

*Bibiana Prada de Camargo Colenci*

**ESTUDO CLÍNICO E GENÉTICO DE UMA  
FAMÍLIA PORTADORA DE CARCINOMA  
MEDULAR DE TIREÓIDE**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica, área de concentração Endocrinologia e Metabologia.

**Orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Nogueira**

**Co-orientadora: Dra. Denise Perone**

**Botucatu- SP  
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
*Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus*

Colenci, Bibiana Prada de Camargo.

Estudo clínico e genético de uma família portadora de carcinoma medular de tireóide / Bibiana Prada de Camargo Colenci. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Tese (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2008.

Orientadora: Célia Regina Nogueira

Co-Orientadora: Denise Perone

Assunto CAPES: 40101061

1. Tireóide - Doenças    2. Carcinoma Medular

CDD 616.99444

Palavras chave: cys611tyr; Carcinoma medular de tireóide; Familiar; mutação; proto-oncogene *RET*

“De tudo na vida, ficaram três coisas:  
A certeza de que estamos sempre começando...  
A certeza de que é preciso continuar...  
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminarmos...  
Portanto, devemos:  
Fazer da interrupção um caminho novo...  
Da queda um passo de dança...  
Do medo, uma escada...  
Do sonho, uma ponte...  
Da procura... um encontro.”

**Fernando Pessoa**

Aos meus filhos  
*Gabriel e Murilo,*  
essências da minha vida,  
por me proporcionarem alegria,  
energia e persistência  
para continuar meu caminho.

## Agradecimentos Especiais

Ao meu esposo, *Carlos Eduardo Colenci*,  
pelo irrestrito apoio e dedicação  
durante minha ausência  
para a realização deste trabalho.

Aos membros da família estudada,  
por aceitarem participar deste projeto.

Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque vão nos ajudando na sua construção, outras porque nos apresentam projetos e sonhos e, outras ainda, porque nos incentivam a construí-los.

Ao meu *querido pai*, um fã incondicional e verdadeiro amigo, em todo o meu percurso de vida.

Ao meu irmão, *Paulo André*, e à minha irmã *Juliana*, pela coragem, incentivo e presença constante nos momentos difíceis.

A pequena *Sofia*, minha irmã caçula, pela alegria do seu sorriso, e à *Rachel*, pelo apoio e amizade.

A memória de minha mãe *Anita Virgínia*, que não teve a oportunidade de viver este momento.

A minha orientadora *Dra. Célia Regina Nogueira*, que abriu-me as portas para o desenvolvimento do tema tratado nesta dissertação e também pela orientação dada, sempre de forma gentil e generosa.

A *Dra. Denise Perone*, pela orientação dada, sempre de forma gentil e generosa.

Ao *Sandro Conde*, pela sua generosidade desde o nosso primeiro contato, pela paciência ao clarçar minhas dúvidas bem como pela disponibilidade e amizade então demonstradas.

A toda equipe do *Laboratório de Biologia Molecular* do Departamento de Clínica Médica, convivência e amizade e

também pela compreensão e interesse manifestados por este trabalho.

À *Dra. Maria Inês Pardini*, por gentilmente disponibilizar o seqüenciador.

Ao *Dr. Peter Kopp*, pelo incentivo, e acima de tudo, pelo exemplo de profissional apaixonado por sua profissão.

À *Dra. Gláucia Mazeto*, pelo convívio, apoio, compreensão, amizade e pela revisão cuidadosa do texto.

À *Dra. Ana Lúcia Ferreira dos Anjos*, acima de tudo uma grande amiga, pela revisão tão cuidadosa do texto e pelo apoio e orientação durante toda minha formação.

À *Dra. Walkiria Pimenta*, pela convivência, amizade e apoio.

Às médicas endocrinologistas *Adriana Mendes, Juliana Cruz e Vânia Nunes dos Santos*, pela convivência, amizade e apoio durante todos esses anos.

Aos *Funcionários do Departamento de Clínica Médica*, em especial ao *Mário Dalaqua*, pelo tempo e paciência ao me ajudar a formatar o texto.

À *Deus*, por me presentear com momentos maravilhosos com as pessoas acima.

# SUMÁRIO



1. Introdução .....	1
2. Objetivo .....	18
3. Pacientes e Métodos .....	20
4. Resultados .....	26
5. Discussão .....	35
5. Conclusão .....	50
6. Resumo .....	52
7. Abstract .....	54
7. Referências Bibliográficas .....	56
8. Anexos .....	64

# INTRODUÇÃO

## I. Considerações Iniciais

O carcinoma medular de tireóide (CMT) é um tumor maligno raro, com origem nas células parafoliculares da tireóide, e por isso, tem a calcitonina como principal produto secretório. Foi primeiramente descrito por Hazard et al. (1959) e apresenta como uma característica morfológica a presença de amilóide no estroma. Representa de 3 a 10% de todos os tumores tireoidianos, sendo responsável por grande número de mortes em portadores de câncer de tireóide (1, 2). Em 65-75% dos pacientes, o CMT ocorre na forma esporádica (2). Nos demais casos ocorre de forma hereditária autossômica dominante com alto grau de penetrância e variabilidade de expressão, podendo fazer parte de três síndromes clínicas distintas dependendo dos órgãos envolvidos: neoplasia endócrina múltipla (NEM) 2A, NEM 2B e CMT familiar (CMTF). A NEM 1 não está relacionada ao CMT; esta entidade se caracteriza pela ocorrência associada de adenoma hipofisário, hiperparatireoidismo e tumor em pâncreas/duodeno (3).

As associações descritas nas síndromes NEM do tipo 2 estão relacionadas à origem embriológica comum das células C da tireóide, da medula adrenal, da paratireóide e do plexo mioentérico, todos estes elementos derivados da crista neural (1, 2). Das formas hereditárias do CMT, a NEM 2A é a mais comum, representando mais de 75% dos casos de NEM do tipo 2 (2). Ela é caracterizada pela presença de carcinoma medular de tireóide (100%), feocromocitoma (30-50%) e hiperparatireoidismo (10–20%). O CMT é, de longe, a apresentação clínica mais comum da NEM 2A (4).

A NEM 2B é menos freqüente que a NEM 2A, ocorrendo em 5% dos casos de NEM do tipo 2, porém é clinicamente mais distinta. O CMT é mais agressivo e ocorre em 90-100% dos pacientes, estando associado ao feocromocitoma em 45% dos casos, hábito marfanóide em 65% dos indivíduos, e à ganglioneuromatose múltipla em 100% dos pacientes. O hiperparatireoidismo não ocorre na NEM 2B (4). Nesta condição, a manifestação inicial consiste em diarreia intermitente e constipação. A grande maioria dos casos de NEM 2B resulta de mutações novas do proto-oncoгене *RET* e por isso a maioria dos pacientes não apresenta história familiar positiva, nem necessita de rastreamento ou tratamento profilático. Seu diagnóstico é tardio, quando já existem neuromas cutâneos ou massa tireoidiana palpável (1, 2, 4).

Já o CMTF é caracterizado pela ocorrência de CMT isolado, sem qualquer outra manifestação sindrômica de NEM. Para ser caracterizado como familiar, o CMT deve estar presente em quatro ou mais indivíduos da mesma família (2, 5, 6). A Tabela 1 resume a freqüência do CMT nas diversas situações nosológicas em que ocorre (1-4).

**Tabela 1:** Freqüência do carcinoma medular da tireóide em diferentes situações nosológicas.

	Freqüência (%)
CMT <sup>1</sup> não hereditário (isolado, esporádico)	75%
CMT hereditário:	25%
• NEM 2A	75%
• NEM 2B	5%
• CMTF	5-15%

<sup>1</sup>CMT – carcinoma medular ; NEM 2A - neoplasia endócrina múltipla tipo 2A; NEM 2B – neoplasia endócrina múltipla tipo 2B; CMTF – carcinoma medular de tireóide familiar.

A hiperplasia das células C (HCC) é reconhecidamente o estágio precursor do CMT hereditário, sendo que a transformação neoplásica pode levar anos para ocorrer (6, 7). Os vários estágios da carcinogênese, desde o padrão normal de distribuição de células C até o carcinoma, coexistem dentro de uma mesma tireóide. Por outro lado, o CMT na forma esporádica se origina de uma única célula C, evoluindo para um tumor solitário (8). A hiperplasia das células C é um diagnóstico histológico, definido pela presença de mais de 50 células por campo histológico com aumento de 300 vezes, ou mais de 40 células C por cm<sup>2</sup>. Na população geral a hiperplasia de células C é mais comum em homens e pode estar associada a várias doenças tiroidianas (tireoidite de Hashimoto, doença de Graves e tumores foliculares de origem folicular) (2, 7).

Os casos com CMT devem ser seguidos com exames laboratoriais e de imagem, procurando avaliar se há recidiva tumoral ou metástase. Os exames de laboratório utilizados para o diagnóstico e ou seguimento do CMT são as determinações séricas da calcitonina e do antígeno carcinoembrionário (CEA). Os estudos genético-moleculares são úteis para a identificação dos familiares em risco de desenvolverem o CMT.

## II. Calcitonina (CT)

A calcitonina (CT) é um peptídeo de 32 aminoácidos que existe sob diversas formas moleculares no plasma. Seu nível plasmático tem sido utilizado como marcador bioquímico para diagnóstico e seguimento pós-operatório dos pacientes com CMT (1, 7).

Diversas formas de calcitonina imunorreativas estão presentes na circulação de indivíduos normais e portadores de CMT (9). Os primeiros ensaios para dosagem de calcitonina ocorriam por radioimunoensaio (RIE) que, além da calcitonina monomérica circulante, reconhecem suas moléculas precursoras e seus metabólitos. Métodos radioimunométricos (IRMA) são específicos para a aferição da CT monomérica com concentrações normais abaixo de 7 ng/mL (10,11). Na dependência de fatores como diferenciação tumoral, as formas não monoméricas podem elevar-se anormalmente e mais precocemente que a forma monomérica. Assim, em alguns pacientes portadores de CMT, a dosagem de CT por RIE pode estar elevada antes que qualquer alteração seja observada nos ensaios imunométricos (9). Nos ensaios imunométricos para CT, o *cutoff* é menor ou igual a 10 pg/mL, independente do uso de anticorpos monoclonais ou policlonais (9). Em casos de elevação discreta, recomenda-se teste de estímulo e/ou repetição da dosagem utilizando-se outro método (9). Outro método de dosagem de CT, por quimiluminescência, possui sensibilidade analítica de 1 pg/mL (12), onde o *cutoff* ainda é 10 pg/mL.

A principal vantagem dos testes de estímulo com secretagogos da calcitonina são o diagnóstico precoce do CMT e o acompanhamento dos pacientes tratados. Os testes são realizados com infusão de cálcio, pentagastrina ou ambos. Existe também o teste com infusão de omeprazol, porém com resultados dúbios (9, 13, 14). A hipótese diagnóstica de CMT deve ser considerada em pacientes com valores de calcitonina basal maiores que 10 pg/mL (método imunoquimioluminométrico). Os valores normais de CT para qualquer teste de estímulo não devem ultrapassar 30 a 40 pg/mL. Valores entre 40–100 pg/mL são compatíveis com uma zona de incerteza e indica-se a repetição deste teste após um ano. Valores acima de 100 pg/mL são altamente sugestivos de CMT (9, 12).

Embora o teste do estímulo com pentagastrina tenha sido o mais referido em artigos dessa área, essa droga é de aquisição difícil no Brasil e, além

disso, não é mais utilizada nos EUA. Em nosso país, o teste mais utilizado é o de estímulo com gluconato de cálcio. Este teste pode apresentar efeitos colaterais como bradicardia, assistolia reversível com atropina e aumento da pressão arterial. Deste modo, é contra indicado em pessoas com frequência cardíaca inferior a 50 batimentos por minuto e hipertensão arterial descompensada (12).

### III. Antígeno Carcinoembrionário (CEA)

O CEA é produzido pelas células C neoplásicas. Está integrado na membrana celular (15), sendo mais estável que a calcitonina, e pode ficar ligado a anticorpos anti-CEA durante o exame de imunocintilografia (16). Diferente da calcitonina, ele não responde a estímulos e, portanto, não serve para diagnóstico de doença oculta. Sua aferição é útil durante o seguimento de pacientes com CMT devido a elevação de seus níveis séricos quando há progressão da doença (10).

### IV. Outros peptídeos

As células tumorais do CMT produzem ainda várias outras substâncias, entre elas: CGRP (*calcitonin gene-related peptide*), amilóide, somatostatina, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), peptídeo intestinal vasoativo, peptídeo liberador de gastrina, prostaglandina, serotonina, catecolamina, substância P, histaminase, cromogranina A,  $\beta$ -endorfina, melanina, fator de crescimento nervoso, neurotensina, endolase neurônio-específica, sinaptofisina, caliceína e cininas (9, 17). Estas substâncias podem produzir sintomas clínicos como síndrome de Cushing, *flushing* ou diarreia.

A cromogranina A é uma proteína que é estocada e liberada juntamente com as catecolaminas pela medula adrenal e vesículas neuronais simpáticas. Tumores neuro-endócrinos elevam os níveis de cromogranina A, principalmente o feocromocitoma. No CMT os níveis de cromogranina A podem estar elevados quando em presença de grandes metástases (18). A elevação de cromogranina A em pacientes com aumento moderado de CT sugerem feocromocitoma ou tumor neuro-endócrino de outra origem. No momento, a cromogranina A não deve ser usada para diagnóstico e seguimento do CMT (18,

58). Nenhum destes peptídeos é comparável à CT com relação à sensibilidade diagnóstica e para seguimento do CMT (18).

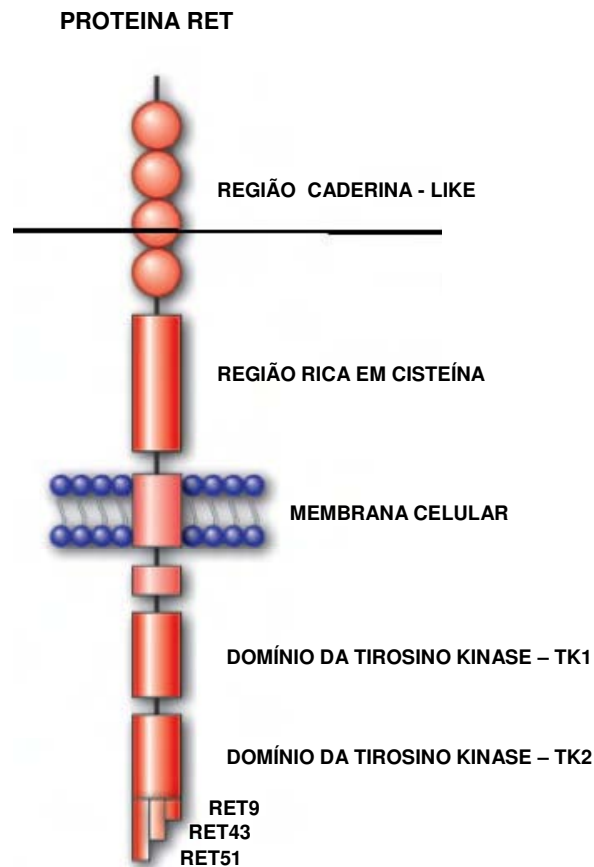
## V. Estudos Genéticos

Estudos genético-moleculares têm demonstrado o envolvimento do proto-oncogene *RET* (**R**e**a**rranged **d**uring **T**ransfection) na maioria das formas hereditárias de CMT e, em menor frequência, em sua forma esporádica (1, 2, 5, 6).

O proto-oncogene *RET* está localizado perto do centrômero no braço longo do cromossomo 10, possui 21 éxons e codifica um receptor tirosino-kinase expresso nas células derivadas da crista neural e seio urogenital, inclusive em tumores neuro-endócrinos originados dessas células. Estudos com ratos *knockout* mostraram que o gene *RET* é essencial para o desenvolvimento do sistema nervoso entérico e rins (1, 2, 5, 6, 19, 20). Daí, é possível entender a associação do CMT nas síndromes NEM 2A e NEM 2B, pois os tumores que ocorrem nestas situações são de mesma origem embriológica.

## VI. Proteína RET

A proteína RET é um receptor transmembrana constituído por três domínios: um domínio extracelular que contém o peptídeo sinalizador com quatro regiões *cadherin-like* repetidas e uma região rica em cisteína, um domínio transmembrana e uma porção intracelular contendo dois domínios tirosino-kinase (TK1 e TK2) (17, 19, 20) (Figura 1). A região extracelular é importante para a dimerização do receptor, enquanto que a região intracelular está envolvida com a transdução de sinais. O receptor RET pertence à superfamília dos receptores de tirosino-kinase (RTK), que são muito importantes na gênese de tumores (4, 21). Em condições normais, a atividade RTK é fortemente controlada. Quando desregulado, o RTK pode desencadear a oncogene. As transformações conseqüentes à quatro possibilidades de alterações do proto-oncogene *RET*: transdução retroviral, rearranjos genômicos, mutações em ponto e superexpressão. No caso, o *RET* é um paradigma, onde um único gene RTK induz a diferentes tipos de cânceres em humanos, dependendo da mutação (19-23).



