

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA
MESTRADO

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

MÁRCIA KHALED PUÑALES

ORIENTADOR: PROFA. DRA. ANA LUIZA MAIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Endocrinologia, da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, dezembro de 2000.

Este trabalho é dedicado:

A meus pais, pelo incentivo inicial, fundamental na minha formação.

A meus irmãos, Karina, Dina, Raphic e Layane pela admiração e carinho.

A meus amigos, Regis e Flávia, pelo apoio e compreensão.

A minhas amigas, Eliane e Maria Alice, pela força e encorajamento.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, a Profa. Dra. Ana Luiza Maia pelos ensinamentos, incentivo a pesquisa e principalmente pelo apoio e perseverança quando eu pensava desistir.

Ao Prof. Dr. Jorge Luiz Gross, pelo incentivo inicial, desde o período em que cursava a residência médica em pediatria.

Ao Dr. Hans Graf pelo carinho e confiança, e, principalmente por manter o elo com os amigos da cidade de Curitiba.

Aos pacientes, pela contribuição e por tornarem possível a realização do meu trabalho.

A ex-aluna de iniciação, Simone, a qual facilitou o andamento do estudo.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Lenara, Márcia, Richard e Caroline, pelo apoio e compreensão.

Ao colega, Dr. Gastão pela colaboração e encaminhamento de algumas famílias para análise.

A acadêmica, Fabíola, pela coleta dos dados das famílias de Curitiba.

E a todos os meus amigos, que de certa forma, contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

SINOPSE

SUMMARY

1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	13
2- MÉTODOS.....	14
2.1 Delineamento	15
2.2 Pacientes	15
2.3 Estudos <i>in vitro</i>	17
2.3.1 Estratégias para diagnóstico molecular	17
2.3.2 Extração DNA	18
2.3.3 PCR (reação polimerase em cadeia).	18
2.3.4 Restrição Enzimática	19
2.3.5 Sequenciamento	20
3- RESULTADOS	22
3.1 Aspectos Gerais	23

3.2 CMT Hereditário	24
3.2.1 Dados clínicos e laboratoriais	24
3.2.2 Rastreamento do feocromocitoma	25
3.2.3 Rastreamento do hiperparatireoidismo	25
3.2.4 Fenótipo	25
3.2.5 Avaliação das famílias	26
3.3 CMT Esporádico	27
3.4 Aspectos Moleculares	28
3.4.1 CMT Hereditário	28
3.4.2 CMT Esporádico	33
4- DISCUSSÃO	34
5- CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS	53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Estrutura do proto-oncogene *ret*7
- Figura 2- Efeito das mutações no proto-oncogene *ret* na função do receptor9
- Figura 3- Gel de agarose ilustrativo da Ilustração da utilização diagnóstica da enzima de restrição *Rsa I*29
- Figura 4- Gel de agarose ilustrativo da Ilustração da utilização diagnóstica da enzima de restrição *Hha I*30
- Figura 5- Gel de agarose ilustrativo da Ilustração da utilização diagnóstica da enzima de restrição *Fok I*.....31

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Tipos, freqüência e apresentação clínica do CMT5
- Tabela 2- Famílias com NEM Tipo 2 com mutações no proto-oncogene *ret* nos exons 10, 11, 13, 14 e 1612
- Tabela 3- Classificação Operacional dos fenótipos da NEM tipo 2 formulada pelo Comitê Internacional de mutações do proto-oncogene *ret*16
- Tabela 4- Seqüência de nucleotídeos dos primers utilizados na amplificação dos diferentes exons e tamanhos dos respectivos fragmentos.....19
- Tabela 5- Características das famílias com Neoplasia Endócrina Múltipla de acordo ao Comitê Internacional.....32

SINOPSE

O carcinoma medular de tireóide (CMT) é responsável por 5 a 8% dos tumores malignos da tireóide, ocorrendo na forma esporádica (80%) ou hereditária (20%). O CMT hereditário é uma doença autossômica dominante, maligna, de difícil diagnóstico clínico-laboratorial precoce e de alta mortalidade, podendo apresentar-se como componente das síndromes de Neoplasia Endócrina Múltipla (NEM 2A e 2B) ou Carcinoma Medular de Tireóide Familiar (CMTF) ou outras formas (famílias não incluídas nas formas anteriores). A síndrome genética NEM 2A se caracteriza por CMT (95%), feocromocitoma (30-50%) e hiperparatireoidismo (10-20%). De acordo a alguns autores e baseando-se na apresentação clínica, a síndrome NEM 2A foi subdividida em 3 subtipos fenotípicos: 1) NEM 2A(1), que consiste no acometimento pelos 3 componentes da síndrome (CMT, feocromocitoma e hiperparatireoidismo), 2) NEM 2A(2), que consiste no acometimento por 2 componentes da síndrome (CMT e feocromocitoma) e 3) NEM 2A(3), que consiste no acometimento por 2 componentes da síndrome (CMT e hiperparatireoidismo). A síndrome NEM 2B se caracteriza pela presença de CMT (90%), feocromocitoma (45%), ganglioneuromatose intestinal (100%) e hábitos marfanóides (65%). O CMTF, consiste na presença de CMT isolado em pelo menos 4 membros da mesma família e as outras formas hereditárias consistem no acometimento de 2 ou 3 membros da família com CMT, sem a presença de feocromocitoma ou hiperparatireoidismo até o momento do rastreamento.

Diferentes mutações no proto-oncogene *ret* foram identificadas como responsáveis pelo CMT e estudos recentes sugerem uma correlação entre o genótipo-fenótipo, podendo existir uma variabilidade grande de síndromes clínicas associadas as diferentes mutações, ou seja, indivíduos com um determinado tipo de mutação tem uma probabilidade maior ou menor de apresentar um determinado componente da síndrome. Visto que o CMT é uma doença autossômica dominante, maligna e de alta mortalidade, a aplicação do rastreamento genético para o manejo adequado da hereditariedade do CMT é de extrema importância, já que o diagnóstico precoce determina a conduta e o prognóstico no indivíduo afetado e em seus familiares. O presente estudo teve como objetivo a análise molecular do proto-oncogene *ret* no CMT e avaliar uma possível correlação entre as mutações identificadas e os diferentes fenótipos nos indivíduos afetados e seus familiares. Foram selecionadas para estudo molecular 21 famílias com diagnóstico histopatológico de CMT, provenientes de diferentes localidades e encaminhados aos ambulatórios de endocrinologia do HCPA e HC-Curitiba. O DNA genômico foi extraído de leucócitos periféricos dos indivíduos afetados e/ou familiares. Os exons 10, 11, 13 e/ou 16 do proto-oncogene *ret* foram amplificados pela técnica de reação polimerase em cadeia (PCR) com *primers* específicos. A presença de mutações foi determinada pela análise de restrição enzimática e/ou sequenciamento, seguindo a estratégia diagnóstica. Das 21 famílias analisadas, 14 famílias apresentavam a forma hereditária do CMT e 7 a forma esporádica. Das famílias com CMT hereditário (6 NEM 2A, 2 NEM 2A associada à Líquen Amilóide Cutânea (CLA), 1 NEM 2B, 2 CMTF e 3 outras formas hereditárias), no total de 96 indivíduos. Em todas as famílias com NEM 2A, inclusive na variante CLA, a mutação localizava-se no exon 11 (códon 634; TGC → CGC ou TGC → TAC) e nas famílias com CMTF, no exon 10 (códon 618, TGC → AGC). No paciente portador da NEM 2B foi detectada uma mutação *de novo* no exon 16 (códon 918, ATG → ACG). Nas outras formas de carcinoma hereditário, as mutações localizavam-se no exon 11 (códon 634, TGC → CGC ou TGC → TAC) numa

família, em outra no exon 10 (códon 618, TGC → AGC) e na última no exon 10 (códon 618 ou 620, TGC → CGC). Foram identificadas mutações em todos os indivíduos com história clínica e laboratorial sugestiva de doença hereditária e/ou diagnóstico histopatológico de CMT multicêntrico e em 8 familiares assintomáticos, destacando a importância do rastreamento genético como método diagnóstico.

SUMMARY

Medullary Carcinoma of the Thyroid (MTC), a rare thyroid malignancy originating from parafollicular C cells, represents less than 8% of all thyroid cancers and may occur either as sporadic (80%) or hereditary (20%) disease. 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. MEN 2A is characterized by MTC (95%), phaeochromocytoma (30-50%) and hyperparathyroidism (10-20%). Three phenotypic subtypes have been reported. MEN 2A(1) corresponds to kindred with all three components. MEN 2A(2) includes kindred with MTC and phaeochromocytoma, without hyperparathyroidism. MEN 2A(3) relates to kindred with MTC and hyperparathyroidism, without phaeochromocytoma. A variant of MEN 2A, associated with pruritic skin lesions known as cutaneous lichen amyloidosis (CLA), has also been described in a few kindred. MEN 2B syndrome is well characterized by having a specific phenotype, by MTC (90%), neuromas and ganglioneuromatosis (100%) and marfanoid habitus (65%). FMTC includes kindred with at least 4 members with MTC, without other components of MEN 2A or MEN 2B. Other hereditary MTCs correspond to kindred with MTC in 2 or 3 members, without phaeochromocytoma or hyperparathyroidism.

Germline mutations in the *ret* proto-oncogene, which codes for a receptor tyrosine kinase, cause MEN 2 and recent studies suggest a relationship between specific mutations and different phenotypes in MEN 2 syndromes. Early diagnosis and

treatment considerably improve the prognosis in patients with MTC and genetic screening is a fundamental tool for the management of MTC hereditary. 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 21 families with histopathological diagnosis of MTC were included in the study, 14 with the hereditary pattern and 7 with sporadic tumors. DNA was extracted from leukocytes of the affected individuals and relatives. Exons 10, 11, 13 and 16 were amplified by PCR, using specific primers. The presence of mutation was determined by enzymatic restriction analysis and/or automatic sequencing. The phenotypes of hereditary MTC were as follows: 6 MEN 2A, 2 MEN 2A associated with CLA, 1 MEN 2B, 2 FMTC and 3 other forms. We identified mutations at codon 634, exon 11 (TGC → CGC or TGC → TAC) in all families with MEN 2A and MEN 2A+ CLA. In both cases of FMTC, the mutation was found in the codon 618, exon 10 (TGC → AGC). A mutation at codon 918, exon 16 (ATG → AGC) was identified in the only individual with MEN 2B, while in the other hereditary forms of the MTC, mutations were identified at 3 different codons, 634 (exon 11, TGC → CGC or TGC → TAC), 618 (exon 10, TGC → AGC) and 618 or 620 (exon 10, TGC → CGC). The genetic screening was able to identify 8 asymptomatic carriers and determine the hereditary MTC pattern in 2 individuals with apparently sporadic tumors. In conclusion, genetic testing can identify affected and asymptomatic individuals with hereditary disease, allowing early diagnosis and treatment. In addition, the results suggest a correlation between specific mutations and phenotypes, meaning that molecular analysis could also improve the follow up of gene carriers.

1. INTRODUÇÃO

1- 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 ⁽²⁾. A forma esporádica ou não hereditária é a mais comumente encontrada, sendo responsável por aproximadamente 80% dos casos. O restante (20%) 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 ⁽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% ⁽⁶⁻⁸⁾. O hiperparatireoidismo ocorre em aproximadamente 10 a 20% dos indivíduos com NEM 2A, acometendo geralmente todas as glândulas paratireóides ^(6,9). 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 ^(6,9). A síndrome NEM 2A foi subdividida em três subtipos fenotípicos (tabela 1), baseando-se na apresentação clínica ^(4,10,11): 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) ⁽¹²⁾ ou doença de Hirschsprung ⁽¹³⁾.

A síndrome NEM 2B caracteriza-se por CMT (90%), feocromocitoma (45%), ganglioneuromatose (100%) e hábitos marfanóides (65%) ^(5,8,14,15). Essa síndrome caracteriza-se por um fenótipo único que inclui ganglioneuromatose difusa da língua, lábios, olhos e do trato gastrointestinal ^(8,16). As fácies características são precocemente reconhecidas durante a infância (neuromas da mucosa) ^(8,16). O envolvimento gastrointestinal pode causar diarreia e constipação intermitente, dor abdominal, megácolo e ocasionalmente obstrução intestinal ^(8,16,17). Outro aspecto fenotípico da NEM 2B é o hábito marfanóide com dedos e extremidades longas, hiperextensão de articulações e anormalidades epifisárias ^(8,16), no entanto estes pacientes não apresentam as anormalidades cardíacas da síndrome de Marfan ⁽¹⁸⁾.

