nos estágios iniciais da doença é a hiperplasia glandular, porém se a doença é diagnosticada mais tardiamente a lesão adenomatosa se superpõe a hiperplasia (7). A síndrome NEM 2A foi subdividida em três subtipos fenotípicos, baseando-se na apresentação clínica (4,5): a) NEM 2A (1), que consiste nos indivíduos que apresentam os três componentes da síndrome (CMT, feocromocitoma e hiperparatireoidismo); b) NEM 2A(2), que inclui indivíduos que apresentam CMT e feocromocitoma, sem hiperparatireoidismo; c) NEM 2A (3), que está relacionado a indivíduos com CMT e hiperparatireoidismo, sem feocromocitoma. Outras

associações raras com NEM 2A incluem a presença de líquen amilóide cutânea (CLA) (8,9) ou doença de Hirschsprung (10).

A síndrome NEM 2B caracteriza-se por CMT (90%), ganglioneuromatose (100%) e hábitos marfanóides (65%) e feocromocitoma (45%) (2,3,11). O CMTF consiste na presença de CMT isolado em pelo menos quatro membros da mesma família (2-4). As outras formas de CMT hereditário, consistem no acometimento de dois ou três membros da mesma família com CMT, sem a presença de feocromocitoma ou hiperparatireoidismo (2-4).

Em 1970, foram realizados os primeiros estudos para identificação da mutação genética causadora do CMT, sendo que em 1993 o proto-oncogene *RET* foi identificado como o gene causador da neoplasia (12) e alguns meses após foram identificadas mutações nos exons 10 e 11 (13,14). O proto-oncogene *RET* apresenta 21 exons e codifica um receptor tirosino-quinase expresso nas células derivadas da crista neural (15), incluindo tumores originados dessas células como CMT e feocromocitoma. As mutações descritas estão localizadas basicamente nos exons 10, 11 e 16 (16-20), embora sejam identificadas mutações, com menor frequência, nos exons 13, 14 e 15 (21,22). A proteína *Ret* apresenta um domínio extracelular com uma estrutura homóloga ao gene da família da *cadherin* e outro domínio rico em cisteína, com papel importante na conformação e dimerização das proteínas; além desse domínio, a proteína apresenta ainda um domínio transmembrana e dois domínios intracelulares citoplasmáticos tirosino-quinase (TK1 e TK2), cujo ligante é o denominado *glial derived neurotrophic factor* (GDNF), que atua via receptores *a-GDNF* (23,24).

Determinados estudos têm demonstrado a associação entre mutações específicas e as diferentes síndromes clínicas associada à NEM (4,5,25). Mais recentemente, alguns

autores sugerem que determinados códons afetados estão correlacionados com uma maior agressividade tumoral (26). Em um estudo multicêntrico, que avaliou 477 famílias com NEM 2 acompanhadas em 18 centros de referência, foi observada a associação de determinadas mutações com a presença ou não dos diferentes componentes da NEM 2 (5). Mutações no códon 634 (exon 11), por exemplo, foram associadas à presença de feocromocitoma e hiperparatireoidismo, sendo que a substituição da cisteína (TGC) por arginina (CGC), que ocorre de modo mais freqüente na NEM 2A não foi detectada em nenhum caso de CMTF. Por outro lado, mutações nos códons 768 (exon 13) e 804 (exon 14) foram identificadas unicamente em casos de CMTF enquanto que as descritas no códon 918 (exon 16) são específicas para a NEM 2B (5). Na rara síndrome de NEM 2A associado ao líquen amilóide cutâneo (CLA) (5), a mutação ocorreu no códon 634 em todos os casos relatados até o momento e na NEM 2A associada à doença de Hirschsprung os códons afetados estão localizados no exon 10 (618 e 620) (5).

Na literatura, a importância do rastreamento genético para o manejo da hereditariedade do CMT é bem determinada (27,28). Recentemente, o diagnóstico molecular do carcinoma medular de tireóide foi implementado no nosso serviço e no presente trabalho relatamos os resultados de 16 famílias avaliadas até o momento, descrevendo o tipo de mutação e a correlação dessas com os diferentes fenótipos nos indivíduos afetados e seus familiares.