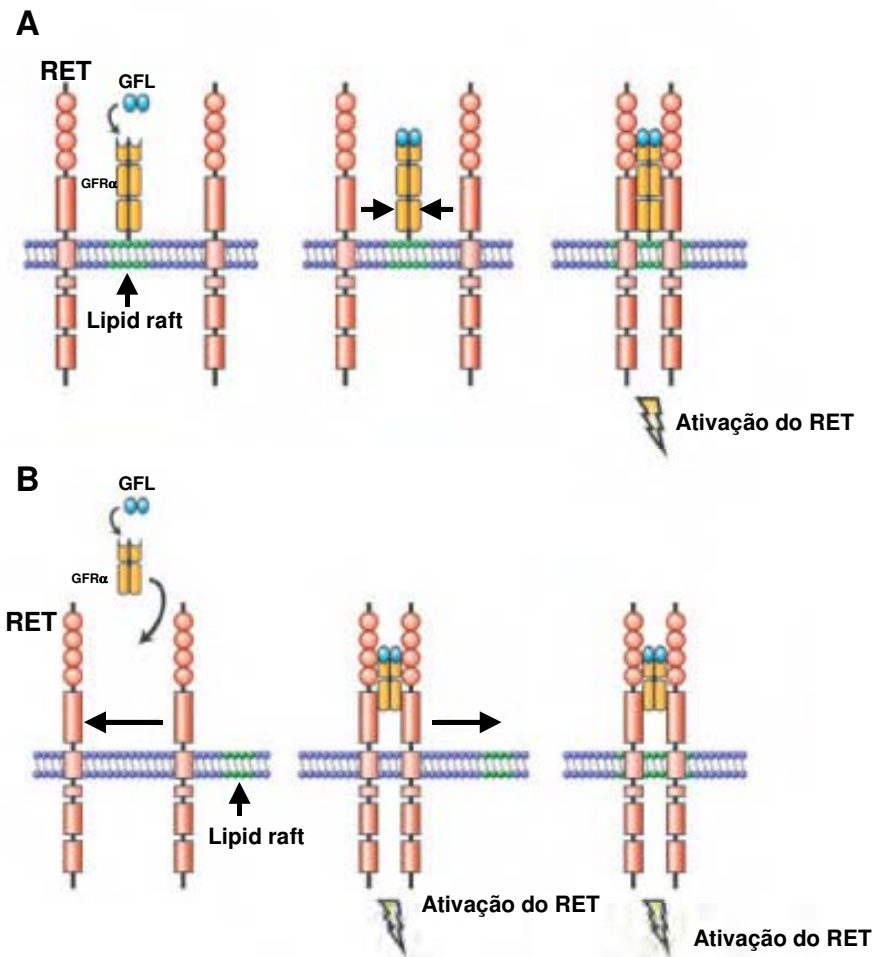
**Figura 1:** Receptor de tirosino-kinase RET. A região extracelular é constituída por regiões *caderine-like* e cisteínas. Apresenta uma região transmembrana e 2 domínios tirosino-kinase intracelulares (TK1 e TK2). As 3 isoformas do RET estão indicadas. Adaptado de De Groot (2006) (20).

Em condições normais, o RET pode ser ativado por um complexo de co-receptor e ligantes. O ligante do RET é um peptídeo que pertence à superfamília do TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*) denominada *glial neurotrophic derived factor family* (GNDF), os quais se ligam ao RET via seus co-receptores  $\alpha$ -GNDF (4, 20, 21). Quatro membros desta família são ligantes para o RET (GFLs): GNDF, *neurturin*, *artemin* e *persephin*. A ativação do RET por cada um destes ligantes é mediada por co-receptores específicos GFR $\alpha$ 1-4, formando o complexo GFR $\alpha$ /GFL e levando à autofosforilização dos resíduos de tirosina. Os co-receptores estão preferencialmente ligados à superfície da membrana celular, mas podem estar solutos no plasma. Desta forma, a ativação do RET pode ocorrer de duas formas: a *cis* e a *trans* (20-22). Na forma *cis*, o GFL se liga ao GFR $\alpha$  da membrana e este complexo une duas moléculas RET, resultando na ativação das mesmas. No modelo



*trans*, o GFL se liga a um co-receptor solúvel (sGFR $\alpha$ ) e este complexo ativa o RET via dimerização (Figura 2).

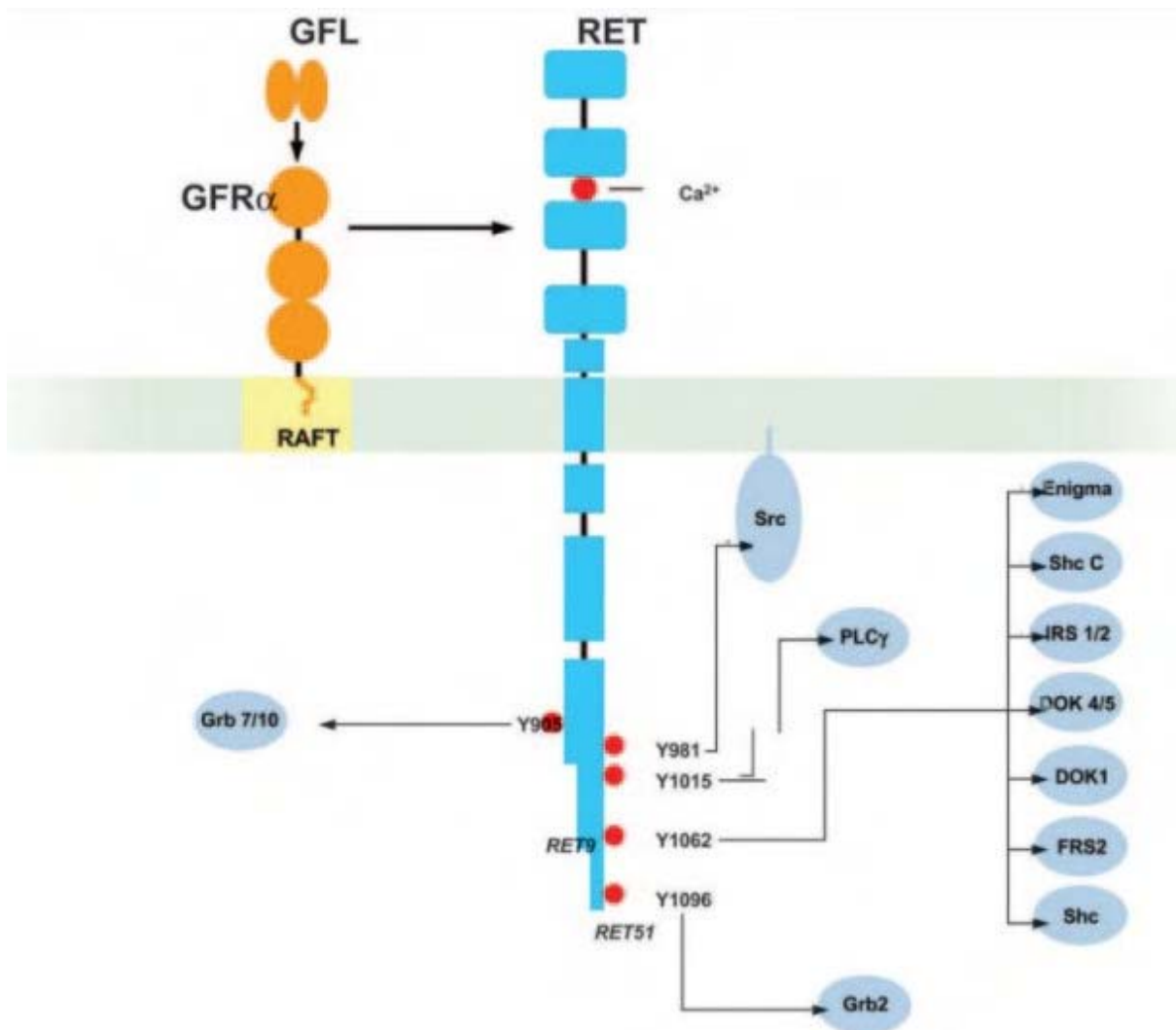
Os GFR $\alpha$  da membrana estão em locais ricos em lipídeos chamados *lipid rafts*. Estes sítios contêm proteínas sinalizadoras (20, 21) e são responsáveis pela adesão celular e interação com o RET. A interação de um dos ligantes com seu co-receptor GRF $\alpha$  une duas moléculas de proteína RET e induz a dimerização, resultando em autofosforilação de um dos resíduos específicos de tirosina intracelulares. Estes resíduos fosforilados servem de locais de ligação de várias moléculas envolvidas na transdução de sinais (4, 20, 21, 23) (Figura2).



**Figura 2:** Mecanismos de ativação do RET. A: RET é ativado via *cis* quando o GFL se liga ao GFR $\alpha$  localizado na membrana celular. B: ativação via *trans*, quando o GFL se liga ao co-receptor solúvel e depois recruta os receptores RET. Adaptado de De Groot (2006) (20).

O RET pode sofrer *splicing* alternativo gerando três isoformas: a curta (RET9), a intermediária (RET43) e a longa (RET51), que diferem na seqüência de aminoácidos da cauda C-terminal. Os RET9 e RET51 são os principais produtos *in vivo*, sendo o RET9 essencial para a morfogênese renal e desenvolvimento de sistema nervoso entérico, enquanto o RET51 é essencial para a diferenciação tardia renal (14, 19, 20). Os RET9 e RET43 contêm seis resíduos de tirosina, enquanto que o RET51 contém dois resíduos a mais na cauda C-terminal.

Entre estes resíduos de tirosina, o Y1062 é o sítio de ligação de pelo menos 7 proteínas diferentes, incluindo *enigma*, *ShcC*, *IRS 1/2*, *dok 4/5*, *dok1*, *FRS2*, *shc* (4, 19, 20), envolvidas na proliferação, diferenciação e transporte intracelular (21). A ativação do RAS/ERK (*rat sarcoma oncogene/extracelular signal-regulated kinase*), p38MAPK (*proteína kinase p38 mitogen-activated*) e JNK (*c-jun N-terminal kinase*) ocorrem principalmente via Y1062 (4, 20, 15) (Figura 3). A formação de complexos protéicos neste nível ativa o RAS/ERK e AKT, possibilitando a transformação neoplásica (4).

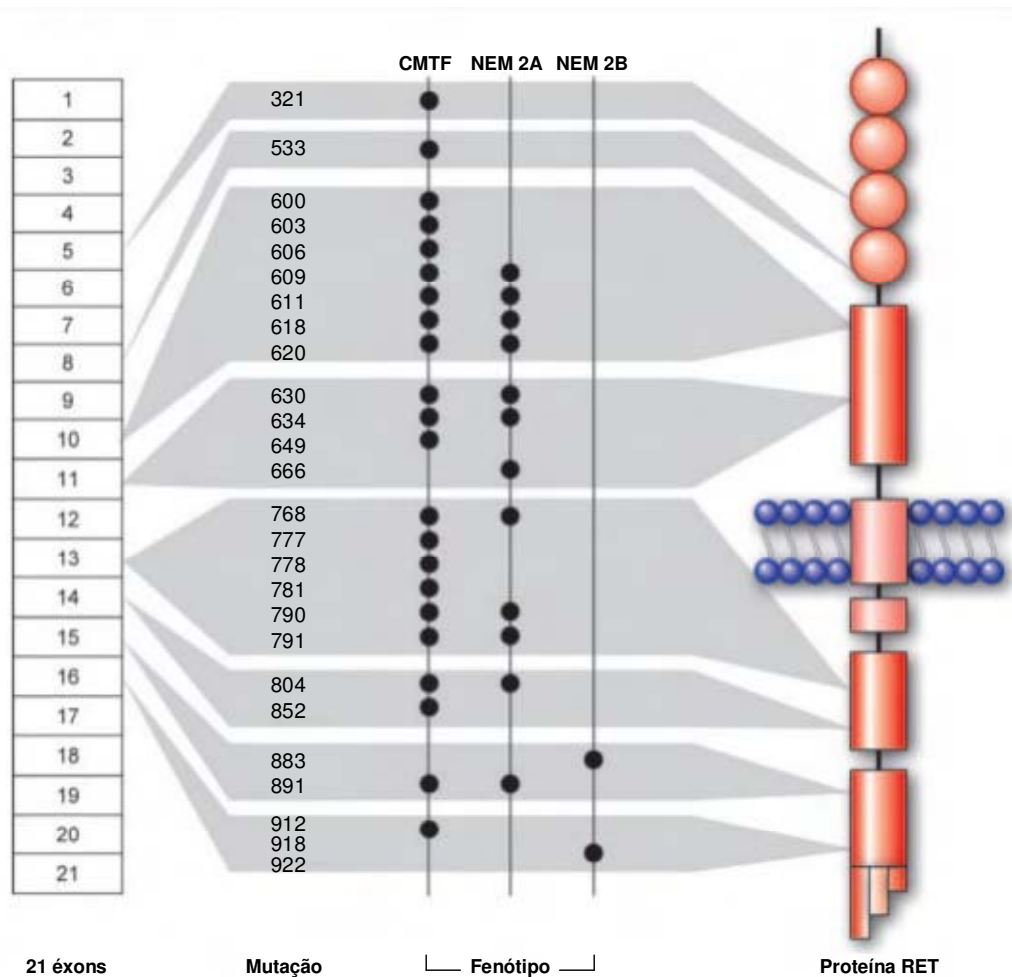


**Figura 3:** Esquema da proteína RET com seus quatro domínios extracelulares ricos em caderinas-*like*, a região rica em cisteína e duas isoformas alternativas, RET9 e RET51. O RET é estimulado pelos ligantes da superfamília GNDF (GFL), o qual, juntamente com seu co-receptor GFRα, une duas moléculas de proteína RET e ativa a autofosforilação e sinalização intracelular. Os pontos em vermelho são os locais onde a tirosino-quinase foi fosforilada, expondo os resíduos para acoplamento de proteínas diferentes, levando a cascata de ativação. Adaptado de Santoro et al. (2006) (4).

As mutações observadas na NEM 2A e no CMTF podem ocorrer ao longo de todo RET, mas principalmente na região extracelular rica em cisteína, correspondendo aos éxons 10 e 11. As mutações nas regiões cisteínas identificadas no NEM 2A e CMTF ativam o RET induzindo a homodimerização independente do ligante (19, 20, 21) (Figura 4).

Mutações somáticas e germinativas do RET são responsáveis por várias doenças humanas. Mutações inativadoras resultam na Doença de Hirschprung, enquanto que mutações ativadoras germinativas em ponto são responsáveis pelo desenvolvimento da NEM 2A, NEM 2B e CMTF. Já que o RET é um proto-oncogene, uma única mutação ativadora de um dos alelos é suficiente para a transformação neoplásica (4, 19, 21, 23, 25, 26). Imagina-se que a troca da cisteína por outro aminoácido permita à cisteína adjacente, que normalmente estaria envolvida na formação de uma ponte de dissulfeto intramolecular, a ficar livre e induzir pontes de dissulfetos aberrantes entre dois receptores mutantes vizinhos. Mutações no domínio tirosino-kinase induzem alteração conformacional do sítio catalítico, permitindo ativação do RET sem a dimerização do receptor (19, 21).

Nos últimos anos, foram realizados diferentes estudos com o objetivo de avaliar possíveis correlações entre mutações específicas e as diferentes apresentações clínicas do CMT (27, 28). Os diferentes fenótipos resultantes das mutações nas diferentes cisteínas podem ser teoricamente explicados por diferenças na intensidade da indução da dimerização do receptor (20, 21). As mutações do tipo *missense*, originárias da linhagem germinativa, são as principais responsáveis pelo CMT hereditário. Em pequeno número de casos há mutações duplas, pequenas inserções, deleções e pequenas inserções-deleções. Os éxons mais comumente afetados são os éxons 10, 11, 13, 15 e 16 (29). As mutações mais freqüentemente encontradas no CMTF e NEM 2A ocorrem nos resíduos de cisteína do éxon 10 (códon 609, 611, 618, 620) e do éxon 11 (códon 634) (10, 21, 28, 30). Estas mutações são responsáveis por 98% de todas as mutações da NEM 2A. Nestes pacientes, 80% de todas as mutações estão localizadas no códon 634. Uma mutação em ponto no códon 634 com substituição de uma cisteína por uma arginina (TGC → CGC) é responsável por 50% de todas as mutações na NEM 2A (10, 20) (Figura 4).



**Figura 4:** Receptor de tirosino-kinase RET e a localização das mutações no gene RET, no códon, e fenótipo correspondentes. CMTF = carcinoma medular de tireóide familiar; NEM 2A = neoplasia endócrina múltipla tipo 2A; NEM 2B = neoplasia endócrina múltipla tipo 2B. Adaptado de De Groot (2006) (20).

Nos pacientes com CMTF, 50% das mutações ocorrem no éxon 10 (códon 618 e 620), e em um número menor de familiares ocorre mutação no éxon 11 (códon 630, 631, 634, 635). Também são descritas mutações nos éxons 5 (códon 312), 8 (códon 532, 533) 13 (códon 768, 777, 778, 781, 790 e 791), 14 (códon 804, 844 e 852), 15 (códon 883, 891) e 16 (códon 912, 918), localizados no domínio intracelular do gene, interferindo com a ligação do ATP ao domínio tirosino-kinase (30, 31, 32). Algumas destas mutações são descritas em famílias específicas com CMTF: mutações R321G, R600Q, K603E, Y606C, S649L, N777S, V778I, Q781R, I852M e R912P. Esta última é uma mutação *missense* com substituição da arginina pela prolina no domínio tirosino-kinase intracelular. Neste caso, a paciente apresentou sobrevida maior que 30 anos (4, 24).

Por outro lado, as mutações da NEM 2B ocorrem em 95% dos casos no códon 918 (M918T) do éxon 16 (17, 33). Esta mutação causa alteração no substrato de reconhecimento catalítico. Outras mutações mais raras reconhecidas na NEM 2B ocorrem no éxon 15, códon 883 e 891, ou, mais raramente, nos códon 804, 904 e 922 (1, 32, 34).

A Tabela 2 mostra os diversos aspectos clínicos e genéticos do CMT.