O CMTF, consiste na presença de CMT isolado em pelo menos quatro membros da mesma família ^(3,8,10). 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 ^(8,10). Os tipos de tumores e frequência de aparecimento estão ilustrados na tabela 1.

O CMT é um tumor cujas as células C produzem uma variedade de substâncias, incluindo: calcitonina (CT), *calcitonin gene-related peptide* (CGRP), antígeno carcinoembrionário (CEA), amilóide, somatostatina, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), prostaglandinas, serotonina e outras ^(16,19-23). A CT é o marcador mais importante sendo utilizado na detecção, no manejo pós cirúrgico de indivíduos com CMT e na avaliação de indivíduos afetados ou com risco de apresentar a

doença. Visto que alguns indivíduos apresentam níveis normais de CT testes provocativos são necessários para avaliar a sua secreção⁽²⁴⁾. Os testes de estímulo podem ser realizados com a infusão de cálcio ou pentagastrina, sendo o último mais eficaz. Embora estes testes possam ser aplicados em crianças e jovens, são de difícil realização técnica (efeitos colaterais durante a realização como náuseas, vômitos, sabor metálico, mal-estar, dor abdominal e outras manifestações) e apresentam baixa especificidade e sensibilidade (falso-positivos e falso-negativos podem ser observados de 5 a 18% dos casos)⁽²⁴⁾. Recentemente, Erdogan e cols.⁽²⁵⁾ descreveu que o omeprazole, droga utilizada para bloquear a secreção ácida gástrica, quando utilizada por um curto período, provoca a liberação de CT e pode também ser utilizada como teste provocativo. No entanto, mais estudos são necessários para comprovação da eficácia. Além da CT, outras substâncias podem ser avaliadas nestes pacientes como o CEA e o CGRP plasmático, que estão elevados em pacientes com tumores grandes ou em casos de doença metastática^(26,27). Os indivíduos com feocromocitoma podem apresentar inicialmente um aumento discreto da epinefrina urinária ou da excreção fracionada de catecolaminas^(8,28,29), no entanto, outros podem ser assintomáticos. O rastreamento para hiperparatireoidismo deve ser realizado pelas dosagens de cálcio sérico a cada 2 anos e se documentada a hipercalcemia o hormônio da paratiróide (PTH) deve ser determinado para confirmação diagnóstica^(8,9). A CT basal e pós-estímulo são exames utilizados como marcadores da ação tumoral pós-ressecção cirúrgica pois são indicativos de recidiva ou de doença metastática⁽²⁸⁾.

Tabela 1 - Tipos, frequência e apresentação clínica do CMT

FENÓTIPO	FREQUÊNCIA	APRESENTAÇÃO CLÍNICA
CMT esporádico	80%	CMT
NEM 2A		
2A(1)	4%	CMT, feocromocitoma e hiperparatireoidismo
2A(2)	4%	CMT e feocromocitoma
2A(3)	1%	CMT e hiperparatireoidismo
NEM 2B	3%	CMT, feocromocitoma e ganglioneuromas
CMTF	1%	CMT (pelo menos em 4 membros)
Outros	7%	CMT (em 2 ou 3 membros)

Adaptado ⁽⁸⁾

O CMT esporádico é usualmente unifocal, unilateral e surge aproximadamente na quinta ou sexta década de vida ⁽⁸⁾. As manifestações clínicas incluem nódulo ou massa tireoidiana, linfadenomegalia cervical ou outros sintomas cervicais locais, sendo raro o aparecimento de diarreia ou sinais de doença metastática ⁽⁸⁾. Na forma hereditária, o tumor é usualmente multifocal e bilateral, surgindo em torno da terceira ou quarta década de vida no NEM 2A e CMTF e mais precocemente no NEM 2B (durante infância podem ser observados neuromas) ^(8,15,17). Do ponto de vista anatômico, a forma hereditária acomete mais freqüentemente o terço superior e médio de cada lobo tireoidiano ⁽⁸⁾. Macroscopicamente, CMT é sólido, firme e não encapsulado e na microscopia, apresenta-se sob aspecto de uma rede de células neoplásicas uniformes, podendo observar-se a presença de amilóide e de calcificações ⁽⁸⁾. Os padrões de crescimento tumoral mais comumente encontrados são o trabecular e o alveolar. O CMT esporádico usualmente não é precedido por hiperplasia celular, enquanto que na forma hereditária a hiperplasia é precursora do carcinoma, observada até mesmo ao nascimento ^(8,30).

O prognóstico dos indivíduos com CMT varia de acordo a especificidade do tumor bem como a associações com neuromas, hiperparatireoidismo, feocromocitoma ou CLA. Estima-se uma sobrevida de 10 anos em 65% dos casos de NEM 2⁽¹²⁾, no entanto NEM 2B é mais agressiva com o aparecimento de metástases mais precocemente, principalmente á distância (pescoço, fígado, mediastino, osso e pulmões), levando a morte⁽¹⁰⁾.

Estudos Genéticos

Em 1970, foram realizados os primeiros estudos para identificação da mutação genética causadora do CMT⁽³¹⁾. Primeiramente, os estudos se focalizavam no locus HLA, porém sem sucesso. Com o aprimoramento da técnica de *linkage analysis*, análises importantes na identificação do agente causador do carcinoma medular de tireóide foram obtidos. Os primeiros resultados relacionados ao mapeamento do gene foram expostos no *First International Work Shop on Multiple Endocrine Type 2* em 1984^(31,32). Até o segundo *workshop*, em 1986, o locus do gene ainda não havia sido identificado, no entanto algumas porções do genoma humano já haviam sido excluídas⁽³³⁾. Em 1987, foi realizado o mapeamento do gene na região centromérica do cromossoma 10, na região proximal do braço longo do cromossoma, banda q11.2.^(34,35) Em 1993, foi identificado o gene causador CMT, o proto-oncogene *ret*^(36,37) e apenas alguns meses após foram identificadas as mutações nos exon 10 e 11⁽³⁶⁻³⁸⁾.

O proto-oncogene *ret* apresenta 21 exons (Figura 1) e codifica um receptor tirosino-quinase expresso nas células derivadas da crista neural⁽³⁹⁾, incluindo tumores originados dessas células como CMT e feocromocitoma. A proteína Ret apresenta um domínio extracelular com uma estrutura homóloga ao gene da família da *cadherin* e outro domínio

rico em cisteína, com papel importante na conformação e dimerização das proteínas; além desse domínio, o *ret* apresenta ainda um domínio transmembrana e dois domínios intracelulares citoplasmáticos tirosino-quinase (TK1 e TK2) ⁽⁴⁰⁾. O ligante do receptor já foi identificado, é o denominado GDNF (*glial-cell-line derived neurotrophic factor*), um fator de crescimento neuronal ⁽⁴¹⁾, membro distante da superfamília do TGF- β (*transforming growth factor- β*) ⁽⁴²⁾. O GDNF parece ser responsável pela diferenciação e sobrevivência dos neurônios do sistema nervoso central, além de participar na organogênese dos rins e no desenvolvimento do sistema nervoso periférico ^(41,42). O mecanismo pelo qual o GDNF induz a ativação do proto-oncogene *ret* é mediado por receptores α -GDNF (receptores de membrana) ⁽⁴²⁾.

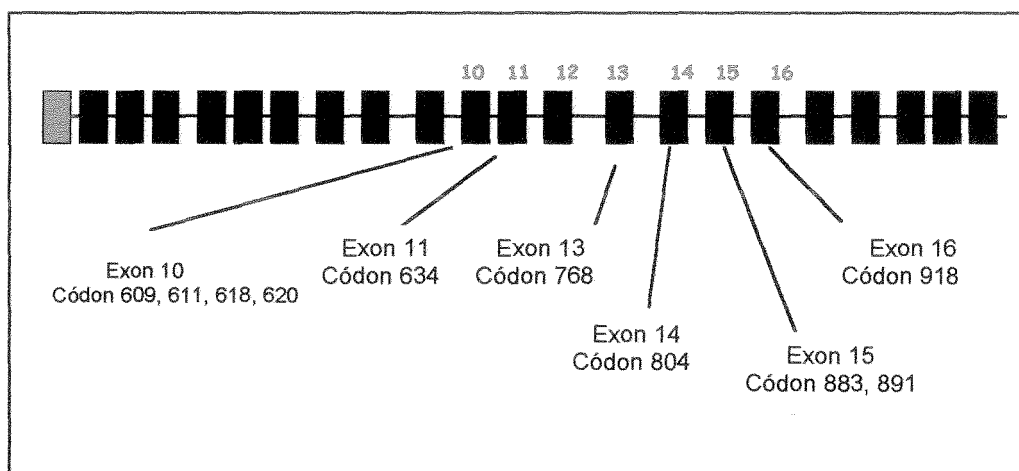


Figura 1 - Estrutura do proto-oncogene *ret*. Os exons e os respectivos códons nos quais foram identificadas mutações associadas a Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 2 estão assinaladas.

O mecanismo molecular pelo qual as mutações no proto-oncogene *ret* desencadeariam o processo neoplásico foi determinado através de elegantes estudos *in vitro* realizados pelo grupo de Santoro e cols ⁽⁴³⁻⁴⁵⁾ (Fig 2). De modo simplificado, no

indivíduo normal o proto-oncogene *ret* somente é ativado na presença do GDNF, que ao se ligar ao receptor RET, promove a sua dimerização, com autofosforilação do resíduo tirosina e liberação de fosfato para a cadeia de substratos reguladora^s do crescimento e diferenciação celular ⁽⁴⁵⁾. A presença de mutação no domínio extracelular, por exemplo, no códon 634, causa a dimerização do receptor, aumento da fosforilação, com conseqüente transformação celular. Neste tipo de mutação, mesmo na ausência do ligante, o receptor estaria constantemente ativado. Mutações no domínio intracelular tirosino-quinase (códon 918), não interferem na dimerização do receptor, mas induz a um aumento da fosforilação, mesmo na ausência da dimerização da proteína, resultando na transformação celular. A ativação do proto-oncogene *ret* é responsável pelo processo de transformação neoplásica nos tecidos onde é expresso, células C da tireóide, cromafins e da paratireóide, mas parece representar apenas um passo inicial na via oncogênica ^(4,44). Evidências moleculares de outras anormalidades cromossômicas sugerem que eventos citogenéticos adicionais estão, provavelmente, envolvidas na progressão para a malignidade. A especificidade tecidual à mutações do *ret* ainda não é bem compreendida, mas alguns autores propõem que exista um limiar ao efeito das alterações moleculares ⁽⁴⁵⁾. Dentro desse conceito, as glândulas tireóide e paratireóides seriam as mais e menos susceptíveis, respectivamente, às alterações da proteína RET ⁽⁹⁾.

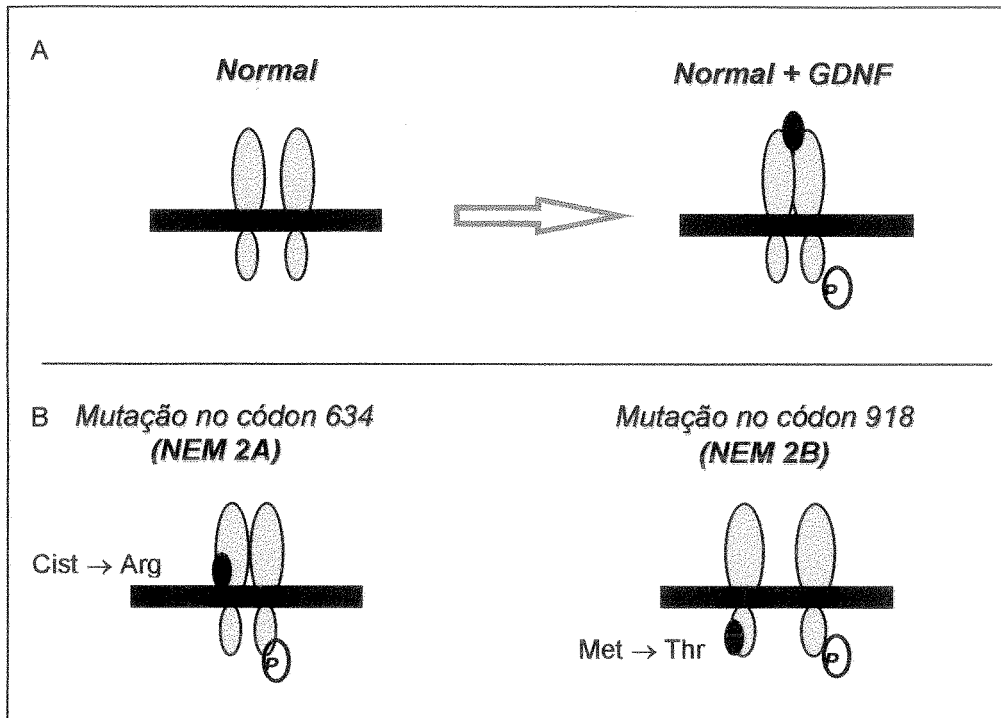


Figura 2 - Efeito das muta es no proto-oncogene *ret* na fun o do receptor. A. Normalmente, o receptor *ret* existe como uma mol cula  nica. Intera es com o ligante (GDNF, *glial-cell-line derived neurotrophic factor*) resultam na dimeriza o do receptor, autofosforila o e fosforila o do substrato. B. Muta es no c don 634 (NEM 2A), resultam na dimeriza o do receptor com subsequente autofosforila o e fosforila o de substrato. No entanto, muta es no c don 918 (NEM 2B), resultam na ativa o do res duo tirosino-quinase do receptor na aus ncia de dimeriza o, (adaptado ⁽⁵⁾).