MATERIAL E MÉTODOS

A população estudada foi de 57 pacientes com diagnóstico histopatológico de Carcinoma Medular de Tireóide e seus familiares de primeiro grau, provenientes de diferentes estados (Alagoas, Rio Grande do Sul, Rio Janeiro e Paraná) e encaminhados aos ambulatórios de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre-RS e Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR.

Os pacientes e seus familiares foram entrevistados para preenchimento de uma ficha clínica (idade ao diagnóstico e atual, sexo, raça, presença de nódulos, metastases locais e à distância, sinais e sintomas sugestivos de feocromocitoma e/ou hiperparatireoidismo e exames laboratoriais pertinentes). Os pacientes assinaram o termo de consentimento informado e o estudo foi aprovado pela comissão de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Grupo de Pesquisa de Pós-Graduação - PPG n°1991). As informações sobre dados clínicos e laboratoriais, bem como a presença de outras neoplasias associadas ao CMT, feocromocitoma e/ou hiperparatireoidismo, foram obtidas através da revisão de prontuário e/ou informações dos

médicos assistentes. O rastreamento e/ou diagnóstico de feocromocitoma foi realizado através da determinação sérica/urinária do ácido vanil-mandélico, catecolaminas e/ou metanefrinas urinárias. O rastreamento e/ou diagnóstico de hiperparatireoidismo foi determinado através da dosagem sérica de cálcio e PTH.

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

Extração DNA e reação polimerase em cadeia (PCR)

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos de sangue periférico, através da técnica padrão (29). O fragmento de DNA de interesse foi posteriormente amplificado pela técnica de PCR, utilizando *primers* específicos (tabela 1). As condições utilizadas foram as seguintes: 3 minutos à 94°C seguidos de 35 ciclos (94°C, 1 minuto, 56-60°C, 30 segundos e 72°C, 2 minutos). Cada reação de PCR foi realizada a partir de 100 ng/dl DNA genômico, 20 mM tris (pH 8,4), 0,2 mM de dNTP, 0,5 mM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 2,0 mMol MgCl₂ e 1U de *Taq* polimerase em 50 ml de solução final. Os fragmentos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose à 1,5% e posteriormente à SSCP, restrição enzimática e/ou sequenciamento automático.

Identificação das mutações

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

SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*)

Para análise pela técnica de SSCP dos exons 10, 11, 13, 14 e 16, os fragmentos de DNA foram previamente denaturados em formamida e resfriados em gelo antes da aplicação em gel não denaturante. Utilizou-se gel 8-12% policrilamida, 0,8% bis-acrilamida a 8°, 45°, 30°C ou à temperatura ambiente para os exons 10, 11, 13 e 14, à 200-400 mV, durante 2 - 4 horas num aparelho vertical de eletroforese (30,31). O gel foi posteriormente corado com nitrato de prata de acordo a técnica padrão (29). Os fragmentos que apresentavam alteração na migração eram posteriormente submetidos à restrição enzimática e/ou sequenciamento.

Restrição enzimática / Sequenciamento

A técnica de restrição enzimática foi utilizada para análise das mutações detectadas pela técnica de SSCP, utilizando enzimas de restrição específicas para cada mutação, quando disponíveis (32). Os produtos de PCR foram digeridos com a enzima de restrição apropriada de acordo com as instruções do fornecedor, analisados em eletroforese em gel de agarose à 2% e visualizados por transiluminação ultravioleta (Image Master, Pharmacia). O sequenciamento foi utilizado para determinação das mutações não identificadas por restrição enzimática, SSCP ou para identificar a troca de amino-ácido da mutação, sendo o método utilizado por terminação em cadeia por dideoxynucleotídeos descrito por Sanger (1997) (33), com kit para sequenciamento *ALFexpress AutoCycle Sequencing Kit* e sequenciador automático *ALF Express* (Pharmacia).

RESULTADOS

Aspectos gerais

Foram incluídas no estudo 16 famílias, inicialmente 13 foram consideradas como portadoras de CMT hereditário com base na história familiar e/ou presença de outras neoplasias características das síndromes hereditárias e 13 como esporádicos. Após a análise molecular, três indivíduos pré-classificados como portadores de CMT esporádico apresentavam a forma hereditária da doença, confirmando então 16 famílias com CMT hereditário e 10 indivíduos com CMT esporádico. Foram analisadas 150 amostras, sendo 57 de indivíduos com diagnóstico histopatológico e imunohistoquímico de CMT. Todos os indivíduos com história clínica e/ou laboratorial sugestiva de CMT hereditário, submetidas à análise molecular do proto-oncogene *RET*, incluídos em nosso estudo, apresentaram mutações. O rastreamento molecular foi capaz de identificar 23 indivíduos carreadores, ainda sem manifestação clínica da neoplasia.