**Tabela 2:** Aspectos clínicos e genéticos do CMT\*.

	<b>CMTF</b>	<b>NEM2A</b>	<b>NEM2B</b>	<b>CMT Esporádico</b>
Mutações RET	germinativa	germinativa	germinativa	somática
Éxons	5, 8,10,11,13, 14,15, 16	10, 11, 13, 14, 15,	15, 16	13, 15, 16
CMT	100%	100%	100%	100%
Idade ao diagnóstico clínico (anos)	<20 - >50	<20	<10	30 – 60
Multicentricidade	100%	100%	100%	<30%
Bilateralidade	100%	100%	100%	<30%
Hiperplasia de células C	100%	100%	100%	Raro
Feocromocitoma	0%	10- 60%	50 %	0%
Hiperparatireoidismo	0%	5 –20%	0%	0%
Amilóidose líquen-cutânea	0%	0%	100%	0%
Ganglioneuromatose	0%	0%	100%	0%
Dismorfia	0%	0%	100%	0%

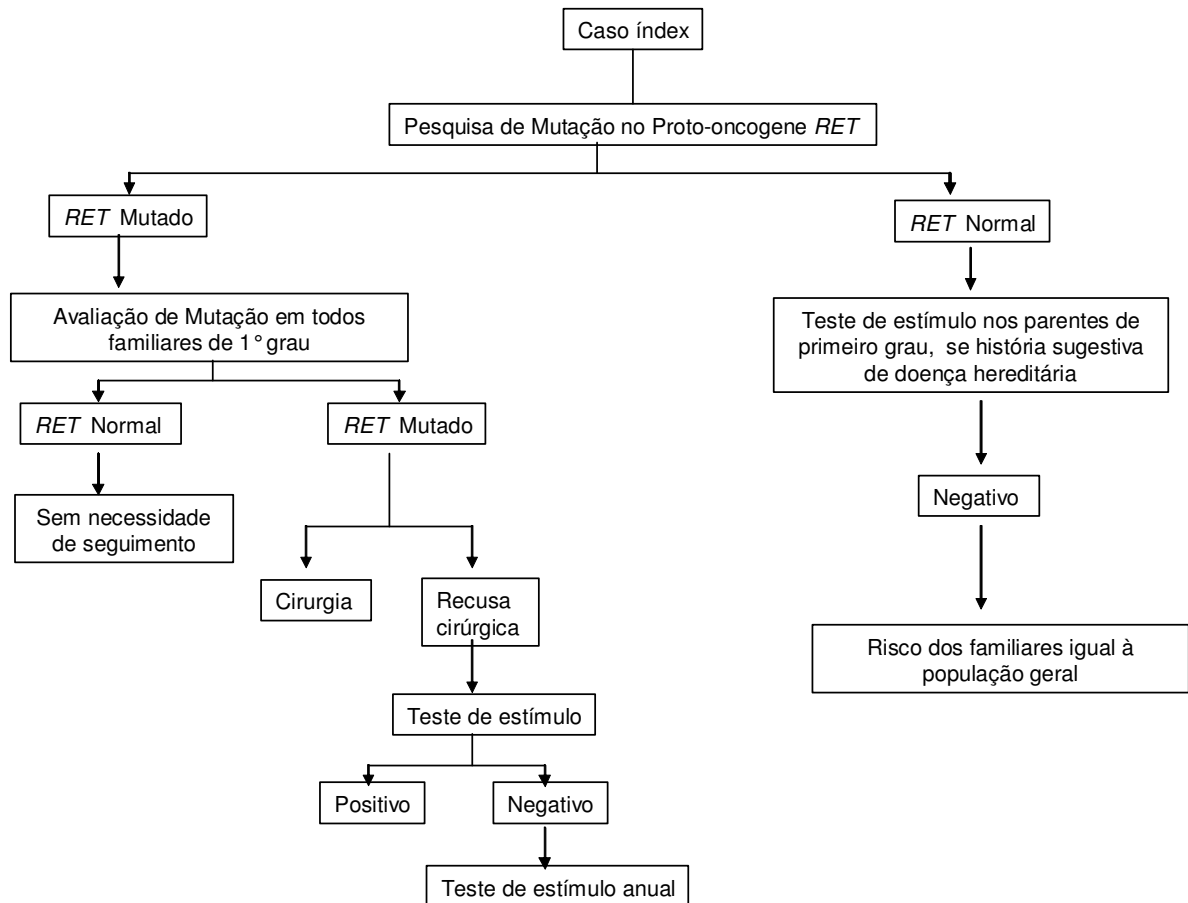
\*Adaptado de Schlumberger M., Pacini F (2003). Medullary Thyroid Carcinoma. *In*: Thyroid Tumors. 2º ed. 2003. Editora Nucleon, Paris p. 316 (2).

A aplicação de testes genéticos é de fundamental importância para o manejo adequado do CMT hereditário, já que possibilita seu diagnóstico precoce, determina a conduta terapêutica e indica o prognóstico da doença no indivíduo afetado e em seus familiares. Além disto, é de baixo custo e não apresenta efeitos colaterais como os observados com testes de estímulo da calcitonina, que também têm elevados índices de falsos positivo e falsos negativo.

O teste genético deve ser indicado em indivíduos com a neoplasia independente da sua idade ao diagnóstico. Massoll et al.(2004) sugerem rastrear os *hot spots*, éxons 10, 11, 13, 14, 15 e 16. Em caso de ausência de mutação nestes éxons, os outros 15 éxons devem ser seqüenciados devido à possibilidade, ainda que pequena, de se encontrar um CMT hereditário (29). Encontrando-se uma mutação no caso índice, deve ser realizado o rastreamento genético em todos os familiares de primeiro grau, pois eles têm 50% de probabilidade de carregar a mutação e, portanto, de desenvolver CMT (19). Os familiares *RET* negativos estão dispensados do acompanhamento médico, pois o risco de desenvolverem a doença

é igual ao da população geral. Nestes familiares não é necessário realizar rastreamento para feocromocitoma e ou hiperparatireoidismo (19, 29).

Por outro lado, caso o rastreamento do caso índice venha a ser negativo, realiza-se teste de estímulo de liberação da calcitonina nos parentes de primeiro grau (1, 26, 29, 35, 36). Em famílias com NEM 2A, um teste positivo indica que a criança tem 90% ou mais de probabilidade de desenvolver CMT em algum momento de sua vida (10, 26). O algoritmo 1, abaixo, resume a investigação frente a um indivíduo com CMT.



**Algoritmo 1:** Investigação diante de um paciente com CMT. Adaptado de Schlumberger & Pacini (2003) (2). *RET*= Proto-oncogene *RET*.

Há consenso de que a decisão de submeter o indivíduo à tireoidectomia total profilática deva ser baseada predominantemente no resultado positivo do teste genético, em detrimento dos testes bioquímicos (1, 17, 25) (Tabela 3).

A Tabela 3 apresenta a estratificação do risco e a conduta cirúrgica baseado nas mutações descritas acima. Crianças com NEM 2B e ou portadoras de



mutações nos códons 883, 918 ou 922 devem ser classificadas dentro do nível 3 (altíssimo risco) e submetidas à tireoidectomia total antes dos 6 meses de idade, ou, de preferência, no primeiro mês de vida, já que existem relatos de metástases no primeiro ano de vida. A cirurgia indicada é a tireoidectomia total com esvaziamento ganglionar central estendido (29). Indivíduos portadores de mutações nos códons 611, 618, 620, 630, ou 634 são classificados dentro do nível 2 (alto risco), devendo ser submetidos à tireoidectomia profilática antes dos 5 anos de idade, ou até mesmo antes dos 2 anos, dependendo da história familiar (2, 3, 5, 6, 13, 14, 25, 29, 37). Especificamente em relação às mutações no códon 634, o risco acumulativo para CMT aumenta com a idade, entre 2-20 anos, sendo a idade média de diagnóstico por volta dos 10 anos. Uma vez que ocorra transformação maligna, metástases ganglionares ocorrem 6,6 anos depois (38). Nestes casos de risco nível 2 deve-se realizar tireoidectomia total com retirada da cápsula posterior e dissecação dos linfonodos centrais. Na eventualidade de se operar antes dos 2 anos de idade, não existe consenso quanto à necessidade de dissecação ganglionar. Os portadores de mutações nos códons 533, 649, 666, 768, 790, 791, 804 ou 891 devem ser classificados dentro do nível 1, ou risco intermediário para CMT. O comportamento biológico do CMT no risco intermediário é variável, mas, em geral, o tumor cresce mais lentamente e aparece em idades mais tardias. No entanto, têm sido descritas metástases ganglionares e mortes causadas pelo CMT em indivíduos portadores de algumas dessas mutações. Embora alguns autores indiquem tireoidectomia total antes do 5 anos de idade, tal como para indivíduos com risco 2, e outros sugiram cirurgia aos 10 anos de idade, alguns recomendam esperar resultados elevados da CT no teste de estímulo da CT para indicar a cirurgia.

Diante disso, não existe consenso quanto ao manuseio de pacientes com mutações nos éxons 13, 14 e 15 (20, 29, 32). Nestes pacientes, a idade média do diagnóstico é por volta de 16 anos. Em indivíduos com mutação no éxon 10, o CMT pode se desenvolver mais tardiamente (38).

**Tabela 3:** Estratificação do risco e conduta cirúrgica segundo as mutações do gene RET

<b>Estratificação de risco</b>	<b>Mutação (Códons)</b>	<b>Idade mais precoce de aparecimento</b>	<b>Conduta cirúrgica</b>
Altíssimo risco ou nível 3	883, 918, 922	< 6 meses de vida	< 6 meses de vida. De preferência 1º mês de vida
Alto risco ou nível 2	609, 611, 618, 620, 630, 634,	3 - 7 anos de vida	Antes dos 5anos de vida
Risco intermediário ou nível 1	533, 649, 666, 768, 790, 791, 804, 891	3º - 4º décadas de vida	1ª década de vida. Teste do estímulo anual após os 5 anos de vida

Adaptado de Brandi et al. (2006) (25).

Aproximadamente 5% dos CMT esporádicos apresentam mutação germinativa no proto-oncogene RET e, conseqüentemente, a forma hereditária de CMT. Estes casos incluem mutações *de novo* ou a existência de membros com CMT não identificado na família. Caso o rastreamento genético de um indivíduo com CMT venha a ser negativo, a probabilidade de pertencer a uma família com CMT hereditário é menor que 1% (19). Nesses casos, realiza-se o teste da CT estimulada em parentes de primeiro grau quando existem fatores que sugiram tumor hereditário (idade jovem no diagnóstico, tumor multifocal, hiperplasia de células C). Caso o teste com estímulo venha normal em três parentes de primeiro grau, a probabilidade de CMT hereditário cai a nível insignificante (10). Por outro lado, um teste positivo em um parente de primeiro grau não necessariamente quer dizer que exista CMT hereditário, pois tal resposta pode estar relacionada à hiperplasia benigna de células C, especialmente em homens (10).

Diante do exposto, fica evidente a importância da avaliação clínica e classificação genética de pacientes portadores de CMT. Estes procedimentos são obrigatórios e decisivos para a conduta cirúrgica assim como para o aconselhamento dos demais membros da família.

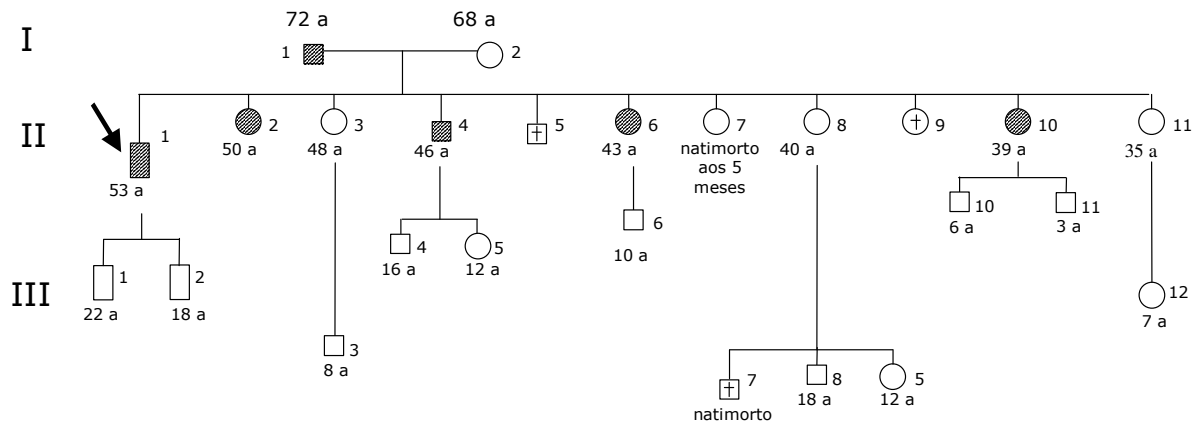
No presente trabalho estudamos aspectos clínicos e moleculares do CMT de uma família de 25 membros, dos quais cinco já desenvolveram esta neoplasia. Nos familiares em que detectamos a mutação no proto-oncogene RET foi realizada orientação para tratamento cirúrgico preventivo e aconselhamento genético de sua prole.

**OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho foi estudar aspectos clínicos, de propedêutica armada e molecular de indivíduos de uma família de 25 membros, dos quais cinco já apresentam o carcinoma medular da tireóide manifesto. Nos familiares em que detectamos a mutação gene *RET*, objetivamos orientar o tratamento preventivo seu e de sua prole.

# PACIENTES E MÉTODOS

Estudamos uma família de 25 membros acompanhada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, com diagnóstico de carcinoma medular de tireóide. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética local, segundo o protocolo n.º. 300/2005-CEP (Anexo 1). Após a assinatura do termo de consentimento informado livre e esclarecido, os membros foram submetidos ao teste de calcitonina estimulado por gluconato de cálcio. Amostras de sangue periférico foram colhidas para extração do DNA e pesquisa de mutação do proto-oncogene *RET*. O pedigree da família está na Figura 5.



**Figura 5:** Pedigree da família estudada. Seta: caso *índice*.

O caso *índice* é um senhor de 50 anos que se encontrava sob acompanhamento devido a *Diabetes Mellitus*. Durante a consulta, ele relatou que sua irmã havia sido tireoidectomizada devido a carcinoma medular de tireóide. A avaliação ultra-sonográfica da tireóide do paciente evidenciou um nódulo, cuja punção possibilitou o diagnóstico de CMT. O paciente apresentava níveis de calcitonina basal superiores a 100 pg/mL. Foi submetido à tireoidectomia total com esvaziamento ganglionar. Sua família foi investigada para CMTF de acordo com os protocolos utilizados por Massoll (29).

Para estudo deste paciente e de sua família, elaboramos um protocolo específico para CMT e, como ainda não tínhamos o resultado do seqüenciamento, incluímos alguns itens para o possível diagnóstico de NEM tipo 2 (Anexos 2 e 3).

Para seguimento a longo prazo, seguimos o protocolo de Schlumberger & Pacini (2003) (2) modificado (Anexo 4).

## **Teste da Calcitonina**

A determinação da calcitonina plasmática foi realizada em amostras de sangue periférico, com o paciente em jejum, nos tempos 0 e após, 2, 5, 10 e 15 minutos da infusão de 2 mg/kg de gluconato de cálcio a 10%, via endovenosa por 1 minuto (9, 12). O método de dosagem da CT foi do quimioluminescência no aparelho Immolite 2000 (*kits* DPC, Los Angeles, CA)

## **Outros Exames Laboratoriais**

### **I. Antígeno carcinoembrionário (CEA)**

O CEA foi dosado pelo método ensaio enzimático de micropartículas (MEIA), no aparelho AxSYM. O valor de referência foi <5 ng/mL (Abbott, Chicago, EUA).

### **II. Hormônios relacionados à tireóide**

O T4 livre e o TSH foram dosados por quimioluminescência no aparelho Immolite 2000, com valores de normalidade entre 0,8 – 1,9 ng/dL e 0,4-4,0 uIU/L, respectivamente (*kits* DPC, Los Angeles, CA).

### **III. Hormônio Paratireoideo (PTH)**

O PTH foi dosado por quimioluminescência no aparelho Immolite 2000, com valores de normalidade entre 8-74 pg/mL (DPC, Los Angeles, CA).

### **IV. Metanefrina Urinária**

A metanefrina urinária foi dosada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com valores de normalidade menores que 1 ug/mg de creatinina

## V. Cortisol

A determinação do cortisol plasmático após 1 g de dexametasona oral foi utilizada para rastreamento da Síndrome de Cushing. Esta determinação também foi realizada por quimioluminescência assumindo valores <1,8 ug/mL para exclusão da doença (DPC, Los Angeles, CA).

## Exames de Imagem

Foram realizados os seguintes exames de imagem: Raio X (Multix B 500 Amperes, Simens, Alemanha), ultra-sonografia da tireóide e da região cervical (aparelho Toshiba com Transdutor de 10MHz), tomografia computadorizada (Shimatzu SCT7000, Japão), ressonância nuclear magnética (GE Signa Contour 0,5 Tesla, EUA) e exames de medicina nuclear: cintilografia óssea com o marcador metilenidifosfonato de sódio (MDT) e pesquisa de corpo inteiro com I-MIBG (iodo-metaiodobenzilguanidina) marcado com  $I^{131}$ , realizados no aparelho gama-câmara (Millenium, GE, EUA).

## Citopatológico

As punções foram realizadas por médico patologista e dirigidas por ultra-sonografia. Foi utilizada agulha 13x8,5 *gauge* sem anestesia local, sendo puncionadas as áreas suspeitas. O conteúdo da agulha foi ejetado sobre uma lâmina histológica convencional e transformado em esfregaço, que foi corado pela técnica de Giemsa. Em caso de dúvida diagnóstica, algumas lâminas foram coradas para calcitonina por técnica de imunoistoquímica.

## Extração do DNA

A extração, amplificação, seqüenciamento do DNA e análise dos resultados foram realizados no Laboratório Experimental da Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UNESP, Botucatu.