Principais Muta es no Proto-oncogene *ret*

As muta es descritas est o localizadas basicamente nos exons 10, 11 e 16 ^(38,46-52), no entanto foram relatadas muta es com menor frequ ncia nos exons 13, 14 e 15 ^(50,53,54). No CMTF e NEM 2A, as muta es mais frequentes afetam um dos cinco res duos de ciste na no exon 10 ou 11, no dom nio extracelular do proto-oncogene *ret* ^(38,46). No CMTF

também foram descritas mutações no resíduo ácido glutâmico no exon 13⁽⁵³⁾ e no resíduo de valina no exon 14⁽⁵⁴⁾, localizadas no domínio intracelular do RET. A mutação mais freqüente na NEM 2A localiza-se no exon 11, códon 634, promovendo a troca do aminoácido cisteína (TGC) em arginina (CGC), enquanto que no CMTF, a alteração mais comum ocorre no exon 10, códon 618 (tabela 4)^(55,56).

A síndrome NEM 2B está associada em 95% dos casos à presença de mutação no exon 16, códon 918, no domínio intracelular do proto-oncogene *ret*, com troca do aminoácido metionina (ATG) em treonina (ACG)⁽⁴³⁾. Alguns estudos sugerem que essa modificação acarrete alteração na especificidade ao substrato ou na propriedade catalítica da proteína RET⁽⁴⁸⁾. Recentemente, outras mutações foram descritas, como no exon 15 (códon 791 e 883)⁽⁵⁰⁾. Nos indivíduos com NEM 2B 50% das alterações genéticas descritas são mutações *de novo*⁽⁴⁹⁾, provavelmente devido ao perfil mais agressivo e à mortalidade associada a essa síndrome.

Mutações na linhagem germinativa também já foram relatadas em casos de pacientes com CMT aparentemente esporádico (aproximadamente 5%)^(5,43,47). No entanto, provavelmente a maioria dos casos deve corresponder a mutações *de novo* no CMTF ou NEM 2A com avaliação familiar incompleta⁽⁸⁾. Um subgrupo de pacientes CMT esporádico (25%) apresentam mutações somáticas nos exons 13 e 16^(43,48,53).

A ocorrência de intensidade variáveis de indução da dimerização das proteínas seria uma possível explicação para a existência dos diferentes tipos fenotípicos causados pelas mutações nos diferentes resíduos de cisteínas do RET, segundo alguns autores^(43,45,48). Uma das correlações citadas seria pacientes com mutação no códon 634, que apresentam uma freqüência maior de feocromocitoma e hiperparatireoidismo do que pacientes com mutações em outros códons, sendo que o hiperparatireoidismo é mais comum quando a mutação é do subtipo cisteína → arginina⁽¹⁰⁾. Nas mutações na NEM 2B, a atividade

quinase poderia ser potencializada na presença do ligante, sugerindo que mutações presentes no domínio intracelular do receptor possa resultar em estimulação mais forte do que aquela observada na porção extracelular ⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾. Na NEM 2B, além da alteração quantitativa na atividade quinase basal, a troca de amino-ácidos mais freqüentemente observada, metionina por treonina (Met918Thr), parece afetar a qualidade da geração de sinais intracelulares (*RET-generated intracellular signals*) ⁽⁶⁰⁾. Essas alterações talvez seja a explicação para o comportamento mais agressivo do CMT na síndrome da NEM 2B. Sendo assim, as mutações presentes no domínio intracelular do receptor, apresentam uma atividade mutante mais elevada e mais agressiva ^(8,60-62).

Estudos sugerem uma correlação entre o genótipo e o fenótipo encontrados, podendo existir uma variabilidade grande de síndromes clínicas associadas as diferentes mutações, ou seja, indivíduos com um determinado tipo de mutação tem uma probabilidade maior ou menor de apresentar um determinado componente da síndrome ⁽¹⁰⁾. Recentemente foi realizado um estudo, avaliando 477 famílias com NEM 2 acompanhadas em 18 centros de referência, com o objetivo de estabelecer possíveis correlações entre mutações e síndromes clínicas ⁽¹⁰⁾. Os resultados obtidos são favoráveis a associação de determinadas mutações com a presença ou não dos diferentes componentes da NEM 2. Mutações no códon 634 (exon 11), por exemplo, foram associada à presença de feocromocitoma e hiperparatireoidismo, sendo que o tipo de mutação que ocorre de modo mais freqüente na NEM 2A, TGC → CGC, 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 ⁽¹⁰⁾. Na rara síndrome de NEM 2A associado ao líquen amilóide cutâneo (CLA) ⁽¹⁰⁾, a mutação ocorre 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) ⁽¹⁰⁾.

Tabela 2 – Famílias com NEM Tipo 2 com mutações no proto-oncogene *ret* nos exons 10, 11, 13, 14 e 16

Tipo	CÓDON, Nº (%) DE FAMÍLIAS COM MUTAÇÕES							
	609	611	618	620	634	768	804	918
NEM								
2B	0	0	0	0	0	0	0	75 (100)
2A(1)	0	0	5 (6)	2 (2)	84 (92)	0	0	0
2A(2)	0	3 (3)	4 (4)	12 (13)	76 (80)	0	0	0
2A(3)	1 (8)	2 (15)	1 (8)	0	9 (69)	0	0	0
CMTF	2 (7)	1 (3)	10 (33)	5 (17)	9 (30)	3 (10)	0	0
Outros	2 (1,5)	7 (5)	18 (13)	13 (10)	93 (68)	1†(<!)	2†(1,5)	0

Adaptado ⁽¹⁰⁾

O CMT é uma doença autossômica dominante, maligna, de difícil diagnóstico clínico-laboratorial precoce e de alta mortalidade quando diagnosticada tardiamente. A aplicação do rastreamento genético para o manejo adequado da hereditariedade do Carcinoma Medular de Tireóide é de extrema importância, já que o diagnóstico precoce determina a conduta terapêutica e o prognóstico da doença no indivíduo afetado e em seus familiares.

1.1- OBJETIVOS

- 1- Análise molecular do proto-oncogene *ret* no carcinoma medular de tireóide.
- 2- Avaliar uma possível correlação entre as mutações identificadas e os diferentes fenótipos nos indivíduos afetados e seus familiares.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2- MÉTODOS

2.1 Delineamento do estudo:

Estudo clínico e descritivo.

2.2 Pacientes:

A população em estudo foram os 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 (em anexo) padronizada e para coleta de 10 ml de sangue para extração de DNA, após aceitarem participar do estudo e assinarem o termo de consentimento (em anexo). Os dados clínicos e laboratoriais (rastreamento CMT, feocromocitoma, hiperparatireoidismo e a presença de metástase), citopatológico e anatomopatológico foram obtidos através da consulta ao prontuário do paciente, solicitados pelo médico assistente conforme plano diagnóstico e terapêutico.

Foram incluídas no estudo 21 famílias. Para fins da apresentação descritiva consideramos caso índice ou probando nas famílias com CMT hereditário, o indivíduo no qual foi estabelecido primeiramente o diagnóstico de CMT.

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*), ilustrado na tabela 3.

Tabela 3 – Classificação Operacional dos fenótipos da NEM tipo 2 formulada pelo Comitê Internacional de mutações do proto-oncogene *ret*.

CATEGORIA	ASPECTOS CLÍNICOS
NEM 2A	Famílias com CMT e feocromocitoma ou doença paratireoidiana ou ambas
NEM 2A(1)	Famílias com CMT, feocromocitoma e doença paratireoidiana
NEM 2A(2)	Famílias com CMT e feocromocitoma, rastreamento negativo para doença paratireoidiana no afetado e nos familiares de risco
NEM 2A(3)	Famílias com CMT e doença paratireoidiana, rastreamento negativo para feocromocitoma no afetado e nos familiares de risco
NEM 2B	Famílias com CMT, com ou sem feocromocitoma, com anormalidades clínicas específicas, usualmente sem doença paratireoidiana
CMTF	Famílias com pelo menos 4 membros afetados com CMT, sem evidências de feocromocitoma ou doença paratireoidiana no afetado e nos familiares em risco
Outros tipos	Famílias com menos de 4 membros afetados com CMT, sem evidências de feocromocitoma ou doença paratireoidiana no afetado e nos familiares em risco

Os resultados obtidos a partir da análise genética (presença ou não da mutação) foram informados aos pacientes e/ou familiares através de consulta individual, com os responsáveis pelo estudo.

2.3 Estudos *in vitro*

2.3.1 Estratégias para diagnóstico molecular

Primeiramente foi analisado o probando de acordo as mutações mais freqüentes descritas, citada na tabela 2. De acordo aos resultados foram analisados os familiares de primeiro grau. Em caso de positividade dos familiares eram posteriormente analisados seus descendentes e em caso de negatividade desses familiares não se prosseguia com a investigação dos descendentes. De acordo com literatura 80 – 90% das mutações da NEM 2A estão situadas exon 11, no códon 634, sendo este o primeiro local a ser analisado, utilizando as enzimas de restrição específicas para esses sítios. Dessa mesma forma eram analisados os indivíduos com NEM 2B e CMTF. Os indivíduos com história clínica e anatomopatológico sugestivo de doença esporádica foram submetidos a restrição enzimática, amplificando os exons 10, 11 e 13, sendo excluída a presença de mutações germinativas em aproximadamente 95%, através da utilização dessa técnica. Sendo assim, o método de restrição enzimática foi utilizado para analisar mutações recorrentes e casos esporádicos e o sequenciamento para mutações novas ou investigação de alguns casos sugestivos de doença esporádica.

2.3.2 Extração DNA

Foi extraído o DNA genômico dos leucócitos periféricos, através da técnica padrão. Resumidamente, ao sangue total extraído (5 ml) foi acrescentado 45 ml de água estéril gelada, para lise das hemácias com posterior centrifugação (20 minutos, 400 rpm). A seguir, o sobrenadante é descartado e ao sedimento é adicionado 25 ml da solução 0,1% de Triton X-100 e nova centrifugação por mais 20 minutos. Logo após, descarta-se novamente o sobrenadante e adiciona-se ao sedimento 3 ml de tampão de lise nuclear (*Nucleolysis 1X*), agita-se e acrescenta-se 120 μ l de proteinase K (10 mg/ml em tampão) e 200 μ l de SDS 10%. Posteriormente, esse material é incubado a 55°C durante 1 hora ou 37°C, 12 -14 horas. Seqüencialmente, adiciona-se 1 ml de solução de acetato de amônio 9,6 M, agita-se no vortex por 15 segundos e repousa-se a temperatura ambiente por 10 a 15 minutos. Esse material é então centrifugado por 20 minutos a 400 rpm para posterior adição de 10 ml de etanol absoluto, misturando-se levemente o conteúdo para finalmente 'pescar' o DNA com tubo capilar para micro-hematócrito, colocar em novos tubos *ependorf* estéril e ressuspendê-lo em 200 a 300 μ l de TE. O DNA extraído foi quantificado e posteriormente armazenado a menos 20°C até a análise molecular.

2.3.3 PCR (reação polimerase em cadeia)

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 μ M de cada primer (*forward* e *reverse*), 2,0 mMol MgCl₂ e 1U

de Taq polimerase em 50 μ l de solução final. Os fragmentos de DNA amplificados foram posteriormente submetidos a restrição enzimática ou sequenciamento.