Os dados clínicos e laboratoriais das famílias com CMT hereditário e esporádico estão resumidos na tabela 2. De acordo ao comitê internacional da classificação operacional da NEM 2, os fenótipos encontrados foram: NEM 2A, NEM 2A+CLA, NEM 2B, CMTF e outras formas hereditárias (famílias com menos de 4 membros afetados com CMT, sem evidências de feocromocitoma ou doença paratireoidiana no afetado e nos familiares em risco).

Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2A:

Das 7 famílias com NEM 2A avaliadas, 3 famílias apresentavam CMT associado a feocromocitoma e hiperparatireoidismo, caracterizando o fenótipo de NEM 2A(1) e 4 famílias apresentavam CMT associado a

feocromocitoma sem evidência clínica ou laboratoriais sugestivas de hiperparatireoidismo no indivíduo afetado ou nos familiares em risco, caracterizando a síndrome de NEM 2A(2), (tabela 3). Em nosso estudo, seis famílias analisadas apresentavam a mutação TGC@CGC ou TGC@TAC, códon 634 (exon 11) e apenas uma família apresentou a mutação TGC@CGC, códon 618 (exon 10).

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

Três famílias apresentavam a rara associação de NEM 2A com Líquen Amilóide Cutâneo (CLA). A CLA é definida como lesão de pele pruriginosa, rica em amilóide, localizada preferencialmente na região interescapular. Nas 3 famílias incluídas em nosso estudo este achado foi confirmado pela biópsia da lesão. A mutação localizava-se no domínio extracelular, códon 634 (exon 11), sendo as substituições TGC@CGC (2 famílias) e TGC@TAC (1 família).

Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2B:

Foram incluídos em nosso estudo 3 indivíduos com NEM 2B, cujo os pais não apresentavam nenhuma evidência clínica ou laboratorial sugestiva da síndrome, caracterizando uma mutação *de novo*. As características fenotípicas de um dos indivíduos afetados permitiram o diagnóstico da síndrome durante a infância. Em todos os casos, a mutação identificada se localizava no domínio intracelular tirosino-quinase, ATG@ACG, códon 918 (exon 16).

Carcinoma Medular de Tireóide Familiar:

Devido a rigorosidade dos critérios de classificação do consórcio internacional de NEM 2, foram classificadas apenas 2 famílias com a síndrome de CMTF ou seja, famílias com acometimento com CMT isolado em pelo menos 4 membros, sem evidências clínicas ou laboratoriais de feocromocitoma ou hiperparatireoidismo. A mutação identificada localizava-se no domínio extracelular, TGC@TAC, códon 634 (exon 11).

Outras formas CMT hereditário:

A única família classificada como portadora da outras formas de CMT hereditário, a mutação identificada foi TGC@TAC, códon 634 (exon 11).

CMT esporádico

A análise molecular através de SSCP e/ou restrição enzimática não identificou mutações nas células germinativas dos 10 casos de CMT esporádico avaliados. A utilização dessas técnicas permite excluir mais de 95% das mutações descritas.

DISCUSSÃO

O CMT é um tumor raro, responsável por 5 à 8% de todos tumores malignos da glândula, com padrão de herança autossômica dominante, maligna, de difícil diagnóstico precoce e de elevada taxa de mortalidade quando diagnosticada tardiamente. A aplicação do rastreamento genético para o manejo adequado da hereditariedade do Carcinoma Medular de Tireóide é de fundamental importância, já que o diagnóstico precoce determina a conduta terapêutica e o prognóstico da doença no indivíduo afetado e em seus familiares. Os nossos resultados confirmam os dados da literatura e indicam que o rastreamento genético é decisivo para realização da conduta terapêutica adequada.