O DNA foi extraído pelo método de extração de Sambrook et al. (39). *Primers* específicos para os éxons 8 ao 16 do gene *RET* (Gene Bank, acesso no.



AJ243297) foram usados para gerar produtos de PCR, os quais foram purificados e seqüenciados.

### **Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)**

A reação foi realizada utilizando-se 200 ng do DNA genômico em um volume final de 50 µl contendo: 10 mmol/l Tris-HCL (pH 8,3); 50 mmol/l KCl; 200 µmol/l de deoxy-NTP; 1,5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>; 1 U Taq DNA polimerase e 25 pmol/l de cada *primer* específico (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

As condições para gerar os produtos de PCR incluíram uma fase inicial de 5 minutos à 94°C; um ciclo de 45 segundos à 94°C, para a abertura das fitas; com uma temperatura de anelamento variando de 59 a 68°C dependendo do par de *primer* utilizado; e uma temperatura de extensão de 1 minuto à 72°C. Utilizamos 35 ciclos para a amplificação da reação. Os produtos gerados serão submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1% com brometo de etídio. Após esta corrida, os produtos foram purificados usando o kit Rapid PCR Purification Systems (Marligen Bioscience) e quantificados usando DNA mass Ladder (Invitrogen). Os *primers*, e a temperatura de anelamento e o numero de pares de base do produto do PRC estão apresentados no Anexo 5.

### **Seqüenciamento**

Para a reação de seqüenciamento foi utilizado o seguinte protocolo: 1 µL de “sense primer” a 1,6 pmol/µL, 2 µL de Big Dye TM Terminator Cycle Sequencing v 3.1 (Applied Biosystems Foster City, CA, USA), 1 µL de tampão Save Money; 1,5 µL de amostra; 4,5 µL de água.

O termociclador foi programado da seguinte maneira: 10 segundos à 96° C, 25 ciclos de 5 segundos à 50°C, 4 minutos à 60°C, mantido à 4°C. Cada amostra foi seqüenciada pelo menos duas vezes em cada direção.

Após a reação de seqüenciamento, os produtos foram submetidos à precipitação alcoólica e lidos no seqüenciador ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, USA).

As alterações encontradas foram confirmadas pelo seqüenciamento da fita “anti-sense”.

## **Análise dos Dados**

Os dados foram analisados relacionando-se o quadro clínico dos pacientes com seus níveis de calcitonina basal e pós-estímulo, com os níveis de CEA, com os exames de imagem e com as mutações encontradas.

# RESULTADOS

O acompanhamento dos indivíduos desta família tem sido muito problemático. Alguns não retornaram ao ambulatório para exames de controle, outros abandonaram o seguimento e outros, ainda, recusaram-se a participar do estudo (Tabela 4). Os pacientes II-1 (caso *índex*), II-6 e II-10 estão em seguimento desde 2005. No entanto, o paciente I-1, apesar de apresentar CT basal elevada e nódulos ao USG, não desejou sofrer intervenção cirúrgica nem manter seguimento. Os pacientes II-2, II-4, III-4 e III-5 estão em acompanhamento em outro serviço e não concordaram em participar do presente estudo; os pacientes II-2 e II-4 são portadores de CMTF, porém não há dados a respeito dos outros dois. Os sujeitos II-5 e II-9 faleceram por acidentes e o III-7 era um natimorto.

## **1. Exames Laboratoriais**

### **1.1 Calcitonina**

Em geral, os pacientes com CMTF que realizaram a dosagem de calcitonina (I-1, II-2, II-6, II-10) mostraram níveis elevados deste marcador sérico, tanto basal como após estímulo. Os baixos níveis de CT do paciente II-2 explicam-se pelo fato de que o paciente já havia sido operado do CMT em outro serviço e encontrava-se sem doença residual.

No momento do estudo, o restante da família ainda não apresentava elevação dos níveis de CT basal ou pós-estímulo, o que não exclui a possibilidade de serem portadores da mutação crítica e desenvolverem o CMT no futuro. O paciente III-8, de 18 anos de idade, apresentou CT basal e pós-estímulo maiores que 10 pg/mL e, apesar de não ter sido submetido à punção por agulha fina (PAAF) compatível com CMT ou hiperplasia de células C (HCC), foi submetido à tireoidectomia total, cujo anatomopatológico revelou bócio colóide. Sua mãe (indivíduo II-8) também havia sido operada por bócio colóide. Embora não apresentasse aumento da CT basal ou pós-estímulo, devido à ansiedade pela presença de uma doença hereditária na família, ela desejou ser submetida ao procedimento cirúrgico.

Nos pacientes acompanhados no pós-operatório por CMT observamos discrepância quanto ao valor da CT pós-operatória e de seguimento, pois foram realizadas em laboratórios diferentes e com metodologias diversas.

**Tabela 4:** Resumo dos exames laboratoriais iniciais de cada membro da família com CMTF\*.

Sujeitos	Calcitonina (pg/mL)		CEA* (ng/mL)	USG* TIREÓIDE	PAAF*	CIRURGIA	ANATOMOPATOLÓGICO
	BAS*	PÓS*					
I-1 ♂	190		3,3	Nódulos	Inconclusivo	Não	
I-2 ♀	<0,1	<0,1	1,5	Normal			
II-1 ♂ (Index)	590		25	Nódulo	CMTF	Sim	CMTF multifocal, nódulo maior com 2 cm. HCC*. pT1N0Mx
II-2 ♀	2,0	2,1	CMTF - Acompanhamento em outro serviço				
II-3 ♀	<0,1	<0,1	1,2	Normal	NR	Não	
II-4 ♂	CMT - Acompanhamento em outro serviço						
II-5 ♂	Falecido por acidente						
II-6 ♀	533		39	Nódulos	CMTF	Sim	CMTF 2,3cm. pT2N0Mx
II-7 ♂	Natimorto						
II-8 ♀	<0,1	<0,1	1,0	Nódulos	Bócio colóide	Sim	Bócio colóide
II-9 ♀	Falecida por outras causas						
II-10 ♀	75	>100	2,1	Nódulo	CMTF	Sim	CMTF com metástase. nódulo de 4,0 cm pT3N1bMx
II-11 ♀**	<0,1	<0,1	1,6	Não visualizada	NR	Não	
III-1 ♂	<0,1	7,9	2,1	Pequenos cistos	Bócio colóide	Não	
III-2 ♂	<0,2	<0,2	2,1	Normal	NR	Não	
III-3 ♂	<0,1	<0,1	0,9	Normal	NR	Não	
III-4 ♂	Acompanhamento em outro serviço						
III-5 ♀	Acompanhamento em outro serviço						
III-6 ♂	4,0	8	1,2	Normal	NR	Não	
III-7 ♂	Natimorto						
III-8 ♂	>10	42	1,6	Normal	Bócio colóide	Sim	Bócio colóide
III-9 ♀	2,0	3,0	0,6	Heterogenia	Bócio colóide	Não	
III-10 ♂	6,0	13	0,8	Heterogenia	NR	Não	
III-11 ♂	<0,1	<0,1	0,9	Normal	NR	Não	
III-12 ♀	<0,1	<0,1	2,5	Normal	NR	Não	

\*BAS = basal; PÓS= pós-estímulo com gluconato de cálcio; CMTF = carcinoma medular de tireóide familiar; USG = ultrassonografia; PAAF = punção aspirativa por agulha fina; HCC = hiperplasia de células C; NR = não realizado.

\*\* sujeito II-11 apresenta hipotireoidismo.

A paciente II-10 apresentou dois exames de CT discrepantes colhidos na mesma amostra. A Tabela 5 resume o seguimento laboratorial desta paciente e os exames de dois laboratórios discrepantes. Esta paciente já havia sido submetida a três cirurgias e apresentava nódulos linfáticos acometidos, de forma que o exame com maior nível de CT foi sobre o qual nos apoiamos para dar seguimento ao caso. Esta paciente fora referida ao nosso serviço após a segunda cirurgia. Seu

diagnóstico de CMT foi realizado após lobectomia tireoidiana direita para retirada de nódulo de 4 cm em sua maior dimensão. O diagnóstico de CMT não havia sido realizado pela PAAF pré-operatória. Em seguida ela realizou loboistimetomia esquerda. Não foi realizado esvaziamento ganglionar e por isso seu teste de calcitonina pós-operatório apresentou-se tão alto. A paciente sofreu duas cirurgias de esvaziamento ganglionar ao longo de um ano, apresentando entre 2-3 nódulos linfáticos acometidos em cada cirurgia. Os exames de seguimento desta paciente encontram-se no Anexo 6.

**Tabela 5:** Exames da paciente II-10 mostrando discrepância entre valores da CT colhidos da mesma amostra de sangue (em negrito).\*

Data	CALCITONINA (pg/mL)	CEA (ng/mL)	TSH (mIU/mL)	PTH (pg/mL)	Metanefrinas urinárias (ug/mg)	Cortisol pós 1 mg de dexta
	VR < 4,6 ♀	VR < 5	VR 0,4-4	VR 8-74	VR < 1ug/mg de creatinina)	VR < 1,8 ug/ml
	Basal					
		Pós Teste				
3/2005	74	100	2,1			
6/2005			1,6			
<b>3/2006</b>	<b>1,5</b>		3,4	10,8		
<b>3/2006</b>	<b>39</b>	2,1				
4/2006					0,42	
7/2006	30					0,9
10/2006	46,7					
2/2007		1,6				
9/2007	Em aguardo					

\*CEA = antígeno carcinoembrionário; TSH = hormônio tireoestimulante; PTH = hormônio paratireoideo; VR = valor de referência

O sujeito II-6 apresentava CT basal de 533 pg/ml e foi submetido à tireoidectomia total com esvaziamento cervical bilateral. No pós-operatório, a calcitonina diminuiu para 28 pg/mL. No entanto, após um ano, a CT voltou a se elevar (Tabela 6). A paciente foi investigada conforme o protocolo adotado, sem evidência de metástases. A pesquisa de corpo inteiro com I<sup>131</sup>-MIBG evidenciou processo tumoral na região cervical anterior. Foi encontrado um nódulo supraclavicular que, após exérese e avaliação imunoistoquímica revelou ser metástase de CMT, sendo a paciente submetida à cirurgia (Anexo 7).

**Tabela 6:** Exames laboratoriais de acompanhamento do paciente II-6.\*

Data	CALCITONINA (pg/mL) VR<4,6	CEA (ng/mL) VR <5	TSH (mIU/ml) VR 0,4-4	PTH (pg/ml) VR 8-74	Metanefrinas urinárias (ug/mg) VR <1ug/mg de creatinina)
3/2005	533	39			
4/2005	28 (pos operatória)				
5/2005	9,8				
6/2005	3,8 → 3,2	7,9	1,95		
1/2006	10				
3/2006		12,9			
4/2006		10,3		9,1	0,68
7/2006	97,7		1,14		
9/2006		34	1,15		
12/2006		13,4			
1/2007	294				
7/2007		18,6			
9/2007	330	19,4			

\* CEA = antígeno carcinoembrionário; TSH = hormônio tireoestimulante; PTH = hormônio paratireoideo; VR = valor de referência

O sujeito II-1 (índex) apresentava CT basal pré-operatória de 590 pg/mL. Após a tireoidectomia total com esvaziamento ganglionar, evoluiu com supressão de CT (Tabela 7) e mantém níveis de CT baixos desde então. Seus exames de imagem estão no Anexo 8.

**Tabela 7:** Exames laboratoriais de acompanhamento do paciente II-1.\*

Data	CALCITONINA (pg/mL) VR<4,6	CEA (ng/mL) VR<5	TSH (mIU/mL) VR 0,4-4	PTH (pg/mL) VR 8-74	Metanefrinas urinárias (ug/mg) VR<1ug/mg de creatinina)
03/2005	590	25,1	1,15		
10/2005	0,1 → 0,1	2,3		10	
05/2006	0,1				negativo
12/2006	< 0,2		4,0		
03/2007	<0,2 → 0,2	2,1			
08/2007	<0,2				

\*CEA = antígeno carcinoembrionário; TSH = hormônio tireoestimulante; PTH = hormônio paratireoideo; VR = valor de referência

## 1.2 Antígeno Carcinoembrionário (CEA)

O CEA esteve elevado apenas nos pacientes II-1 e II-6, ambos com a doença. Interessante notar que na paciente II-10, com metástases ganglionares cervicais, o CEA esteve sempre baixo (Tabela 5). No entanto, quando esta paciente chegou ao nosso serviço já havia sido submetida à lobectomia direita e loboistimetomia esquerda por CMT. Não dispomos dos níveis de calcitonina ou de CEA desta época.

Nos outros pacientes, que não apresentam a doença, foi identificado CEA em níveis normais, conforme apresentado na Tabela 4.

## 2. Ultra-sonografia (USG)

Ao exame de USG, os tumores mostraram-se como nódulos únicos ou múltiplos. No entanto, nos casos II-8 e III-8, que apresentavam teste da calcitonina e PAAF negativos, a USG detectou nódulos que, após cirurgia revelaram ser bócio colóide multinodular. Por outro lado, os casos III-9 e III-10 apresentaram tireóide heterogênea ao USG, embora o primeiro deles apresentasse bócio colóide, diagnosticado pela PAAF. A pesquisa de anticorpo anti-tireoglobulina e o teste de estímulo da calcitonina com gluconato de cálcio nestes indivíduos resultaram negativos.

Finalmente, a tireóide não foi visualizada à USG do paciente II-11, que apresentava hipotireoidismo, diagnosticado aos 5 anos de idade, e oligofrenia leve.

## 3. Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF)

Dentre os oito casos submetidos à PAAF, houve confirmação do CMTF nos sujeitos II-1 (*índex*), II-6 e II-10. Em outros casos (II-8, III-1, III-8 e III-9) o exame revelou bócio colóide; de fato, estes pacientes não apresentavam qualquer outro exame sugerindo a ocorrência de CMTF (níveis de calcitonina, de CEA e USG).

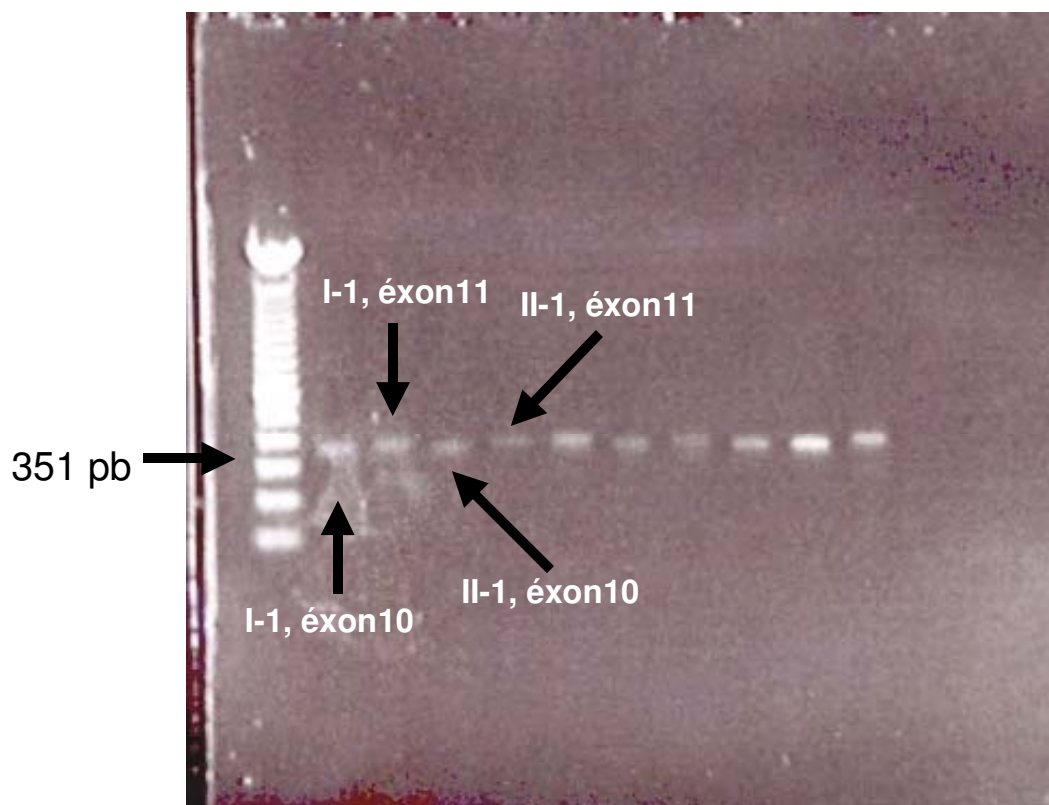


#### 4. Exames de Imagem

Os exames de imagem dos pacientes em acompanhamento por CMTF estão nos Anexos 6, 7 e 8.

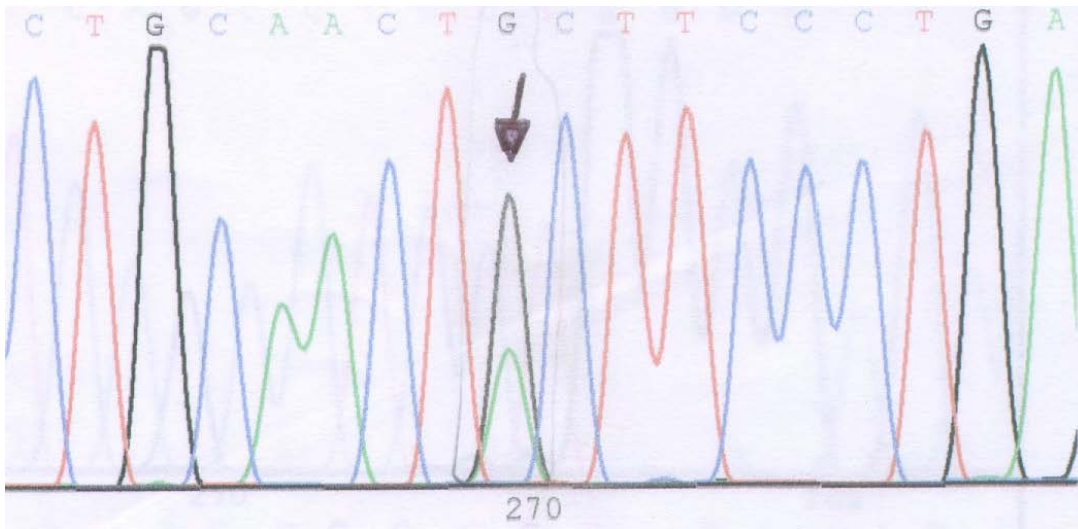
#### 5. PCR e Seqüenciamento

A Figura 5 mostra o produto do PCR para os éxons 10 e 11 dos casos I-1 e II-1 (Índex) da família com CMT.