As reações de PCR foram realizadas, utilizando primers específicos para os exons 10, 11, 13 e 16 (tabela 4). Os fragmentos amplificados foram posteriormente submetidos a eletroforese em gel de agarose à 1,5%. As condições de ciclo de temperatura utilizadas foram: 3 minutos à 94°C seguidos de 35 ciclos (94°C, 1 minuto, 56 -60°C, 30 segundos (temperatura de anelamento, vide tabela) e 72°C, 2 minutos.

Tabela 4 – Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados na amplificação dos diferentes exons e tamanhos dos respectivos fragmentos.

EXON	PRIMER	SEQUÊNCIA SINTETIZADA	FRAG.	TEMPERATURA ANELAMENTO
10	RET10F	5'- GGC AGC ATT GTT GGG GGA CAC -3'	173 pb	64° C
	RET10R	5'- GTT GAG ACC TCT GTG GGG CT -3'		62° C
11	RET11F	5'- ATG AGG CAG AGC ATA CGC AGC C -3'	347 pb	60° C
	RET11R	5'- CTT GAA GGC ATC CAC GGA GAC C -3'		60° C
13	INT12F	5'- AAC TTG GGC AAG GCG ATG CA -3'	276 pb	57° C
	INT13R	5'- AGA ACA GGG CTG TAT GGA GC -3'		57° C
16	M2BF	5'- AGG GAT AGG GCC TGG GCT TC -3'	192 pb	57° C
	M2BR	5'- TAA CCT CCA CCC CAA GAG AG -3'		57° C

2.3.4 Restrição Enzimática

O princípio deste método consiste no fato de que uma mutação pode criar ou destruir o sítio de restrição de uma determinada enzima de restrição (endonuclease). Ou seja, a

enzima pode clivar uma seqüência específica de um fragmento de DNA, sendo que esta seqüência é reconhecida especificamente por cada enzima. Demonstrando o alelo normal e o alelo mutado. Desta forma esta técnica pode ser utilizada para rastreamento de mutações recorrentes bem como para confirmação de uma mutação nova após sequenciamento.

* Os produtos de PCR (15 µl) foram digeridos com a enzima de restrição apropriada em um volume total de 20 µl, de acordo com as instruções do fornecedor. Em geral, utilizou-se 15 µl do produto de PCR, 0,5 µl de enzima, 1,0 µl de tampão e completa-se o volume com água estéril e de-ionizada e quando necessário adiciona-se a reação BSA. Incuba-se a reação de acordo a temperatura e tempo indicados para cada enzima para posteriormente adicionar 5 µl de corante (*gel loading*) e eletroforese em gel de agarose à 2%. Os produtos de digestão são visualizados por transiluminação ultravioleta e seus tamanhos são comparados com um marcador de peso molecular de 100 pb. Todos os resultados obtidos foram realizados em duplicata.

2.3.5 Sequenciamento

O sequenciamento foi utilizado para identificação de mutações não diagnosticadas por restrição enzimática ou para identificar a troca de amino-ácido da mutação, utilizando método por terminação em cadeia por dideoxynucleotídeos descrito por Sanger (1997). Utilizando-se kit para sequenciamento *ALFexpress AutoCycle Sequencing Kit* e sequenciador automático ALF Express (Pharmacia), conforme orientação do fornecedor.

Este método baseia-se na identificação de uma seqüência de bases de uma fita de DNA pela síntese dessa molécula *in vitro*, desde que se forneça todos os reagentes

necessários, como o DNA em fita simples que servirá de molde para a síntese, o iniciador da síntese (*primer*), os nucleotídeos (A, T, C e G) e a enzima polimerase. A análise de DNA é baseada na fluorescência emitida e um software adequado é utilizado para interpretação dos dados.

3. RESULTADOS

3- RESULTADOS

3.1 Aspectos gerais

As famílias incluídas no estudo foram pré-classificadas como portadores de CMT hereditário ou esporádico de acordo com critérios clínicos (história familiar de câncer de tireóide, idade do diagnóstico < 40 anos, presença de outras neoplasias endócrinas).

Das 21 famílias com CMT incluídas no estudo, 12 foram pré-classificadas classificadas como hereditárias e 9 como esporádicas. No entanto, após o rastreamento genético, duas famílias pré-classificadas como esporádicas apresentavam a forma hereditária, num total de 14 famílias com CMT hereditário e 7 indivíduos com CMT esporádico.

As informações sobre 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 do ácido vanil-mandélico e/ou da dosagem das catecolaminas urinárias. O rastreamento e/ou diagnóstico de hiperparatireoidismo foi determinado através da dosagem sérica de cálcio e/ou PTH.

3.2 CMT HEREDITÁRIO

3.2.1 Dados clínicos e laboratoriais

Das 14 famílias incluídas no estudo, apenas 6 referiram história familiar sugestiva de carcinoma medular de tireóide e 2 relataram problemas associados a glândula, sem saber especificar. No entanto, ao serem questionados quanto a presença de história familiar de neoplasias em geral, 13/14 famílias acompanhadas referiam positividade (neoplasias: mama, osso, garganta, cordas vocais, esôfago, próstata e outras). A média de idade ao diagnóstico foi $38,8 \pm 14,6$ anos (7a6m - 55 anos, mediana 42,5 anos). Todos esses indivíduos apresentavam nódulos tireoidianos a palpação da tireóide. As metástases para linfonodos regionais estiveram presentes em 64,2% (9/14) e a distância em 28,5% (9/14). Houve um caso de CMT associado a gastrinoma numa paciente do sexo feminino. A ecografia tireoidiana confirmou a presença de nódulos em todos os pacientes avaliados, os quais foram posteriormente submetidos a PAAF, com diagnóstico sugestivo de carcinoma medular, com hiperplasia celular. O diagnóstico anatomopatológico demonstrou a presença de carcinoma medular multicêntrico e multifocal em 100% dos casos de carcinoma hereditário. O rastreamento do CMT com calcitonina foi realizado em 11/14 probandos, destes 9/11 foram positivos, a média dos valores de calcitonina do rastreamento inicial foi de $1915,0 \pm 1117,4$ pg/ml (642,0 – 3500,0, mediana 1850,0 – V.R. < 10,0 pg/ml). Somente um indivíduo realizou teste de estímulo com pentagastrina (recurso próprio). Os outros indivíduos com calcitonina negativa não realizaram testes de estímulo, devido as dificuldades na aquisição de pentagastrina.

3.2.2 Rastreamento de feocromocitoma

O rastreamento para feocromocitoma foi realizado em 10/14 indivíduos incluídos no estudo, com positividade em 6/10, sendo indicada a adrenalectomia. Ao serem questionados quanto a presença sinais e/ou sintomas clínicos sugestivos de feocromocitoma (hipertensão, sudorese, taquicardia), apenas cinco referiram positividade.

3.2.3 Rastreamento de hiperparatireoidismo

O rastreamento para hiperparatireoidismo, foi realizado em 10/14 indivíduos incluídos no estudo, com positividade em 3/10, sendo indicada a paratireoidectomia. Ao serem questionados quanto a presença de sinais e/ou sintomas sugestivos de hiperparatireoidismo, como dores músculo-esqueléticas, somente dois referiram queixas.

3.2.4 Fenótipo

A classificação fenotípica, de acordo ao comitê internacional da classificação operacional da NEM 2 (vide material e métodos) das 14 famílias incluídas no estudo está sumarizada na tabela 5, sendo os fenótipos encontrados: 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).

3.2.5 Avaliação das famílias

Famílias com NEM 2A:

Das famílias com NEM 2A avaliadas, 3 famílias apresentavam NEM 2A(1), CMT associado a feocromocitoma e hiperparatireoidismo e 3 famílias apresentavam NEM 2A(2), CMT associado a feocromocitoma sem evidência clínica ou laboratorial sugestiva de hiperparatireoidismo no indivíduo afetado ou nos familiares em risco. Não houve nenhum caso de CMT associado a hiperparatireoidismo sem evidência clínica ou laboratorial sugestiva de feocromocitoma NEM 2A(3). Das 14 famílias analisadas, duas famílias apresentavam a rara associação de NEM 2A com Líquen Amilóide Cutânea (CLA). A CLA é definida como lesão de pele pruriginosa, rica em amilóide, localizada preferencialmente na região interescapular. Nas 2 famílias incluídas em nosso estudo este achado foi confirmado pela biópsia da lesão.

Famílias com NEM 2B:

Apenas um indivíduo com NEM 2B foi incluído em nosso estudo, sendo que os pais não apresentavam nenhuma evidência clínica ou laboratorial sugestiva da síndrome, sugerindo então uma mutação *de novo*. As características fenotópicas da paciente foram diagnosticadas durante a infância, com carcinoma medular de tireóide diagnosticado aos 14 anos, com presença de metástases locais e alguns anos após aparecimento de metástases à distância (fígado e osso). A ganglioneuromatose intestinal foi observada nos primeiros

meses de vida e os neuromas da mucosa oral surgiram aproximadamente aos oito anos de idade.

Famílias com CMTF:

Foram incluídas no estudo 2 famílias com a síndrome de CMTF, ou seja, famílias com acometimento com CMT isolado em pelo menos 4 membros, sem evidências clínicas ou laboratoriais de feocromocitoma ou hiperparatireoidismo. Na primeira família, foram diagnosticados 7 indivíduos afetados e na outra 6 indivíduos.

Outras formas hereditárias:

Até o momento, não foi possível determinar se as 3 famílias com CMT isolado, incluídas em nosso estudo, que apresentam menos de 4 membros afetados, sem a presença de sinais e/ou sintomas de feocromocitoma e/ou hiperparatireoidismo no indivíduo afetado ou em algum familiar, apresentam a forma CMTF ou NEM 2A. Em 2 casos, foram afetados somente 2 indivíduos e no outro apenas uma criança de 7 anos e 6 meses.

3.3 CMT ESPORÁDICO

Foram avaliados 7 indivíduos com diagnóstico histopatológico de CMT, sem história familiar de CMT ou outras neoplasias e sem a presença de dados clínicos e/ou laboratoriais sugestivos de feocromocitoma, hiperparatireoidismo, neuromas, hábitos marfanóides ou

lesões de pele, ou seja, presença de carcinoma de tireóide isolado. A média de idade do diagnóstico do tumor foi $52,5 \pm 18,4$ anos (mediana 55,5 anos). Todos os pacientes referiam história de nódulo ou massa tireoidiana, com confirmação diagnóstica através da ecografia de tireóide. Os indivíduos cuja ecografia revelou a presença de nódulos foram submetidos a PAAF, com diagnóstico sugestivo de malignidade em todos os casos. Seis pacientes foram submetidos a tireoidectomia total e o anatomopatológico demonstrou a presença de tumor unifocal, unilateral em 71,4% (4/6) e em 2 demonstrou a presença de tumor multicêntrico, fato este, que fez levantar a hipótese da hereditariedade do tumor. Um paciente não foi submetido a tireoidectomia conforme orientação do médico assistente, devido à extensão tumoral.

3.4 ASPECTOS MOLECULARES

Foram analisadas 21 famílias, com indivíduos com diagnóstico histopatológico de CMT, num total de 95 amostras analisadas. Quatorze famílias apresentavam CMT hereditário e o restante, 7 indivíduos, a forma esporádica. Os resultados individualizados de cada família estão detalhados no anexo 1.

3.4.1 CMT HEREDITÁRIO

O material genético foi analisado de acordo a estratégia diagnóstica, num total de 88 amostras analisadas. Todas as famílias com NEM 2 analisadas, apresentavam mutações (tabela 5).

Famílias com NEM 2A:

Em todos os casos de NEM 2A descritos na literatura, a mutação localizava-se no domínio extracelular, em um dos cinco resíduos de cisteína (códon 609, 611, 618, 620 ou 634). Em nosso estudo, todas as famílias analisadas apresentavam a mutação no códon 634 do exon 11, sendo que duas famílias apresentavam a troca do amino-ácido cisteína → tirosina (TGC → TAC), uma família apresentava a troca do amino-ácido cisteína → arginina (TGC → CGC). Nas outras 3 famílias com NEM 2A, a análise através da restrição enzimática, utilizando a enzima de restrição *Hha I*, pode identificar 2 possibilidades de mutações, a troca do amino-ácido cisteína → arginina (TGC → CGC) ou cisteína → triptofano (TGC → TGG). A figura 3 demonstra um gel de agarose ilustrativo em uma família com NEM 2A, utilizando a enzima de restrição *Rsa I*.