O perfil agressivo do tumor foi evidenciado pela presença de metástases locais e a distância e pela idade de acometimento. De acordo com o esperado, a lesão descrita no exame anatomopatológico de tireóide de todos os casos de CMT hereditário avaliados foi multicêntrica e multifocal. No entanto, em 2 casos sugestivos de doença esporádica, o exame anatomopatológico também revelou a presença de lesão multifocal e multicêntrica, o que levantou a hipótese de CMT hereditário, fato este excluído através da análise molecular.

Antes do advento das técnicas de biologia molecular, o rastreamento dos familiares em risco de CMT era realizado através de testes de estímulo seriados com pentagastrina ou cálcio (34,35). Além do alto índice de resultados falso-negativos, à presença de efeitos colaterais, tornavam-no de difícil realização (34,35). Um estudo comparativo entre o rastreamento clínico e a análise de DNA em famílias com NEM 2, concluiu que o diagnóstico molecular é superior na identificação do gene mutado em indivíduos carreadores e em risco para o desenvolvimento da síndrome (34). O teste genético deve ser indicado em famílias com mutação conhecida no proto-oncogene *RET*, sendo a identificação de membros não carreadores suficiente para encerrar a investigação desses indivíduos e de seus descendentes (34).

Nossos dados quanto a correlação entre genótipo-fenótipo da síndrome foram semelhantes aos descritos na literatura, que observaram que alguns tipos de mutações têm uma probabilidade maior ou menor de apresentar um determinado componente da síndrome (5). Um exemplo dessa associação foi a mutação encontrada no códon 634 (exon 11), com a troca do aminoácido cisteína por arginina (TGC@CGC), a mais encontrada em todos os indivíduos com CMT, feocromocitoma e/ou hiperparatireoidismo (NEM2A) e

não detectada em nenhum caso de CMTE. Essas mutações no códon 634 apresentam uma frequência maior de hiperparatireoidismo e feocromocitoma do que mutações em outros códons, sendo que o hiperparatireoidismo é mais comum quando a mutação é do subtipo cisteína@arginina (5). Em nosso estudo, a grande maioria das mutações encontradas nas famílias com a síndrome de NEM 2A, inclusive na variante com CLA e as famílias com CMTE, localizaram-se no códon 634 do exon 11. Nos pacientes com NEM 2B incluídos em nosso estudo, encontramos a mutação mais frequente descrita, no códon 918 (exon 16), sendo hoje considerada específica para a síndrome de NEM 2B. Assim como na literatura que em 50% das mutações na NEM 2B são mutações *de novo*, nas 3 famílias com NEM 2B avaliadas, a mutação *de novo* localizava-se no códon 918 do exon 16 (5).

Quanto a rara associação NEM2A e líquen amilóide cutâneo (CLA) descrita somente em 20 famílias na literatura (8,9), em nosso estudo observamos 3 famílias afetadas. É interessante observar que famílias com CLA não associado à NEM não apresentam mutações no proto-oncogene *RET* (5).

O rastreamento molecular foi capaz de identificar 23 indivíduos carreadores, ou seja, sem evidência clínica de carcinoma, sendo que um destes carreadores assintomáticos já apresentava a presença de hiperplasia celular no resultado do exame anatomopatológico, reforçando o conceito de que muitas vezes o tumor já está evidente muitos anos antes da apresentação clínica. Dados atuais demonstram que a mortalidade nesses casos é inferior a 5%, contrastando com a alta mortalidade do tumor e ressaltando a importância da tireoidectomia total como prevenção (36).

O rastreamento genético identifica a maioria dos indivíduos com doença hereditária, permitindo o tratamento precoce, através da tireoidectomia. A avaliação molecular também foi fundamental para identificação de três casos encaminhados como CMT esporádico, que posteriormente foram classificados como hereditários. Esses casos ilustram a necessidade de identificação do rastreamento molecular nos casos de CMT esporádico para excluir a hereditariedade da doença, confirmando relatos que sugerem que o CMT familiar pode existir em contexto aparentemente esporádico (36,37).

Os nossos dados confirmam a importância da aplicação do rastreamento genético para o manejo adequado da hereditariedade do CMT, já que o mesmo permite o diagnóstico precoce, fundamental na conduta terapêutica e no prognóstico da doença no indivíduo afetado e em seus familiares.

Tabela 1. Sequência de primers e respectivos fragmentos:

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

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

	CMT Hereditário	CMT Esporádico	p
Idade (média)	36,2±18,5anos	59,2±10,8anos	< 0.01
Nódulo a palpação	16 (100%)	10 (100%)	
AP (multifocal/multicêntrico)	16 (100%)	2 (20%)	
Metástases locais	13 (81,2%)	7 (70%)	
Metástases distância	7 (43,7%)	5 (50%)	
Calcitonina sérica (pg /ml)	1486,2±822,5	2580±1492	

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

Fenótipo	Nº Famílias (%)	Codon	Substituição Nucleotídeo	Substituição Aminoácido
NEM 2A	7 (43.7%)			
NEM 2A(1)	3 (18.7%)	634	TGC → TAC TGC → CGC TGC → TGG	Cis → Tir Cis → Arg Cis → Tip
NEM 2A(2)	3 (18.7%)	634	TGC → TAC TGC → CGC TGC → TGG	Cis → Tir Cis → Arg Cis → Tip
	1 (6.2%)	618	TGC → CGC	Cis → Arg
NEM 2B	3 (18.7%)	918	ATG → ACG ATG → ACG ATG → ACG	Met → Thre
CMTF	2 (12.5%)	634	TGC → TAC TGC → TAC	Cis → Tir
Outras formas	1 (6.2%)	634	TGC → TAC	Cis → Tir
NEM 2A + CLA	3 (18.7%)	634	TGC → CGC TGC → CGC TGC → TAC	Cis → Arg Cis → Arg Cis → Tir

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Pommier RF, Brennan ME Medullary thyroid carcinoma. *Endocrinol* 1992; 2:393-02.
- Ponder BA. The phenotypes associated with RET mutations in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes. *Cancer Res* 1999; 59:1736-42.
- Gharib H, McConahew WM, Tiegues RD, Bergstralh EJ, Goellner JR, Grant CS *et al.* Medullary thyroid carcinoma; clinicalpathologic features and Long term follow up of 65 patients treated during 1946 through 1970. *Mayo Clin Proc* 1992;67:934-40.
- Mulligan LM, Marsh DJ, Robinson BG, Schuffenecker I, Zedenius J, Lips CJM *et al.* International RET mutation consortium. Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2: report of international RET mutation consortium. *J Intern Med* 1995; 238:343-46.
- Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF *et al.* The relationship between specific RET proto-oncogene mutation and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. *Jama* 1996; 276:1575-79.
- Niccoli-Sire P, Murat A, Rohmer V, Frank S, Chabrier G, Baldet L *et al.* The french calcitonin tumors study group (GETC). Familial medullary thyroid carcinoma with noncysteine RET mutations: phenotype-genotype relationship in a large series of patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:3746-3753.
- Casanova S, Rosenberg-Bourgin M, Farkas D. Pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2 A: survey of 100 cases, *Clin Endocrinol* 1993; 38:531-38.
- Ceccherini I, Romei C, Barone V, Pacini F, Martino E, Loviselli A *et al.* Identification of a cys634@tyr mutation of the RET proto-oncogene in a pedigree with multiple endocrine neoplasia type 2a and localized cutaneous lichen amyloidosis. *J Endocrinol Invest* 1994; 17:201-04.
- Gagel R, Levy ML, Donovan DT, Alford BR, Wheeler B, Tschien JA. Multiple endocrine neoplasia type 2 an associated with cutaneous lichen amyloidosis. *Ann Intern Med* 1989; 111:802-06.
- Eng C, Flier JS, Underhill LH. The RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 and Hirschsprung's disease. *N Engl J Med* 1996; 335:943-51.
- Eng C, Marsh DJ, Robinson BG, Chow CW, Patton MA, Southey MC *et al.* Germline RET codon 918 mutation in apparently isolated intestinal ganglioneuromatosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 83:4191-94.
- Mulligan LM, Gardener E, Smith BA, Mathew CG, Ponder BA. Genetic events in tumor initiation and progression in multiple endocrine neoplasia type 2. *Genes Chromosom Cancer* 1993; 6:166-77.

13. Mulligan L. Germ-line mutation of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 A. *Nature* 1993; 363:458-59.
14. Mole SE, Moore JK, Papi L, Ponder MA, Telenius H, Tunnacliffe A *et al.* Germ-line mutation of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 A. *Nature* 1993; 363:458-63.
15. Takahashi M, Cooper GM. Cloning and expression of the RET proto-oncogene encoding a tyrosine-kinase with two potential transmembrane domain. *Oncogene* 1988; 3:571-76.
16. Quadro L, Panariello L, Salvatore D, Carlomagno F, Del Frete M, Nunziata V *et al.* Frequent RET protooncogene mutations in multiple endocrine neoplasia type 2a. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:590-94.
17. Mulligan LM, Eng C, Healey CS, Clayton D, Kwok JB, Gardner E *et al.* Specific mutation of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC. *Nat Genet* 1994; 6:70-74.
18. Eng C, Smith DP, Mulligan LM, Healey CS, Zvelebil MJ, Stonehouse T *et al.* Point mutation within the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 B and related sporadic tumors. *Hum Mol Genet* 1994; 3:237-41.
19. Hofstra RMW, Landsvater RM, Ceccherini I *et al.* A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature* 1994; 367:375-80.
20. Eng C, Smith DP, Mulligan LM, Healey CS, Zvelebil MJ, Stonehouse T *et al.* A novel point mutation in the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma and in a family with FMTC. *Oncogene* 1995; 10:509-13.
21. Bolino A, Schuffenecker I, Lou Y, Seri M, Silengo M, Tocco T *et al.* RET mutation in exons 13 and 14 of FMTC patients. *Oncogene* 1995;10:2415-19.
22. Gimm O, Marsh DJ, Andrew SD, Frilling A, Dania PL, Mulligan LM. Germline dinucleotide mutation in codon 883 of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2b without codon 918 mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3902-04.
23. Jing S, Wen D, Yu Y *et al.* GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* 1996; 85:1113-.
24. Durbec P, Gutierrez MCV, Kilkenny C. GDNF signaling through the RET receptor tyrosine kinase. *Nature* 1996; 381:789-92.
25. Machens A, Gimm O, Hinze R, Hoppner W, Boehm BO, Dralle H. Genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid carcinoma: oncological features and biochemical properties. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1104-09.
26. Lombardo F, Baudin E, Chiefari E, Arturi F, Bardet S, Caillou B, Conte C, Dallapiccola B, Giuffrida D, Bidart JM, Schlumberger M, Filetti S. Familial medullary thyroid carcinoma: clinical variability and low aggressiveness associated with RET mutation at codon 804. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1674-80.
27. Brandi ML, Gagel RF, Angelli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C *et al.* Consensus: guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:5658-71.
28. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E *et al.* Application of genetic screening information to the management of medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2. *End Metab Clin Am North* 1996; 25:1-24.
29. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989; 6:6.36-49.
30. Ceccherini I, Hofstra RMW, Luo Y, Stulp RP, Barone V, Stelwagwn T. DNA polymorphisms and conditions for SSCP analysis of the 20 exons of the RET proto-oncogene. *Oncogene* 1994; 9:3025-29.
31. Tsai MS, Ledger GA, Khosla S. Identification of multiple endocrine neoplasia, type 2 gene carriers using linkage analysis and analysis of the RET proto-oncogene. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78:1261-67.
32. Wohllk N, Cote GJ, Evans DB, Goepfert H, Ordonez NG, Gagel RF. Application of genetic screening information to the management of medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2. *End Metab Clin Am North* 1996; 25:1-24.
33. Sanger F, Niklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA* 1977; 74:5163-69.
34. Lips CJM, Landsvater RM, Hoppener JWM, Geerdink RA, Blijham G, Jansen-Schillhorn van Veen JM *et al.* Clinical Screening as compared with DNA Analysis in Families with Multiple Endocrine Neoplasia type 2 A. *N Engl J Med* 1994; 828-35.
35. Heshmati HM, Gharib H, Van Heerden JA, Sizemore GW. Advances and controversies in the diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma. *Am J Med* 1997; 103:60-9.
36. Hansen HS, Topping H, Godballe C, Jäger AC, Nielsen FC. Is thyroidectomy necessary in RET mutations carriers of the familial medullary thyroid carcinoma syndrome? *Cancer* 2000; 89:863-67.
37. Marsh DJ, Learoyd DL, Robinson BG. Medullary thyroid carcinoma: recent advances and management update. *Thyroid* 1995; 5:407-11.