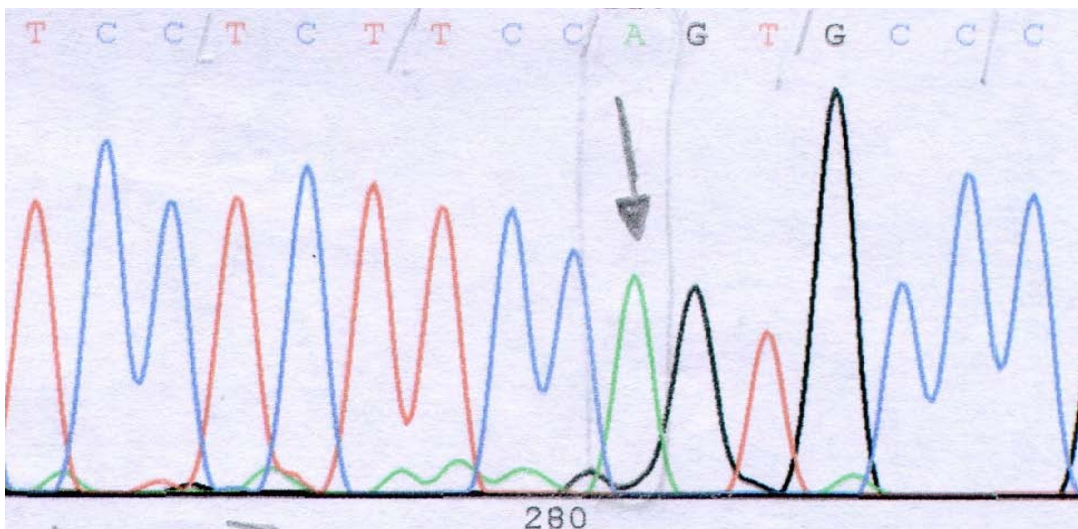
**Figura 5:** Produto de PCR para éxons 10 e 11 nos casos I-1 e II-1 (*Índex*).

Foram seqüenciadas amostras dos casos I-1 e II-1; ambos apresentam a mutação C611T (TGC→TAC) no éxon 10, códon 611 (Figura 6).

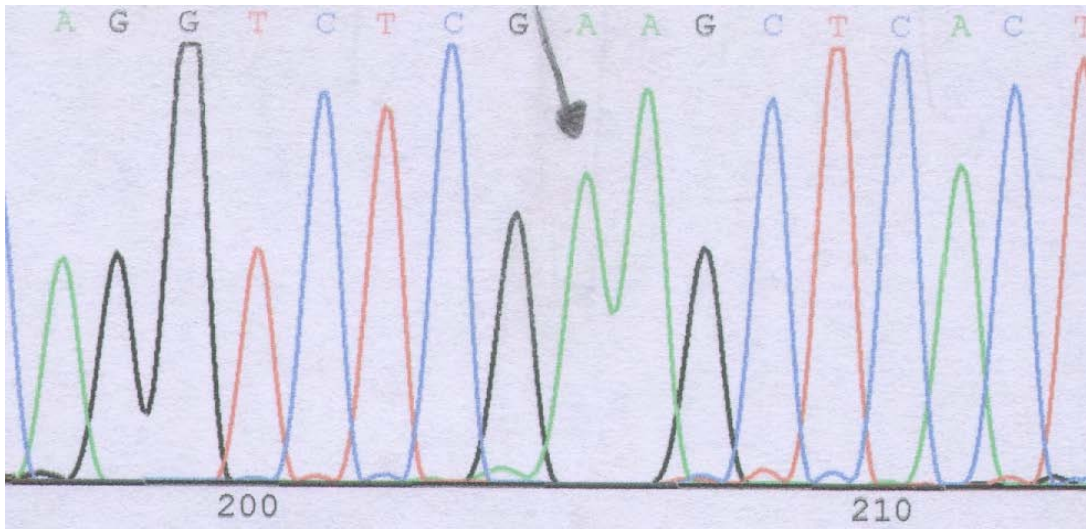


**Figura 6:** Seqüenciamento representativo mostrando a mutação cys611tyr (TGC→TAC).

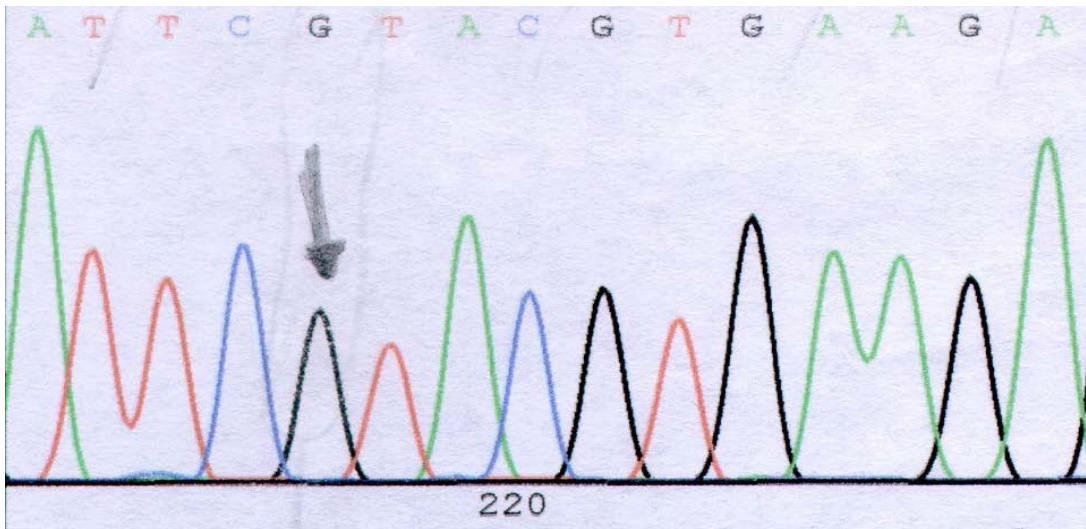
Além disso, encontramos polimorfismos no éxon 11 (G691S), no éxon 13 (L769L) e no éxon 15 (S904S) em ambos pacientes (Figuras 7, 8, 9).



**Figura 7:** Seqüenciamento representativo mostrando o polimorfismo G691S no éxon 11 (GGT→AGT).



**Figura 8:** Seqüenciamento representativo mostrando o polimorfismo L769L no éxon 13 (CAG→AAG).



**Figura 9:** Seqüenciamento representativo mostrando polimorfismo S904S no éxon 15 (TTC→TTG).

# DISCUSSÃO

Este trabalho estudou aspectos clínicos, laboratoriais e de imagem de uma família portadora de CMTF, cujos membros apresentam, de modo variado, algumas características desta condição nosológica, como níveis séricos elevados de calcitonina basal e pós-estímulo, níveis séricos elevados de CEA, nódulos tireoidianos e, em pelo menos dois casos, metástases ganglionares comprovadas. O rastreamento genético realizado nos éxons 8 ao 16 do proto-oncogene *RET* de dois pacientes revelou a mutação cys611tyr no éxon 10, assim como três polimorfismos nos éxons 11, 13 e 15. O presente estudo representa uma contribuição ao conhecimento do diagnóstico e acompanhamento de pacientes com CMT.

Hazard et al. (1959) foram os primeiros a descrever o CMT (40). Este foi um dos primeiros tumores humanos relatado em associação com outras neoplasias, que acabou levando à identificação das síndromes de neoplasia endócrina múltipla (Sipple, 1961) (41). A caracterização clínica da entidade CMTF só foi realizada em 1986 por Farndon et al. (42). Narod et al. (1989) (43) mostraram que o CMTF é causado pelas mesmas mutações que são responsáveis pela NEM 2A. Em 1993, Mulligan et al. (44) demonstraram associação entre o proto-oncogene *RET* e o CMT hereditário. Em 1995, Pasini et al. (45) clonaram inteiramente o gene *RET*, o que facilitou os estudos genético-moleculares e a pesquisa de sua correlação genótipo-fenótipo, realizada por Manchens et al. (2001) (26).

A partir de 2002 apareceram vários trabalhos sobre a função do gene e da proteína *RET*. Em 2006, Plaza-Manacho (46) revisaram diferentes mecanismos de doenças relacionadas ao *RET*, sinalizando possíveis tratamentos medicamentosos para esta entidade.

## **Calcitonina**

A CT pode estar elevada nas condições fisiológicas em que ocorre maior demanda de cálcio, como em neonatos, gravidez, lactação e crescimento estatural e nas hiperplasias de células C da tireóide (HCC) (36, 20). Também, há outras condições patológicas que causam elevação do nível de CT, como a insuficiência renal crônica e tumores neuro-endócrinos, principalmente quando há metástases (7, 36) (Tabela 8).

**Tabela 8:** Condições associadas a aumento patológico da calcitonina\*

**Tumores secretores de calcitonina**

Adenocarcinoma de mama	Carcinoma medular da tireóide
Adenocarcinoma de próstata	Glianglioneuromas
APUDomas	Neuroblastomas
Carcinóides (pulmão, trato gastro intestinal)	Timomas

**Patologias e condições associadas a aumento de calcitonina**

Anemia perniciosa	Hemorragia gastrointestinal
Choque	Insuficiência Renal (aguda e crônica)
Cirurgia de Tireóide	Infarto do Miocárdio
Cirurgia Hepática	Intoxicação por Lítio
Doença de Graves	Pancreatites
Estresse cirúrgico	Trauma
Gastrite Aguda	Úlcera Péptica

\**apud* Ezabela (1998).

Hauache et al. (2003) (9) analisaram a CT basal de 1.124 indivíduos normais, encontrando níveis inferiores a 5pg/mL em 87,5%, e inferiores a 2pg/mL em 68,5% dos casos. Verga (2006) verificou que em meninos e homens adultos normais os níveis de CT tendiam ser mais elevados, sugerindo possível efeito de andrógenos na regulação do crescimento das células C (11). Os níveis de CT basais e pós-estímulo são mais elevados em homens do que em mulheres (10, 11).

Níveis pré-operatórios de calcitonina correlacionam-se significativamente com o tamanho do CMT e com a possibilidade de metástases. Níveis basais superiores a 1.000pg/mL correspondem à mediana de tamanho tumoral de 25mm e estão associados à presença de metástases em cerca de 10% dos casos (47). Por outro lado, níveis inferiores a 1.000pg/mL associam-se a tumores com tamanho mediano de 7mm e metástases à distância em apenas 3% dos casos. Níveis de calcitonina inferiores a 100pg/mL indicam tumores de cerca de 3mm. Finalmente, níveis de calcitonina basal pré-operatória inferiores a 50pg/mL correlacionam-se com normalização pós-operatória em 98% dos casos (47).

De maneira geral, nossos casos acompanham a literatura sobre a relação tamanho/progressão de tumor e níveis de calcitonina sérica. O caso *índex* (II-1) apresentou CT basal pré-operatória de 590pg/mL, e encontra-se livre da doença desde a cirurgia, com CT basal e pós-estímulo menores que <0,1pg/mL

(Tabela 7, Anexo 8). Ele apresentava um nódulo de 20mm e HCC ao anatomopatológico, o que poderia ter elevado o nível da CT, sem presença de metástase. Já a paciente II-6 apresentava CT basal pré-operatória de 533pg/mL e mostrava um nódulo de 23mm (Tabela 4). No pós-operatório sua CT normalizou, porém voltou a subir, por metástase cervical (Tabela 6).

A dosagem basal de calcitonina não apresenta boa sensibilidade para o rastreamento diagnóstico dos portadores de CMT que ainda não apresentam tumor palpável, ou para avaliação de familiares dos portadores da doença, pois sua concentração pode ser normal na fase inicial da carcinogênese, representada pela hiperplasia de células C (HCC). Nestes casos, testes que estimulam a secreção de CT podem revelar hiper-responsividade das células transformadas, possibilitando o diagnóstico (9, 47). O nível de CT pós-estímulo encontra-se abaixo de 10pg/mL em 80% dos adultos normais e praticamente em todos os indivíduos abaixo dos 20 anos de idade (48). O pico de CT mantém-se normalmente abaixo de 30pg/mL em 95% da população normal (10). Este pico pode ser devido a HCC, mas também pode ocorrer na ausência de qualquer doença das células C. Os valores máximos de CT considerados normais para este teste não devem ultrapassar 30-40pg/mL. Valores entre 40 a 100pg/mL correspondem a uma zona de incerteza em relação ao diagnóstico e, nestes casos, é indicada a repetição deste teste após um ano, ou mesmo antes, dependendo do grau de suspeita diagnóstica. Um valor após estímulo maior que 100pg/mL em qualquer momento do teste é altamente sugestivo de CMT (7, 9). Com o teste de estímulo, o paciente III-8, de 18 anos e sexo masculino (Tabela 4), apresentou níveis de CT elevados, embora dentro da zona de incerteza. Como ele pertencia a um grupo de risco para CMT, optou-se pela conduta cirúrgica, embora ele não apresentasse CMT pela PAAF, mas somente bócio colóide, o que foi confirmado pelo anatomopatológico. Já o paciente II-10 (Tabela 5) apresentava CT basal de 75pg/mL, também dentro da zona de incerteza. O teste de estímulo confirmou a existência do CMT, pois a CT elevou-se mais que 100pg/mL.

Antes da possibilidade do rastreamento genômico do *RET*, a literatura preconizava teste de estímulo da calcitonina anual em familiares de portadores de CMT. Com o rastreamento genético, os pacientes negativos para a mutação acabam sendo dispensados do seguimento. No presente estudo, os familiares que foram negativos para o teste de calcitonina continuarão a ser acompanhados com o teste

de estímulo anualmente, até que o resultado do rastreamento genético defina quais deles devem abandonar o acompanhamento.

A determinação dos níveis de CT também se presta para seguimento pós-operatório do CMT. Caracteriza-se como cura biológica da neoplasia níveis de CT basal no pós-operatório menores que 10pg/mL e que não se elevam após estímulo (9, 37, 49, 50). Os níveis pós-operatórios de calcitonina diminuem mais após a primeira cirurgia do que quando o paciente é submetido à uma outra cirurgia, provavelmente por efeito de diminuição da massa tumoral (16). O caso *índex* apresentou níveis basais e pós-estímulo abaixo daquele valor, confirmando a cura biológica. Os níveis de CT do paciente II-6 e II-10 também regrediram no pós-operatório em relação ao pré-operatório. No entanto, ambos pacientes apresentavam elevação posterior da CT, nos guiando para pesquisar metástases. O paciente II-10 manteve os níveis pós-operatórios elevados devido à metástase cervical, porém com níveis mais baixos do que os da paciente II-6, que não apresentava o foco de metástase facilmente localizável.

É muito importante que a determinação dos níveis da CT seja realizada em laboratório confiável para evitar dúvidas diagnósticas, como ocorreu com a paciente II-10, pois sempre nos apoiamos neste exame para tomada de decisão terapêutica.

## **CEA**

O nível do CEA depende, ainda, da massa total de células do CMT, independente de sua localização dentro ou fora da tireóide (16). Seus níveis têm sido relacionados ao aumento da agressividade do tumor, à recorrência e a pior prognóstico. O tamanho do tumor e metástase linfonodal também estão relacionados aos níveis do CEA, de modo nível-dependente (16). Em um estudo retrospectivo com 150 pacientes com CMT, Machens et al. (2007) (16) verificaram que os níveis de CEA elevados no pré-operatório relacionavam-se com tumores maiores e com a presença de metástases. Eles verificaram também que o CEA era mais alto antes da primeira cirurgia, quando comparado a cirurgias posteriores, o que foi evidente no nosso caso *índex* (II-1) e no sujeito II-6, nos quais os níveis do CEA caíram no pós-operatório (Tabelas 6 e 7). Porém, no caso II-10, o CEA não foi um bom marcador (Tabela 5).



O sucesso cirúrgico é maior quando o CEA é negativo antes da primeira cirurgia (16). Valores de CEA acima de 30ng/mL (eletroquimiluminescência) indicam metástase linfonodal e ipsilateral (70% dos casos), enquanto que CEA acima de 100ng/mL indicam metástase contra-lateral e à distância (90%) (16). Apesar dos níveis do CEA não serem úteis para a previsão de sobrevida (15), altos níveis de CEA no pré-operatório refletem a extensão da doença (16) e auxiliam o cirurgião a planejar a cirurgia. Níveis de CEA menores que 30ng/mL são compatíveis com doença local, podendo ser curado com tireoidectomia total mais dissecação central e bilateral dos linfonodos. Por outro lado, quando maiores do que 30ng/mL, quase que invariavelmente indicam doença sistêmica e intratável (16). Este pode ser o caso da paciente II-6, com CEA de 39ng/mL no pré-operatório, e com recidiva tumoral.