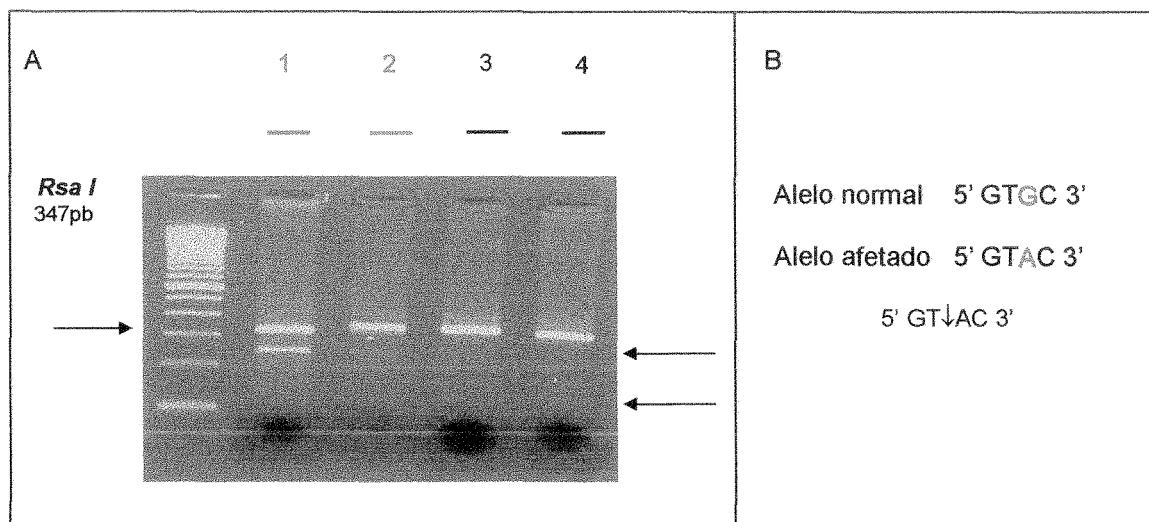


Figura 3 – A. Gel de agarose ilustrativo da utilização diagnóstica da enzima de restrição *Rsa I*. Os indivíduos 1 e 2 são os afetados (positivos) enquanto que 3 e 4 são os não portadores da mutação (negativos). Nos indivíduos afetados, a mutação cria um sítio de restrição para esta enzima, levando a clivagem do fragmento de DNA. B. Sítio de reconhecimento da enzima *Rsa I*.

Famílias com NEM 2A associada à CLA:

As 2 famílias com a rara síndrome de NEM 2A associada à CLA, a mutação também localizava-se no domínio extracelular, no códon 634 do exon 11, com a troca do amino-ácido cisteína → arginina (TGC → CGC), conforme ilustrado na figura 4.

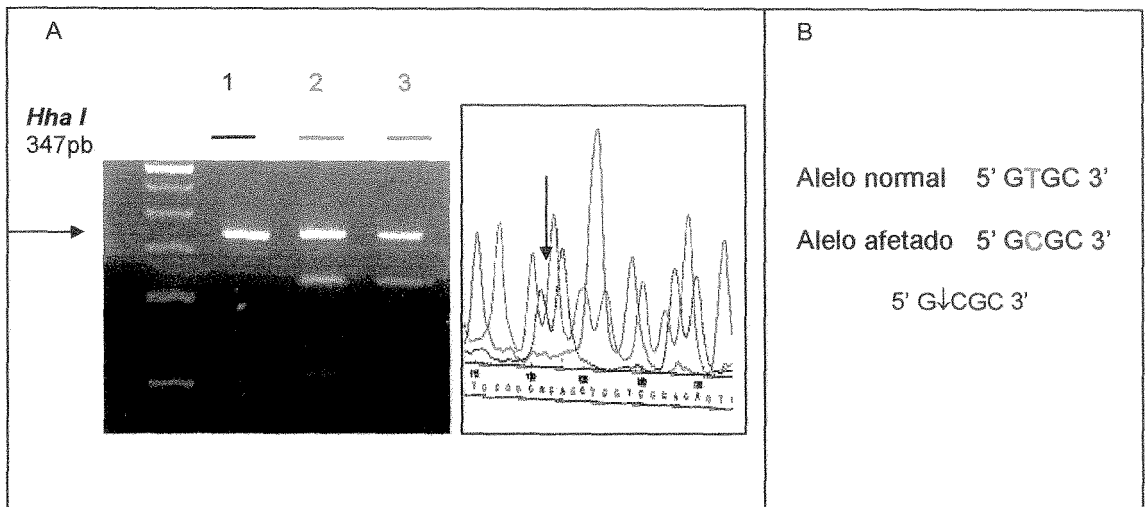


Figura 4— A. Gel de agarose ilustrativo da utilização diagnóstica da enzima de restrição *Hha I*. O indivíduo 1 não portador da mutação (negativo) enquanto que 2 e 3 são os afetados (positivos). Nos indivíduos afetados, a mutação cria um sítio de restrição para esta enzima, levando a clivagem do fragmento de DNA. Na representação esquemática de sequenciamento, a seta representa os picos concomitantes da troca de nucleotídeos. B. Sítio de reconhecimento da enzima *Hha I*.

Famílias com CMTF:

Nas 2 famílias portadoras da síndrome de CMTF, as mutações encontradas situaram-se no domínio extracelular, no códon 618 do exon 10, troca do amino-ácido cisteína → serina (TGC → AGC).

Famílias com NEM 2B

Na única família com NEM 2B, a mutação se localiza no domínio intracelular tirosino-quinase, no códon 918 do exon 16, troca do amino-ácido metionina → treonina (ATG → ACG), conforme ilustração na figura 5.

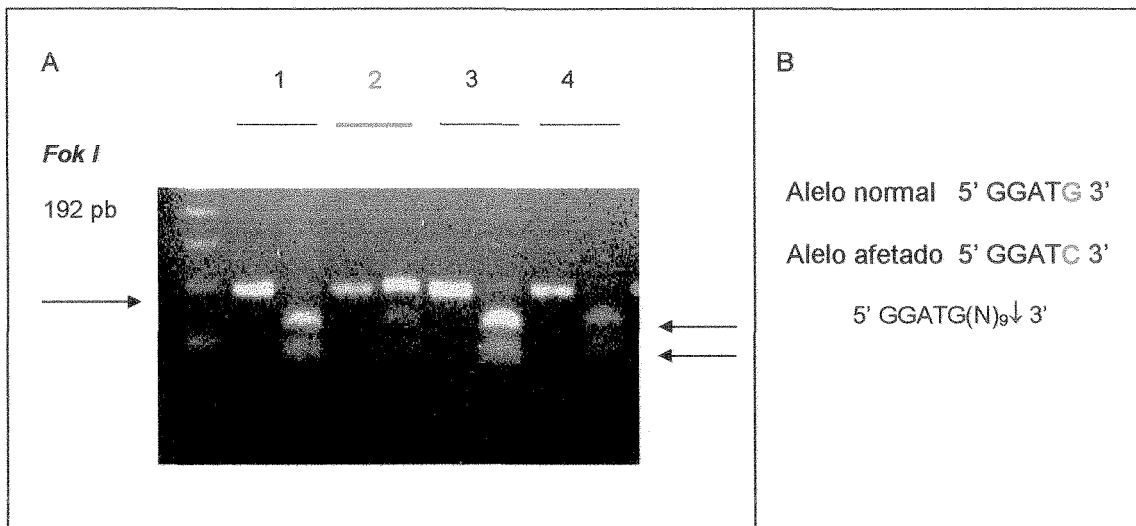


Figura 5 – Gel de agarose ilustrativo da utilização diagnóstica da enzima de restrição *Fok I*. Os indivíduos 1, 3 e 4 são os não portadores da mutação (negativos) enquanto que 2 é afetado (positivo). Nos indivíduos afetados, a mutação destrói o sítio de restrição para esta enzima. B. Sítio de reconhecimento da enzima *Fok I*.

Outras formas hereditárias:

Foram analisadas 3 famílias com outras formas hereditárias do CMT, as mutações se localizavam no domínio extracelular. No entanto, em uma família, a mutação se localizava no códon 634 do exon 11, troca do amino-ácido cisteína → arginina (TGC → TAC) ou do amino-ácido cisteína → triptofano (TGC → TGG), na outra no códon 618 do exon 10, troca do amino-ácido cisteína → serina (TGC → AGC) e na última a mutação se situava no códon 620

ou 618 do exon 10, troca do amino-ácido cisteína → arginina (TGC→CGC). As mutações encontradas nesses indivíduos estão resumidas na tabela 5.

Tabela 5 – Características das famílias com Neoplasia Endócrina Múltipla de acordo ao Comitê Internacional:

SÍNDROME	Nº(%) FAMÍLIA	CÓDON / EXON AFETADO	ENZIMA	TROCA AMINO-ÁCIDO
NEM 2A(1)	3 (21,4%)	634 / 11	<i>Rsa I</i>	cis → tir
			<i>Hha I</i>	cis → arg
			<i>Hha I</i>	cis → trp
NEM 2A(2)	3 (21,4%)	634 / 11	<i>Rsa I</i>	cis → tir
			<i>Hha I</i>	cis → arg
			<i>Hha I</i>	cis → trp
NEM 2A(3)	-	-	-	-
NEM 2A+CLA	2 (14,3%)	634 / 11	<i>Hha I</i>	cis → arg
NEM 2B	1 (7,1%)	918 / 16	<i>Fok I</i>	met → tre
CMTF	2 (14,3%)	618 / 10	<i>Alu I</i>	cis → ser
Outros	3 (21,4%)	634 / 11	<i>Aci I</i>	cis → arg
		618 / 10	<i>Alu I</i>	cis → ser
		618 ou 620 / 10	<i>Rsa I</i>	cis → tir
CMT esporádico	7			

3.4.2 CMT ESPORÁDICO

A análise molecular através da restrição enzimática não identificou mutações nas células germinativas dos 7 casos de CMT esporádico avaliados. A utilização dessa técnica

- permite excluir mais de 95% das mutações descritas.

4. DISCUSSÃO

4- DISCUSSÃO

O CMT é considerado uma doença autossômica dominante, com elevada taxa de malignidade e mortalidade se diagnosticada tardiamente. A aplicação do rastreamento genético para o manejo adequado da hereditariedade do CMT possibilita o diagnóstico precoce, sendo de extrema importância, visto que é determinante na conduta terapêutica e no prognóstico da doença no indivíduo afetado e em seus familiares.

O CMT é um tumor raro, responsável por 5 à 8% de todos tumores malignos da glândula. O CMT foi primeiramente reconhecido como entidade de histologia distinta dos tumores de tireóide por Hazzard e cols.⁽⁶³⁾ em 1959. Em 1961, Sipple⁽⁶⁴⁾ relatou incidência elevada de CMT associada a feocromocitoma. Seqüencialmente, outros investigadores reconheceram que a forma de carcinoma de tireóide desses indivíduos se assemelhava a descrita por Hazzard e que apresentavam um padrão de herança autossômica dominante, com a associação de hiperparatireoidismo e em alguns casos a associação com neuromas. No entanto, o termo neoplasia endócrina múltipla tipo 2 somente foi sugerido em 1968, por Steiner e cols⁽⁶⁵⁾, para diferenciar uma síndrome clínica caracterizada pela presença de carcinoma medular de tireóide, feocromocitoma e hiperparatireoidismo da conhecida síndrome de Wermer ou neoplasia endócrina múltipla tipo 1, que acomete as glândulas paratireóide, pâncreas e hipófise. A denominação de neoplasia endócrina múltipla refere-se

acometimento de hiperplasia e/ou neoplasia em uma ou mais glândulas no mesmo indivíduo⁽²⁸⁾. Apesar de raras, essas síndromes despertam um grande interesse devido as suas características bioquímicas e genéticas específicas, sendo um excelente modelo experimental para o estudo da gênese e evolução das neoplasias.

O advento da biologia molecular proporcionou um grande avanço no entendimento dos mecanismos envolvidos na carcinogênese. E em alguns tipos de neoplasia, a identificação da base genética permite avaliar a suscetibilidade da doença nos indivíduos afetados e em seus familiares, implicando assim no melhor manejo clínico e terapêutico, como no caso do carcinoma medular de tireóide (CMT).

Antes da disponibilidade das técnicas de biologia molecular, o rastreamento dos familiares em risco de CMT era realizado através de testes de estímulo seriados com pentagastrina ou cálcio, com as conseqüentes limitações já comentadas anteriormente. Além do alto índice de resultados falso-negativos, os efeitos colaterais observados, o tomavam de difícil realização. Um estudo comparativo entre o rastreamento clínico e a análise de DNA em famílias com NEM 2 concluiu que a diagnóstico molecular é superior na identificação de indivíduos carreadores do gene mutado e em risco para o desenvolvimento da síndrome⁽⁶¹⁾. 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. Por outro lado, a tireoidectomia total, e a avaliação bioquímica para o feocromocitoma e hiperparatireoidismo quando pertinentes, deve ser indicada aos portadores da alteração genética⁽⁶¹⁾. Mutações no proto-oncogene *ret* são identificadas em aproximadamente 95% das famílias com NEM 2, e os casos relatados de falso-positivo ou falso-negativo referem-se a, provavelmente,

O rastreamento molecular foi capaz de identificar 8 indivíduos assintomáticos, sendo que um destes já apresentava a presença de hiperplasia celular no resultado do anatomopatológico, reforçando a idéia de que muitas vezes o tumor já está evidente muitos anos antes da apresentação clínica. A avaliação molecular também foi fundamental para identificação de dois casos encaminhados como CMT esporádico, que posteriormente foram classificados como hereditários. O primeiro caso, como NEM 2A associado à CLA, nesta família também diagnosticamos a presença de um nódulo a palpação da tireóide, confirmado pela ecografia, em um indivíduo assintomático. Além do nódulo, paciente apresentava uma lesão de pele na região interescapular que foi posteriormente biopsiada com diagnóstico de CLA. O paciente foi submetido a tireoidectomia total que revelou a presença de hiperplasia celular. E o segundo caso foi classificado como outras formas hereditárias (família com 2 membros acometidos com CMT isolado, sem a presença de feocromocitoma e/ou hiperparatireoidismo). Esses casos ilustram o porquê do rastreamento molecular ser indicado nos casos de CMT esporádico para excluir a hereditariedade da doença, confirmando relatos que sugerem que o CMT familiar pode existir em contexto aparentemente esporádico ⁽⁶¹⁾.

Os indivíduos com forma esporádica do CMT, foram excluídos como portadores da forma esporádica através da análise das mutações pela técnica de restrição enzimática, utilizando diferentes enzimas de restrição, amplificando os exons onde existem descritas as mutações mais freqüentes, permitindo assim a exclusão da herança genética acima de 95% dos casos.

O fenótipo associado à síndrome NEM 2A é o mais comum, surgindo em torno de 9% dos casos (NEM 2A(1) em 4%, NEM 2A(2) em 4% e NEM 2A(3) em apenas 1%. A síndrome NEM 2B está presente em 3% dos casos, o CMTF em 1% e os casos que não se enquadram nas formas acima em 7%. No presente estudo, a síndrome NEM 2A foi a mais

frequentemente observada (42,8% dos casos), sendo o fenótipo caracterizado pela presença dos 3 componentes da síndrome, NEM 2A(1), e o fenótipo caracterizado por CMT e feocromocitoma, NEM 2A(2), os dois encontrados. A presença de NEM 2A associada ao líquen amilóide cutâneo (CLA) na região interescapular foi observada em 2 famílias. Esta associação é extremamente rara, pois existem relatos de apenas 17 famílias afetadas. É interessante observar que famílias com CLA não associado à NEM não apresentam mutações no proto-oncogene *ret* ⁽¹⁰⁾. As outras formas hereditárias (CMTF, NEM 2B e outros) estiveram presentes em menor frequência.

Em nosso estudo, todas as mutações encontradas nas famílias com a síndrome de NEM 2A (42,8%), inclusive na variante com CLA, localizaram-se no códon 634 do exon 11. Enquanto que no único indivíduo afetado com NEM 2B, a mutação *de novo*, localizava-se no códon 918 do exon 16. As mutações presentes na forma CMTF localizavam-se nos códons 618 do exon 10 e nas outras formas de CMT hereditário, em 2 famílias localizavam-se nos códon 618 ou 620 do exon 10 e em uma no códon 634 do exon 11.

Quanto a correlação entre genótipo-fenótipo na NEM 2, nossos dados estão de acordo com os descritos em outros estudos, que observam que alguns tipos de mutações têm uma probabilidade maior ou menor de apresentar um determinado componente da síndrome ⁽¹⁰⁾. Um exemplo dessa associação foi a mutação encontrada no códon 634 (exon 11), com a troca do amino-ácido cisteína por arginina (TGC → CGC), a mais encontrada em todos os indivíduos com CMT, feocromocitoma e/ou hiperparatireoidismo (NEM 2A) e não detectada em nenhum caso de CMTF. Essas mutações no códon 634, apresentam uma frequência maior de hiperparatireoidismo e feocromocitoma do que mutações em outros códons, sendo que o hiperparatireoidismo é mais comum quando a mutação é do subtipo cisteína → arginina ⁽¹⁰⁾. Na paciente com NEM 2B incluída em nosso estudo, encontramos a mutação mais frequente descrita, no códon 918 (exon 16), sendo hoje considerada

mutação mais freqüente descrita, no códon 918 (exon 16), sendo hoje considerada específica para a síndrome de NEM 2B ⁽¹⁰⁾. Na rara síndrome de NEM 2A associado ao líquen amilóide cutâneo (CLA) ^(10,12), a mutação identificada foi semelhante a relatada nas outras 17 famílias afetadas, no códon 634 (exon 11).

Como já mencionado, no presente estudo foram identificados 8 carreadores da mutação no proto-oncogene *ret*, nesses casos é indicada a tireoidectomia total. A recomendação atual é realizar a cirurgia entre 5-7 anos de idade nos pacientes com NEM 2A e bem mais precocemente, no 1º ano de vida, nos indivíduos com NEM 2B ⁽¹⁰⁾. As outras manifestações da NEM 2 surgem, geralmente, mais tarde e não estão associadas a transformação maligna; conseqüentemente as estratégias diagnósticas e terapêuticas são diferentes. Todos os indivíduos assintomáticos, diagnosticados em nosso estudo, foram encaminhados a tireoidectomia, inclusive os mais jovens, com idade em torno dos 5 anos. No entanto até o presente momento, temos à disposição somente os dados referentes ao anatomopatológico de um indivíduo, hiperplasia celular. As 2 crianças encaminhadas a tireoidectomia, aguardam férias escolares para realização da cirurgia. Estamos aguardando informações referentes ao anatomopatológico dos indivíduos provenientes de outras localidades.

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

Segundo informações citadas no site na internet do centro *MD Anderson* (<http://endodrcr06.mda.uth.tmc.edu/gagel/avail.html>) existem atualmente apenas 8 centros disponíveis no mundo para diagnóstico molecular do carcinoma medular de tireóide, nenhum na América Latina. A existência de tão poucos centros se explica pela raridade da síndrome NEM 2.

Além dos inequívocos avanços para o manejo das famílias com CMT, o diagnóstico molecular do carcinoma permite gerar dados epidemiológicos locais, colaborando para criação de um registro nacional sobre esse tipo de neoplasia, além de contribuir para o estudo dessa síndrome com grupos internacionais.

5. CONCLUSÃO

5- CONCLUSÃO

A aplicação do rastreamento genético é de extrema importância para o manejo adequado da hereditariedade do CMT, pois determina a conduta terapêutica e o prognóstico da doença no indivíduo afetado e em seus familiares.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pommier RF, Brennan MF. Medullary thyroid carcinoma. *Endocrinol* 2: 393, 1992.
2. Marsh DJ, Learoyd DL, Robinson BG. Medullary thyroid carcinoma: recent advances and management update. *Thyroid*, 5:407, 1995.
3. Gharib H, McConahew WM, Tiegas RD *et al.* Medullary Thyroid Carcinoma; Clinicalpathologic features and long term follow up of 65 patients treated during 1946 through 1970. *Mayo Clin Proc*, 67:934, 1992.
4. Mulligan LM, Marsh DJ, Robinson BG *et al.* Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2: report of International RET mutation Consortium. *J Intern Med*, 238:343, 1995.
5. Wohlk N, Cote GJ, Evans DB *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*, 25:1, 1996.
6. Casanova S, Rosenberg-Bourgin M, Farkas D *et al.* Pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2A: survey of 100 cases, *Clin Endocrinol*, 38: 531, 1993.

7. Modigliane E, Cohen R, Campos J *et al.* Prognostic factors for survival and for biochemical cure in medullary thyroid carcinoma: results in 899 patients. *Clin Endocrinol*, 48: 265, 1998.
8. Heshmati HM, Gharib H, Heerden JA *et al.* Advances and Controversies in the Diagnosis and Management of Medullary Thyroid Carcinoma. *Am J Med*, 103:60, 1997.
9. Raue F, Kraimps JL, Dralle H *et al.* Primary hyperparathyroidism in multiple endocrine neoplasia type 2A. *J Intern Med*, 238:369, 1995.
10. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I *et al.* The Relationship Between Specific *Ret* Proto-oncogene Mutation and Disease Phenotype in Multiple Endocrine Neoplasia Type 2. *Jama*, 276:1575, 1996.
11. Gagel RF. Multiple endocrine neoplasia. *Williams Textbook of Endocrinology 9th Edition* WB Saunders Company, section 9, cap32:1627, 1998.
12. Gagel R, Levy ML, Donovan DT *et al.* Multiple Endocrine Neoplasia Type 2 an Associated with Cutaneous Lichen Amiloidosis. *Ann Intern Med*, 111:802, 1989.
13. Eng C, Flier JS, Underhill LH. The *Ret* Proto-oncogene in Multiple Endocrine Neoplasia type 2 and Hirschsprung's disease. *N Engl J Med*, 335:943, 1996.
14. Bravo EL, Gifford RW. Pheochromocytoma: diagnosis, localization and management. *N Engl J Med*, 30: 1682, 1984.
15. Gorlin RJ, Sedano HO, Vickers RA *et al.* Multiple mucosas neuromas, pheochromocytoma and medullary carcinoma of the thyroid- a syndrome. *Cancer*, 22:293, 1968.

16. Ball DW, Baylin SB, Bustros AC. Medullary Thyroid Carcinoma Werner and Ingbars', The Thyroid, 7th Braveman LE and Utiger RD, Lippincott-Raven Publishers, 81:946, 1996.
17. Eng C, Marsh DJ, Robinson BG *et al.* Germline *RET* Codon 918 Mutation in Apparently Isolated Intestinal Ganglioneuromatosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(12):4191, 1998.
18. Marfan AB. Un cas de deformation congénitale des quatre membres plus prononcée aux extrémités caractérisée par l'allongement des os avec un certain degré d'amincissement. *Bull Mem Soc Méd Hôp Paris*, 13:220, 1896.
19. Roos BA, Lindall AW, Ellsj *et al.* Increased plasma and tumour somatostatin-like immunoreactivity in medullary thyroid carcinoma and small cell lung cancer *J Clin Endocrinol Metab*, 52:187, 1981.
20. Melvin KEW, Tashjian Ah Jr, Cassidy CE *et al.* Cushing syndrome caused by ACTH-and calcitonin secreting medullary carcinoma of the thyroid. *Metab*, 19: 831, 1970.
21. Kameya at, Bessho T, Tsumuraya M *et al.* Production of gastrin-releasing peptide by medullary carcinoma of the thyroid. *Virch Arch*, 401: 99, 1983.
22. Baylin SB, Mendelsohn G. Medullary Thyroid Carcinoma: A model for the study of human tumour progression and cell heterogeneity In: Owens AH Jr, Coffey DS, Baylin SB, eds Tumor cell heterogeneity, origins and implications. NY Acad Press, 12, 1982.
23. Deftos LJ, Woloszczuk W, Krisch I *et al.* Medullary thyroid carcinoma expressed chromogranin A and a novel neuroendocrine protein recognized by monoclonal antibody HISL-19. *Am J Med*, 85: 780, 1988.