O paciente II-6 apresentou elevação do CEA paralelo ao aumento da CT, conforme é descrito pela literatura (15, 16). No entanto, o nível do CEA da paciente II-10 nunca chegou a subir, mesmo com múltiplas metástases. A paciente já sofreu 5 cirurgias, sendo duas para retirada de linfonodos acometidos (2-3 nódulos em cada cirurgia). Este dado em particular confronta, de modo não explicável, as informações de Machens et al. (2007) (16) e Barbet et al. (2005) (15) as quais os níveis de CEA relacionam-se diretamente ao número de linfonodos acometidos, ao aumento da agressividade do tumor, à recorrência e ao pior prognóstico. Por outro lado, há relatos de CMT com pouca ou nenhuma secreção de CT e CEA, onde, no entanto, a imunoistoquímica do tumor é positiva para ambos e o prognóstico é mais reservado (50-53). Este pode ser o caso do paciente II-10. No entanto, não temos sua imunoistoquímica pois a cirurgia foi realizada em outro local.

## **Seguimento e Prognóstico**

Como já referido, o acompanhamento dos indivíduos desta família tem sido problemático. Alguns não retornaram ao ambulatório para exames de controle, outros abandonaram o seguimento e outros ainda recusaram-se a participar do estudo.

Os pacientes com bócio colóide (II-8 e III-8) e o paciente com hipotireoidismo (III-8) foram dispensados do acompanhamento clínico.

Os 3 casos com CMT foram seguidos conforme a literatura especializada, que preconiza que após a tireoidectomia total com esvaziamento cervical estendido, faz-se a reposição com L-tiroxina de forma habitual, mantendo a concentração de TSH dentro dos valores normais (10, 17, 27).

No paciente II-1, realizamos a dosagem de CT e CEA após 3 meses da cirurgia. O CEA diminuiu para níveis normais e a CT estava indetectável, de forma que, conforme preconiza o protocolo de seguimento (10,17, 27) (Anexo 4), passamos a realizar o teste de estímulo da calcitonina, que também resultou em “nível indetectável”.

Pacientes com dois testes de estímulo da calcitonina negativos no pós-operatório são considerados livres da doença. Mesmo assim, recidivas podem ocorrer, e o seguimento posterior deve ser realizado com avaliações da calcitonina basal e CEA a cada 6 meses por 2 anos, e depois anualmente, pois, com doença clínica, a cura bioquímica ocorre em 75-90% dos casos sem acometimento linfonodal (1, 2, 10).

Em relação aos pacientes II-6 e II-10, o acompanhamento foi realizado com USG cervical e hepático, TC cervical, tórax e abdome, cintilografia óssea e RNM do pescoço (Anexo 3), conforme recomendado pela literatura especializada (2). Eventualmente, usamos outros exames para localizar possíveis metástases.

As metástases constituem a principal causa de morte pelo CMT. Metade dos casos já as apresenta ao diagnóstico. Geralmente são múltiplas e envolvem órgãos simultaneamente, como o fígado, pulmões e ossos. A sobrevivência após se descobrir uma metástase a distância é de 20 % em 10 anos (10). Muitas técnicas podem ser usadas para localizar metástases em pacientes com CMT, mas até o momento não existe consenso sobre o melhor método de imagem

Uma boa imagem ajuda estabelecer o estadiamento, a avaliar a progressão do tumor, o seu prognóstico e a resposta terapêutica (10, 27, 54). Giraudet et al. (2007) (55) declararam que os métodos mais eficientes para diagnóstico de metástase de CMT são o USG de pescoço, a tomografia de tórax, a RNM de fígado e ossos, e a cintilografia óssea, contrapondo-se à visão de Oudoux et al. (2007) (54) que sugerem que a tomografia é um método bom para avaliar fígado e pulmão, enquanto que a ressonância magnética avalia bem ossos. O ultrassom apresenta alta sensibilidade (96%) e baixa especificidade (83%) para avaliação do pescoço. Interessante observar que a tireóide não foi visualizada a USG do

paciente II-11, que apresentava hipotireoidismo detectado aos cinco anos de idade, sugerindo agenesia da tireóide. Não encontramos relação na literatura de agenesia tireoidiana com CMT, porém este foi um fator protetor contra a doença nesta paciente.

As metástases pulmonares são macro ou micro-nodulares e geralmente difusas em ambos os pulmões, e a tomografia é o exame mais sensível para esses casos (54, 55). Em nossos pacientes com CMT não foram encontradas metástases pulmonares à tomografia de tórax ou à radiografia dos pulmões.

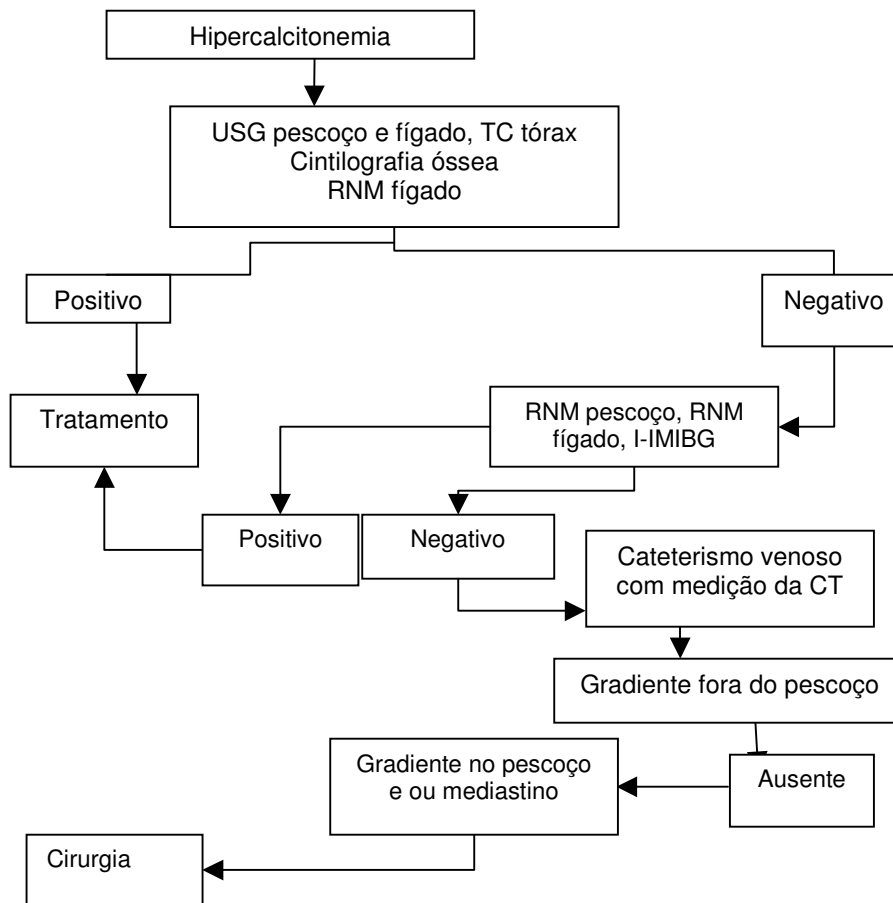
As metástases ósseas são osteolíticas ou osteoblásticas à radiografia, e à cintilografia óssea apresentam-se com aumento de captação (55). A cintilografia óssea também não detectou metástases em pacientes.

Metástases hepáticas são hiperecóicas ao ultrassom e, quando pequenas, assemelham-se a hemangiomas. O uso de TC ou RNM com contraste pode ser útil no diagnóstico diferencial (10). Rastreamos metástases hepáticas com USG e tomografia de abdome, mas não as detectamos em nossos pacientes.

Na paciente II-6 não conseguimos encontrar metástases com os exames convencionais. Somente com exame cintilográfico com o radiotraçador I<sup>131</sup>-MIBG foi possível visualizar o processo metastático em região cervical anterior, o qual não havia sido visualizado nos exames de USG, tomografia e RNM cervical. O <sup>131</sup>I-MIBG é um bom método para visualização de feocromocitomas, paragangliomas e outros tumores neuroendócrinos constituídos por células cromafins. Para o CMT pode ser usado como exame complementar, com uma sensibilidade de 30-50 %. O radiotraçador isotópico <sup>131</sup>I-MIBG tem sido proposto para uso em doses terapêuticas nestes tumores (56, 57).

Outros exames com isótopos radioativos, como o *scanning* isotópico com Tálcio<sup>201</sup>, o ácido dimercaptossuccínico Tecnécio<sup>99m</sup> e análogos de somatostatina marcados com <sup>111</sup>I, além de anticorpos monoclonais marcados contra CT ou CEA e o exame PET-FGD, têm sido estudados com resultados indefinidos (54, 55, 57, 58).

Segue abaixo o algoritmo para pesquisa de metástases em hipercalcitonemia persistente.



**Algoritmo 2:** Seguimento do CMT pós-operatório modificado, com hipercalcitoninemia persistente (adaptado de Schlumberger, 2003).

O prognóstico de um paciente com CMT depende do estágio da doença, de sua idade e sexo (59-61). Para o CMT tem sido utilizado o estadiamento TMN, realizado pelo estudo anatomopatológico dos espécimens ressecados cirurgicamente e do tumor residual (25, 59) (Tabela 9).

**Tabela 9:** Classificação TMN para o carcinoma medular da tireóide\*

**Tumor primário:**

TX: Tumor primário não pode ser avaliado

T0: Sem evidência de tumor primário

T1: Tumor com 2 cm ou menos na sua maior dimensão, limitado à tireóide

T2: Tumor com mais de 2 cm, mas não maior que 4 cm na sua maior extensão, limitado à tireóide

T3: Tumor com mais de 4 cm na sua maior extensão, limitado a tireóide , ou qualquer mínima extensão extra-tireoidiana

T4a: Tumor de qualquer tamanho que se estende além da cápsula da tireóide e invade tecido moles subcutâneos, laringe, traquéia, esôfago ou o nervo laringeo recorrente

T4b: Tumor invade fáscia pré-vertebral ou engloba a artéria carótida ou vasos mediastinais

**Linfonodo regional:**

Nx: Linfonodo regional não podem ser avaliados

N0: Ausência de metástases

N1: Metástases

N1a: Metástases para nível IV (linfonodos pré-traqueais, paratraqueais e pré-laringeos/delphianos)

N1b: Metástases em linfonodos cervicais unilaterais, bilaterais ou contralaterais

**Metástase à distância (incluindo linfonodos não-regionais):**

MX: Metástases à distância não podem ser avaliadas

M0: Ausência de metástases à distância

M1: Metástases à distância

\*Manual de Estadiamento do Câncer. American Joint Committee on Cancer (59).

A sobrevida de pacientes com CMT com 10 anos de seguimento é por volta de 65%. Aproximadamente 90% dos pacientes que apresentam diagnóstico precoce por meio de rastreamento familiar ficarão livres da doença, pois se submeterão a tratamento cirúrgico profilático (1, 2, 6, 59-61). No estágio 1, a sobrevida em 10 anos chega a 100%. No estágio 2 a sobrevida cai para 93%, no estágio 3, para 71% e no estágio 4 cai para 40% (Tabela 10).

**Tabela 10:** Estadiamento TNM e sobrevida em casos de CMT

Estádio	TNM	Sobrevida em 10 anos
I	T1N0M0	100%
II	T2N0M0	93%
III	T3N0M0 /T1-T3N1aM0	71%
IV	T1-T3N1bMo/T4M1	40%

Modificado de: Manual de Estadiamento do Câncer. American Joint Committee on Cancer (59).

A extensão tumoral é outro fator de risco independente. Os pacientes com o tumor confinado à tireóide têm uma sobrevida de 95,6% em 10 anos, enquanto os pacientes com doença estendida regionalmente têm sobrevida de 75,5%. Pacientes com metástase à distância têm prognóstico mais reservado, com sobrevida de 40% em 10 anos (37). A presença de 3 ou mais linfonodos metastáticos no momento da primeira cirurgia é o principal fator que define a recorrência (56). Neste caso, a cura pela cirurgia agressiva é possível em 20-30% destes pacientes, sendo mais difícil quando o paciente tem mais de 10 nódulos acometidos. Isto mostra claramente a importância do tratamento precoce no prognóstico dos pacientes com CMT (9, 29, 25).

A idade do paciente no momento do diagnóstico e o estágio da doença são indicadores independentes de sobrevida (10, 61). Os valores demográficos mais fortes para sobrevida são: idade abaixo de 40 anos e sexo feminino (37). A cada ano de vida adicional, o risco de mortalidade aumenta 5,2% (37). Assim, prognósticos mais reservados são para pacientes do sexo masculino, idosos (>65anos), quando a tireoidectomia é realizada em idade mais avançada, casos de tumores disseminados e após radioterapia (37, 61). Interessante notar que a radioterapia é um fator independente de pior prognóstico (30).

O CMTF aparece em idade mais tardia que a NEM 2A, com idade variando de 20 a 50 anos (14). Segundo a literatura, a idade média de aparecimento de CMT nos pacientes com mutação no códon 611 é por volta dos 44 anos de idade. Especificamente em relação à mutação cys611tyr, o tumor ocorre por volta de 43 anos (26). Em nossos pacientes, as idades ao diagnóstico foram de 53, 43 e 39 anos nos pacientes II-1, II-6 e II-10, respectivamente. Em contraste, mutações nos éxons 13 e 14 (códon 768, 790, e 804), que são regiões não-cisteínas, levam à

ativação mais fraca do gene *RET* mutado e ao aparecimento mais tardio do tumor (entre os 50 e 60 anos) (49, 26). A Tabela 11 mostra a relação entre a idade média de aparecimento do CMT e o códon acometido.

**Tabela 11:** Relação entre idade de aparecimento do CMT e o códon acometido por mutação

Códon	611	618	620	634	768	790	804
Idade mais precoce de aparecimento (anos)	42	7	34	3	47	12	60
Idade média de aparecimento do CMT (anos)	44	29	36	27	60	39	62

Adaptado de Machens et al. (2001) (26).

As diferenças entre os 3 casos com CMT acompanhados neste estudo ficam evidentes quando são comparados a estádios TNM realizados pelos exames anatomopatológicos. O caso *índex* apresentava pT1N0Mx; ele realizou tireoidectomia total com esvaziamento ganglionar, como preconizado. Seu tumor, de 2 cm, era confinado à tireóide. Com esses dados, calculamos que o paciente apresenta uma sobrevida provável de 95-100% em 10 anos.

O caso II-6, embora tenha sido submetido ao mesmo procedimento cirúrgico que o caso *índex*, apresentava nódulo não encapsulado de 2,3 cm, sendo classificado como pT2NoMx. O fato de o nódulo não ser encapsulado pode ter facilitado as metástases, como a que encontramos recentemente em sua região cervical. A sobrevida deste paciente cai para 70-90% em 10 anos.

Por fim, o caso II-10, classificado como pT3N1bMx no espécime cirúrgico, vem apresentando metástases recidivantes, tendo até sofrido cirurgias para retirada de linfonodos cervicais. Sua primeira cirurgia foi incompleta, o que, por si só já indica mau prognóstico (25, 37). Desta forma sua sobrevida diminuiu para menos que 40% em 10 anos.

## Mutações

A identificação de mutações responsáveis pelo CMT representa uma ferramenta prognóstica importante (25). De fato, a mutação no éxon 10 do proto-oncogene *RET* confere alto risco de agressividade. Manches et al. (2001)

correlacionaram os genótipos do *RET* (éxons 10, 11, 13 e 14) de 63 pacientes com CMT hereditário com a idade, sexo, estágio TNM e níveis basais de calcitonina (26). Mutações nos éxons 10, 11, 13 e 14 foram demonstradas em 22% (14/63), 54% (34/63), 21% (13/63) e 3% (2/63) respectivamente. A idade média ao diagnóstico diferiu significativamente (38, 27, 52 e 62 anos, respectivamente). Quando agrupados pelos códons de cisteína (éxon 10 e 11 versus 13 e 14), esta alteração ficou ainda mais evidente (30 versus 56 anos).

Mutações do tipo *missense* originárias na linha germinativa celular são responsáveis pelo CMT hereditário. Os éxons mais comumente afetados são 10, 11 e 16, mas, mutações nos éxons 5, 8, 14 e 15 podem ser encontradas mais raramente. Na maioria dos casos, os pacientes com NEM 2A e CMTF apresentam mutações em 5 *hot spots* codificadores dos resíduos cisteína localizados no domínio extracelular do *RET*, sendo eles os 609, 611, 618 e 620 (éxon 10) e o 634 (éxon 11) (33). Assim, a diferenciação entre NEM 2A e CMTF pode ser arbitrária, meramente refletindo a intensidade da ativação do oncogene *RET* e sua penetrância (38 62).

As mutações no CMTF apresentam distribuição mais ou menos uniforme ao longo do *RET*, ocorrendo nos códon 532, 533 (éxon 8), 609, 611, 618, 620 (éxon 10), 630, 634 (éxon 11), 768, 790, 791 (éxon 13), 840 (éxon 14), 891 (éxon 15) e 912 (éxon 16) (19). No entanto, no CMTF, apresentam discreta concentração nos códons 10 e 11, sendo mais freqüentes as mutações cys618ser (33%) e cys634tyr (30%) (32). Mutações nos códons 532, 533, 768, 844 e 912 foram identificadas somente em CMTF, enquanto que as outras também foram identificadas na síndrome NEM 2A. Além disto, enquanto somente 30% das mutações do CMTF ocorrem no códon 634, elas ocorrem em 95% dos casos de NEM 2A (19).

O paciente *index* apresenta mutação TGC→TAC (cys611try) no éxon 10. Manches et al. (2003) encontraram incidência de 3 % desta mutação no CMT hereditário (38), coincidente com a freqüência descrita por outros autores (1, 30, 63). A maior incidência desta mutação em famílias com CMTF parece ocorrer em Portugal e Espanha, sugerindo especificidade geográfica e ou étnica na prevalência de mutações do *RET* (64). Esta mutação pode ocasionar tanto CMTF quanto NEM 2A.

Existem cerca de 13 mutações descritas no códon 611 (65), a relação genótipo-fenótipo não foi bem estabelecida devido ao número pequeno de familiares



em cada descrição. Landsvater et al. (1996) foi o primeiro a descrever a mutação cys611tyr no CMT (66).

## Polimorfismos

Polimorfismos representam variações na seqüência de nucleotídeos de determinado gene que estão presentes na população geral em freqüência maior que 1%. Embora teoricamente eles não confirmem efeitos deletérios aos indivíduos que os apresentam e assim não aumentem o risco para CMT (63, 67), alguns estudos epidemiológicos moleculares e o Projeto Genoma Humano referem que algumas variações polimórficas não são totalmente inócuas (1). Neste estudo, inesperadamente, os sujeitos seqüenciados apresentaram polimorfismos G691S, L769L e S904S no éxons 11, 13 e 15, respectivamente.

Elisei et al. (2004) encontraram alta freqüência alélica (27,83%) do polimorfismo G691S em pacientes com CMT em relação ao grupo controle (18,86%). No entanto, excluíram a influência deste polimorfismo sobre a expressão do mRNA do *RET* mutado, assim como não observaram relação deste polimorfismo com os achados clínicos patológicos (63). A freqüência alélica dos polimorfismos L769L e S904S, no entanto, foram iguais à da população geral (63, 68). A ocorrência de co-segregação destes polimorfismos também foi avaliada, onde a co-segregação do L769L foi raramente associada a outro polimorfismo. Baumgartner-Prazer et al. (2005) observaram que a presença de G691S em homozigose em pacientes com predisposição ao CMT está associada ao desenvolvimento da doença 10 anos mais cedo do que em pacientes com heterozigose (68). No presente trabalho, o paciente II-1 apresentava o polimorfismo em homozigose, porém o diagnóstico da doença foi feito por volta dos 50 anos de idade, o que discorda da observação daqueles autores.

Em relação ao polimorfismo L769L, Wiench et al. (2001) descreveram este polimorfismo com maior freqüência em pacientes diagnosticados com CMT antes dos 30 anos de idade do que em pacientes com CMT diagnosticados mais tardiamente (69). Magalhães et al. (2002) (35) observaram associação deste polimorfismo com a mutação V804M no éxon 14 em uma paciente que apresentou CMT aos 32 anos, enquanto que a mãe desta paciente desenvolveu a doença somente com 60 anos de idade. A mutação V804M é de risco intermediário de

agressividade, aparecendo mais tarde nos indivíduos afetados. Estes achados sugerem que o polimorfismo L769L poderia modular a apresentação fenotípica do CMT. Baumgartner-Prazer et al. (2005) observaram associação positiva entre este polimorfismo e a mutação no códon 791 em pacientes com CMTF sugerindo que o polimorfismo L769L poderia estar atuando como modificador genético no desenvolvimento do CMT (68).

Cebrian et al. (2005) notaram que os polimorfismos S904S e G691S poderiam estar associados a aumento de probabilidade de desenvolvimento do CMT em 1,5 a 2,5 vezes (70). No entanto, a ação de qualquer um destes polimorfismos sobre o desenvolvimento de CMT ainda é uma questão em aberto (33). São necessários estudos populacionais para avaliar a importância dos polimorfismos do *RET*, assim como suas interações com as mutações que ocorrem neste proto-oncogene em casos de CMT.

Os mecanismos precisos de como os polimorfismos influenciam o desenvolvimento e ou a evolução do CMT não é conhecido. Um dos mecanismos proposto sugere que o polimorfismo poderia influenciar o RNA mensageiro do gene *RET*. No entanto, estudos quantitativos realizados por Elisei et al. (2004) não demonstraram diferença na expressão *RET* em pacientes com e sem polimorfismo. Outras hipóteses propõe que a troca de base da molécula de DNA causaria um *splicing* alternativo, levando à uma proteína alterada, ou então que um nucleotídeo modificado estaria em desequilíbrio de ligação com uma variante funcional ainda não conhecida (59). De fato, é referido que nos polimorfismos em que ocorre substituição de aminoácidos pode-se supor que uma modificação tenha um efeito cooperativo na dimerização do receptor do produto do *RET*, ou que forme um novo sítio de fosforilação no domínio tirosino-kinase (33).

**CONCLUSÃO**

Encontramos uma mutação rara (1-3%) no éxon 10 (cys611tyr) do gene *RET* que corresponde a risco 2 de agressividade pelo tumor e que ainda não havia sido descrita no Brasil em famílias com CMTF.

É interessante ressaltar que, além desta mutação, encontramos três polimorfismos em diferentes éxons do proto-oncogene *RET* em ambos os pacientes seqüenciados até o momento (G691, L769L e S904). A presença simultânea da mutação e dos três polimorfismos teoricamente pode modular a manifestação e progressão do CMT nestes pacientes, influenciando características como idade do aparecimento da neoplasia, sua agressividade local e seu potencial para desenvolvimento de metástases.

Nesta linha, é curioso também notar que, dentre os membros da família que não apresentam o CMTF, há um membro com hipotireoidismo (II-11) e dois casos com bócio colóide multinodular (II-8 e III-8), um deles com somente 18 anos de idade (III-8). Isto sugere que esta família é portadora de uma instabilidade genética relacionada ao desenvolvimento da tireóide, que deve ser mais bem estudada, e da qual o CMTF é uma das manifestações.

Os pacientes com CMT devem receber rastreamento genético para mutação do *RET* porque a probabilidade de existir um componente genético é relativamente grande e a tireoidectomia precoce é o único tratamento curativo e preventivo.

**RESUMO**

O carcinoma medular de tireóide familiar (CMTF) é uma doença autossômica dominante relacionada a mutações do proto-oncogene *RET*, que ocorre principalmente nas regiões cisteínas da proteína RET dependentes dos códons 10 e 11. Responde por 5 a 15% dos casos de CMT hereditários. Para caracterizar o CMT de natureza familiar, este deve estar presente em pelo menos 4 indivíduos de uma mesma família.

O presente trabalho objetivou o estudo clínico-genético de uma família portadora de carcinoma medular de tireóide. Esta família consiste de 25 indivíduos (13 homens e 2 mulheres) distribuídos em três gerações. Destes, seis apresentam a doença ativa: um homem da 1ª geração e dois homens e três mulheres da 2ª geração. Nenhum membro da 3ª geração desenvolveu a doença até agora.

Foram coletadas amostras de sangue periférico de 19 desses indivíduos. Nestas amostras foram realizadas amplificações dos segmentos gênicos de interesse pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e os respectivos seqüenciamentos. Até o momento, detectou-se em dois indivíduos, mutação no códon 10 (cys611tyr). Esta mutação tem uma incidência baixa (1-3%) nos casos de CMTF, mas, no entanto, implica em alto risco de agressividade do tumor. Além disso, detectou-se a presença de 3 polimorfismos (G691S, L769L, S904S), nos éxons 11, 13 e 15. Enquanto que a mutação cys611tyr está relacionada ao desenvolvimento do CMTF, sua relação com os polimorfismos encontrados e o papel desta relação com esses tumores não está esclarecida.

A realização do rastreamento genético das mutações no *RET* deve ser considerada pela sua praticidade, custo-benefício e sensibilidade e especificidade do método. Além disso, a determinação de mutações nos familiares com CMT implicará em indicação cirúrgica preventiva e aconselhamento genético familiar.

# ABSTRACT

Familial medullary thyroid carcinoma (FMTC) is an autosomic dominant disorder related to mutations in the *RET* proto-oncogene. These mutation occur mostly in the extracellular rich cistein domains of the RET protein, related to the codons 10 and 11. The FMTC represents 5-15% of hereditary medullary thyroid carcinoma (MTC). To characterize MTC of familial origin, at least four members of a family must be affected.

The present study focused upon clinical-genetics characteristics of a 25-member family (13 men and 12 women) distributed through three generations. Six of them had MTC: one first generation man, two men and three women from the second generation. Up until now, no member from the third generation has developed the disease.

We studied 19 of these individuals for mutations in the *RET* proto-oncogene. A cys611tyr mutation was found in two of the kindreds. This mutation has a low incidence (1-3%) in FMTC, but implies in high aggressiveness risk. Moreover, we found the polymorphisms G691S, L769L, S904S in the exons 11, 13 and 15, respectively. While cys611tyr mutation is responsible for cases of FMTC, its relationship to these polymorphisms and the consequences of this interrelation to tumor development is still unknown.

The screening for *RET* proto-oncogene mutations in relatives of MTC patients must be considered for its practicability, low cost, high specificity and sensibility. Besides, the determination of mutations in FMTC patients' kindred will conduct them to prophylactic surgery and familial counseling.



# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- \* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references. Bethesda: U. S. National Library of Medicine; 2003 [last updated 2003 July 09; cited 2005 June 01]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).  
National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington; 2003. 240p.

1. Magalhães PKR, Castro M, Elias LLK, Maciel LMZ. Carcinoma medular de tireóide: da definição às bases moleculares. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003; 47:515-28.
2. Schlumberg M, Pacini F. Medullary thyroid carcinoma. In: Schlumberg M, Pacini F. *Thyroid tumors.* 2nd ed. Paris: Éditions Nucleon; 2003. p.305-36.
3. Toledo APA. Toledo RA, Lourenço DM Jr. Neoplasia Endócrina Múltipla tipo1. In: Cukiert, A. ,Lieberman, B. *Neuroendocrinologia. Clínica e Cirúrgica.* São Paulo: Lemos, 2002, p 577-602.
4. Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Vecchio G, Fusco A. Minireview: RET: normal and abnormal functions. *Endocrinology.* 2004; 145:5448-51.
5. Raue F, Frank-Raue K, Grauer A. Multiple endocrine neoplasia type 2. Clinical features and screening. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1994; 3:37-56.
6. Ball DW, Baylin SB, Bustros AC. Medullary thyroid carcinoma. In: Braverman LE, Utiger RD. *Werner and Ingbar's: the thyroid: a fundamental and clinical text.* 7th ed. Philadelphia: Lippincott Raven Publishers. 1996; p.946-60.
7. LiVolsi VA. Cell hyperplasia/neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82:39-41.
8. Jackson CE, Block MA, Tashjian Jr AH. The two-mutational-event theory in medullary thyroid carcinoma. *Am J Hum Genet.* 1997; 31:704-10.
9. Hauache OM, Vieira JG, Maciel RMB. Diagnóstico laboratorial do carcinoma medular de tireóide: calcitonina basal e testes de estímulo. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003; 47: 529-33.
10. Leboullex S, Baudin E, Travagli JP, Schlumberger M. Medullary thyroid carcinoma [review]. *Endocrinology.* 2004; 61:299-310.
11. Verga H, Morpurgo PS, Vaghi I, Radetti G, Beck-Peccoz P. Normal range of calcitonin in children measured by a chemiluminescent two-site immunometric assay. *Horm Res.* 2006; 66:17-20.
12. Manual de Provas Funcionais em Endocrinologia e Metabologia. Fleury Centro de Medicina Diagnóstica. 2º ed, São Paulo, 2002, pg49-50.

13. Viégas TMRF, Gomes S, Ezabella M, Toledo SPA, Abelin NMA. Comparação dos testes de estímulo da secreção de calcitonina (omeprazol versus cálcio) no diagnóstico e seguimento dos pacientes com carcinoma medular de tireóide (CMT). *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2000; 44:173.
14. Viera AEF, Mello MP, Elias LLK, LaU IF, Maciel LMZ, Moreira AC, et al. Molecular and biochemical screening for the diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Horm Metab Res.* 2002; 34:1-5.
15. Barbet J, Champion L, Kraeber-Bodéré F, Chatal JF and GTE Study Group. Prognostic impact of serum calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling-times in patients with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:6077-6084.
16. Machens A, Ukkat J, Hauptmann S, Dralle H. Abnormal carcinoembryonic antigen levels and medullary thyroid cancer progression. *Arch Surg* 2007; 142:289-293.
17. Punales MK, Rocha AP, Gross JL, Maia AL. Carcinoma medular de tireóide: aspectos moleculares, clínico-oncológicos e terapêuticos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004; 48:137-46.
18. Guignat L, Bidart JM, Nocera M, Comoy E, Schlumberger M, Baudin E. Chromogranin A and the [alpha]-subunit of glycoprotein hormones in medullary thyroid carcinoma and pheochromocytoma. *Br J Cancer.* 2001; 84:808-12.
19. Hubner R, Houlston R. Molecular advances in medullary thyroid cancer diagnostics. *Clin Chim Acta.* 2006; 370:2-8.
20. de Groot JW, Links TP, Plukker JT, Lips CJ, Hofstra RM. RET as therapeutic target in neuroendocrine tumors. *Endocrine Reviews* 2006, 27(5):535-560.
21. Arighi E, Barrello MG, Sariola H. RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005; 16:441-67.
22. Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Lou Y, Fang M et al. GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR- $\alpha$ , a novel receptor for GDNF. *Cell.* 1996; 85:1113-1124.

23. Yoshinori K, Naoya A, Kimi K, Mayumi J, Yoshiki M, Ichihara M, et al. The RET proto-oncogene: a molecular therapeutic target in thyroid cancer. *Cancer Sci.* 2005; 96:143-8.
24. Jimenez C, Darig GT, Schultz PN, El-Naggar A, Shapiro S, Barnes EA, et al. A novel point mutation of the *RET* proto-oncogene involving the second intracellular tyrosine kinase domain in a family with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89:3521-6.
25. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, et al. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:5658-71.
26. 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; 86:1104-9.
27. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutation and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. *JAMA.* 1996; 276:1575-9.
28. Ponder BA. The phenotypes associated with RET mutations in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes. *Cancer Res.* 1999; 59:1736-42.
29. Massoll N, Mazzaferri EL. Diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma. *Clin Lab Med.* 2004; 24:49-83.
30. Machens A, Dralle H. Multiple endocrine neoplasia type 2 and the RET proto-oncogene: from bedside to bench to bedside. *Molec Cell Endocrinol.* 2006; 247:34-40.
31. Lima J, Teixeira-Gomes J, Soares P, Maximo V, Honavar M, Williams D, Sobrinho-Simoes M. Germline succinate dehydrogenase subunit D mutation segregating with familial non-RET C cell hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88:4932-7.
32. Toledo SPA, Cortina MA, Toledo RA, Lourenço DM. Impact of ret proto-oncogene analysis on the clinical management of multiple endocrine neoplasia type 2. *Clinics.* 2006; 61(1): 59-70.

33. Rocha AP, Magalhães PK, Maia AL, Maciel LM. Polimorfismos genéticos: implicações na patogenese do carcinoma medular de tireóide. *Arq Bras Endoc Metab.* 2007; 51(5): 723-730.
34. Menko FH, Van der Luit RB, De Valk IAJ, Toorians AWFT, Sepers JM, Van Diest PJ, et al. Atypical MEN type 2B associated with two germline RET mutations on the same allele not involving codon 918. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87:393-7.
35. Magalhães PKR et al. Rastreamento genético e imunoistoquímico para o proto-oncogene RET: papel no diagnóstico e manejo das formas hereditárias do carcinoma medular de tireóide *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002; 46: S95.
36. Ezabella MCL. Carcinoma medular de tireóide: análise de 62 casos em seus aspectos clínicos, evolutivos e no diagnóstico e conduta na recidiva [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1998.
37. Roman S, Lin R, Sosa JA. Prognosis of medullary thyroid carcinoma: demographic, clinical, and pathologic predictors of survival in 1252 cases. *Cancer.* 2006; 107:2134-42.
38. Machens A, Niccoli-Sire P, Hoegel J, Frank-Raue K, Van Vroonhoven TJ, Roehrer HD, et al. Early malignant progression of hereditary medullary thyroid cancer. *N Engl J Med.* 2003; 349:1517-25.
39. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *A laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
40. Hazard J, Hawk W and Crille D. Medullary (solid) carcinoma of the thyroid – a clinico-pathologic entity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1959; 19: 152-161.
41. Sipple JH. The association of pheochromocytoma with carcinoma of the thyroid gland. *Am J Med.* 1961; 31:163-166.
42. Fardon JR, Leight GS, Dilley WG, Baylin SB, Smallrigde RC, Harrison TS and Wells SA Jr. Familial medullary thyroid carcinoma without associated endocrinopathies: a distinct clinical entity. *Br J Surg.* 1986; 73:278-281.
43. Narod SA, Sobol H, Nakamura Y, Calmettes C, Baulieu JL, Bigorgne JC, Chabrier G, Couette J, de Gennes JL, Duprey J, et al. Linkage analysis of

- hereditary thyroid carcinoma with and without pheochromocytoma. *Hum Genet.* 1989 Nov;83(4):353–358.
44. Mulligan LM, Gardner E, Smith BA, Mathew CGP and Ponder BAJ. Genetic events in tumor initiation and progression in multiple endocrine neoplasia type 2. *Genes Chromosomes Cancer.* 1993; 6:166-177.
45. Pasini B, Hofstra RMW, Yin L, Bocciardi R, Santamaria G, Grootsholten PM, et al. The physical map of the human RET proto-oncogene. *Oncogene* 1995;11:1737-43
46. Plaza-Menacho I, Bursynski GM, de Groot JW, Egger BJ, Hofstra RM. Current concepts in Ret-related genetics, signaling and therapeutics. *Trends Genet.* 2006; 22(11):627-36.
47. Cohen R, Campos J, Salaun C, Heshmati HM, Kraimps J, Proye C et al. Preoperative calcitonin levels are predictive of tumor size and postoperative calcitonin normalization in medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:912-22.
48. Constante G, Meringolo D, Durante C, Bianchi D, Nocera M, Tumino S et al. Predictive value of serum calcitonin levels for preoperative diagnosis of medullary thyroid carcinoma in a cohort of 5817 consecutive patients with thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92(2): 405-455.
49. Vila JMF, Peix JL, Mandry AC, Mezzadri NA, Lifante JC. Biochemical results of reoperations for medullary thyroid carcinoma. *Laryngoscope.* 2007; 117:886-889.
50. de Groot JW, Kema IP, Breukelman H, van der Veer E, Wiggers T, Plukker JT, Wolffenbuttel BH, Links TP. Biochemical markers in the follow-up of medullary thyroid cancer. *Thyroid.* 2006; 16(11): 1163-70.
51. Bockhorn M, Rewerk S, Liedke M, Dirsch O, Schmid KW, Broelsch CE. Lack of elevated serum carcinoembryonic antigen and calcitonin in medullary thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2004; 14(6):468-470.
52. Schmid KW, Ensinger C. "Atypical" medullary thyroid carcinoma with little or no calcitonin expression. *Virchows Arch.* 1998;433:209-215.

53. Sobol RE, Memoli V, Deftos LJ. Hormone-negative, chromogranin A-positive endocrine tumors. *N Engl J Med.* 1989; 320:444-447.
54. Oudoux A, Salaun PY, Bournaud C, Campion L, Ansquer C, Rousseau C et al. Sensitivity and prognostic value of positron emission tomography with F-18-Fluorodeoxyglucose and sensitivity of immunocintigraphy in patients with medullary thyroid carcinoma treated with anticarcinoembryonic antigen-targeted radioimmunotherapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92(12):4590-4597.
55. Giraudet AL, Vanel D, Leboullex S, Aupérin A, Dromain C, Chami L et al. Imaging in medullary thyroid carcinoma with persistent elevated calcitonin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2007, 92(11):4185-4190.
56. Kaltsas GA, Besser m, Grossman AB. Advanced NET diagnosis. *Endocrine Reviews.* 2004;25(3):458-511.
57. Mukherjee JJ, Kaltsas GA, Isiam N, Plowman PN, Foley R, Hikmat J et al. Treatment of metastatic carcinoids tumors, phaeochromocytoma, paraganglioma and medullary thyroid carcinoma of the thyroid with <sup>131</sup>I-meta-iodobenzylguanidina (<sup>131</sup>I-ImIBG). *Clin Endocrinol.* 2001; 55:47-60.
58. Gourgiotis L, Sarlis NJ, Reynolds JC, Vanwaes C, Merino MJ, Pacak K. Localization of medullary thyroid carcinoma metastasis in a multiple endocrine neoplasia type 2A patient by 6-(F-18)-fluorodopamine positron emission tomography. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88:637-41.
59. Manual do Estadiamento do Câncer. American Joint committee on Câncer. Porto Alegre 6° ed. Artmed. 2004, pg 94-103.
60. DeLellis RA et al. World Health Organization Classification of tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs. Lyon 2004; pg 50-91.
61. Kebebew wt al. Outcomes of patients with medullary thyroid carcinoma. *Cancer.* 2000; 88(5):1139-1148.
62. Nicoli-Sire P, Murat A, Rohmer V, Gibelin H, Chabrier G, Conte-Devolx B et al. When should thyroidectomy be performed in familial medullary thyroid carcinoma gene carriers with non-cysteine RET mutations? *Surgery* 2003;143(6):1029-1037.

63. Elisei R, Cosci B, Romei C, Bottici V, Sculli M, Lari R, et al. RET exon 11 (G691S) polymorphism is significantly more frequent in sporadic medullary thyroid carcinoma than in general population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89:3579-84.
64. Prazeres HJ, Rodrigues F, Figueiredo P, Naidenov P, Soares P, Bugalho MJ et al. Occurrence of the Cys611Tyr mutation and a novel ARG866Trp substitution in the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 families and sporadic medullary thyroid carcinoma cases originating from the central region of Portugal. *Clin Endocrinol* 2006; 64:659-666.
65. Siggelkow H, Melzer A, Nolte W, Korester K, Hoppner W and Hufner M. Presentation of a kindred with familial medullary thyroid carcinoma and Cys611Phe mutation of the *RET* proto-oncogene demonstrating low grade of malignancy. *Eur J Endocrin.* 2001; 144: 467-473.
66. Landsvater RM, Jansen RP, Hofstra RM, Buys CH, Lips CJ and Ploos van Amstel HK. Mutation analysis of the *RET* proto-oncogene in Dutch families with MEN 2A, MEN 2B and FMTC: two novel mutations and one *de novo* mutation for MEN 2A. *Human Genetics.* 1996; 97: 11-14.
67. Wiench M, Wloch J, Wygoda Z, Gubala E, Oczko M, Pawlaczek A et al. Ret polymorphisms in codons 769 and 836 are not associated with predisposition to medullary thyroid carcinoma. *Cancer Detection and Prevention.* 2004; 28(4): 231-236.
68. Baumgartner-Parzer S, Lang R, Wagner L, Heinze G, Niederle B, Kaserer K et al. Polymorphisms in exon 13 and intron 14 of RET proto-oncogene: genetic modifiers of medullary thyroid carcinoma? *Journ Clin Endocrin Metab.* 2005; 90(11): 6232-6236
69. Wiench M et al. Estimation of risk if inherited medullary thyroid carcinoma in apparent sporadic patients. *J Clin Oncol.* 2001,19(5): 1374-90.
70. Cebrian A, Leusner F, Martin S, Leyland J, Ahmed S, Luccarini C et al. Polymorphisms in the initiators of RET (rearranged during transfection) signaling pathway and susceptibility to sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(1):6268-6274.



**ANEXOS**

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.  
CEP: 18.618-970  
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143  
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de  
abril de 1997

Botucatu, 05 de setembro de 2.005

OF. 300/2005-CEP

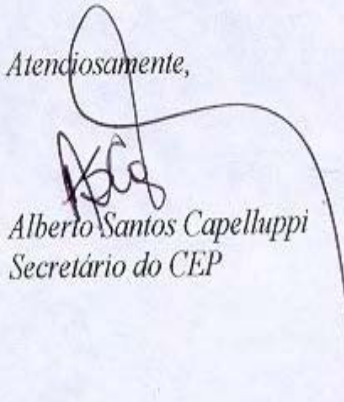
*Ilustríssima Senhora  
Prof.ª Dr.ª Célia Regina Nogueira  
Departamento de Clínica Médica  
Faculdade de Medicina de Botucatu.*

*Prezada Dr.ª Célia,*

*De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "Pesquisa de mutação do Prot-oncogene RET em família com carcinoma medular de tireóide", a ser conduzido por Bibiana Prada de Camargo Colenci, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável (cópia em anexo), aprovado em reunião de 05/09/2005.*

*Situação do Projeto: APROVADO*

*Atenciosamente,*

  
*Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP*

Data: \_\_/\_\_/\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Data de nascimento : \_\_\_\_\_

Local: \_\_\_\_\_

Idade : \_\_\_\_ História Familiar Positiva:  sim  não

Heredograma n° : \_\_\_\_\_

Já com Dx de Ca medular?  sim  não  operado?  sim- data

\_\_\_\_\_

não

metástase

pulmonar

mediastino

cervical

abdômen: \_\_\_\_\_

Dx de FEOCROMOCITOMA?  sim  não  operado?  sim -- data

\_\_\_\_\_

não

Dx de HIPERPARATIREOIDISMO?  sim  não  operado?  sim - data

\_\_\_\_\_

não

HMA

: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

DM  HAS  dislipidemia  CCC  ICO

Exame físico :

→ cabeça

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

→ neuroma mucoso  sim  não

→ hábito marfanóide  sim  não

→ pescoço  tireóide

---

linfonódos

---

outros

---

→ coração  normal  sopros \_\_\_\_\_  estase

jugular

→ pulmão  MVFDS/RA  roncos  sibilos

\_\_\_\_\_

→ abdômen  normal  hepatomegalia

\_\_\_\_\_

→ mmii  edema

\_\_\_\_\_

Data da operação : \_\_/\_\_/\_\_

Descrição do AP: n° : \_\_\_\_\_

---

---

---

---

Calcitonina pré operatória

: \_\_\_\_\_

Calcitonina basal 1 mês pos operatória : \_\_\_\_\_ → se nl → pos teste

: \_\_\_\_\_

CEA : pré operatória : \_\_\_\_\_ pos operatório ( 1mes): \_\_\_\_\_

**USG cervical**

Pré

operatório:nodulo:\_\_\_\_\_

Vol ume LD \_\_\_\_\_ volume LE \_\_\_\_\_

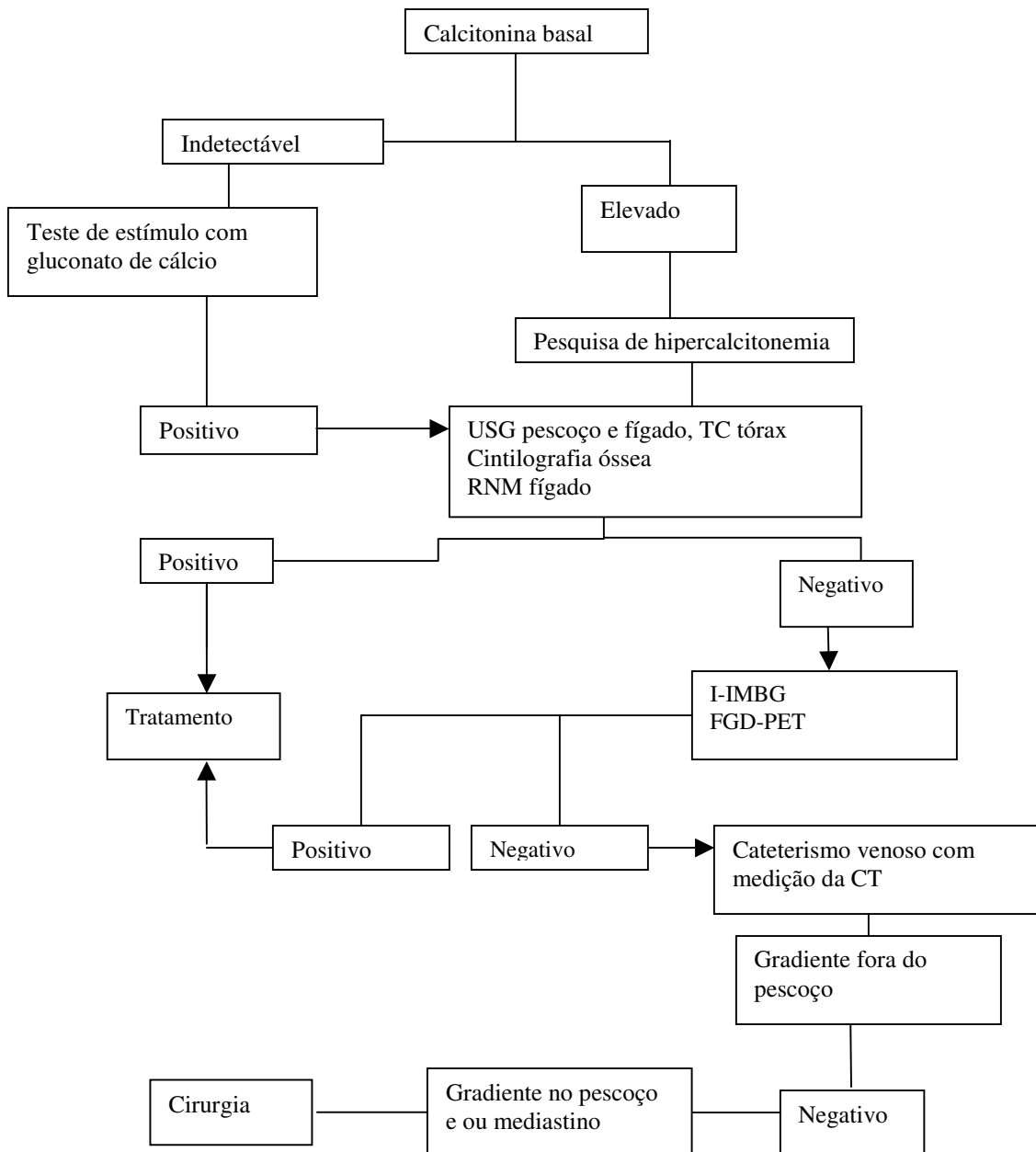
Pos operatório

:\_\_\_\_\_

**Recidiva** → **ver folha de acompanhamento de ca medular/men2**









*Primers*, Temperatura de Anelamento e  
Número de Pares de Base dos Produtos do PRC

<b>ÉXON</b>	<b>OLIGONUCLEOTIDEO</b>	<b>TEMPERATURA DE ANELAMENTO (°C)</b>	<b>NÚMERO DE PARES DE BASE DOS PRODUTOS DO PCR</b>
<b>8</b>	<b>5'- GCTGTTCCCTGTCCTTGG - 3'</b>	<b>60</b>	<b>397</b>
	<b>5'- GTATGCTGGCATCGAGAGC - 3'</b>		
<b>9</b>	<b>5'-GATCTGCCTAGGAGGTGGTG - 3'</b>	<b>60</b>	<b>308</b>
	<b>5'- ACTCTGGCTGAAGTGCCTGT - 3'</b>		
<b>10</b>	<b>5'- CCCGGCTAAGCCAAGCTGCT - 3'</b>	<b>68</b>	<b>351</b>
	<b>5'- GTTGACAGGTCTGTGGGCT - 3'</b>		
<b>11</b>	<b>5'- CCTCTGGCGGTGCCAAGCCTC -3'</b>	<b>68</b>	<b>367</b>
	<b>5'- GACAGCAGCACCGAGACGAT -3'</b>		
<b>12</b>	<b>5'- CTCTTCTCCCCCTTCCCTC -3'</b>	<b>60</b>	<b>246</b>
	<b>5'- CACTGTGCCTGTGCCTGG - 3'</b>		
<b>13</b>	<b>5'- AACTTGGGCAAGGCGATGCA - 3'</b>	<b>60</b>	<b>317</b>
	<b>5'- AGAACAGGGCTGTATGGAGC - 3'</b>		
<b>14</b>	<b>5'- CCTGGCTCCTGGAAGACC - 3'</b>	<b>60</b>	<b>361</b>
	<b>5'- CATATGCACGCACCTTCATC - 3'</b>		
<b>15</b>	<b>5'- TTCCTACAGCTCGTTCATCG - 3'</b>	<b>62,5</b>	<b>260</b>
	<b>5'- TCTTTCCTAGGCTTCCCAAG - 3'</b>		
<b>16</b>	<b>5' - CTGAAAGCTCAGGGATAGGG - 3'</b> <b>5'-TAACCTCCACCCAAGAGAG - 3'</b>	<b>60</b>	<b>230</b>

Anexo 6

Exames de imagem do sujeito II-10

Data	USG cervical	USG hepático	TC cervical	TC tórax	TC crânio	TC abdômen	Cintilografia óssea	RNM Pescoço	DMSA Pentavalente	PAAF / AP
1/2005	Sem sinais de metástase ou recidiva tumoral				Sem sinais de metástase					
5/2005	Istmo com 0,2 cm . ausência de linfonodos	Ausência cirúrgica da vesicular biliar .		Sem sinais de metástase						
9/2005					Sem sinais de metástase	Sem sinais de metástase	Negativo para metástase	Linfonodo-megalia carotídea junto às glândulas submandibulares		ESVAZIAMENTO CERVICAL 2 nódulos acometidos
01/2006				Sem sinais de metástase						Grupo de células adiposas e fibro-elásticas sem atipia
3/2006	Imagem sugestiva de linfonodo em região submandibular direita						Negativo para metástase			
07/2006	Aumento do volume das glândulas submandibulares e parótida. Ausência de linfonodomegalia		Ausência de metástase ou recidiva							
02/2007	Metástase linfonodal em cadeia II à direita e à esquerda .		Ausência de metástase ou recidiva	Sem sinais de metástase		Sem sinais de metástase	Negativo para metástase		Negativo para metástase	Compatível com CMT
03/2007	Não visualizados linfonodos							Sem sinais de metástase		
4/2007	Linfonodo nível 3 sem gordura em seu interior 1,3x0,9		Ausência de metástase ou recidiva							Linfonodo de aspecto reacional
08/2007		Sem sinais de metástase	Sem sinais de metástase	Sem sinais de metástase	Sem sinais de metástase			Sem sinais de metástase		CMT
10/07										ESVAZIAMENTO CERVICAL 3 nódulos acometidos

## Exames de imagem para seguimento do sujeito II-6

Data	USG cervical	USG hepático	Rx tórax	TC tórax	TC abdômen	TC mediastino	Cintilografia óssea	RMN pescoço	RNM mediastino	PCI com MIBG	PAAF / AP
2005	Sem evidência de metástase ou recidiva tumoral	Colelitíase	Sem evidência de metástase								
06/2006	Ausência cirúrgica da tireóide. Sem linfonodo -megalia		Sem evidência de metástase	Sem evidência de metástase							
10/2006				Sem evidência e metástase	Sem evidência de metástase	Sem sinais de recidiva tumoral	Negativa para acometimento ósseo secundário	Sem evidência de recidiva tumoral			
01/2007										Positiva para processo tumoral neuro-endócrino em região cervical anterior	
3/2007	Linfonodo 1,1x1,0 em cadeia mediastinal pré-vascular	Ausência cirúrgica da vesícula biliar			Sem evidências de metástase						
10/2007	Linfonodo 1,5x1,1 em topografia nível VI			Sem evidência de metástase	Sem evidência de metástase				Sem evidência de metástase		CMT

Exames de imagem do sujeito II-1

Data	USG cervical	USG hepático	TC tórax	TC abdômen	PCI com I <sup>131</sup>
10/2005	Sem sinais de recidiva ou metástase				Positiva pra a região cervical anterior
06/2006	Sem sinais de recidiva ou metástase		Ausência de metástase		
05/2007	Sem sinais de recidiva ou metástase	Colelitíase biliar			
08/2007	Sem sinais de recidiva ou metástase		Ausência de metástase	Sem evidências de metástase	