24. Hennessey JF, Wells AS Jr, Ontjes DA *et al.* A comparison of pentagastrin injection and calcium infusion as provocative agents for the detection of medullary carcinoma of the thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 39:487, 1974.
25. Erdogan MF. Omeprazole: calcitonin stimulation test for the diagnosis follow-up and family screening in medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 82(3):897, 1997.
26. Mason RT, Shulkes A, Zajac JD *et al.* Basal and stimulated release of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in patients with medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 25: 675, 1986.
27. Schifter S. Calcitonin gene-related peptide and calcitonin as tumor markers in MEN 2 family screening. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 30: 263, 1989.
28. Stratakis CA, Ball DW. A concise Genetic and clinical guide to multiple endocrine neoplasia and related syndromes. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 13:457, 2000.
29. Schimke RN. Syndrome of bilateral pheochromocytoma, medullary thyroid carcinoma and multiple neuromas: a possible regulatory defect in differentiation of chromaffin tissue. *N Eng J Med*, 279:1,1968.
30. Baylin SB, Hsu SH, Gann DS. Inherited medullary thyroid carcinoma: the results of a final monoclonal mutation imposed on one of multiple clones of susceptible cells. *Science*, 199: 429, 1978.
31. Cote G, Wohllk N, Evans D *et al.* RET proto-oncogene mutations in multiple endocrine neoplasia type 2 and medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol Metab*, 9:609, 1995. Kidd KK, Kruger SD, Gerhard DS *et al.* Linkage data excluding a locus for multiple

- endocrine neoplasia type 2 syndrome from the distal part of the short arm of chromosome 11. *Henry Ford Hosp J*, 32:262, 1984.
32. Simpson NE and Kidd KK. Where is the locus for multiple endocrine neoplasia type 2A ?. *Henry Ford Hosp J*, 35:168 , 1987.
33. Simpson NE, Kidd KK, Goodfellow PJ *et al*. Assignment of multiple endocrine neoplasia type 2A to chromosome 10 by linkage. *Nature*, 328:528, 1987.
34. Mathew CG, Chin KS, Easton DF *et al*. A linked genetic marker for multiple endocrine neoplasia type 2A on chromosome 10. *Nature*, 328:527, 1987.
35. Lairmore TC, Dou S, Howe JR *et al*. 1,5-Megabase yeast artificial chromosome contig from human chromosome 10q112 connecting three genetic loci (RET, D1OS94 and D1OS1O2) closely linked to the MEN 2A locus. *Proc Nat Acad Sci USA*, 90:492, 1993.
36. Mole SE, Mulligan LM, Healey CS *et al*. Localization of the gene for multiple endocrine neoplasia type 2A to 480 kb region in chromosome band 10q112. *Hum Mol Genet*, 2:247, 1987.
37. Mulligan L. Germ-line mutation of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 A. *Nature*, 363:458, 1993.
38. Kwok J, Gardner E, Warner JP *et al*. Structural Analysis of the Human Ret Proto-oncogene Using Exon Trapping. *Oncogene*, 8:2575, 1993.
39. Takahashi M, Cooper GM. Cloning and expression of the RET proto-oncogene encoding a tyrosine-kinase with two potential transmembrane domain. *Oncogene*, 3:571, 1988.
40. Durbec P, Gutierrez MCV, Kilkenny C *et al*. GDNF signaling through the *Ret* receptor tyrosine kinase. *Nature*, 381:789,1996.

41. 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*, 85:1113, 1996.
42. Eng C, Mulligan LM, Smith DP *et al.* Mutation of the RET protooncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Genes Chromosom Cancer*, 12:209, 1995.
43. Myia A, Yamoto M, Morimoto H *et al.* Expression of the ret proto-oncogene in human medullary thyroid carcinomas and pheochromocytomas of MEN 2A. *Henry Ford Hosp Med J*, 40:215, 1992.
44. Santoro M, Carlomagno F, Mellito RM *et al.* Molecular mechanism of RET activation in human neoplasia. *Endocrinol Invest*, 22:811, 1999.
45. Donis-Keller H, Shenshen D, Chi D *et al.* Mutation in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet*, 2: 851, 1993.
46. Eng C, Smith D, Mulligan L *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*, 3:237, 1994.
47. Hofstra RMW, Landsvater RM, Ceccherini *et al.* A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature*, 367:375,1994.
48. Carlsson KM, Dou S, Chi D *et al.* Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the RET proto-oncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. *Proc Nat Acad Sci USA*, 91:1579, 1994.

49. Gimm O, Marsh DJ, Andrew SD *et al.* Germline Dinucleotide Mutation in Codon 883 of the Ret Proto-oncogene in Multiple Endocrine Neoplasia Type 2B without Codon 918 Mutation. *J Clin Endocrinol Metab*, 82:3902, 1997.
50. Mulligan LM, Ponder BAJ. Genetic Basis of Endocrine Disease: Multiple Endocrine Neoplasia Type 2. *J Clin Endocrinol Metab*, 80:1989, 1995.
51. Mulligan LM, Gardener E, Smith BA *et al.* Genetic events in tumor initiation and progression in multiple endocrine neoplasia type 2. *Genes Chromosom Cancer*, 6:166, 1993.
52. Eng C, Smith DP, Mulligan LM *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*, 10:509, 1995.
53. Bolino A, Schuffenecker I, Lou Y *et al.* RET mutation in exons 13 and 14 of FMTC patients. *Oncogene*, 10:2415, 1995.
54. Mulligan LM, Eng C, Healey CS *et al.* Specific mutation of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC. *Nat Genet*, 6:70, 1994.
55. Tsai MS, Ledger GA, Khosla S *et al.* Identification of multiple endocrine neoplasia, type 2 gene carriers using linkage analysis and analysis of the RET proto-oncogene. *J Clin Endocrinol Metab*, 78:1261, 1994.
56. Maeda S, Namba H, Takamura N *et al.* A single missense mutation in codon 918 of the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Endocrinol J*, 42:245, 1995.

57. Carlomagno F, Salvatore G, Cirafici AM *et al.* The different RET-activating capability of mutation of cysteine 620 or cysteine 634 correlated with the multiple endocrine neoplasia type 2 disease phenotype. *Cancer Res*, 57:391, 1997.
58. Carlomagno F, Melillo RM, Visconti R *et al.* GDNF differentially stimulates Ret mutants associated with the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes and Hirschsprung disease. *Endocrinol*, 139:3613, 1998.
59. Songyang Z, Carraway III KL, Eck MG *et al.* Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signaling. *Nature*, 373:536, 1995.
60. Cornelis JM, Lips MD, Rudy M *et al.* Clinical Screening as compared with DNA Analysis in Families with Multiple Endocrine Neoplasia type 2 A. *N Engl J Med*, 828, 1994.
61. Dottorini M, Assi A, Sironi M *et al.* Multivariate Analysis of patients with Medullary Thyroid Carcinoma. *Cancer*, 77:1556, 1995.
62. Sanger F, Niklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA* 74:5163, 1977.
63. Hazzard JB, Hawk WA, Crile G.Jr. *et al.* Medullary (solid) carcinoma of the thyroid, a clinicopathologic entity. *J Clin Endocrinol Metab* 19:152,1959.
64. Sipple JH. The association of pheochromocytoma with carcinoma of the thyroid gland. *Am J Med* 31:163, 1961.
65. Steiner AL, Goodman AD, Powers SR. Study of a kindred with pheochromocytoma, medullary thyroid carcinoma, hyperparathyroidism, and Cushing disease: MEN type II, *Medicine*, 47:371, 1968.

ANEXOS

ANEXO 1

Em anexo os dados referentes as famílias com NEM analisadas. Para fins didáticos utilizamos as letras **P**: probando, **Ca**: outros carcinomas, **CMT**: carcinoma medular de tireóide, **N**: assintomático com rastreamento positivo e **?**: dúvida quanto causa morte. A coloração escura para representar o indivíduo afetado e a vermelha para identificar os novos diagnósticos.

- **Famílias NEM 2A**

Foram analisados 6 indivíduos / família, num total de 78 amostras analisadas e 8 novos casos de NEM 2A assintomáticos.

Família 1 - Probando com 36 anos ao diagnóstico, com confirmação diagnóstica (molecular) CMT e com 8 membros afetados na família com CMT, feocromocitoma e hiperparatireoidismo. Apresenta mutação no códon 634, exon 11, troca TGC→TAC, enzima de restrição utilizada foi *Rsa I*. Diagnóstico molecular em 3 indivíduos assintomáticos.

Família 2 - Probando com 50 anos ao diagnóstico, com confirmação diagnóstica (molecular) CMT, associado a feocromocitoma e gastrinoma. Na evolução, o filho desenvolveu CMT e foi diagnosticado um familiar assintomático através do rastreamento. A

mutação foi encontrada no códon 634, exon 11, troca TGC→TAC, enzima de restrição utilizada foi *Rsa I*.

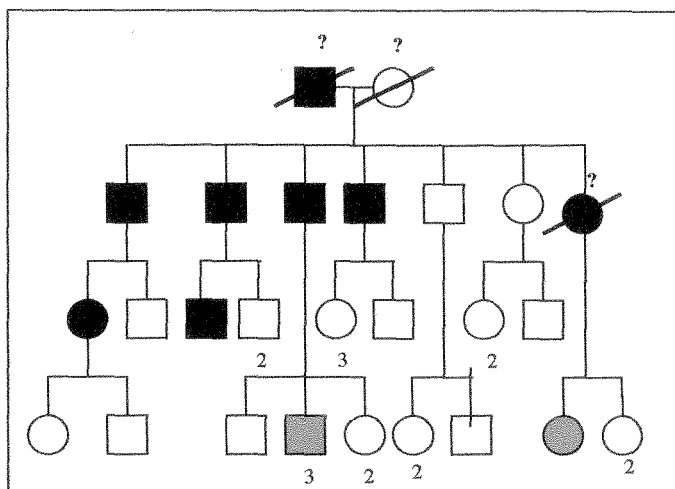
Família 3 - Probando com 42 anos ao diagnóstico, com NEM 2A(2), CMT associado a feocromocitoma, sem outros membros na família com clínica de CMT. Através do rastreamento dos familiares diagnosticado um novo caso assintomático. A mutação foi encontrada no códon 634, exon 11, troca TGC→CGC ou TGC→TGG, enzima de restrição utilizada foi *Hha I*.

Família 4 - Probando com 25 anos ao diagnóstico, com NEM 2A(3), CMT associado a feocromocitoma e hiperparatireoidismo. Através do rastreamento dos familiares diagnosticado um novo caso assintomático. A mutação foi encontrada no códon 634, exon 11, troca TGC→CGC ou TGC→TGG, enzima de restrição utilizada foi *Hha I*.

Família 5 – Probando 44 anos ao diagnóstico, com confirmação diagnóstica (molecular) CMT, associado a feocromocitoma. Posteriormente foi diagnosticado CMT num familiar (filho *Probando*), sem outros membros na família afetados clinicamente ou através do rastreamento molecular. A mutação foi encontrada no códon 634, exon 11, troca TGC→CGC ou TGC→TGG, enzima de restrição utilizada foi *Hha I*.

Família 6 – Probando 37 anos ao diagnóstico, com confirmação diagnóstica CMT, associado a feocromocitoma e hiperparatireoidismo. Na evolução surgiram seis membros clinicamente afetados com CMT. A mutação foi encontrada no códon 634, exon 11, troca TGC→CGC ou TGC→TGG, enzima de restrição utilizada foi *Hha I*.

Família 1- Heredograma



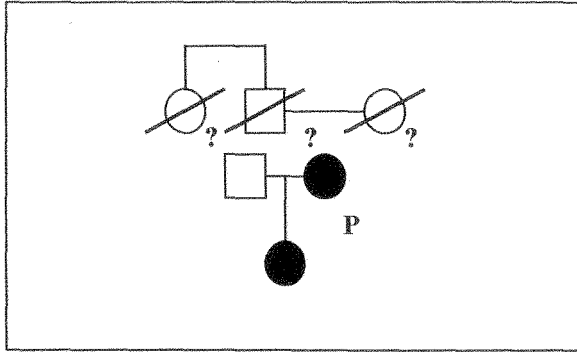
- **Famílias NEM 2A associada à CLA**

Foram analisadas 2 famílias com diagnóstico de CMT associado a lesão pruriginosa de pele, posteriormente biopsiada e caracterizada por líquen amilóide cutâneo.

Família 7 – Probando 27 anos ao diagnóstico, encaminhada com CMT esporádico no entanto após análise molecular confirmado CMT hereditário, associada à CLA. Indivíduo estava em acompanhamento realizando terapia supressiva por nódulo de tireóide durante 2 anos. Posteriormente, realizado PAAF e tireoidectomia. Foi diagnosticado por rastreamento, nódulo num familiar, encaminhado a tireoidectomia, com hiperplasia celular. A análise molecular demonstrou mutação no códon 634, exon 11, troca TGC→CGC, enzima de restrição utilizada foi *Hha I*.

Família 8 – Probando 45 anos ao diagnóstico, com rastreamento positivo, com CMT associada à CLA, posteriormente sua filha desenvolveu CMT e a lesão de pele. A mutação localizava-se no códon 634, exon 11, troca TGC→CGC, enzima de restrição utilizada foi *Hha I*.

Família 7- Heredograma

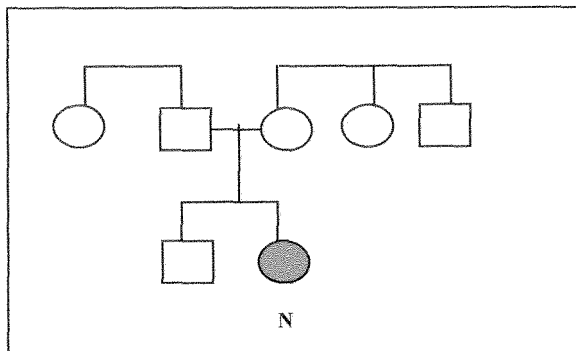


• Famílias NEM 2B

Foi analisada uma família com suspeita de NEM 2B, confirmada posteriormente com análise molecular.

Família 9: Probando com 14 anos ao diagnóstico, apresentou ganglioneuromatose intestinal sintomática nos primeiros anos de vida, durante a infância aproximadamente aos 8 anos de idade surgiram neuromas na cavidade oral. Posteriormente, apresentou CMT. A análise molecular demonstrou uma mutação *de novo* no códon 918, exon 16, troca ATG→ACG, enzima de restrição utilizada foi *Fok I*.

Família 9- Heredograma



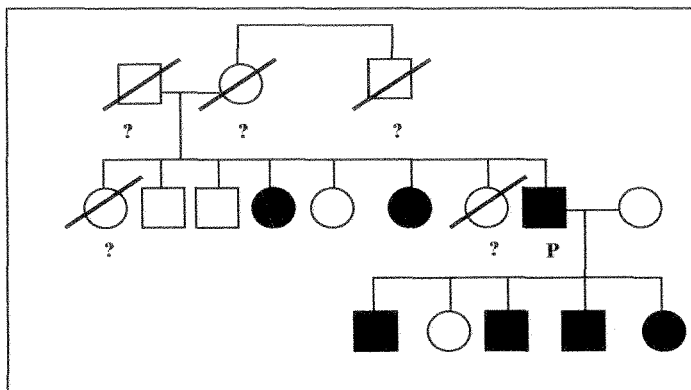
• Famílias CMTF

Foram analisados 2 famílias com CMT isolado, ou seja, sem a presença de feocromocitoma ou hiperparatireoidismo.

Família 10: Probando com 50 anos ao diagnóstico, apresentou CMT isolado. Na evolução, aparecimento de CMT em outros 6 membros da família. A mutação foi encontrada no códon 618, exon 10, troca TGC→AGC, enzima de restrição utilizada foi Alu I.

Família 11: Probando com 55 anos ao diagnóstico, apresentou CMT isolado. Na evolução, aparecimento de CMT em outros 5 membros da família. A mutação foi encontrada no códon 618, exon 10, troca TGC→AGC, enzima de restrição utilizada foi Alu I.

Família 10- Heredograma



- **Outras formas hereditárias**

Foram analisadas 3 famílias com suspeita de pertencer a outras formas hereditárias de NEM 2.

Família 12: Probando com 7 anos e seis meses, apresentou CMT isolado, com acometimento de linfonodos regionais e sem a presença de neuromas ou hábitos marfanóides, sem outros membros afetados na família e sem história familiar de CMT ou outras neoplasias. A mutação foi encontrada no códon 620 ou 618, exon 10, troca TGC→AGC, enzima de restrição utilizada foi *Aci I*.

Família 13: Probando com 43 anos ao diagnóstico, com confirmação molecular de CMT e com 1 filho posteriormente afetado. Apresentando CMT, sem associação com feocromocitoma ou hiperparatireoidismo. O Probando apresentou metástases ósseas e em fígado. A mutação foi encontrada no códon 634, exon 11, troca TGC→TAC, enzima de restrição utilizada foi *Rsa I*.

Família 14: Probando com 66 anos ao diagnóstico, apresentou CMT isolado. Sem história de aparecimento de CMT em outros membros da família, no entanto com história progressiva de neoplasias na família. Este caso venho encaminhado como doença esporádica e o estudo molecular demonstrou a presença de doença hereditária, pois foi encontrada mutação nas células germinativas e além disso diagnosticou um indivíduo assintomático. A mutação foi encontrada no códon 618, exon 10, troca TGC→AGC, enzima de restrição utilizada foi *Alu I*.

- **NOVOS DIAGNÓSTICOS**

Foram identificadas mutações em 8 indivíduos assintomáticos, com idade variando de 5 anos a 28 anos. Esses pacientes foram encaminhados a tireoidectomia após rastreamento molecular. Destes, um apresentou a presença de hiperplasia celular no resultado do exame anatomopatológico.

- **Indivíduos com CMT Esporádico**

Todos os indivíduos com CMT esporádico não apresentavam história familiar de CMT ou outras neoplasias. Dois indivíduos previamente encaminhados como CMT esporádico foram classificados posteriormente como hereditário, visto que apresentavam mutações nas células germinativas. E, 2 indivíduos cujo anatomopatológico revelou tumor multicêntrico e multifocal, foram excluídos de se tratar de doença esporádica devido a análise molecular.

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO (PACIENTE)

Nome do indivíduo: _____

Investigadores: Dra. Márcia Khaled Puñales e Dra. Ana Luiza Maia

Título do projeto: Diagnóstico Molecular do Carcinoma Medular de Tireóide

O objetivo do estudo é estudar os genes envolvidos no carcinoma medular de tireóide e correlacioná-los com os diferentes fenótipos da doença.

Estou ciente de que serei submetido à coleta de 10 ml de sangue venoso periférico para extração do DNA (código genético). O material genético (DNA) do meu sangue será examinado por pesquisadores do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e os resultados poderão ser compartilhados com pesquisadores de outros centros. Eu entendo que os resultados ou informação compartilhados com outros pesquisadores não irão conter meu nome ou outra informação que possa me identificar.

Eu compreendo que a minha tireóide será examinada (palpação) e em caso de apresentar alguma massa, nódulo ou aumento da glândula, realizarei uma ecografia da glândula (pescoço).

Eu fui informado que toda a informação coletada sobre mim para este estudo será considerada confidencial e não será revelada para outros. Dados que possam me identificar, como nome, serão mantidos em um arquivo separado dos demais informações do estudo. Meu sangue e todas as demais informações sobre mim serão identificadas somente por números.

Apesar de todos os cuidados para manter a informação sobre mim confidencial, existe o risco que informação perceptível (por exemplo o fato de eu ter câncer, ou de ter risco de ter câncer ou outra doença) pode ser descoberto ou inferido por meus familiares. Da mesma forma eu posso descobrir ou inferir sobre dados de meus familiares.

Eu fui informado que nenhum benefício direto é prometido para mim como um participante do estudo. Eu compreendo que os resultados da extração do meu DNA me serão fornecidos. E que esses resultados podem alterar o plano terapêutico de minha enfermidade. Eu também compreendo que posso sair do projeto ou negar a realizar qualquer procedimento a qualquer momento, sem que isso acarrete qualquer prejuízo ao meu atendimento.

Eu fui informado que em caso do meu DNA apresentar a mutação (cancer de tireóide), será revelado a meus familiares o risco deles também apresentarem a mutação.

Eu fui informado e compreendo o objetivo do projeto descrito acima e seus procedimentos. Eu também fui informado e entendi dos riscos, desconforto e benefícios previstos.

Eu fui informado e compreendi que tenho acesso ao comitê de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre se tiver qualquer questão em relação aos meus direitos como participante do projeto de pesquisa, através de seu presidente ou representante legal. Eu também compreendo que o comitê pode ter acesso a mim e/ou aos meus dados para desempenho de suas atribuições.

O pesquisador responsável é a Dra. Márcia Khaled Puñales sob orientação da Dra. Ana Luiza Maia, fone para contato no HC-UFRGS (051) 3168127.

Pesquisador

Data e local

Paciente

Data e local

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO (FAMILIAR)

Nome do indivíduo: _____

Investigadores: Dra. Márcia Khaled Puñales e Dra. Ana Luiza Maia

Título do projeto: Diagnóstico Molecular do Carcinoma Medular de Tireóide

O objetivo do estudo é estudar os genes envolvidos no carcinoma medular de tireóide e correlacioná-los com os diferentes fenótipos da doença.

Eu tenho um familiar com diagnóstico de carcinoma medular de tireóide que está em acompanhamento no serviço de endocrinologia no Hospital de Clínicas e estou ciente que esse tipo de carcinoma é transmitido da forma hereditária, sendo necessário o estudo do meu material genético.

Estou ciente de que serei submetido à coleta de 10 ml de sangue venoso periférico para extração do DNA (código genético). O material genético (DNA) do meu sangue será examinado por pesquisadores do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e os resultados poderão ser compartilhados com pesquisadores de outros centros. Eu entendo que os resultados ou informação compartilhados com outros pesquisadores não irão conter meu nome ou outra informação que possa me identificar.

Eu compreendo que a minha tireóide será examinada (palpação) e em caso de apresentar alguma massa, nódulo ou aumento da glândula, realizarei uma ecografia da glândula (pescoço) e outros exames laboratoriais com finalidade diagnóstica.

Eu fui informado que toda a informação coletada sobre mim para este estudo será considerada confidencial e não será revelada para outros. Dados que possam me identificar, como nome, serão mantidos em um arquivo separado dos demais informações do estudo. Meu sangue e todas as demais informações sobre mim serão identificadas somente por números.

Apesar de todos os cuidados para manter a informação sobre mim confidencial, existe o risco que informação perceptível (por exemplo o fato de eu ter câncer, ou de ter risco de ter câncer ou outra doença) pode ser descoberto ou inferido por meus familiares. Da mesma forma eu posso descobrir ou inferir sobre dados de meus familiares.

Eu fui informado que nenhum benefício direto é prometido para mim como um participante do estudo. Eu compreendo que os resultados da extração do meu DNA me serão fornecidos. Em caso do meu DNA apresentar mutações, poderá ser sugerido um plano terapêutico, como a retirada cirúrgica da glândula tireoidiana. Eu também compreendo que posso sair do projeto ou negar a realizar qualquer procedimento a qualquer momento, sem que isso acarrete qualquer prejuízo ao meu atendimento.

Eu fui informado que em caso do meu DNA apresentar a mutação (cancer de tireóide), será revelado a meus familiares o risco deles também apresentarem a mutação.

Eu fui informado e compreendo o objetivo do projeto descrito acima e seus procedimentos. Eu também fui informado e entendi dos riscos, desconforto e benefícios previstos.

Eu fui informado e compreendi que tenho acesso ao comitê de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre se tiver qualquer questão em relação aos meus direitos como participante do projeto de pesquisa, através de seu presidente ou representante legal. Eu também compreendo que o comitê pode ter acesso a mim e/ou aos meus dados para desempenho de suas atribuições.

O pesquisador responsável é a Dra. Márcia Khaled Puñales sob orientação da Dra. Ana Luiza Maia, fone para contato no HC-UFRGS (051) 3168127.

Pesquisador

Data e local

Paciente

Data e local

ANEXO 3

PROTOCOLO CARCINOMA MEDULAR DE TIRÉOIDE

- Nome / família:
- Sexo:
- Idade atual:
- Resumo clínico:

Idade ao diagnóstico:

Nódulo:

Aumento tireóide:

Linfonodos cervicais:

Suspeita clínica Feocromocitoma:

Suspeita clínica Hiperparatireoidismo:

Manchas pele:

Outros sinais / sintomas:

História familiar CMT/ quantos:

História familiar outras neoplasias:

- Exames laboratoriais:

Calcitonina basal:

Calcitonina após estímulo/qual:

Screening feocromocitoma/qual:

Screening hiperparatireoidismo:

- Imagens:
 - Ecografia de tiróide:
 - Radiografias /quais:
 - Outros (rastrear metástases):
- Fenótipo (CMT e/ou feocrom. e/ou hiperpara.):
- Screening DNA:
- Genótipo:
- Conduta:
 - Tireoidectomia:
- Citopatológico (PAAF):
- Anatomopatológico (Ca unifocal/ multifocal..):
- Heredograma: