Flávia Lima Coutinho

**Caracterização do fenótipo e rastreamento gênico em
famílias com neoplasia endócrina múltipla tipo 2A
devido à nova dupla mutação germinativa
C634Y/Y791F no proto-oncogene *RET***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Pereira de Almeida Toledo

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Coutinho, Flávia Lima

Caracterização do fenótipo e rastreamento gênico em famílias com neoplasia endócrina múltipla tipo 2A devido à nova dupla mutação germinativa C634Y/Y791F no proto-oncogene *RET* / Flávia Lima Coutinho. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientador: Sérgio Pereira de Almeida Toledo.

Descritores: 1.Neoplasia endócrina múltipla tipo 2a 2.Dupla mutação
3.Fenótipo 4.Feocromocitoma

USP/FM/DBD-414/12

Dedicatória

A Deus, que sempre está ao meu lado e que tornou tantas coisas possíveis na minha vida.

A minha família, que me conduziu em todas conquistas, incentivando-me também neste momento.

Dedico especialmente aos meus pais, José Fernando e Maria das Graças que dignamente me apresentaram à importância da família e ao caminho da honestidade e persistência.

Aos meus irmãos, Fábio e Fernando pelo amor, carinho e amizade.

A minha avó Judith (*in memoriam*), saudades... Sei que mesmo não podendo participar deste momento, sempre me incentivou nas minhas escolhas.

Ao meu avô Francisco, exemplo de amor incondicional e fé.

A minha sobrinha, Carolina que está iniciando sua jornada pela vida, e que me traz alegria com seu sorriso.

Ao Thiago, por todo amor e paciência. Agradeço por participar comigo desta vitória e nós sabemos o quanto esta conquista exigiu algumas abdições.

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida, e por me proporcionar força e coragem para conclusão desta tese.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Pereira de Almeida Toledo, pela confiança e pelo exemplo de amor à Ciência; o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transmite sabedoria, simplicidade e eficiência.

Aos colegas Rodrigo, Tomoko e Roxane pelo apoio nos diagnósticos gênicos e por compartilhar conhecimentos de Biologia Molecular

A todos os funcionários e alunos da Unidade de Endocrinologia Genética/ LIM-25, em especial, ao Delmar, Graça, Eliete, Geni, Elisângela, Michele, Joya e Viviane pela amizade e convivência nestes vários anos.

À amiga, Michelle Patrocínio Rocha, pela amizade e por encaminhar um dos casos-índice das famílias estudadas.

À Prof. Dra Berenice Bilharinho de Mendonça, pelo inestimável apoio para a realização deste projeto.

À Dra Lois Mulligan e Simona Wagner da *Queen's University* de pela realização do estudo de análise funcional do receptor RET

A todos os pacientes, que participaram deste estudo, pela confiança e disponibilidade. Em especial, pela oportunidade e experiência única de vida que é o trabalho de campo.

À CNPQ pelo apoio financeiro.

“A persistência é o menor caminho do êxito”

(Charles Chaplin)

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro Cunha, Maria Júlia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos e dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Siglas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Classificações da NEM2	2
1.2	Retrospectiva da NEM2	5
1.3	Carcinoma medular de tireoide associado à NEM2A	6
1.4	Feocromocitoma associado à NEM2A	8
1.5	Hiperparatireoidismo relacionado à NEM2A	11
1.6	Bases moleculares da NEM2	11
1.7	Mutações <i>RET</i> e categorias de risco.....	14
1.7.1	Mutação C634Y	16
1.7.2	Mutação Y791F	17
1.7.3	Polimorfismos	19
1.7.4	Duplas mutações	20
2	OBJETIVOS	22
3	CASUÍSTICA.....	24
3.1	Casos índices	26
3.2	Familiares sob risco	33
4	MÉTODOS	44
4.1	História Familiar	45
4.2	Abordagem Clínica.....	46
4.2.1	Investigação de FEO	47
4.2.2	Investigação de CMT.....	48
4.2.3	Investigação de HPT	50

4.3	Análise de mutação do gene <i>RET</i>	51
4.3.1	Extração de DNA.....	51
4.3.2	PCR e Sequenciamento gênico.....	51
4.4	Análise de microssatélites	52
4.5	Estudo <i>in vitro</i>	53
4.5.1	Cultura de célula e transfecção	53
4.5.2	<i>Western blotting</i>	54
4.6	Estatística	54
5	RESULTADOS	55
5.1	Rastreamento genético	56
5.2	Rastreamento clínico	59
5.3	Análise de microssatélites	69
5.4	Estudo <i>in vitro</i>	69
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÕES	83
8	ANEXOS	85
9	REFERÊNCIAS	89

LISTA DE ABREVIATURAS

25-OHD	25-hidroxivitamina D
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
ATP	adenosina trifosfato
AVC	acidente vascular cerebral
CEA	antígeno carcinoembrionário
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CI	caso-índice
CLA	líquen cutâneo amiloidótico
CMT	carcinoma Medular de Tireoide
CMTF	carcinoma Medular de Tireoide Familiar
DGGE	eletroforese em gel de gradiente desnaturante
DMO	densitometria mineral óssea
Dr.	doutor
<i>et al.</i>	e outros
FEO	feocromocitoma
GDNF	fator neutrófico derivado das células gliais
GFR α	co-receptor glicosilfosfatidilinositol
HE	hematoxilina-eosina
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i>
HPT	hiperparatireoidismo
HSCR	doença de Hirschprung
ICMA	ensaio imunoquimioluminométrico
ITA	atividade de transformação <i>in vitro</i>

JNK	<i>Jun N-terminal Kinase</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MIBG	meta-iodobenzilguanidina
NEM2A	Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2A
NEM2B	Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2B
OMIN	herança mendeliana <i>online</i> no homem
PA	pressão arterial
PCR	reação em cadeia da polimerase
Prof.	professor
PTH	paratormônio
PAAF	punção aspirativa com agulha fina
Ref.	referência
<i>RET</i>	rearranged during transfection
RNM	ressonância nuclear magnética
SNP	polimorfismo de único nucleotídeo
TC	tomografia computadorizada
US	ultrassonografia
VUS	variante de significado desconhecido
VHL	Síndrome de Von-Hippel-Lindau
VMA	ácido vanilmandélico
wt	<i>wild-type</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
/	por ou de
<	menor que
=	igual
>	maior que
±	mais ou menos
+	mais
µg/mL	micrograma por mililitro
cm	centímetro
g	grama
h	hora
kg	kilograma
mg	miligrama
mg/dL	miligrama por decilitro
mmHg	milímetros de mercúrio
ng/mL	nanograma por mililitro
nl	normal
pg/mL	picograma por mililitro
vr	valor de referência
x	vezes

LISTA DE SIGLAS

CNPq	Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DPC	<i>Diagnostic Products Corporation</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LIM-25	Laboratório de Investigação Médica-25
OMS	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da NEM2, conforme as principais manifestações clínicas e suas frequências (%)	3
Tabela 2 - Subclassificação da NEM2A	4
Tabela 3 - Classificação, incidência e mutações associadas à Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 2	4
Tabela 4 - Dados comparativos referentes às mutações germinativas <i>RET</i> C634Y e Y791F * baseados na literatura	18
Tabela 5 - Duplas variantes descritas no proto-oncogene <i>RET</i>	20
Tabela 6 - Valores de catecolaminas séricas e urinárias e seus metabólitos dos casos-índices das cinco famílias com NEM2A que foram estudadas	32
Tabela 7 - Resumo do rastreamento clínico-gênico dos indivíduos afetados e que foram estudados nas cinco famílias	60
Tabela 8 - Sexo e idade média ao diagnóstico do CMT, FEO e HPT nos 27 afetados com a mutação C634Y/Y791F	60
Tabela 9 - Dados clínicos e pós-cirúrgicos de CMT nos 23 casos com NEM2A tireoidectomizados. Estadiamento de tumores malignos e os diferentes estadios do CMT (vide Métodos) ⁷¹	62
Tabela 10 - Penetrância do FEO nos pacientes com NEM2A e portadores da mutação C634Y/Y791F no gene <i>RET</i>	65
Tabela 11 - Valores médios, desvio padrão e variação das dosagens de catecolaminas séricas e urinárias em 16 pacientes com FEO/NEM2A	67
Tabela 12 - Dados clínicos e anatomopatológicos dos 16 pacientes com FEO/NEM2A associados à mutação germinativa <i>RET</i> 634/791	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do receptor tirosina quinase RET	13
Figura 2 - Representação esquemática do gene <i>RET</i> mostrando principais códons sujeitos a mutações e fenótipos correlacionados.....	15
Figura 3 - Genealogia da Família 1	34
Figura 4 - Genealogia da Família 2	37
Figura 5 - Genealogia da Família 3.....	40
Figura 6 - Genealogia da Família 4.....	41
Figura 7 - Genealogia da Família 5.....	42
Figura 8 - Esquema da localização das mutações C634Y (domínio rico em cisteína) e Y791F (domínio tirosina quinase) no proto-oncogene <i>RET</i> e sequenciamento automático mostrando a presença da dupla mutação germinativa C634Y e Y791F	58
Figura 9 - Níveis de fosforilação da tirosina do receptor RET.....	70

Resumo

Coutinho FL. *Caracterização do fenótipo e rastreamento gênico em famílias com Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 2A devido à nova dupla mutação germinativa C634Y/Y791F no proto-oncogene RET* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012. 103p.

INTRODUÇÃO: A imensa maioria dos casos com Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 2 (NEM2) é causada por uma única mutação germinativa no proto-oncogene *RET*. Entretanto, há alguns poucos casos descritos na literatura (~16) que apresentam duplas mutações/polimorfismos no gene *RET*, geralmente associados a fenótipos atípicos. **OBJETIVOS:** Os objetivos deste projeto são: a) caracterizar os aspectos clínicos de pacientes advindos de cinco famílias não relacionadas com diagnóstico de NEM2A, nas quais se documentou a presença de uma nova dupla mutação germinativa *RET* nos códons 634 e 791 e b) realizar rastreamento gênico familiar dos casos sob-risco com a finalidade de identificarmos possíveis casos com esta nova mutação. **PACIENTES:** Cinco casos-índice foram recentemente descobertos albergando a dupla mutação germinativa *RET* C634Y/Y791F. Nestas famílias há relato de 208 parentes, potencialmente, sob-risco (~50%) de serem portadores desta mutação. Dentre estes 208 indivíduos, 81 (38,9%) aceitaram participar do rastreamento gênico. **MÉTODOS:** O estudo foi realizado na Disciplina de Endocrinologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O DNA do sangue periférico dos pacientes e de seus parentes sob-risco foi obtido após a obtenção do consentimento livre e esclarecido. Após PCR, foi realizado o sequenciamento gênico direto (ABI 3130x/I Sequencer, Applied Biosystems), abrangendo todos os 20 éxons do *RET*. Foram investigados potenciais polimorfismos e mutações no *RET*. Os tumores NEM2-relacionados (carcinoma medular de tireoide, CMT; feocromocitoma, FEO; hiperparatireoidismo primário, HPT) foram estudados quanto a vários parâmetros clínicos, como: sinais/sintomas; dimensão, penetrância e agressividade dos tumores; porcentagem de remissão bioquímica do CMT, e recidiva ou persistência dos tumores. **RESULTADOS:** Dentre os 81 indivíduos que participaram do rastreamento gênico, documentamos 28 casos (34,5%) como portadores da dupla mutação *RET* C634Y/Y791F. Além disso, as mutações foram testadas *in vitro* e um gene de efeito fundador foi descartado. Observou-se que: a) os cinco casos-índice (100%) com mutação germinativa *RET* C634Y/Y791F apresentaram FEO com características tais como, tumores medindo acima de 5,0 cm, e quatro dentre os cinco casos (80%) tiveram o diagnóstico com idades inferiores a 35 anos. A frequência de FEO nos parentes adultos (a partir da terceira década) foi de 73% e eram bilaterais em 80%; b) as características do CMT nos afetados albergando a mutação *RET* 634/791 eram similares às que ocorrem em pacientes com a mutação 634 isolada. Adicionalmente, estudo *in vitro* desta dupla mutação revelou que o grau de fosforilação das células com a dupla mutação celular 634/791 era significativamente maior ($p=0,04$), quando comparada com a capacidade fosforilativa das mutações 634 e 791 avaliadas individualmente.

CONCLUSÃO: Diante dos presentes achados, conclui-se que os pacientes com esta nova dupla mutação tenderam a apresentar FEO de maior agressividade (precocidade, tumores volumosos e bilaterais), enquanto que o CMT, nestes casos, apresentava características usuais aos portadores de mutação *RET* no códon 634. A nossa hipótese é que os achados relativos ao FEO, nos presentes pacientes, foram influenciados pela presença da segunda mutação *RET* Y791F, a qual teria atuado como fator modulador do fenótipo. Esta hipótese foi suportada pelos estudos *in vitro*. Além disso, a ausência de um efeito fundador levou-nos a prever que esta dupla mutação *RET* pode não ser rara, na área geográfica estudada. Ainda que estes achados devam ser validados, os presentes dados podem ser úteis no diagnóstico genético e no manejo clínico e terapêutico dos pacientes com NEM2A.

Descritores: 1.Neoplasia endócrina múltipla tipo 2.Dupla mutação 3.Fenótipo 4.Feocromocitoma

Summary

Coutinho FL. *Phenotype characterization and genetic screening in multiple endocrine neoplasia type 2A families associated with the new double germline mutation C634Y/Y791F in the RET proto-oncogene* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012. 103p.

INTRODUCTION: The vast majority of cases with multiple endocrine neoplasia type 2A (MEN2A) is caused by a single germline mutation in the *RET* proto-oncogene. However, some instances (~16) of double germline *RET* mutations have been reported, most frequently associated with atypical phenotypes. **OBJECTIVES:** The main goals of this project were: a) to characterize the phenotype of patients from five unrelated MEN2A families harboring a new *RET* double germline in codons 634 and 791; b) perform the genetic screening in at-risk family members attempting to search for new similarly affected cases. **PATIENTS:** Five affected index-cases were recently found with this new double *RET* mutation C634Y/Y791F. In these five families, 208 first-degree relatives were reported and they were at-risk (~50%) to develop this mutation. Eighty-one individuals out of the 208 at-risk relatives (38.9%) were available and signed the informed consent. **METHODS:** The present investigation was performed at the Department of Endocrinology, School of Medicine, University of São Paulo. DNA was obtained from the peripheral blood of patients and at-risk relatives, after obtaining the informed consent of all individuals. After PCR, the direct genetic sequence was performed (ABI 3130x/l Sequencer, Applied Biosystems), involving all 20 exons of the *RET* proto-oncogene. Potential mutations and polymorphisms were investigated. In addition, the mutations were tested *in vitro* and a potential founder effect was evaluated. The MEN2A-related tumors (medullary thyroid carcinoma, MTC; pheochromocytoma, PHEO; and primary hyperparathyroidism, HPT) were approached using several clinical parameters, as: signs and symptoms; age at the diagnosis; tumor size and aggressiveness; biochemical remission of MTC; tumor relapse or persistence; **RESULTS:** Within the 81 genetically screened individuals, 28 cases (34.5%) were documented harboring the *RET* C634Y/Y791F germline mutation. It was observed that: a) the five affected index-cases (100%) were presented with PHEOs with features such as tumors measuring more than 5.0cm, and four out of the five cases (80%) had this diagnosis under the age of 35 years old. The frequency of PHEO in the adult affected relatives was also high (73%), from the third decade on, and were bilateral in 80%; b) the features and outcome of MTC in the affected C634Y/Y791F cases were similar to those MEN2A cases harboring the *RET* 634 mutation only. In addition, *in vitro* studies verified that cells with the 634/791 mutation had a significantly higher capacity of phosphorylation than cells harboring each individual mutation ($p=0.04$). Also, a founding gene was ruled out in these families. **CONCLUSION:** Our present data indicated that the earlier and more aggressive PHEOs seen in the present cases were most probably due to a phenotype modulation of the second *RET* 791 mutation. This hypothesis was supported by data from *in vitro* studies. Also, the absence of a founding

couple led us to predict that this double *RET* mutation may not be rare, in the studied geographic area. Although these findings need to be validated, the present data may be useful in the genetic diagnosis as well as in the clinical and therapeutic management of MEN2A.

Descriptors: 1. Multiple endocrine neoplasia type 2 2. Double mutation
3. Phenotype 4. Pheochromocytoma

1 INTRODUÇÃO

A neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (NEM2) é uma síndrome hereditária transmitida por herança autossômica dominante e envolve tecidos específicos, relacionados à proliferação tumoral das células derivadas da crista neural, como células C da tireoide, células cromafins da medula das suprarrenais, células principais e oxifílicas das paratireoides, gânglios simpáticos, parassimpáticos e entéricos ^(1; 2). A prevalência estimada da NEM2 é de 1:30.000 ⁽³⁾.

1.1 Classificações da NEM2

A NEM2 pode ocorrer por meio de diferentes formas clínicas (Tabela 1 e 2):

- a) NEM2A (OMIM 171400), que compreende 75% dos casos de NEM2 e é caracterizada pela associação de CMT (> 95% dos casos), FEO (~ 50 %) e hiperparatireoidismo primário (HPT; 10-30 %);
- b) NEM2B (OMIM 162300), caracteriza-se pela associação de CMT, FEO, neuromas de mucosa (lábios, língua, pálpebras e ocular), ganglioneuromatose do trato gastrointestinal e *habitus* marfanoide; nesta condição não há o envolvimento de paratireoides. É a forma mais rara e representa em torno de 5% dos casos de NEM2; e

- c) CMTF (OMIM 155240), que representa até 20% dos casos de NEM2 e se caracteriza pela presença isolada de CMT no caso-índice e em pelo menos 4 a 10 outros indivíduos de uma mesma família NEM2, havendo ausência de FEO e HPT ⁽³⁾.

Adicionalmente, existem duas variantes incomuns associadas à NEM2: líquen cutâneo amiloidótico (CLA) e doença de Hirschsprung (HSCR) ou megacólon congênito ^(1; 3; 4; 5; 6; 7). A HSCR, também conhecida como aganglionose intestinal, é caracterizada pela ausência de células ganglionares dos plexos intermusculares e submucosos, profundo e superficial, em decorrência de uma falha na migração da crista neural no intestino distal. Como consequência, ocorre severa dilatação do cólon, acompanhada por obstrução e constipação intestinal que afeta principalmente recém-nascidos. Enquanto o CLA é uma lesão cutânea liquenoide pruriginosa, usualmente localizada na região interescapular.

Tabela 1 - Classificação da NEM2, conforme as principais manifestações clínicas e suas frequências (%)

NEM2A	NEM2B	CMTF
CMT (95%)	CMT (90%)	CMT (100%) isolado em no mínimo 4 membros da mesma família
FEO (30-50%)	FEO (50%)	
HPT (10-30%)	Ganglioneuromatose (100%)	
Hábitos marfanoides (65%)		

NEM2A, neoplasia endócrina múltipla tipo 2A; NEM2B, neoplasia endócrina múltipla tipo 2B; CMTF, carcinoma medular de tireoide familiar; CMT, carcinoma medular de tireoide; FEO, feocromocitoma; HPT, hiperparatireoidismo

Tabela 2 - Subclassificação da NEM2A

NEM 2A (1)	NEM2A (2)	NEM2A (3)	Outras
CMT + FEO + HPT	CMT + FEO	CMT + HPT	CLA e HSCR

NEM2A, neoplasia endócrina múltipla tipo 2A; CMT, carcinoma medular de tireoide; FEO, feocromocitoma; HPT, hiperparatireoidismo; CLA, líquen cutâneo amiloidótico; HSCR, doença de Hirschsprung

Tabela 3 - Classificação, incidência e mutações associadas à Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 2

Fenótipo	Incidência	Mutações			Apresentação Clínica
		Exon	Códons	%	
CMT esporádico	80%		-		CMT
NEM2A	9%	10	609	<1	CMT, FEO, HPT
			611	2	
			618	3	
			620	6	
		11	634	87	
NEM2B	3%		634&640*		CMT, FEO, HPT
		13	790**		
		14	804&806		
		15	804&904		
CMTF	1%	16	883	5	CMT, FEO, Ganglioneuromas
			918	94	
		8	533*		
		10	609	4	
			611	<1	
			618	30	
			620	21	
		11	630	<1	
			634	26	
		13	768	8	
			790	<1	
			791	<1	
Outras formas	7%	14	804	3	CMT (em + de 10 membros)
		15	891	<1	

NEM2A, neoplasia endócrina múltipla tipo 2A; NEM2B, neoplasia endócrina múltipla tipo 2B; CMTF, carcinoma medular de tireoide familiar; CMT, carcinoma medular de tireoide; FEO, feocromocitoma; HPT, hiperparatireoidismo; *, mutação dupla; **, 1 família relatada

Ref. 85

1.2 Retrospectiva da NEM2

O carcinoma medular de tireoide (CMT), foi reconhecido primeiramente como entidade clínico-histológica distinta por Hazard *et al.* em 1959 ⁽⁸⁾. Os autores descreveram uma estrutura histopatológica de baixo ou intermediário grau de malignidade e a presença de depósitos de amiloide no estroma em tumores de tireoide.

Em 1961, Sipple ⁽⁹⁾ descreveu pela primeira vez a associação de CMT e feocromocitoma (FEO). No entanto, apenas Steiner *et al.*, em 1968 ⁽¹⁰⁾, reconheceu a entidade NEM2A em uma família com FEO, CMT, Hiperparatireoidismo (HPT) e doença de Cushing. A primeira descrição de Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2B (NEM2B) foi feita por Wagenmann e Froboese em 1922 ⁽¹¹⁾. Outros autores, como Williams e Pollock em 1966 ⁽¹²⁾ e Gorlin e Vickers em 1971 ⁽¹³⁾, delinearam o fenótipo completo relacionado à NEM2; em contraste à síndrome caracterizada pela associação de tumor hipofisário, HPT e tumores pancreáticos, descrita anteriormente por Werner, em 1954 ⁽¹⁴⁾, e reconhecida como Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1.

Em 2007, após reavaliação da família de uma jovem de 18 anos, originalmente descrita como a primeira descrição clássica de FEO em 1886 ⁽¹⁵⁾ na Alemanha, reconheceu-se que se tratava de um caso com NEM2A sendo, portanto, o primeiro caso de NEM2A descrito na literatura ⁽¹⁶⁾. Nesta paciente foi relatada, também, a presença de bócio.

O proto-oncogene *RET* (OMIM 164761) foi clonado em 1985 por Takahashi *et al* ⁽¹⁷⁾. Durante um experimento de transfecção de células NIH

3T3 com DNA de células T de linfoma humano, transcrição. Diante disso, os autores denominaram identificaram um gene que era ativado por um rearranjo entre 2 segmentos homólogos e não-ligados de DNA durante o processo de transfecção, resultando em uma nova unidade de o gene de *RET* (*REarranged during Transfection*). Posteriormente, dois grupos relataram evidências iniciais de que este gene encontrava-se no cromossomo 10^(18,19). E, em 1989, Ishizaka *et al.*⁽²⁰⁾, identificaram a localização do RET no cromossomo 10, q11.2.

Em 1993, dois grupos independentes identificaram pela primeira vez mutações no proto-oncogene *RET* em pacientes com NEM2A e CMT familiar (CMTF)^(21,22). Logo em seguida, foram identificadas mutações no *RET* associadas à NEM2B⁽²³⁾.

Várias outras publicações se seguiram associando diferentes mutações aos diferentes fenótipos relacionados à NEM2.

1.3 Carcinoma medular de tireoide associado à NEM2A (CMT/NEM2A)

As células C ou parafoliculares têm localização exclusivamente tireoidiana e correspondem a menos de 0,1% de toda massa celular da tireoide. Localizam-se em maiores concentrações no terço médio e superior dos lobos tireoidianos, sendo que a maior densidade de células C se encontra no eixo central dos lobos e praticamente não são encontradas no istmo⁽²⁴⁾.

O CMT é um tumor derivado destas células C parafoliculares ⁽⁸⁾ que produzem principalmente calcitonina, antígeno carcinoembrionário (CEA) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). A calcitonina é considerada o principal marcador bioquímico para diagnóstico e seguimento pós-operatório dos pacientes portadores desta neoplasia.

O CMT representa cerca de 8-10% dos carcinomas da tireoide. Cerca de 70% são esporádicos e 30% representam a forma hereditária destes tumores ^(3;6). O CMT hereditário caracteriza-se por apresentação histopatológica multicêntrica e, muitas vezes, coexistindo com hiperplasia de células C da tireoide, enquanto a forma esporádica tem apresentação focal e usualmente não apresenta a fase pré-maligna (hiperplasia de células C). O CMT na NEM2 manifesta-se em idade jovem (<30 anos), em contrapartida aos casos esporádicos que ocorrem mais tardiamente, ao redor dos 50 anos ⁽⁶⁾.

A apresentação clínica do CMT é bastante diversificada e frequentemente relaciona-se à presença nódulos tiroidianos e linfonodomegalias na região cervical, mas também, pode apresentar sintomas sugestivos de invasão local como disfagia, rouquidão e dispneia. Outros sintomas como rubor facial, diarreia e dor óssea podem estar associados à síndrome paraneoplásica.

Seu rastreamento laboratorial envolve a dosagem dos níveis basais de calcitonina ou após teste de estímulo com cálcio ou pentagastrina. O exame de imagem de eleição é a ultrassonografia de tireoide, enquanto para programação cirúrgica a TC cervical traz informações importantes ⁽³⁾. Em casos de familiares sob-risco, pertencentes a famílias caracterizadas

como NEM2, o rastreamento genético é de suma importância para o diagnóstico precoce desta neoplasia, uma vez que se trata de uma condição cujo único tratamento eficaz é o cirúrgico, desde que o CMT é resistente à quimio, rádio e iodo terapias ⁽²⁵⁾. Experimentos com drogas bloqueadoras da ação tirosinoquinase da proteína RET estão sendo atualmente testadas e apontam para uma alternativa potencialmente promissora ⁽²⁶⁾.

1.4 Feocromocitoma associado à NEM2A (FEO/NEM2A)

As glândulas adrenais são constituídas de medula e córtex originados, respectivamente, da neuroderma e mesoderma. A medula constitui a porção mais interna da glândula e é composta por células cromafins.

FEOs são tumores originários destas células cromafins que produzem, armazenam, metabolizam e secretam catecolaminas. De acordo com a classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2004, os FEOs são tumores localizados na medula adrenal enquanto, os tumores localizados nos paragânglios simpáticos e parasimpáticos extra-adrenais são denominados paragangliomas ⁽²⁷⁾. A maioria dos casos de FEO são esporádicos, no entanto, cerca de 30% dos casos são FEO familiares. Os FEOs familiares podem ocorrer isoladamente ou como parte de síndromes genéticas, tais como a NEM2 ^(28; 29).

A primeira descrição de FEO na literatura, como comentado, foi em 1886 e cerca de 120 anos depois, verificou-se que se tratava de um caso de NEM2A ⁽¹⁶⁾.

Os FEOs associados à NEM2A são diagnosticados com maior frequência entre 30 e 40 anos de idade, são usualmente intra-adrenais (97%), bilaterais (65%) e muito raramente extra-adrenais (3%) e malignos (3%) ⁽³⁰⁾. Estes tumores são geralmente reconhecidos após o diagnóstico do CMT ⁽³¹⁾.

Pacientes com mutação nos éxons 10, 11, 13 e 16 do *RET* estão especialmente propensos a apresentar FEO, que acomete cerca de 50% dos casos de NEM2A e NEM2B, porém, esta penetrância pode variar entre os portadores dos diferentes tipos de mutação *RET* ^(3; 29).

O FEO/NEM2A pode ocorrer sincronicamente (20-30%), posteriormente (40-50%) ou mesmo anteceder o CMT (30%) ⁽³⁾. O FEO deve ser ativamente pesquisado na presença de mutações germinativas *RET* nos códons: 609, 611, 618, 620, 630, 634, 790, 804, 883, 918 e 922 ⁽²⁹⁾. O tratamento é eminentemente cirúrgico e, na coexistência de FEO e CMT, a cirurgia de FEO deve preceder a do CMT, com o objetivo de evitar as crises adrenérgicas no peri ou intra-operatório do CMT.

Em pacientes sob-risco para FEO e potencialmente portadores de mutações germinativas no *RET*, o rastreamento realizado somente por meio de exames bioquímicos (catecolaminas séricas e urinárias, etc) é frequentemente insuficiente, uma vez que a possibilidade de resultados falso-negativos é maior que nos casos esporádicos ⁽³²⁾.

A acurácia dos exames laboratoriais para o diagnóstico de FEO varia de acordo com os pontos de corte utilizados e, também, do padrão secretor dos tumores, que tende a ser bastante heterogêneo ⁽³³⁾.

O tamanho do tumor também pode influenciar no padrão secretório. Pequenos tumores, em geral, secretam catecolaminas não-metabolizadas enquanto grandes tumores císticos possuem uma lenta taxa de metabolização e liberam, predominantemente, catecolaminas metabolizadas. Tumores extra-adrenais e tumores associados à síndrome de Von-Hippel-Lindau (VHL) são principalmente nor-adrenérgicos, enquanto que o FEO associado à NEM2, geralmente, apresenta um padrão adrenérgico ⁽³⁴⁾.

No diagnóstico do FEO, a dosagem das metanefrinas livre plasmáticas é o exame com maior acurácia ⁽³²⁾. Porém, na prática clínica, este exame não está disponível. Assim, a melhor forma de investigação bioquímica seria a combinação de, no mínimo, dois testes para melhorar a acurácia diagnóstica. Além disto, considerando a secreção episódica de catecolaminas por estes tumores, as dosagens devem ser feitas em, pelo menos, dois dias diferentes ⁽²⁸⁾.

O diagnóstico radiológico se faz através, principalmente, da ressonância nuclear magnética (RNM) e da tomografia computadorizada (TC) de adrenais. O tratamento efetivo é essencialmente cirúrgico. A técnica de escolha é adrenalectomia por via laparoscópica, principalmente para tumores < 5.0cm.

1.5 Hiperparatireoidismo relacionado à NEM2A (HPT/NEM2A)

O HPT primário é encontrado em aproximadamente 25-30% na NEM2A e caracteriza-se pela apresentação mais usual de hiperplasia multiglandular. Sua apresentação clínica usualmente é lenta e suave, dificultando por muitas vezes seu diagnóstico ⁽⁶⁾.

Existem evidências que apontam para ausência de HPT no seguimento de indivíduos portadores de mutação germinativa no *RET* que foram submetidos à tireoidectomia total profilática em baixa idade, fato este que poderia ser em decorrência da ausência de lesão ou eventual retirada das glândulas paratireoides durante a cirurgia ⁽⁵⁾.

O diagnóstico é estabelecido pelo achado de PTH sérico elevado ou inapropriadamente normal na presença de hipercalcemia.

1.6 Bases moleculares da NEM2

O proto-oncogene *RET* está localizado no braço longo do cromossomo 10 (10q11.2) sendo formado por 21 éxons ⁽²⁰⁾. O gene *RET*, expresso nas células derivadas da crista neural, codifica um receptor tirosina quinase, a proteína *RET*, constituída por três domínios: extracelular, transmembrana e intracelular (Figura 1 e 2) ^(1; 35). A função fisiológica da proteína *RET* é a transdução de sinais extracelulares de proliferação, crescimento, diferenciação, sobrevivência das células e apoptose celular para o

interior da célula ^(1; 19). Sua função em células normais e tumorais é mediada por uma série complexa de co-receptores e ligantes da proteína RET. Portanto, há diferentes vias de ativação do receptor RET, que podem ter impacto direto sobre o fenótipo do CMT/NEM2 ⁽³⁵⁾.

O domínio extracelular é constituído por regiões homólogas às moléculas de adesão celular das caderinas (região caderina-símile), constituindo-se em região rica em resíduos de cisteína, e é codificado pelos primeiros 11 éxons do gene.

O domínio intracelular tirosina quinase é onde estão localizados os resíduos de tirosina que irão ser fosforilados durante a ativação do RET e que estão envolvidos na ativação das vias intracelulares de sinalização ^(1; 35).

Em condições normais, o receptor RET é ativado através de um complexo formado por duas proteínas distintas: um ligante da família do Fator Neutrónico Derivado das Células Gliais (GDNF) e um co-receptor de superfície celular da família dos receptores proteicos α , co-receptor glicosilfosfatidilinositol (GFR α). Cada ligante da família do GDNF interage com maior afinidade com um co-receptor específico da família GFR α . O complexo GDNF/GFR α se liga ao receptor RET ativando-o, formando homo ou heterodímeros. Esta dimerização desencadeia a autofosforilação dos resíduos de tirosina do domínio intracelular tirosina quinase, determinando assim a transmissão do sinal (Figura 1). Consequentemente, três principais vias metabólicas são ativadas: MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*), fosfolipase C e JNK (*Jun N-terminal Kinase*) ⁽³⁶⁾.

Mutações ativadoras no *RET* levam ao crescimento neoplásico e mutações inativadoras levam a quadro do HSCR. Na condição de mutações inativadoras, ou temos deleções no gene, que levam a perdas de partes da proteína, ou stop codons que aparecem prematuramente; podem também ocorrer mutações pontuais, que levam a uma diminuição da expressão da proteína, essas mutações levam a que o RNA seja menos estável e que a proteína seja mais degradada.

Figura 1 - Representação esquemática do receptor tirosina quinase RET (A) Receptor tirosina quinase constituído por 3 domínios: extracelular, transmembrana e intracelular; e localização das mutações mais comuns encontrados em pacientes com neoplasia endócrina múltipla tipo 2. (B) Mecanismo de ativação do RET e sua dimerização através da ligação com o complexo formado pela ligação do ligante (GDNF) e seu co-receptor específico (GFR α), desencadeando diferentes vias intracelulares sinalizadoras (37)

1.7 Mutações *RET* e categorias de risco

A vasta maioria dos casos (95%) da NEM2 é causada por mutações germinativas ativadoras no proto-oncogene *RET* com predomínio nos éxons 8, 10, 11, 13, 14, 15 e 16 ^(3; 38). O *RET* codifica uma proteína, receptor tirosina quinase- RET, havendo na NEM2 uma forte correlação genótipo-fenótipo ^(4; 39) (Tabela 3; Figura 2). Tomando-se como base a correlação genótipo-fenótipo observada na NEM2, as mutações *RET* podem ser definidas em quatro categorias de risco:

Risco nível D: incluem-se aqui as mutações que ocorrem no domínio catalítico do receptor RET, tais como A883F e M918T nos éxons 15 e 16, respectivamente, que estão associadas ao NEM2B ^(3; 25; 40; 41). Estas mutações apresentam altíssima capacidade de transformação celular, > que 120 vezes mais às das células controle. Recomenda-se que indivíduos com estas mutações sejam submetidos, preventivamente, à tireoidectomia total até os 6 meses de idade ⁽³⁾.

Risco nível C: aqui se incluem as mutações que ocorrem no códon 634 do *RET*. Trata-se de mutações com alto poder neoplásico, cerca de 120 vezes mais às das células controle (em geral, células 3T3). Recomenda-se que pacientes com mutações germinativas *RET*, neste códon, sejam operados ao redor dos 3 anos; uma vez que há relatos de casos albergando a mutação C634R e que podem apresentar CMT já aos 3 anos de idade ⁽²⁵⁾.

Risco nível B: inclui mutações que ocorrem no domínio extracelular do receptor RET rico em cisteína, tais como mutações nos códons 609, 618, 620.

Estas mutações apresentam capacidade de transformação celular ao redor de 30 vezes maior que as células controle. Recomenda-se que indivíduos com estas mutações sejam submetidos, preventivamente, à tireoidectomia total ao redor dos 5 anos de idade ⁽²⁵⁾.

Risco nível A: inclui mutações ocorrendo na porção intracelular, não-cisteína no domínio tirosina quinase, tais como, as que ocorrem nos códons 790 e 804 no éxon 13 e 14, respectivamente. Estas mutações têm capacidade de transformação neoplásica aproximadamente 7 vezes acima do controle. Recomenda-se que indivíduos com estas mutações sejam submetidos, preventivamente, à tireoidectomia total até os 5-10 anos de idade ^(3; 25).

FMTC, carcinoma medular de tireoide familiar; MEN2A, neoplasia endócrina múltipla tipo 2A; MEN2B, neoplasia endócrina múltipla tipo 2B (1).

Figura 2 - Representação esquemática do gene *RET* mostrando principais códons sujeitos a mutações e fenótipos correlacionados

1.7.1 Mutação C634Y

Mutações do tipo “missense” no códon 634 do *RET* são a causa mais frequente de NEM2 ^(4; 42). Demonstrou-se que mutações neste códon, como as altamente prevalentes mutações C634R e C634Y, apresentam risco similar para tumores NEM2-relacionados ⁽⁴²⁾. Estes dados não suportam achados anteriores sugerindo que a mutação C634R estaria ligada a fenótipos NEM2 mais graves do que aqueles ligados à mutação C634Y ⁽⁴³⁾. Recentemente, Frank-Raue *et al.* (2008) ⁽⁴⁴⁾ e Qi *et al.* (2011) ⁽⁴⁵⁾ confirmaram o fato que os diferentes tipos de mutação que podem ocorrer no códon 634 do *RET* podem apresentar fenótipo bastante diversificado.

Assim, a mutação *RET* no éxon 11 - C634Y - apresenta alto risco tanto para CMT como para FEO; pode estar associada ao CMTF ou à NEM2A e, frequentemente, associa-se à CMT de comportamento bastante agressivo e de início precoce (Tabela 4).

A mutação C634Y apresenta nível C de risco para CMT; induz dimerização do tipo ligante-independente e fosforilação cruzada; em células 3T3 NIH, apresenta atividade de transformação *in vitro* (ITA) ao redor de 113 vezes mais elevada que nas células controle; responde a estímulos adicionais do ligante do RET, o GDNF; e frequentemente leva a fenótipos NEM2A relativamente homogêneos ^(3; 4; 6; 25; 29; 42; 46).

1.7.2 Mutação Y791F

Ao contrário das mutações que ocorrem no códon 634 e, também, em outros códons localizados no domínio extracelular, a mutação *RET* Y791F no éxon 13 que ocorre no domínio intracelular do receptor RET tirosina quinase apresenta as seguintes características: baixa penetrância para CMT (~15%) e FEO (~29%); está frequentemente associada à CMTF de curso moderado, início tardio e evolução prolongada; induz NEM2 de início tardio, majoritariamente após os 20 anos de idade e apresenta nível A de risco para CMT ^(42; 44; 47).

Esta é provavelmente uma das mutações com menor índice de transformação neoplásica, quando testada em células-controle, *in vitro*; não responde a estímulos do GDNF; facilita a ligação de ATP ao seu sítio de ligação; e usualmente leva a quadros clínicos altamente variáveis ^(6; 29; 44; 47; 48; 49) (Tabela 4).

Há relatos na literatura que casos com esta mutação podem se apresentar como FEO ou CMT aparentemente esporádicos; CMTF ou NEM2A ^(44; 47; 50; 51). Esta mutação foi inicialmente (1998) descrita na Alemanha e tem sido relatada principalmente na Europa Central (Alemanha, Áustria, Polônia, Tchecoslováquia), sugerindo que possa haver distribuição com preferência geográfica regional ⁽⁴⁷⁾. A primeira mutação Y791F, nos USA, foi descrita em paciente de 39 anos apresentando FEO multifocal aparentemente esporádico, associado à paraganglioma ⁽⁵⁰⁾. Portadores da mutação Y791F parecem apresentar maior propensão a tumores das células

cromafins que aqueles com mutações nos códons 790 e 804. Além disto, nos poucos casos com Y791F até agora descritos que apresentavam FEO, este tumor frequentemente precedia o CMT ^(29; 44). Os dois casos mais jovens com esta mutação tinham 15 e 18 anos, respectivamente ⁽⁵¹⁾.

Mais recentemente, Erlic *et al.* (2010) ⁽⁵²⁾ levantaram a hipótese de que esta variante genética possa ser, na realidade, um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) ou mesmo, uma variante de significado ainda desconhecido (VUS). Outras observações serão necessárias para elucidar este ponto.

Tabela 4 - Dados comparativos referentes às mutações germinativas *RET* C634Y e Y791F * baseados na literatura

	C634Y	Y791F
Éxon	11	13
Localização	Extracelular	Intracelular
Domínio	Rico em cisteína	Tirosina-quinase
Modo de ação	Dimerização independente do ligante	Auto-fosforilação
Ativação adicional de GDNF	Sim	Não
Atividade de transformação <i>in vitro</i>	113	(~ 7)
Fenótipo	NEM2A	CMTF/FEO
Nível de risco para CMT	2 (ou B)	1
Risco para CMT	Alto (~ 90 %)	Baixo (~ 20 %)
Risco para FEO	Alto (~ 50 %)	Baixo (7-13 %)
Risco para HPT	Moderado/baixo	Baixo
Caso mais jovem CMT	2-3 anos	15 anos
Caso mais jovem FEO	~ 8 anos	39 anos
Apresentação clínica	Mais homogênea	Altamente variável

*, Baseado nas referências 3; 29; 42; 44; 47; 53.

1.7.3 Polimorfismos

Adicionalmente, alguns SNPs têm sido descritos associados às mutações *RET* e sugeriu-se que estes SNPs pudessem atuar, em algumas situações, como moduladores de fenótipo na NEM2A, apesar deste assunto ainda permanecer controverso ⁽⁵⁴⁾. Assim, o polimorfismo L769L no *RET* foi descrito em associação à mutação Y791F ^(55; 51).

Nesta linha, mutações *RET* que tenham baixos valores de transformação neoplásica *in vitro* (“mutações fracas”) podem apresentar maior potencial de risco para CMT quando em homozigose, como descrito em portadores da mutação no códon 804 ^(56; 57).

No nosso meio, Nunes *et al.* (2002) ⁽⁵⁸⁾ descreveram mutação *RET* germinativa C634R, associada em *trans* ao provável *RET* SNP 648, em paciente com NEM2A e FEO produtor de ACTH ectópico, associado à síndrome de Cushing. Este fenótipo, muito raro na NEM2, foi interpretado como tendo sido resultado de uma modulação do fenótipo pelo SNP 648, possivelmente por meio de sua interação com a mutação no códon 634. Reforçando a hipótese de que a variante *RET* 648 seja realmente um SNP, dois indivíduos portadores somente da variante 648, hoje com 30-35 anos, não desenvolveram CMT, FEO ou HPT. Assim, a variante *RET* 648 tem sido interpretada com um SNP com potencial capacidade de modular o fenótipo NEM2A, neste específico paciente (58). Além disto, recentemente a variante 648 do *RET* foi estudada *in vitro* e revelou ser realmente não patogênica ⁽⁴⁹⁾.

1.7.4 Duplas mutações

Além disto, um número crescente de duplas mutações no *RET* tem sido descrito em todos os *hot-spot*, sendo que atualmente há ao redor de 16 relatos ^(59; 60; 61; 62). Ainda que o impacto de uma segunda mutação no *RET* sobre o fenótipo NEM2 seja em grande parte ainda desconhecido, duplas mutações envolvendo o códon 634 no éxon 11 foram, por exemplo, descritas associadas à apresentação não usual de FEO, sugerindo uma modulação genética sobre a medula da suprarrenal ⁽⁶³⁾.

Na tabela 5 podemos verificar algumas das duplas mutações ou mutação/SNPs recentemente anotadas por Qi *et al.* (2011) ⁽⁴⁵⁾. Estes autores, utilizando o método do estudo do sequenciamento de todo exoma, descreveram o achado do composto gênico no *RET*, p.V292M/R67H/R982C o qual pode predispor para CMTF.

Tabela 5 - Duplas variantes descritas no proto-oncogene *RET*

Ano	Mutação	Fenótipo	Origem	Referência
1999	p.C634R/A640G, <i>cis</i>	Feo produtor de calcitonina	Itália	Tessitore <i>et al.</i>
2000	p.V804M/Y806C, <i>cis</i>	NEM 2B	Japão	Miyauchi <i>et al.</i>
2000	p.V804M/R844L, <i>cis</i>	CMT-F com fenótipo leve	Alemanha	Bartsch <i>et al.</i>
2001	p.V804M/V778I, <i>cis</i>	CMT-F com espessamento nervo corneano	Espanha	Kasprzak <i>et al.</i>
2002	p.V804M/S904Y, <i>cis</i>	NEM2B atípico	Holanda	Menko <i>et al.</i>
2002	p.C634R/V648I, <i>trans</i>	Feo produtor de ACTH	Brasil	Nunes <i>et al.</i>
2005	p.C634S/A641S, <i>cis</i>	CMT (10/10), Feo (2/10), HPT (0/10)	Eslováquia	Potumajova <i>et al.</i>
2006	p.V804M/E805K, <i>cis</i>	NEM 2B clássico	Reino Unido	Lesueur <i>et al.</i>
2010	p.C634Y/Y791F, <i>cis</i>	Elevada penetrância de Feo	Brasil	Toledo <i>et al.</i>

Adaptado de referência 45

O impacto do rastreamento familiar gênico no diagnóstico e tratamento dos casos com NEM2 é enorme e de fundamental importância para clínica prática, uma vez que permite em muitas situações, o tratamento precoce e, eventualmente, a possibilidade de remissão clínica e bioquímica do CMT ^(3; 25; 64).

Neste contexto, é importante que o rastreamento de mutações no gene *RET* seja realizado mesmo em códons não frequentemente afetados, pois em cerca de 5-7% dos casos considerados inicialmente como CMT esporádicos, foi possível se encontrar mutação no gene *RET*. Além disto, em 10 a 30% de casos com FEO, inicialmente considerados como esporádicos, foram encontradas mutações germinativas não somente no *RET*, mas também, em outros genes como *VHL*, *TMEM127* e *SDHs B, D and C* ^(3; 31; 45; 65).

2 OBJETIVOS

-
1. caracterizar os aspectos clínicos de pacientes advindos de cinco famílias não relacionadas com diagnóstico de NEM2A, nas quais se documentou a presença de uma nova dupla mutação germinativa RET nos códons 634 e 791 e
 2. realizar o rastreamento gênico familiar dos casos sob-risco para identificar possíveis casos com esta nova mutação.

3 CASUÍSTICA

Desde 1990 nosso grupo de pesquisa tem realizado estudos clínicos e familiares sobre as NEMs. Em 1999, iniciamos o rastreamento dos genes *RET* e *MEN1*, utilizando técnica de rastreamento gênico, a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) ^(2; 58). A partir de 2003, iniciamos a estratégia do sequenciamento gênico direto para análise do *RET* e *MEN1* ^(64; 66; 67, 68; 69, 70). Estes estudos foram apoiados, na maioria das vezes, pelas seguintes instituições: FAPESP; CNPq; Fundação Faculdade de Medicina, via Disciplina de Endocrinologia; NEC do Brasil e Grupo Papaiz. Temos assim, estudado muitos casos com as síndromes NEM1 e NEM2 em pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), sendo este um hospital acadêmico, terciário, de referência e que atende a uma grande região geográfica ⁽⁶⁴⁾. A imensa maioria das famílias NEM2 que estudamos apresentava mutações germinativas únicas do tipo *missense* em heterozigose no *RET* ^(64; 67, 68). Porém, uma destas famílias com NEM2A encontrou-se a mutação *RET* C634R associada à nova variante *RET*, o SNP V648I ^(2, 58).

Durante o referido rastreamento, localizamos recentemente cinco casos-índice pertencentes a famílias geneticamente não relacionadas, originárias da região do Grande São Paulo (18.000.000 habitantes) e de cidades do interior do Estado de São Paulo. Nestes cinco indivíduos documentou-se a mutação dupla no *RET*, do tipo C634Y/Y791F.

Respectivamente, estas cinco famílias apresentam ancestrais de origem: portuguesa e espanhola; portuguesa e alemã; portuguesa e italiana; portuguesa e indígena; portuguesa e espanhola. Os casos-índices com NEM2A foram encaminhados ao HC-FMUSP por intermédio de hospitais secundários da rede pública do Estado de SP.

3.1 Casos índices

O diagnóstico de NEM2 foi realizado seguindo os padrões estabelecidos internacionalmente pelo Consenso sobre NEMs ⁽³⁾.

Caso índice 1 – Feminina, nos procurou aos 63 anos. Havia sido submetida à tireoidectomia parcial aos 54 anos e, na época (1999), foi diagnosticada como tendo carcinoma papilífero de tireoide variante folicular, em outro hospital. Mais tarde, através da revisão patológica (imuno-histoquímica positiva para calcitonina), concluiu-se que na realidade se tratava de um CMT. Em 2002, a paciente foi submetida à tireoidectomia total e dissecação de linfonodos cervicais devido às metástases regionais do CMT, complementada um ano após (2003) por esvaziamento ganglionar cervical extenso.

Em 2004, foi submetida à adrenalectomia unilateral esquerda também em outro hospital. O exame patológico revelou tumor de 5,0cm no maior diâmetro, encapsulado, de caráter benigno. No momento que procurou o HC-FMUSP, em 2008, foi diagnosticado do FEO contralateral, cujas dimensões pela RNM eram de 4,9 x 2,6 x 3,0cm. Apresentava valores

considerados dentro da normalidade de catecolaminas (Tabela 6), apesar de relatar episódios frequentes de palpitação, sudorese e fraqueza. Foi feita a adrenalectomia à direita, sendo que o tumor media 5,2 x 1,8 x 4,0cm, sem características de malignidade.

Durante o seguimento, apresentou alguns valores discretamente elevados de PTH associados a níveis normais de cálcio sérico. No entanto, o diagnóstico de HPT primário não se confirmou, até o momento. A paciente encontra-se assintomática no que se refere às possíveis complicações relacionadas ao HPT.

Caso índice 2 – Paciente do sexo feminino, 27 anos, com diagnóstico anterior realizado em outra instituição de FEO. O diagnóstico inicial de FEO foi confirmado no HC-FMUSP, diante dos valores elevados dos metabólitos séricos e urinários das catecolaminas (Tabela 6). A TC de abdome revelou massa tumoral adrenal bilateral tópica cujas medidas foram: 8,4cm em adrenal esquerda com componente cístico e de 4,5cm com componente cístico de 7,8cm na adrenal direita. Submetida à adrenalectomia bilateral em 2007, as dimensões do FEO eram de 4,5 x 2,9cm à direita; e 4,2cm em seu maior diâmetro à esquerda com aparente invasão local. O exame patológico mostrou presença de tumores benignos, tópicos e componentes císticos importantes.

No rastreamento de CMT, no exame físico, não se palpavam nódulos de tireoide, porém, constataram-se valores séricos elevados de calcitonina e a US de tireoide mostrou nódulo sólido à esquerda medindo 0,6 x 0,8cm.

A PAAF deste nódulo foi sugestiva de CMT. A calcitonina basal pré-cirúrgica era de 203 pg/mL (nl, <5.0 pg/mL). Foi submetida à tireoidectomia total associada ao esvaziamento ganglionar (2008) e os achados patológicos revelaram 2 nódulos no lobo direito (o maior com 0,6 cm) e um no lobo esquerdo (0,9 cm). Havia metástases do CMT para linfonodos cervicais.

HPT primário não foi verificado neste caso.

Após intervenção cirúrgica cervical, permaneceu a suspeita de metástase ganglionar cervical remanescente. Desta forma, em 2009, foi submetida à retirada de linfonodos cervicais, que não revelaram metástases. Até o presente momento, não houve normalização dos valores séricos de calcitonina; os valores oscilaram no período entre 15 e 30 pg/mL (valor normal, <2,0 pg/mL para casos submetidos à tireoidectomia total).

Caso índice 3 – Paciente do sexo feminino que aos 34 anos apresentou quadro de febre, perda de peso (14 kg) e massa axilar volumosa (11 cm), quando foi feito o diagnóstico de Linfoma de Hodgkin clássico, forma esclerose nodular do tipo 1. No mesmo período, a paciente também apresentava palpitações, sudorese e elevações de PA (140x90 mmHg) relacionadas ao esforço físico. Durante investigação, TC de abdome revelou grande massa bilateral em adrenais, com características sugestivas de FEO. A cintilografia com MIBG confirmou estes achados e documentou não haver imagens sugestivas de paragangliomas. As dosagens de epinefrina e nor-epinefrina séricas e urinárias; VMA e metanefrinas urinárias eram bastante

elevadas (Tabela 6). O FEO bilateral apresentava as medidas: 14 x 11 cm e 8 x 6 cm, respectivamente.

Relatava história familiar positiva para tumor tireoidiano. Nódulos de tireoide não eram palpáveis, no entanto a US de tireoide mostrou dois nódulos menores de 1,0 cm. A calcitonina sérica basal encontrava-se elevada (162 e 246 pg/mL; valor normal, <5,0 pg/mL para mulheres; <8,5 pg/mL, para homens; método: imunoquimioiluminescência, DPC, Los Angeles, CA).

Não referia cálculo renal ou fratura prévia. Os níveis de cálcio e PTH séricos eram repetidamente normais nesta paciente, excluindo o diagnóstico de HPT.

Após o diagnóstico de FEO e CMT, a paciente foi submetida à adrenalectomia bilateral e ressecção de linfonodos retro peritoneais aumentados. O resultado patológico revelou FEO com características benignas, com componente cístico de 2cm, e pesando 640g. As linfonodomegalias estavam relacionadas ao Linfoma de Hodgkin e não a uma eventual metástase pelo CMT. Em seguida, 25 dias após, foi submetida à tireodectomia total e esvaziamento ganglionar cervical bilateral. O resultado patológico revelou CMT multicêntrico, bilateral: 1 nódulo à direita (1,2cm) e 1 nódulo à esquerda (0,6cm). Confirmou-se que não havia acometimento dos linfonodos cervicais por metástases de CMT (0/18 linfonodos), porém havia acometimento de linfonodos cervicais pelo Linfoma de Hodgkin clássico. Biópsia de medula óssea e hepática também revelou presença de metástases do linfoma. Este caso foi a óbito aos 36 anos.

Caso índice 4 – Feminina, chegou ao hospital aos 28 anos com episódios de crises de paroxismo que duravam até 15 minutos, de evolução há dois meses. Estas crises eram bastante sugestivas de descargas adrenérgicas. A paciente era hipertensa e apresentava valores muito elevados de catecolaminas séricas e urinárias, assim como de seus metabólitos (Tabela 6). Os exames de imagem (TC e RNM) revelaram massa heterogênea unilateral em adrenal esquerda medindo 9,8 x 8,8 x 8,9 cm, deslocando o rim inferiormente e a cauda do pâncreas anteriormente, porém sem sinais de invasão destas estruturas. Não havia imagens sugestivas de linfonodomegalias, nem de paragangliomas. A US não detectou nódulo tireoidiano. Os valores de calcitonina sérica basal eram pouco elevados (16-30 pg/mL; valor normal, < 5,0 pg/mL), enquanto que a calcitonina estimulada por meio de teste de cálcio endovenoso mostrou resposta anormalmente elevada, 6-7 vezes acima dos valores normais (pico, 384 pg/mL; nl, < 40-80 pg/mL).

Realizada a adrenalectomia à esquerda aos 28 anos, documentou-se FEO benigno (score total I), medindo 9,5 x 9,0 x 8,5cm e peso de 295g. Após 5 anos da primeira adrenalectomia, houve surgimento de FEO contralateral de 1,2cm, tendo sido mais recentemente submetida à adrenalectomia direita (parcial). O exame patológico revelou FEO de 1,1 cm com comportamento biológico benigno. Aos 29 anos, foi realizada a tireoidectomia total seguida de esvaziamento ganglionar cervical bilateral. Evidenciou-se CMT multicêntrico, medindo 0,5cm em lobo direito e 0,3 cm em lobo esquerdo, e ausência de comprometimento ganglionar cervical. Simultaneamente, foram retiradas 3 paratireoides que apresentavam

características normais, sem auto-implante no antebraço. Não se evidenciou HPT neste caso.

Após 5 anos da tireoidectomia total (2010), os níveis basais e estimulados de calcitonina se encontravam indetectáveis (< 2 cm). Com estes dados, considerou-se a paciente em remissão do CMT.

Caso índice 5 – Paciente do sexo masculino, iniciou seguimento na Endocrinologia em 2006, aos 34 anos, devido a nódulo tireoidiano. Quando chegou ao HC-FMUSP, tinha história de nódulo tireoidiano diagnosticado aos 27 anos quando foi orientado a ‘seguimento radiológico periódico’. Três anos após, foi diagnosticado com hipertireoidismo tendo feito tratamento com propiltiouracil e evoluiu, após 8 meses de tratamento, para hipotireoidismo. Aos 33 anos, após realização de US de tireóide e PAAF, foi diagnosticado com “tumor maligno”, sendo submetido à tireoidectomia total e ressecção de linfonodos cervicais em outro hospital. O anátomo-patológico revelou: CMT clássico multicêntrico medindo 2,5 cm em LD e 1,5 cm em LE; sem invasão extra-tireoidiana; e sem acometimento de linfonodos nível II a V bilateral. No momento da cirurgia apresentava valores elevados de calcitonina (1530pg/mL). Após a cirurgia apresenta, até o momento, valores de calcitonina <2pg/mL, e evoluiu para hipoparatiroidismo pós cirúrgico.

Também tinha história de diagnóstico de hipertensão arterial sistêmica desde os 24 anos e crises de palpitação desde os 19 anos de idade. O diagnóstico de feocromocitoma foi feito aos 34 anos de idade pela RNM de abdome que revelou nódulo sólido medindo 2,0 cm na adrenal esquerda.

Porém o paciente nesta época optou por não se submeter ao tratamento cirúrgico. Após 2 anos, foi diagnosticado feocromocitoma contra lateral, medindo 1,7 cm. Após 1 ano deste diagnóstico foi submetido à adrenalectomia esquerda em outro hospital que revelou lesão tumoral cujas medidas eram 8,5 x 3,5 x 2,0cm.

Tabela 6 - Valores de catecolaminas séricas e urinárias e seus metabólitos dos casos-índices das cinco famílias com NEM2A que foram estudadas

	C-I 1	C-I 2	C-I 3	C-I 4	C-I 5	Valores de referência
Epinefrina sérica (pg/mL)	0		1818	1684		0 - 75
Epinefrina urinária (pg/mL)	0		328	277	40	0,5 - 20
Nor-epinefrina sérica (pg/mL)	318	29,8 #	8265	6.386		40 – 268 #(0,06-0,46)
Nor-epinefrina urinária (pg/mL)	35	958 #	1060	586	18	14 - 80 #(26-230)
Dopamina urinária (µg/mg)	334		2096		207	65 - 400
Metanefrinas urinárias (µg/mg)	0,46	73,6 #	45,2	17,4	0,10	0,05 - 1,2 #(2,10-5,00)
Ácido vanilmandelico (µg/mL)		3900	149.000	96,8*		1.100-7.100 * (<12mg)

C-I, caso-índice.

3.2 Familiares sob risco

Durante o estudo foram identificados, por intermédio das 5 genealogias, 208 familiares pertencentes às cinco famílias que se encontravam potencialmente sob-risco de apresentarem mutação no proto-oncogene *RET* (50% de chance no grupo familiar de risco).

Os familiares sob-risco que aceitaram participar do estudo, assim como os casos-índice, foram geneticamente analisados para a mutação germinativa *RET* C634Y/Y791F.

Por sua vez, os casos portadores desta mutação foram ativamente analisados clinicamente, dando-se ênfase aos tumores NEM2-relacionados. Destes indivíduos, em apenas um caso não foi possível finalizar o rastreamento para FEO e HPT.

A descrição mais detalhada do rastreamento das cinco famílias e suas respectivas genealogias está detalhada abaixo.

Figura 3 - Genealogia da Família 1

Rastreamento da família 1:

Na família1, identificamos 65 familiares potencialmente sob-risco de albergarem a mutação C634Y/Y791F. Identificamos o histórico médico de 5 familiares falecidos pertencentes a esta família:

- Caso II-1, irmão do caso-índice, óbito por infarto agudo do miocárdio (IAM) aos 64 anos; os dois filhos deste afetado não albergavam a mutação procurada (*RET* negativo).
- Caso II-2, irmã do caso-índice, com história de óbito após acidente vascular cerebral (AVC) aos 48 anos. Posteriormente, constatamos tratar-se de um caso que era portadora obrigatória da dupla mutação (*RET* positivo obrigatório), pois 2 de seus 4 filhos eram portadores desta mutação.
- Caso II-3, irmã do caso-índice com história de falecimento por “câncer de tireoide”; até o momento, não conseguimos obter informações mais detalhadas sobre esta paciente.
- Caso II-4, irmão do caso-índice que faleceu devido a “problema de pulmão”, não foi possível contatar filhos desde que a família perdeu contato com eles.
- Caso II-7, irmã que do caso-índice. Faleceu aos 46 anos de IAM, segundo informação de familiares. Obtivemos informação que a paciente tinha história de cefaleia crônica e uma “cirurgia de tireoide” aos 30 anos, sendo que os parentes informantes não sabem dizer o resultado desta cirurgia. Trata-se de um portador obrigatório da mutação dupla no gene *RET* (*RET*-positivo

obrigatório), pois recentemente em um de seus filhos documentamos a dupla mutação. Até o presente momento, 3 de seus 8 filhos foram rastreados e 2 não apresentaram a mutação enquanto que em um deles a análise de mutação foi positiva. Portanto, entre os 5 irmãos falecidos, 2 deles não apresentavam história sugestiva de NEM2, enquanto os demais 3 indivíduos apresentaram histórias compatíveis com *causa mortis* relacionada à NEM2A (2 por doença cardiovascular, provavelmente decorrente de complicações de um FEO não diagnosticado; enquanto que o outro caso apresentava história de “câncer de tireoide”, possivelmente CMT.

Até o momento, nesta família foi possível realizarmos o rastreamento gênico de 23 indivíduos, e 8 deles eram portadores da mutação C634Y/Y791F, enquanto que 15 não eram portadores da mutação. Diante destes resultados, foi possível excluirmos estes 15 familiares da avaliação clínica/gênica periódica por se tratarem de casos *RET*-negativo obrigatórios. Para complementar o rastreamento genético nesta família, 8 indivíduos devem ainda realizar o teste genético.

Figura 4 - Genealogia da Família 2

Rastreamento da família 2:

Na família 2 identificamos, inicialmente, 70 indivíduos potencialmente sob-risco. Nesta família há o registro de 7 familiares falecidos, destes:

- Caso II-1, tio de caso-índice, faleceu aos 52 anos devido a “complicações de metástases de câncer de tireoide”. Este caso não teve filhos.
- Caso II-2, tio de caso-índice, faleceu aos 49 anos em decorrência de complicações após AVC. Tinha, também, relato de uma cirurgia de adrenal prévia. Trata-se um portador obrigatório da mutação C634Y/Y791F no gene *RET* (*RET*-positivo obrigatório), pois 2 de seus 10 filhos são portadores de tal mutação.
- Caso II-4, tia de caso-índice, com histórico de falecimento aos 49 anos por infarto agudo do miocárdio e, segundo relato dos filhos, apresentava HAS de difícil controle. Três de seus 5 filhos são portadores de mutação C634Y/Y791F, portanto, também este caso era *RET*-positivo obrigatório.
- Casos II-9 e II-10, tios de caso-índice, referem-se a casos que faleceram na infância, aos 8 meses e 2 anos, respectivamente, de causa desconhecida pelos familiares.
- Casos III-5 e III-10, primos de caso-índice, faleceram em idade jovem por causas não-naturais, acidente por arma de fogo e afogamento, respectivamente. Caso III-5, teve 2 filhas, às quais se recusaram, até o momento, a realizar o rastreamento gênico. O caso III-10 não teve filhos.

Em resumo, alguns casos faleceram e, portanto, não puderam ser submetidos às análises clínica e gênica referente à NEM2A. Constatamos que 4 destes 7 casos não apresentavam história clínica sugestiva de tumores NEM2A-relacionados. No entanto, é importante notar o fato de o óbito ter ocorrido em idades jovens nestes 4 indivíduos: 8 meses, 2, 16 e 32 anos, respectivamente. Em relação aos demais 3 casos, todos tinham história sugestiva de terem apresentado tumores NEM2A-relacionados: em 2 casos a causa da morte foi relacionada à doença cardiovascular que possivelmente poderia ser decorrência de FEO/NEM2; e em um caso havia história de carcinoma de tireoide, possivelmente um CMT.

Realizamos o rastreamento de 28 indivíduos nesta família 2: 9 deles eram portadores da mutação *RET* C634Y/Y791F, enquanto os restantes 19 indivíduos não apresentaram a mutação. Diante dos resultados obtidos nestes 19 indivíduos, pudemos excluir da análise clínica/gênica periódica outros³⁴ de seus descendentes, por se tratarem de casos *RET*-negativos obrigatórios.

Figura 5 - Genealogia da Família 3

Rastreamento da família 3

A família 3 consta de 42 indivíduos sob-risco. Nesta família, além do caso-índice descrito acima, havia registro de apenas mais um óbito:

- Caso II-1, tratava-se de um tio do caso-índice falecido aos 33 anos, sem evidências, segundo familiares, de tumores NEM2A-relacionados. Tinha história apenas de alcoolismo e não teve filhos.

Rastreamos um total de 7 familiares sob-risco; dentre estes, apenas 1 caso (o pai do caso-índice) era portador da mutação C634Y/Y791F no gene *RET*. Os demais 6 indivíduos rastreados não albergavam esta mutação germinativa. Baseado nestes resultados, pudemos excluir 24 familiares da avaliação clínica/gênica, pois eram casos *RET*-negativos obrigatórios.

No momento, para complementar o rastreamento clínico-genético desta família, resta a avaliação de mais 3 parentes do caso-índice.

Figura 6 - Genealogia da Família 4

Rastreamento da família 4:

A família 4 consta de 9 indivíduos potencialmente sob-risco, dos quais pudemos avaliar genicamente 6 familiares até o presente. Entre os 6 casos avaliados para a mutação no gene RET C634Y/Y791F, encontramos 4 indivíduos portadores desta mutação e 2 não portadores. Desta família, para complementar o rastreamento gênico, restam ser analisados 3 familiares sob-risco.

Figura 7 - Genealogia da Família 5

Rastreamento da família 5:

A investigação da família 5 foi iniciada, após termos localizado um paciente com NEM2 que era portador da mutação *RET*C634Y/Y791F. Nesta família foi possível realizarmos o rastreamento gênico em 12 familiares sob-risco, além do caso-índice. Destes 12 parentes, um caso era portador desta mutação, enquanto os outros 11 não apresentavam a mutação descrita. Este caso portador é mãe do caso-índice e é filha única do primeiro

casamento de seu pai, o qual tem mais 5 filhos do segundo casamento. A análise destes 5 meio-irmãos ficou prejudicada pois não há contato entre eles, o que dificultou a localização deles. Na avaliação da história familiar, constatamos que a avó do caso-índice faleceu precocemente por doença cardiovascular. Assim, os indícios iniciais sugeriram haver um risco aumentado de a mutação *RET* ter sido herdada do ramo materno. Porém a análise gênica deste ramo familiar (9 indivíduos potencialmente sob-risco) foi negativa para a mutação C634Y/Y791F. Assim, a possibilidade de herança da mutação do ramo paterno aumentou substancialmente, porém, não foi possível a localização destes familiares.

4 MÉTODOS

Na casuística analisamos vários parâmetros, como os abaixo citados.

4.1 História Familiar

As informações relativas à história familiar dos pacientes foram obtidas confrontando os dados advindos de múltiplos membros da família, principalmente dos mais idosos, e os dados coletados foram periodicamente atualizados.

Após obter por escrito o consentimento informado de cada indivíduo ou de seu responsável legal, foi oferecido a cada um deles a possibilidade de realizar o teste genético baseado na análise de mutação do proto-oncogene *RET*. O resultado genético de cada um dos indivíduos foi fornecido por escrito aos indivíduos e/ou seus representantes legais, mantendo-se a privacidade do resultado dos testes genéticos.

Os familiares geneticamente caracterizados como não-portadores da mutação *RET* foram informados deste fato e dispensados de seguimento médico. Entretanto, foi oferecido a eles orientação quanto a eventual atendimento médico, quando necessário.

Aos familiares que foram caracterizados como portadores de mutação *RET* oferecemos o seguimento médico continuado pela Instituição, dirigido à

análise dos tumores NEM2-relacionados, seguindo-se recomendação do consórcio sobre NEMs ⁽³⁾.

Foram mantidos os parâmetros de confidencialidade quanto ao resultado dos testes genéticos, visando defender os pacientes de atos discriminatórios. A orientação genética (aconselhamento genético) foi oferecida a todos pacientes envolvidos neste estudo, no sentido de tomarem conhecimento dos possíveis riscos de recorrência da doença em suas respectivas famílias.

4.2 Abordagem Clínica

Os principais parâmetros investigados por meio da abordagem clínica foram: pesquisa de casos semelhantes na família com tumores NEM2-relacionados; sexo, idade, idade ao diagnóstico de CMT, idade ao diagnóstico de FEO; idade ao diagnóstico de HPT; idade ao diagnóstico de NEM2; sinais e sintomas compatíveis com tumores NEM2-relacionados (crises adrenérgicas, etc). Pesquisa da presença de eventuais nódulos de tireoide e de linfonodos cervicais aumentados de volume.

Foram realizadas dosagens dos valores séricos de calcitonina, PTH, cálcio, fósforo, 25-OHD e catecolaminas, além das catecolaminas urinárias.

As dimensões dos tumores foram avaliadas por intermédio de um destes métodos ou por vários deles: ultrassonografia, tomografia computadorizada (TC), ressonância nuclear magnética (RNM) e exame anatomopatológico

macroscópico dos tumores. As cintilografias de adrenais com MIBG e das paratireoides com Sestamibi auxiliaram na confirmação e localização de tumores adrenais e paratireoidianos, respectivamente. Os exames microscópicos e histopatológicos dos tumores auxiliaram na caracterização dos mesmos.

4.2.1 Investigação de FEO

Foi realizada basicamente por meio de:

- a) dosagens de metabólitos das catecolaminas séricas (nor-epinefrina, epinefrina, dopamina) e urinárias (nor-epinefrina, epinefrina, dopamina, metanefrinas e ácido vanilmandélico);
- b) TC ou RNM de abdome para adrenais;
- c) cintilografia de corpo inteiro com MIBG.

O exame patológico foi realizado por meio de H-E e imunohistoquímica com marcadores tumorais para tecidos neuroendócrinos.

Os parâmetros clínicos avaliados do FEO foram:

- a) sincronicidade;
- b) uni ou bilateralidade;
- c) uni ou multifocal;
- d) características radiológicas e patológicas benignas ou malignas;
- e) tamanho e peso dos tumores;
- f) características histo e imunopatológicas;
- g) agressividade e precocidade;
- h) índice de cura pós-cirúrgica.

4.2.2 Investigação de CMT

Foi realizada basicamente por meio de:

- a) exame clínico;
- b) dosagens séricas de calcitonina (immunoquimioiluminométrico (ICMA), Immulite; DPC, Los Angeles, CA);
- c) ultrassonografia cervical;
- d) biópsia de agulha de eventuais nódulos cervicais e estudo imunocitoquímico para calcitonina;
- e) exame patológico constou de coloração HE e imuno-histoquímica para calcitonina.

O estadiamento do CMT segundo o método TNM foi baseado na classificação do CMT, 2009.

Os parâmetros clínicos avaliados no CMT foram:

- a) sincronicidade;
- b) uni ou bilateralidade;
- c) uni ou multifocal;
- d) características pré-malignas e malignas;
- e) tamanho e peso dos tumores;
- f) características histo- e imunopatológicas;
- g) agressividade e precocidade;
- h) índice de cura pós-cirúrgica.

Estadiamento

Utilizamos classificação de 2009 para avaliar o estadiamento do CMT ⁽⁷¹⁾. Quanto ao estadiamento do CMT, temos a seguinte classificação:

- Tx: O tumor primário não pode ser avaliado.
- T0: Sem evidência de tumor primário (CMT); pode haver hiperplasia das células C.
- T1: Tumor ≤ 2 cm, limitado à tireoide.

T1a - CMT $\leq 1,0$ cm no maior diâmetro.

T1b - CMT de dimensões > 1 cm e ≤ 2 cm.

- T2: CMT > 2 cm e ≤ 4 cm no maior diâmetro.
- T3: CMT > 4 cm, em seu maior diâmetro.
- T4a: O tumor extendendo-se além da cápsula tireoidiana e invadindo qualquer das seguintes estruturas: tecido subcutâneo, laringe, traqueia, esôfago e nervo laríngeo recorrente.
- T4b: O tumor invade a fascia prevertebral ou artéria carótida ou vasos do mediastino.
- Nx: Não foi possível a avaliação de linfonodos regionais.
- N0: Sem qualquer sinal de metástases linfonodais cervicais.
- N1: Presença de metástases linfonodais cervicais.

N1a - presença de metástases em linfonodos do quadrilátero central do pescoço, ou seja, no nível VI.

N1b - metástases em outros linfonodos: unilateral, bilateral ou contralateral cervical (níveis I, II, III, IV ou V) ou retro-faríngeo ou mediastino superior.

- Mx: Não foi possível avaliação de metástases à distância
- M0: Ausência de metástases à distância.
- M1: Presença de metástases à distância.

Estadio do CMT

O estadio do CMT foi dividido nas seguintes categorias:

I - refere-se à situação de T1N0M0.

II - equivale aos estadiamentos T2 ou T3, associados à N0M0.

III - refere-se aos estadiamentos T1 a T3, associados à N1a.

IVa - referente aos estadiamentos de T1 a T3, associados a N1bM0 ou T4a associado a qualquer N e M0.

IVb - relativo ao estadiamento T4b, associados a qualquer N e M0.

IVc - qualquer T ou N, associados à metástases à distância (M0).

4.2.3 Investigação de HPT

Foi realizada por meio de:

- a) dosagens repetidas de cálcio sérico total e iônico;
- b) dosagens séricas repetidas de PTH intacto (ICMA, Immulite 2000; DPC);
- c) cintilografia de paratireoide Sestamibi;
- d) análise da densitometria mineral óssea, tentativamente abrangendo os três sítios ósseos clássicos: coluna lombar (L1-L4), coxo-femural e 1/3 proximal do rádio distal.

Os parâmetros clínicos a serem avaliados no HPT foram:

- a) Caso sintomático ou assintomático;
- b) comprometimento da massa óssea (DMO);
- c) características histopatológica das paratireoides;

4.3 Análise de mutação do gene *RET*

4.3.1 Extração de DNA

Após obter por escrito a permissão informada de todos pacientes ou seus responsáveis legais e, também, de seus parentes sob-risco, foram colhidas amostras de sangue periférico para extração de DNA. Foi usado o protocolo do método do sal; alternativamente, se utilizou o kit para extração de DNA (GFX Genomic Blood DNA kit; Amersham Bioscience, Piscataway, NJ).

4.3.2 PCR e Sequenciamento gênico

As regiões codificantes com mutações “hot-spots” do proto-oncogene RET (exons 8, 10, 11, 13, 14, 15 e 16) e suas fronteiras intrônicas foram amplificadas por PCR, usando “primers”, como previamente relatado ^(64; 67; 68; 69; 70).

As reações de sequenciamento foram realizadas diretamente com os produtos de PCR, usando os mesmos “primers” das PCRs e Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Todos os sete éxons

hot-spots foram analisados e sequenciados: a) nos sentidos senso e anti-senso; b) realizando sempre o sequenciamento de amostras em duplicata; e c) usando-se as amostras-controle disponíveis. As análises foram realizadas em sequenciador automático, multi-usuário da Disciplina de Endocrinologia, LIM-25, Unidade de Endocrinologia Genética (3130 x/l DNA Analyser, Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante. As análises dos eletroferogramas foram realizadas manualmente, com a ajuda do programa de computador (Mutation Surveyor software; Softgenetics, State College, PA).

As amostras-controle de DNA foram obtidas a partir de 200 doadores anônimos (400 cromossomos), que é um importante centro de referencia terciário. Este critério seguiu as recomendações prévias no sentido de se obter amostras-controle representativas ⁽⁵⁴⁾.

4.4 Análise de microssatélites

Com intuito de avaliar se estas 5 famílias com a dupla mutação C634Y/Y791F compartilhavam um ancestral cromossômico comum, nós analisamos os haplótipos dos indivíduos destas famílias através dos marcadores de micro satélite D10S196, D10S197, D10S537 e D10S1652 ⁽⁷⁵⁾.

4.5 Estudo *in vitro*

4.5.1 Cultura de célula e transfecção

O estudo *in vitro* foi realizado em colaboração no Instituto de Pesquisa de Câncer da *Queen's University*, Kingston, Ontario, Canada. A linhagem de célula utilizada para o estudo foi HEK293 (linhagem embrionária de rim humano) pois são fáceis de manter em cultura e transfectar, além de não apresentam o receptor endógeno RET em sua membrana, fazendo dessas células um bom modelo para estudos de RET exógeno ^(72, 73, 74). As HEK293 cresceram em meio de cultura DMEM (Invitrogen Canada, Burlington, Ontario, Canada) enriquecido com 10% de soro bovino fetal (FBS) (Sigma AldrichCo., St. Louis, MO). As células foram transitoriamente transfectadas com vetor vazio (pcDNA3), com o mesmo plasmídeo contendo a sequência não mutada (*wild-type*) de RET (wtRET) e com os plasmídeos com as mutações *RET* de interesse incorporadas, usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. As células transfectadas foram deixadas por 24 horas em 0,5% FBS-DMEM e tratadas com 50 ng/ml de fator neutrótico derivado das células gliais (GDNF) (Promega, Madison, WI) durante por 30 minutos.

4.5.2 Western blotting

Após 48 horas da transfecção, as células HEK293 transfectadas foram suspensas em tampão para lise e extração de proteínas, como previamente descrito ⁽⁷²⁾. As proteínas foram quantificadas usando o ensaio BCA, de acordo com as recomendações do fabricante (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL). Iguais quantidades de proteína total (30 µg) foram misturadas com tampão Laemmli, corridas em gel 8% SDS-PAGE transferidas para membrana nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada). A expressão do RET foi detectada usando o anticorpo C19 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), e a fosforilação foi detectada usando o anticorpo anti-fosfo-RET (Tyr905) (CellSignaling Technology, Beverly, MA). A quantificação foi determinada por densitometria usando o ImagePro-Plus software.

Os dados funcionais são amostras representativas de 3 replicadas independentes.

4.6 Estatística

Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão e valores máximo e mínimo. Os valores quantitativos de estudo in vitro foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) simples.

Os valores de $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

5.1 Rastreamento genético

Nestas 5 famílias, foram identificados 208 indivíduos potencialmente sob-risco de serem portadores da dupla mutação germinativa *RET* C634Y/Y791F (Figura 8). Dentre estes 208 indivíduos, 81 (38,9%) estavam disponíveis e aceitaram participar da coleta de amostra de sangue periférico, para análise do DNA. Dentre estes 81 indivíduos, 28 (34,5%) foram documentados como portadores da dupla mutação *RET* C634Y/Y791F, enquanto que os 53 restantes eram não-portadores.

Por intermédio da caracterização genética destes últimos 53 indivíduos não-portadores, foi possível inicialmente descartarmos a hipótese da presença da mutação em mais outros 75 de seus descendentes que se encontravam potencialmente sob-risco, totalizando 128 parentes dos pacientes, nos quais o seguimento clínico periódico para tumores NEM2-relacionados pode ser descartado, causando grande alívio psicológico e estes indivíduos.

Além disto, ao caracterizarmos quais parentes dos pacientes eram portadores desta mutação no *RET*, pudemos concluir que 4 membros já falecidos eram obrigatoriamente portadores da mutação germinativa *RET* C634Y/Y791F. Isto porque os descendentes destes 4 casos herdaram esta

mutação. Portanto, houve a possibilidade de se rastrear geneticamente, direta ou indiretamente, 151 pessoas ($28 + 53 + 75 + 4 = 160$) quanto à presença ou ausência da mutação *RET* C634Y/Y791F. Assim, 76,9% (160/208) do total dos indivíduos sob-risco nestas cinco famílias puderam ser geneticamente analisados - direta ou indiretamente - em relação a esta mutação no gene *RET* (Tabela 7). O total de indivíduos sob-risco que faleceram e não eram portadores obrigatórios foi de 8 indivíduos. Excluindo estes casos mencionados, restam ainda 49 familiares sob-risco com os quais ou não foi possível entrar-se em contato até o momento, ou se recusaram a participar do rastreamento genético

Como mencionado, houve possibilidade de se descartar a presença desta mutação germinativa no *RET* em 128 pessoas ($53 + 75 = 128$) dentre os familiares dos pacientes afetados. Isto representou 80% (128/160) do total de indivíduos rastreados direta ou indiretamente. A estas pessoas foi informado que, diante do resultado genético revelando ausência de mutação no *RET*, não haveria necessidade de seguimento clínico quanto a uma possível predisposição genética a tumores NEM2 relacionados. Entretanto, ofereceu-se a estas pessoas a possibilidade de futura orientação médica, caso se fizesse necessário.

Figura 8 - Esquema da localização das mutações C634Y (domínio rico em cisteína) e Y791F (domínio tirosina quinase) no proto-oncogene *RET* e sequenciamento automático mostrando a presença da dupla mutação germinativa C634Y e Y791F

5.2 Rastreamento clínico

No grupo englobando 28 indivíduos portadores da mutação C634Y/Y791F, somente um dos casos não pode ainda ser analisado clinicamente, pois paciente se recusou a realizar exames laboratoriais e de imagem. Assim, 27 dos 28 casos portadores desta mutação foram analisados clinicamente até o presente momento. Portanto, durante a descrição dos casos, neste item dos Resultados vamos sempre nos referir a estes 27 casos geneticamente afetados.

Os 27 casos portadores da mutação que analisados clinicamente referem-se a: cinco casos-índice e 22 de seus familiares diretos. Doze (12) pacientes eram do sexo feminino (44.5%). Ao diagnóstico de NEM2A, a idade média foi de 36.2 ± 19.05 (variação de 2 a 66 anos).

Nos casos-índices o diagnóstico de tumores NEM2-relacionados antecedeu ao diagnóstico gênico. Em relação aos familiares sob-risco, o diagnóstico ou clínico ou gênico foi inicialmente realizado após seus parentes terem sido convocados e ativamente rastreados em relação aos tumores NEM2-relacionados.

Considerando o diagnóstico dos tumores NEM2A-relacionados, a maioria dos casos (14/27: 51,8%) teve como primeiro diagnóstico o CMT, seguido por 5 casos (18,5%) com diagnóstico simultâneo de CMT e FEO. Três casos (11,1%) apresentaram FEO como diagnóstico inicial e 2 casos (7,4%) tiveram o diagnóstico simultâneo dos 3 tumores (CMT/FEO/HPT), no momento do rastreamento clínico.

Os dados clínicos relacionados à prevalência dos tumores NEM2A-relacionados e as respectivas médias de idade ao diagnóstico de cada um dos tumores, estão resumidos nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7 - Resumo do rastreamento clínico-gênico dos indivíduos afetados e que foram estudados nas cinco famílias

Família	Sob-risco + caso-índice	Rastreados (incluindo caso-índice)	RET-positivo (+RET positivo obrigatório)	RET-negativo	RET-negativo Obrigatório	CMT	FEO	HPT
1	66 (4†)	24	9 (+2†)	15	15	8	4	2
2	71(5†)	28	10 (+2†)	18	34	7	6	0
3	44 (1†)	8	2	6	25	2	2	0
4	11	8	5	3	-	5	3	0
5	16 (2†)	13	2	11	1	2	1	0
Total	208(12†)	81	28(+4†)	53	75	24/27 (88,9%)	16 /26 (61,5%)	2/26 (7,7%)

CMT, carcinoma medular de tireoide; FEO, feocromocitoma; HPT, hiperparatireoidismo; †, falecido

Tabela 8 - Sexo e idade média ao diagnóstico do CMT, FEO e HPT nos 27 afetados com a mutação C634Y/Y791F

	Média	SD	Variação
Sexo (M/F)	15/12	-	-
Idade ao diagnóstico de FEO (anos)	43,8	13,99	27 - 66
Idade ao diagnóstico de CMT (anos)	37,8	16,84	7 - 66
Idade ao diagnóstico de HPT (anos)	49,0	1,41	48 - 50

CMT, carcinoma medular de tireoide; FEO, feocromocitoma; HPT, hiperparatireoidismo; M, masculino; F, feminino; SD, desvio padrão

Carcinoma Medular de Tireóide

Vinte e quatro dos portadores da mutação *RET* (24/27; 88,9%) tiveram diagnóstico clínico de CMT.

A média de idade ao diagnóstico do CMT foi de $37,8 \pm 16.84$ anos, variando entre 7-66 anos.

Na avaliação clínica destes 24 pacientes, constatamos que 9 deles (37,5%) apresentavam sinais/sintomas clínicos sugestivos de CMT, tais como: disfagia (n=1), rouquidão (n=2), nódulos (n=4) e/ou gânglios cervicais palpáveis (n=3). Assim, 15 deles (62,5%) eram assintomáticos.

A média dos níveis séricos basais de calcitonina neste grupo de casos foi de 254.6 ± 450.74 pg/mL (variação, 5 - 1530pg/mL).

Até o presente momento, 23 destes 27 pacientes foram submetidos ao tratamento cirúrgico por meio de tireoidectomia total, a grande maioria delas associada à dissecação dos linfonodos da área cervical. Dentre os quatro casos restantes, dois casos ainda aguardam cirurgia e dois perderam o acompanhamento clínico (“drop-out”).

Três dentre os 23 casos já operados apresentavam baixa idade (4, 7 e 7 anos, respectivamente), calcitoninas séricas basais entre 12-19 pg/mL e ultrassonografia de tireoide normal. Todos foram submetidos à tireoidectomia total profilática.

Doze dentre os 23 pacientes operados (52%) estão sendo, até o momento, considerados bioquimicamente “em remissão”. O critério de “remissão bioquímica” aqui utilizado refere-se a valores de calcitoninas basais persistentemente indetectáveis (< 2 pg/mL) no período pós-cirúrgico. O tempo médio de seguimento pós-cirurgia nestes 23 casos é de 4,7 anos.

Neste grupo cirúrgico (n=23), onze (47,8%) dos casos evoluíram para hipoparatireoidismo aparentemente definitivo no período pós-cirúrgico.

Considerando-se o resultado anatomopatológico, observamos que 10/18 (55,5%) dos pacientes apresentavam CMT multicêntrico, sendo que em 10 pacientes o CMT acometia ambos os lobos tireoidianos enquanto que 9 (40,9%) deles já apresentavam metástases do CMT para os linfonodos da área cervical (Tabela 9).

Tabela 9 - Dados clínicos e pós-cirúrgicos de CMT nos 23 casos com NEM2A tireoidectomizados. Estadiamento de tumores malignos e os diferentes estadios do CMT (vide Métodos) ⁷¹

Família/ caso	Idade ao diagnóstico CMT(anos)	Multicêntrico (M)/ único (U)	Estadiamento TNM	Estadio	Remissão bioquímica	Hipoparatireoidismo pós TTx
F1-3	63 *	M	T2 NxMx	II	não	-
F1-2	16	M	Tx N1M0	III	não	não
F1-1	37	M	Tx N0 M0	I	sim	não
F1-4	56	M	T2 N1M0	II	não	não
F1-5	22	M	T1a N0 M0	I	sim	não
F1-6	21	TTx profilática (HCC)	T0 N0M0		sim	sim
F1-7	48	M	T2 N0M0	II	sim	sim
F2-8	27 *	M	T1a N1b M0	IVa	não	sim
F2-9	4	TTx profilática	T0N0M0		sim	sim
F2-10	28	M	T1b N1b M1	IVc	não	não
F2-11	27	M	T1b N1b M0	IVa	não	sim
F2-12	7	U	T1a N0 M0	I	sim	sim
F2-13	61	M	T2 N1b M1	IVc	não	não
F2-14	42	M	T1a N0M0	I	sim	não
F2-15	34	U	T1a N1a M0	III	sim	não
F2-16	7	TTx profilática	T0N0M0		sim	não
F3-17	35 *	M	T1b N0M0	I	óbito	não
F4-18	29 *	M	T1a N0M0	I	sim	sim
F4-19	61	M	T2 NxMx	II?	não	sim
F4-20	19	U	T1a N0M0	I	sim	sim
F4-21	33	M	Tx N1a Mx	III?	não	sim
F5-22	62 *	U#	T1a N1a M0	III	não	sim
F5-23	33	M	T2 N0 M0	II	sim	não

*, caso-índice; HCC, hiperplasia de célula C; # tireoidectomia parcial em 1961 e total + esvaziamento cervical, em 2007

Estadiamento

Sumarizando, três casos apresentaram estadiamento T0N0M0 e idades de 4, 7, e 21 anos (média, 10,7 anos); nove (39,1%) deles se encontravam em T1 a T3 associados a N0M0 e tinham idades variando entre sete e 48 anos (média, 28,9 anos); oito deles (34,8%) se apresentaram em T1 a T3 associados à N1a ou N1b (média, 36 anos); três (13%) estavam em T2 e N1a/N1b e M0 (idade média, 45,7 anos); e dois (8,7%) com metástases à distância (média de idade, 44,5 anos). Alguns casos não tinham dados suficientes para se caracterizar a presença ou ausência de metástases em linfonodos cervicais ou à distância (Tabela 9).

Os casos-índice tinham idades variando entre 27 e 62 anos (média, 38 anos) e apresentavam-se em estadios variáveis.

Hiperparatireoidismo primário

Dentre os 26 casos avaliados clinicamente para o diagnóstico de HPT, 2 deles (7,7%) tiveram diagnóstico de HPT primário.

Nestes 2 casos, os níveis séricos de PTH variaram entre 111–115 mg/dL ($113 \pm 2,89$ mg/dL; NL, 16- 87 pg/ml). Os níveis séricos do cálcio total variaram entre 10.2–10.7 mg/dL ($10,9 \pm 0,71$ mg/dL; NL, 8.6-10.2 mg/dl). Os valores de 25-hidroxivitamina D (25-OHD) oscilaram entre 16,6 – 21,5 ng/mL ($19,1 \pm 3,46$ ng/mL NL, 30-100 ng/mL). Os valores do fósforo sérico foram 3.6 ± 1.04 mg/dL (2.9–4.8 mg/dL; 2,7- 4,5). Estes 2 pacientes com HPT apresentavam níveis de magnésio sérico dentro dos limites da normalidade. O comprometimento mineral ósseo nestes casos era leve quando analisado por intermédio da

avaliação da densidade mineral óssea (DMO), sendo que um caso apresentava osteopenia em coluna lombar (L1-L4) e colo do fêmur. Não foi possível obtermos a análise da DMO do antebraço. Destes 2 pacientes, 1 foi submetido à paratireoidectomia total seguida por auto-implante em músculo braquiorradial do antebraço não dominante. O anátomo patológico revelou hiperplasia de paratireóide inferior esquerda e demais glândulas normais. Este paciente evoluiu para hipoparatireoidismo pós cirúrgico definitivo. O outro caso com diagnóstico de HPT, até o momento, aguarda procedimento cirúrgico.

Feocromocitoma

Nos presentes pacientes, a análise do FEO foi motivo de particular interesse.

Idade ao diagnóstico e apresentação clínica

Dezesseis de 26 pacientes com NEM2A (61.5%) tiveram diagnóstico clínico de FEO. A média de idade ao diagnóstico foi de 43.8 ± 13.99 anos, variando entre 27-66 anos. Considerando-se somente os 5 casos-índice, a média de idade ao diagnóstico do FEO era de $34 \pm 12,6$ anos (27-58). Já entre os familiares afetados, a idade média ao diagnóstico foi $48 \pm 13,7$ anos (27-66 anos).

Na avaliação clínica dos 16 casos com FEO/MEN2A constatamos que 10 deles (62,5%) apresentavam sinais/sintomas clínicos compatíveis com FEO, sendo que os sintomas mais comuns eram: palpitação, cefaleia, sudorese e tonturas. Todos os 16 afetados tinham história e/ou confirmação

clínica de elevações de pressão arterial sistêmica, seja de caráter permanente ou em forma de picos hipertensivos. A idade média de início de sintomas era $33 \pm 16,9$ (12-70 anos).

Considerando os 26 casos com NEM2A por suas respectivas idades cronológicas e a idade ao diagnóstico de FEO e distribuindo-os por décadas de vida, observamos que durante a primeira e a segunda década de vida (0-20 anos) nenhum paciente (0/4) teve diagnóstico de FEO. Durante a terceira década (21-30 anos), 4 de 8 (50%) pacientes manifestaram o tumor adrenal. Esta prevalência foi de 3 em 4 casos (75%) na quarta década; de 4 em 4 (100%) na quinta e de 2 em 2 casos (100%) na sexta década; e de 3 em 4 (75%) nas idades acima de 60 anos (Tabela 10). Se considerarmos a idade de início de sintomas sugestivos de FEO, observamos que a penetrância de FEO é de 43% (3 de 7 casos) antes dos 20 anos de idade.

A penetrância do FEO nos presentes casos foi avaliada. Assim, podemos resumir que 16 de 22 pacientes a partir da terceira década de vida, ou seja, 72,7%% dos pacientes avaliados para este tumor tiveram diagnóstico de FEO, até o presente momento. Neste grupo, a maioria dos casos com FEO (11/16, = 68,75%) teve o reconhecimento da existência da doença (diagnóstico) realizado entre 30 e 50 anos (Tabela 10).

Tabela 10 - Penetrância do FEO nos pacientes com NEM2A e portadores da mutação C634Y/Y791F no gene *RET*

Idade	0-10a	11-20a	21-30a	31-40a	41-50a	51-60a	>60a
nº de FEO/ nº de pacientes	0/4	0/0	4/8	3/4	4/4	2/2	3/4
Prevalência(%)	0	0	50%	75%	100%	100%	75%

Total dos casos com FEO até o presente = $16/26 = 61,5\%$

A maioria dos casos apresentava FEO bilateral (13/16; 81,25%). Dentre os 13 casos com FEO bilateral, 4 deles (30%) tiveram apresentação clínica assíncrona do tumor, no momento do diagnóstico. Um destes 4 casos com FEO assíncrono, teve diagnóstico de FEO contralateral 1 ano após o diagnóstico da lesão inicial, enquanto os demais (n=3) tiveram diagnóstico da segunda lesão 5 anos após a primeira adrenalectomia.

Achados laboratoriais

Os valores médios das catecolaminas séricas e urinárias dos casos com FEO estão especificados na tabela 11. Os valores médios das epinefrinas e nor-epinefrinas séricas e urinárias e das metanefrinas e VMA encontram-se elevados, enquanto que os valores séricos e urinários da dopamina estão dentro da faixa normal.

Tratamento

Até o presente momento, 14 dos 16 pacientes com FEO/NEM2A, foram submetidos ao tratamento cirúrgico. A técnica cirúrgica utilizada foi a adrenalectomia total unilateral nos casos de FEO unilateral. Em casos de FEO bilateral, a abordagem cirúrgica foi ou adrenalectomia total bilateral (n=6) ou adrenalectomia total em uma das adrenais e adrenalectomia parcial da glândula contralateral (nodulectomia com preservação do córtex adrenal) (n=4). Quanto aos dois casos com FEO ainda não operados, 1 deles aguarda ser convocado para cirurgia e o outro recusa o tratamento cirúrgico, tendo optado por acompanhamento clínico.

Dimensão tumoral

A descrição das dimensões dos tumores está especificada na tabela 12. Observamos que dentre os 14 casos já operados por FEO, 10 deles (71,4%) apresentavam tumores > 4,0 cm. Dentre os 4 casos-índice inicialmente descritos ⁽⁷⁵⁾, todos apresentavam FEO (100%) e 3 deles com FEO bilateral que possuíam dimensões avantajadas (Tabela 11). Dentre os 16 tumores já ressecados em que o peso tumoral estava disponível, 6 deles (37,5%) tinham peso > 50g. Entretanto, deve-se ter cautela ao analisar o parâmetro peso tumoral, desde que manipulações das peças cirúrgicas que possam influenciar no peso do tumor não puderam ser descartadas.

Tabela 11 - Valores médios, desvio padrão e variação das dosagens de catecolaminas séricas e urinárias em 16 pacientes com FEO/NEM2A

	Média	SD	Mediana	Minimo	Máximo	Valores de referência
Epinefrina sérica (pg/mL)	261,4	562,16	0	0	825	0 - 75
Epinefrina urinária (µg/24h)	179,7	377,87	28	0	1277	0,5 - 20
Nor-epinefrina sérica (pg/mL)	969,7	1924,44	304	107	6386	40 - 268
Nor-epinefrina urinária (µg/24h)	166,9	206,21	76	18	586	14 - 80
Dopamina sérica (pg/mL)	0	0	0	0	0	0 - 83
Dopamina urinária (µg/24h)	318,1	296,85	207,4	9	934	65-400
Metanefrinas urinárias (µg/mg)	2,3	4,81	0,6	0,1	17,4	0,05-1,2
Acido vanilmandelico (mg/24h)	30,6	33,37	20	9,2	96,8	<12mg/24h

#, valores indetectáveis foram anotados como zero.

Tabela 12 - Dados clínicos e anatomopatológicos dos 16 pacientes com FEO/NEM2A associados à mutação germinativa *RET* 634/791

Famílias	idade ao diagnóstico (anos)	Uni (U) / Bilateral (B) Bilateral Assincrônico (BA)	Adrenal direita (AP)		Adrenal esquerda (AP)	
			(cm)	Peso (g)	(cm)	Peso (g)
1	43*	U	3,0 x 2,5 x 0,5	9,6		
1	58	BA	5,2 x 4,0 x 1,8	14,5	5,0	21
1	50	B	2,5		3,1 x 1,9 x 1,6	
1	48	B	1,0	6,6	2,0 x 1,5 x 0,8	18,5
2	27*	B	4,5 x 2,9	88	4,2	
2	28	BA	5,5 x 4,5 x 4,0	51	#	
2	27	BA	5,0 x 4,0 x 3,5		1,0	
2	42	B	9,5 x 7,4 x 4,3	133	6,8 x 4,5 x 3,5	41,5
2	34	B	3,0 x 1,8	22	5,0 x 3,0 x 2,5	37
2	62	B	#		#	
3	34*	B	14 x 11 x 6	640	8 x 6 x 3	90
3	66	U	#			
4	28*	BA	1,1	3,1	9,5 x 9,0 x 8,5	295
4	61	B	1,5		1,1	
4	58	U	5,7 x 3,8 x 3,7			
5	34	B	#		8,5 x 3,5 x 2,0	31

AP, anatomopatológico; #, aguarda cirurgia; *, caso-índice

5.3 Análise de microssatélites

Através da análise de microssatélites foi demonstrado que esta mutação não se originou de um ancestral comum.

5.4 Estudo *in vitro*

Por meio de estudos *in vitro* da função do receptor RET proteína tirosina quinase, foi observada uma elevação comparativa da atividade de fosforilação em células renais (HEK293, human embryonic kidney cells) contendo insertos do receptor C634Y/Y791F, quando comparada com: a) a taxa de fosforilação observada em células albergando somente a mutação RET Cys634Tyr, b) com a taxa de fosforilação observada em células controle (wt/wt) ($p=0,04$). Estes dados sugerem a presença de interação sinérgica entre as duas variantes do *RET*, ou seja, entre as mutações C634Y e Y791F, que estaria levando a potencialização do evento (Figura 9).

Figura 9 - Níveis de fosforilação da tirosina do receptor RET. O wild-type RET foi fosforilado na presença do GDNF ligante e as 3 proteínas RET foram também fosforiladas. Embora as 2 mutações isoladas mostrem similares níveis de fosforilação ao receptor *wild-type* ligante ativado, a dupla mutação foi significativamente mais fosforilada (* $p=0,04$), sugerindo maior atividade Kinase ⁽⁷⁵⁾

6 DISCUSSÃO

Duplas variantes/mutações no *RET*

A imensa maioria das variantes até hoje descritas no proto oncogene *RET* é constituída por mutações em ponto, do tipo *missense*. Entretanto, nos últimos anos, tem sido relatado o achado de um número crescente de combinações de duas variantes gênicas no *RET* (Tabela 5). Este fato tem se tornado mais evidente após, a) a recomendação para que seja realizada a análise de rotina do gene *RET* em todos pacientes com diagnóstico de CMT e FEO; b) a eventual análise do *RET* em casos com idade < 30 anos apresentando HPT; e c) a recomendação para que a análise mutacional do *RET* deva abranger, no mínimo o estudo dos éxons 10, 11, 13, 14, 15, e 16 ^(3; 25).

Duplas mutações no *RET* têm sido frequentemente encontradas em pacientes apresentando manifestações clínicas atípicas relacionadas à NEM2 e foram recentemente sumarizadas por Qi *et al* 2011⁽⁴⁵⁾, como aqui mencionado (Tabela 5). Assim, foram relatados pacientes com FEO produzindo ectopicamente calcitonina ⁽⁶³⁾; CMT-F com fenótipo surpreendentemente suave ⁽⁷⁶⁾; CMT-F apresentando espessamento corneano ⁽⁷⁷⁾; quadro atípico de NEM2B ⁽⁵⁹⁾; FEO produtor ectópico de ACTH ⁽⁵⁸⁾; NEM2 com ausência de HPT e baixa prevalência de FEO ⁽⁶⁰⁾; duas mutações nos códons 804 e 806 levando a quadro típico de NEM2B ⁽⁷⁸⁾; e nosso trabalho descrevendo a nova dupla variante no *RET*, Cys634Tyr/Tyr791Phe ⁽⁷⁵⁾.

No nosso meio, nosso grupo descreveu em 2002 ⁽⁵⁸⁾ o achado de mutação germinativa *RET* C634R associada em *trans* à variante genética germinativa *RET* V648I, em paciente apresentando uma rara associação de NEM2A e síndrome de Cushing devido à FEO produtor de ACTH ⁽⁷⁹⁾. No seguimento destes casos, os pacientes desta família que eram portadores somente da mutação C634R desenvolveram o fenótipo típico NEM2A (CMT precoce e FEO bilateral), Por outro lado, os dois filhos do caso-índice e que apresentavam somente a variante *RET* V648I permaneceram assintomáticos até o momento, sugerindo que esta variante provavelmente não é *causadora* de doença, mas sim *moduladora* do fenótipo NEM2A ⁽⁵⁸⁾. Neste mesmo sentido, trabalho recente demonstrou por estudos *in vitro* que esta variante do *RET* realmente não é patogênica ⁽⁴⁹⁾.

Em vários outros casos de NEM2 relatados na literatura com dupla mutação germinativa no *RET*, o segundo evento mutacional foi sugerido como fator agravante ou suavizante do quadro clínico da NEM2A ^(59; 60; 63; 76; 78; 80). Contrariamente, outros autores têm relatado que o fenótipo NEM2, nestes casos, seria dependente única e exclusivamente da expressão da mutação com maior capacidade de transformação neoplásica *in vitro* ^(61; 62).

Acentue-se que os vários achados relatando a ocorrência de duas variantes no gene *RET*, na verdade, podem ser dos seguintes tipos combinatórios: a) duplas mutações; b) uma mutação e um SNP; ou ainda, c) dois SNPs ^(45; 51; 55).

Necessidade de estudar no mínimo os 6 éxons *hot-spots*.

A presente investigação documenta a presença de duas variantes em *cis* do gene *RET* em 5 famílias. Uma das variantes está relacionada a uma das mutações *RET* germinativas mais frequentemente encontradas na MEN2A, ou seja, a Cys634Tyr no éxon 11. Esta mutação apresenta alta capacidade de transformação neoplásica celular *in vitro* ⁽⁶⁾. A segunda variante trata-se da mutação Tyr791F ocorrendo no éxon 13, apresentando baixa capacidade de transformação neoplásica celular ⁽⁶⁾. Deste modo, estaríamos diante de uma mutação *RET* “forte” ocorrendo simultaneamente com uma mutação *RET* “fraca”.

Os presentes achados reforçam a necessidade de se ampliar, obrigatoriamente, a análise de mutação do gene *RET* para, no mínimo, seis e possivelmente sete dos éxons *hot-spots*. Em algumas áreas geográficas onde parecem ocorrer, mais frequentemente, mutações no éxon 8 do *RET*, como Brasil e Grécia, o estudo sistemático deste éxon se faz apropriado.

Prevalência da mutação C634Y/Y791F no gene *RET*

O achado da dupla variante Cys634Tyr/Tyr791Phe no gene *RET* foi recentemente descrita por nós, em 2010, em quatro famílias NEM2A ⁽⁷⁵⁾, sendo este trabalho como parte integrante do projeto. Após este nosso estudo ser publicado, expandimos a presente investigação por meio da descrição de uma quinta família afetada, a qual se encontra aqui relatada. A prevalência deste evento genético é desconhecida, havendo necessidade

de novas investigações independentes, que permitam melhor avaliação da prevalência na população em geral da mutação *RET* C634Y/Y791F.

Entretanto, alguns dados sugerem preliminarmente que este evento pode não ser muito raro. Assim, o fato de termos encontrado 5 famílias não relacionadas apresentando este genótipo, levantou a hipótese que este evento possa ser encontrado com maior frequência que o inicialmente suposto. Dados referentes a outros países e regiões geográficas, onde este composto genético possa ser também encontrado, poderão acrescentar novas evidências a este tópico ^(7; 31; 81). Além disto, o fato de que a dupla mutação nestas famílias afetadas, provavelmente, não é causada por uma mutação fundadora (vide abaixo), reforça a hipótese que este evento gênico pode não ser raro.

Efeito do fundador

Estudos iniciais com marcadores de microssatélites indicaram uma baixa probabilidade de que as famílias inicialmente estudadas possuísem um ancestral comum ⁽⁷⁵⁾.

Estes dados sugerem que, na ausência de uma mutação fundadora, a ocorrência simultânea destas duas variantes gênicas no *RET* (634/791), seja mais frequente do que poderia inicialmente postular caso houvesse um efeito fundador. Futuros trabalhos na área serão necessários para se validar esta hipótese.

Preparação para as cirurgias de FEO e CMT

Nos nossos casos, a adrenalectomia sempre precedeu a tireoidectomia, quando o CMT se encontrava simultaneamente associado ao FEO.

A preparação medicamentosa pré-cirúrgica dos pacientes com FEO foi metodicamente realizada por intermédio da administração de prazosin (1 mg) VO, ao deitar, no início do tratamento ^(82; 83). Em seguida, a cada 10-15 dias foi acrescentada a dose de 1mg de prazosin até se atingir o patamar em geral de 6-10 mg/dia, dose esta dividida em 2-3 tomadas ao dia. Após ter-se atingido a dose adequada de prazosin (geralmente 10 mg/dia), nenhum dos pacientes apresentou efeitos colaterais significativos (como p.ex. hipotensão postural)

Do mesmo modo, nenhum dos pacientes operados do FEO apresentou hipotensão postural abaixo dos valores aceitos por Pacak (2007) ⁽⁸³⁾, ou seja, pressão diastólica < 40 mm no pós-cirúrgico.

HPT

Notou-se que a prevalência de HPT primário nos presentes 26 pacientes foi baixa (2/26; 7,7%), em relação à observada em casos MEN2A devido a mutações no códon 634 (20-30%). Entretanto, o número de pacientes afetados, aqui analisados, não permite conclusões, havendo necessidade de dados adicionais sobre este tópico para que se possa eventualmente chegar a uma melhor estimativa da frequência do HPT nestes casos ⁽⁵⁾.

Além disto, consideramos que a avaliação da real prevalência de HPT, nestes casos, ficou prejudicada pelo fato de 47,8%% (11/23) dos pacientes terem evoluído para o hipoparatiroidismo parcial ou total, após a tireoidectomia total devido ao CMT.

Variabilidade do fenótipo de CMT

A idade ao diagnóstico do CMT variou consideravelmente, entre os 7 anos e os 66 anos de idade. Entretanto, esta enorme variação se deu, em grande parte, devido a: a) vários pacientes com CMT terem sido diagnosticados tardiamente; e b) enquanto que outros foram diagnosticados do CMT muito mais precocemente, por ocasião do rastreamento genético-clínico familiar.

Notamos a existência de grande variabilidade do fenótipo nos casos afetados por NEM2 aqui estudados. Ainda que, como esperado, ocorresse crescente comprometimento da tireoide, dos nódulos linfáticos cervicais e órgãos à distância, com o decorrer da idade dos pacientes (Tabela 9).

Em um extremo, encontra-se o paciente com 21 anos (Tabela 9) apresentando somente hiperplasia das células C da tireoide (T0N0M0), o que não é habitual em pacientes com NEM2A nesta idade. Ao contrário, a maioria dos casos com mutação no códon 634 do *RET* apresenta evolução rápida e precoce do CMT, ocorrendo este, muitas vezes, abaixo dos 5 anos de idade ^(3; 25). Este paciente com 21 anos além de 2 outros casos, com 4 e 7 anos, puderam ser submetidos à tireoidectomia total profilática e

apresentaram níveis indetectáveis de calcitonina no pós-cirúrgico (ou seja, foram aparentemente “bioquimicamente curados”).

Em outro extremo está o caso 12 (Tabela 9) que aos 7 anos já apresentava micro-carcinoma medular (<1 cm) de tireoide, mas que também obteve aparente remissão bioquímica após a cirurgia.

Dentre os 8 casos com T1a (tumor < 1 cm), 5 deles não apresentavam metástases linfonodais cervicais detectáveis (idades, 7–42 anos; média, 23,6 anos), enquanto três as apresentavam: dois na fase N1a (34 e 62 anos) e um caso N1b (62 anos).

Em três casos não foi possível se caracterizar adequadamente em qual estadiamento se apresentavam (Tx; Tabela 9).

Seis outros casos que se apresentaram em T2 (CMT, 2-4 cm), tinham idades mais avançadas (média, 53,7 anos). Destes, 2 não tinham metástases cervicais; 2 tinham metástases cervicais; e 2 tinham dados insuficientes (Nx).

“Remissão bioquímica” do CMT

O conceito de “remissão bioquímica” se refere à situação em que há documentação da presença de valores de calcitonina repetidamente indetectáveis durante o pós-cirúrgico. Valores da calcitonina sérica basal indetectáveis foram observados repetidamente em 12 casos (52,2%), sendo que os pacientes tinham idades entre 7 e 48 anos.

Entretanto, o período de acompanhamento clínico pós-cirúrgico foi relativamente curto, desde que a recidiva da doença (com elevação dos

níveis de calcitonina) tem sido relatada, e pode ocorrer em até mesmo 7 anos após a intervenção cirúrgica (Toledo SP, informação pessoal). Como já relatado, a recidiva do CMT pode ser causada por resquício de tecido tireoidiano deixado para trás, assim como, linfonodos cervicais afetados remanescentes, sendo este último evento o mais frequente.

Feocromocitoma

Nesta série de casos com a dupla mutação *RET* notou-se frequência relativamente aumentada de FEO (73%), sobretudo no grupo de pacientes adultos, a partir da terceira década de vida (21-30 anos), quando comparada com a frequência de FEO em pacientes com mutações *RET* ou C634Y ou Y791F, isoladamente.

A idade média ao diagnóstico de FEO, nestes pacientes, não diferiu daquela de pacientes apresentando isoladamente uma das duas mutações, C634Y ou Y791F ^(30; 84).

Principalmente, entre os casos-índice, notou-se tendência da ocorrência de tumores volumosos (> 5 cm), que atingiam até 14 cm em pacientes jovens (27-35 anos). O achado de FEOs bastante volumosos, e ocorrendo em idades relativamente baixas, sugeriu fortemente que estas neoplasias devem ter surgido há vários anos atrás. Assim, estes tumores poderiam mesmo ter se desenvolvido a partir de períodos de idade bastante precoces.

Importante notar que o caso III-11, da família 2, tinha história sugestiva de sintomas/sinais relacionados ao FEO/NEM2 desde os 14 anos

de idade, enquanto que o diagnóstico clínico do FEO se deu aos 28 anos. Estes dados indicam uma defasagem de aproximadamente 14 anos ($28 - 14 = 14$ anos) no diagnóstico de FEO, neste caso específico. Reforçando este achado, a irmã deste caso tinha história sugestiva de sintomas sugestivo de feocromocitoma a partir de 12 anos de idade e porém diagnóstico foi aos 27 anos. Retardos de diagnósticos similares podem, muito provavelmente, ter ocorrido entre os outros pacientes. Este achado de FEOs avantajados e relativamente precoces nos fez levantar a hipótese que a mutação Y791F estivesse modulando o fenótipo destes pacientes e levando a estes quadros clínicos peculiares.

Se considerarmos o início dos sintomas sugestivos de FEO, um achado que nos chamou atenção foi o fato de encontrarmos uma penetrância de FEO aos 20 anos de idade de 43%. Nossos dados também revelam uma penetrância de FEO na terceira década de vida de 50%. Enquanto mutações no códon 634 mostram penetrância de 1,4 e 20% na segunda e terceira década de vida, respectivamente ⁽⁷⁾. Outro achado foi a frequência elevada de feocromocitoma bilateral nestas famílias estudadas. Diante destes achados, sugere-se a investigação de feocromocitoma a partir da segunda década de forma sistemática e anualmente.

Morbi-mortalidade

O caso III-11, da família 2 (acima comentado) ilustra a possibilidade de ocorrer grande retardo na suspeita e diagnóstico de FEO, uma doença com elevada morbi-mortalidade. Na história familiar das 5 famílias aqui

relatadas notamos que ocorreram vários casos de falecimento de parentes de primeiro grau, sobretudo devido a doenças cardiovasculares, potencialmente causadas por FEO. Além disto, muitos deles eram portadores obrigatórios da dupla mutação *RET*. Portanto, pode-se especular que muito provavelmente fossem portadores de FEO não diagnosticado.

Valores das catecolaminas no FEO/NEM2

As medianas dos valores da epinefrinas e norepinefrinas séricas e urinárias se apresentaram pouco elevadas nos presentes pacientes no período pré-cirúrgico, em relação aos valores controles. Grandes oscilações nos níveis de catecolaminas foram notadas, como frequentemente encontradas nos casos de FEOs familiares, sendo que a análise baseada apenas nestas dosagens laboratoriais não se mostraram informativas em alguns casos específicos ^(32; 33).

Análise *in vitro*

Para uma melhor compreensão das implicações funcionais da mutação C634Y/Y791C, foi realizada a análise funcional *in vitro* do receptor tirosina quinase RET. Estes estudos revelaram que o inserto contendo a dupla mutação apresentava elevação estatisticamente significativa de sua capacidade fosforilativa ($p=0,04$) quando comparado com, a) os insertos contendo cada uma das mutações *RET* isoladamente e com, b) os insertos contendo o receptor *wild-type* ativado pelo ligante. Estes achados demonstram a ocorrência de relação funcionalmente sinérgica destas duas mutações, e estes dados estão compatíveis com os achados clínicos nos

pacientes aqui analisados (75). Assim, o aumento de atividade do receptor *RET* C634Y/Y791C poderia explicar, ao menos em parte, o nítido aumento da penetrância do FEO observado especificamente em nossos pacientes.

Temos especulado que possa existir algum tipo de predisposição tecido-específica das células cromafins da medula adrenal para o desenvolvimento do FEO nos presentes casos com a mutação *RET* 634/79 (75). Esta possibilidade necessita mais estudos para ser comprovada.

7 CONCLUSÕES

Descrevemos aqui 5 famílias NEM2A albergando a dupla mutação germinativa *RET* nos códons 634/791. O fenótipo era caracterizado pela presença de feocromocitoma, mais precoce e agressivo do que os observados em pacientes com mutação *RET* somente no códon 634. Mencione-se que a apresentação e evolução do CMT nestas famílias foi semelhante à usualmente encontrada em casos NEM2 A devido a mutação *RET*, códon 634. Estes achados sugerem a existência de modulação do fenótipo pela mutação 791 e que esta teve caráter tecido-específico, restrita à medula adrenal. Os nossos dados de estudo *in vitro* suportam esta nossa hipótese. Adicionalmente, devido a aparente ausência de um efeito fundador nas famílias estudadas, pode-se supor que o achado da dupla mutação *RET* 634/791 não seja um evento raro, ao menos na região geográfica estudada.

Ainda que estes achados devam ser validados, os presentes dados podem ser úteis no diagnóstico genético e no manejo clínico e terapêutico dos pacientes com NEM2A.

8 ANEXOS

Tabela 1S - Parâmetros clínicos de pacientes com feocromocitoma relacionado à NEM2A, pertencentes as famílias com mutação C634Y/Y791F

pacientes	sexo	Idade de sintomas (anos)	Idade de diagnóstico	FEO Uni ou Bilateral
F1-III-13	F	43	43	U
F1-II-8	F	55	58	B
F1-III-3	M	46	50	B
F1-III-4	M	42	48	B
F2-III-12	F	12	27	B
F2-III-11	M	15	28	B
F2-III-13	M	27	27	B
F2-II-3	F		62	B
F2-III-2	M		42	B
F2-III-7	M	32	34	B
F3-III-4	F	34	34	B
F3-II-3	M	70	66	U
F4-III-2	F	28	28	B
F4-II-1	M	42	61	B
F4-II-2	F		58	U
F5IV-1	M	19	34	B

M, masculino; F, feminino; U, feocromocitoma unilateral; B, feocromocitoma bilateral

Tabela 2S - Parâmetros clínicos dos pacientes com diagnóstico de NEM2A e portadores de mutação germinativa RET C634Y/Y791F, relacionados à investigação e evolução pós cirúrgica dos casos submetidos ao tratamento cirúrgico de CMT

pacientes	Diagnóstico CMT/HCC	Idade do diagnóstico	CT pré cirurgia (pg/mL)	CEA pré cirurgia (ng/mL)	CT pós cirurgia (pg/mL)	CEA pós cirurgia (ng/mL)
F1-III-13	S	37			<2,0	0,8
F1-IV-14	S	16			14	
F1-II-6	S	63				
F1-II-8	S	56			322	
F1-III-3	S	50	14,1	1,8		
F1-IV-6	S	22	8,4	3,1	<2,0	3,0
F1-IV-7	S	21	10,5		<2,0	1,8
F1-III-4	S	48	1232	17,9	<2,0	4,4
F2-III-12	S	27	203		15,4	3,4
F2-IV-23	N		19,7	1,2	<2,0	
F2-III-11	S	28			5921	232,7
F2-III-13	S	27	139	4,3	11,9	3,3
F2-IV-24	S	7	13,5	1,5	<2,0	1,3
F2-II-3	S	61			276	
F2-III-2	S	42	5,5	3,1	<2,0	1,6
F2-III-7	S	34	25,1	1,5	<2,0	0,9
F2-IV-15	N		12	1	<2,0	0,6
F2-IV-16	N		6,9	0,7		
F3-III-4	S	35	162		<2,0	
F3-II-3	S	66	96,2	6,4		
F4-III-2	S	29	21		<2,0	
F4-II-1	S	61	282	17,3	39	2,9
F4-III-1	S	19	92	4,2	19	
F4-III-4	S	31	193			
F4-II-2	S	33			268	5,3
F5-IV-1	S	33	1530		<2,0	3,2
F5-III-7	S	62	57	8,3	4,0	3,2

CMT, carcinoma medular de tireóide; HCC, hiperplasia de células C; CT, calcitonina; CEA, antígeno carcinoembrionário

Tabela 3S - Valores de catecolaminas séricas e urinárias dos pacientes, portadores da mutação RET C634Y/Y791F, com diagnóstico de feocromocitoma relacionado à NEM2A

pacientes	VMA (µg/mg)	Epi P (pg/mL)	NE P (pg/mL)	Epi U (µg/24h)	NE U (µg/24h)	DP U (µg/24h)	MN U (µgmg)
F1-III-13		0	107				0,39
F1-II-8							
F1-III-3	14,3	0	183	13	79	9	0,62
F1-III-4		0	285	0	54	490	1,64
F2-III-12							
F2-III-11							
F2-III-13	27,7	0	323	20	41	147	2,4
F2-II-3				8	23	56	1,13
F2-III-2		825	1105	1277	550	934	2,1
F2-III-7	9,9	0	535	267	184	354	0,53
F3-III-4							
F3-II-3		0	207	36	76	300	0,42
F4-III-2	96,8	1684	6386	277	586	750	17,4
F4-II-2	9,2	0	203	28	45	174	0,59
F4-II-2	25,76	105	363	11	18	78	0,4
F5-IV-1				40,1	180,3	207,4	0,1

VMA, ácido vanilmandélico; Epi P, epinefrinas plasmáticas; NE P, nor-epinefrinas plasmática; Epi U, epinefrinas urinárias; NE U, nor-epinefrinas urinárias; DP U, dopamina urinária; MN U, metanefrinas urinárias.

9 REFERÊNCIAS

1. Eng C. RET proto-oncogene in the development of human cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17:380-93.
2. Nunes AB. *Mutações germinativa no gene RET em casos com neoplasia endócrina múltipla tipo2* [tese]. São Paulo:Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002.
3. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, Conte-Devolx B, Falchetti A, Gheri RG, Libroia A, Lips CJ, Lombardi G, Mannelli M, Pacini F, Ponder BA, Raue F, Skogseid B, Tamburrano G, Thakker RV, Thompson NW, Tomassetti P, Tonelli F, Wells Jr SA and Marx SJ. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:5658-71.
4. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, van Amstel HK, Lips CJ, Nishisho I, Takai SI, Marsh DJ, Robinson BG, Frank-Raue K, Raue F, Xue F, Noll WW, Romei C, Pacini F, Fink M, Niederle B, Zedenius J, Nordenskjold M, Komminoth P, Hendy GN, Mulligan LM, et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. *JAMA.* 1996;276:1575-9.
5. Gagel RF, Tashjian AH Jr, Cummings T, Papathanasopoulos N, Kaplan MM, DeLellis RA, Wolfe HJ, Reichlin S. The clinical outcome of prospective screening for multiple endocrine neoplasia type 2a. An 18-year experience. *N Engl J Med.* 1988;318:478-84.

6. de Groot JW, Links TP, Plukker JT, Lips CJ, Hofstra RM. RET as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocr Rev.* 2006;27:535-60.
7. Frank-Raue K, Rybicki LA, Erlic Z, Schweizer H, Winter A, Milos I, Toledo SP, Toledo RA, Tavares MR, Alevizaki M, Mian C, Siggelkow H, Hübner M, Wohllk N, Opocher G, Dvořáková S, Bendlova B, Czetwertynska M, Skasko E, Barontini M, Sanso G, Vorländer C, Maia AL, Patocs A, Links TP, de Groot JW, Kerstens MN, Valk GD, Miehle K, Musholt TJ, Biarnes J, Damjanovic S, Muresan M, Wüster C, Fassnacht M, Peczkowska M, Fauth C, Golcher H, Walter MA, Pichl J, Raue F, Eng C, Neumann HP; International RET Exon 10 Consortium. Risk profiles and penetrance estimations in multiple endocrine neoplasia type 2A caused by germline RET mutations located in exon 10. *Hum Mutat.* 2011;32:51-8.
8. Hazard JB, Hawk WA, Crile G Jr. Medullary (solid) carcinoma of the thyroid; a clinicopathologic entity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1959;19:152-61.
9. Sipple JH. The association of pheochromocytoma with carcinoma of the thyroid gland. *Am J Med.* 1961;31:163-6.
10. Steiner AL, Goodman AD, Powers SR. Study of a kindred with pheochromocytoma, medullary thyroid carcinoma, hyperparathyroidism and Cushing's disease: multiple endocrine neoplasia type 2. *Medicine* (Baltimore). 1968;47:371-409.
11. Wagenmann A. "Multiple neurome des Auges und der Zunge", *Ber Dtsch Ophthalmol Ges.* 1922:282–5.
12. Williams ED, Pollock DJ. Multiple mucosal neuromata with endocrine tumors: a syndrome allied to von Recklinghausen's disease. *J Pathol Bacteriol.* 1966;91:71-80.

13. Gorlin RJ, Vichers RA. Multiple mucosal neuromas, pheochromocytoma, medullary carcinoma of the thyroid and marfanoid body build with muscle wasting: reexamination of a syndrome of neural crest malmigration. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1971;7:69-72.
14. Wermer P. "Genetic aspects of adenomatosis of endocrine glands". *Am. J. Med.* 1954;16: 363–71.
15. Fränkel F. [Classics in oncology: A case of bilateral completely latent adrenal tumor and concurrent nephritis with changes in the circulatory system and retinitis: Felix Frankel.1886]. *CA Cancer J Clin.* 1984;34:93-106.
16. Neumann HP, Vortmeyer A, Schmidt D, Werner M, Erlic Z, Cascon A, Bausch B, Januszewicz A, Eng C. Evidence of MEN-2 in the original description of classic pheochromocytoma. *N Engl J Med.* 2007;357:1311-5.
17. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, RET, by DNA rearrangement. *Cell.* 1985;42:581-8.
18. Mathew CG, Chin KS, Easton DF, Thorpe K, Carter C, Liou GI, Fong SL, Bridges CD, Haak H, Kruseman AC, et al. A linked genetic marker for multiple endocrine neoplasia type 2A on chromosome 10. *Nature.* 1987;328(6130):527-8.
19. Simpson NE, Kidd KK, Goodfellow PJ, McDermid H, Myers S, Kidd JR, Jackson CE, Duncan AM, Farrer LA, Brasch K, et al. Assignment of multiple endocrine neoplasia type 2A to chromosome 10 by linkage. *Nature.* 1987;328(6130):528-30.

-
20. Ishizaka Y, Itoh F, Tahira T, Ikeda I, Sugimura T, Tucker J, Fertitta A, Carrano AV, Nagao M. Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. *Oncogene*. 1989;4:1519-21.
 21. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, Love DR, Mole SE, Moore JK, Papi L, et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature*. 1993;363(6428):458-60.
 22. Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, Howe JR, Moley JF, Goodfellow P, Wells SA Jr. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet*. 1993;2:851-6.
 23. Hofstra RM, Landsvater RM, Ceccherini I, Stulp RP, Stelwagen T, Luo Y, Pasini B, Höppener JW, van Amstel HK, Romeo G, et al. A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature*. 1994;367(6461):375-6.
 24. Wolfe HJ, Voelkel EF, Tashjian AH Jr. Distribution of calcitonin-containing cells in the normal adult human thyroid gland: a correlation of morphology with peptide content. *J Clin Endocrinol Metab*. 1974;38:688-94.
 25. Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, Moley JF, Pacini F, Ringel MD, Schlumberger M, Wells SA Jr; American Thyroid Association Guidelines Task Force. Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid*. 2009;19:565-612. Erratum in: *Thyroid*. 2009;19:1295.

-
26. Sugawara M, Geffner DL, Martinez D, Hershman JM. Novel treatment of medullary thyroid cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2009;16:367-72.
 27. DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. *Lyon: IARC Press.* 2004. p.136-8.
 28. Karagiannis A, Mikhailidis DP, Athyros VG, Harsoulis F. Pheochromocytoma: an update on genetics and management. *Endocr Relat Cancer.* 2007;14:935-56.
 29. Machens A, Brauckhoff M, Holzhausen HJ, Thanh PN, Lehnert H, Dralle H. Codon-specific development of pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasias type 2. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:3999-4003.
 30. Bausch B, Borozdin W, Neumann HP; European-American Pheochromocytoma Study Group. Clinical and genetic characteristics of patients with neurofibromatosis type 1 and pheochromocytoma. *N Engl J Med.* 2006;354:2729-31.
 31. Neumann HP, Bausch B, McWhinney SR, Bender BU, Gimm O, Franke G, Schipper J, Klisch J, Althoefer C, Zerres K, Januszewicz A, Eng C, Smith WM, Munk R, Manz T, Glaesker S, Apel TW, Treier M, Reineke M, Walz MK, Hoang-Vu C, Brauckhoff M, Klein-Franke A, Klose P, Schmidt H, Maier-Woelfle M, Peçzkowska M, Szmigielski C, Eng C; Freiburg-Warsaw-Columbus Pheochromocytoma Study Group. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *N Engl J Med.* 2002;346:1459-66.

-
32. Lenders JW, Pacak K, Walther MM, Linehan WM, Mannelli M, Friberg P, Keiser HR, Goldstein DS, Eisenhofer G. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best? *JAMA*. 2002;287:1427-34.
 33. Kudva YC, Sawka AM, Young WF Jr. Clinical review 164: The laboratory diagnosis of adrenal pheochromocytoma: the Mayo Clinic experience. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:4533-9.
 34. Erlic Z, Neumann HP. Familial pheochromocytoma. *Hormones (Athens)*. 2009;8:29-38.
 35. Hansford JR, Mulligan LM. Multiple endocrine neoplasia type 2 and RET: from neoplasia to neurogenesis. *J Med Genet*. 2000;37:817-27.
 36. Hoff AO, Cote GJ, Gagel RF. Multiple endocrine neoplasias. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:377-411.
 37. Wagner SM, Zhu S, Nicolescu AC, Mulligan LM. Molecular mechanisms of RET receptor-mediated oncogenesis in multiple endocrine neoplasia 2. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67 (Suppl 1):77-84.
 38. Da Silva AM, Maciel RM, Da Silva MR, Toledo SR, De Carvalho MB, Cerutti JM. A novel germ-line point mutation in RET exon 8 (Gly(533)Cys) in a large kindred with familial medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:5438-43.
 39. Raue F, Frank-Raue K. Genotype-phenotype relationship in multiple endocrine neoplasia type 2, Implications for clinical management. *Hormones (Athens)*. 2009;8:23-8.

-
40. Jiménez C, Hu MI, Gagel RF. Management of medullary thyroid carcinoma. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008;37:481-96.
 41. Margraf RL, Crockett DK, Krautscheid PM, Seamons R, Calderon FR, Wittwer CT, Mao R. Multiple endocrine neoplasia type 2 RET protooncogene database: repository of MEN2-associated RET sequence variation and reference for genotype/phenotype correlation. *Hum Mutat*. 2009;30: 548-56.
 42. Machens A, Niccoli-Sire P, Hoegel J, Frank-Raue K, van Vroonhoven TJ, Roehrer HD, Wahl RA, Lamesch P, Raue F, Conte-Devolx, Dralle H. Early malignant progression of hereditary medullary thyroid carcinoma. *N Engl J Med*. 2003; 349:1517-25.
 43. Puñales MK, Graf H, Gross JL, Maia AL. RET codon 634 mutations in multiple endocrine neoplasia type 2: variable clinical features and clinical outcome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:2644-9.
 44. Frank-Raue K, Machens A, Scheuba C, Niederle B, Dralle H, Raue F; German MEN2 Study Group. Difference in development of medullary thyroid carcinoma among carriers of RET mutations in codons 790 and 791. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;69:259-63.
 45. Qi XP, Ma JM, Du ZF, Ying RB, Fei J, Jin HY, Han JS, Wang JQ, Chen XL, Chen CY, Liu WT, Lu JJ, Zhang JG, Zhang XN. RET germline mutations identified by exome sequencing in a Chinese multiple endocrine neoplasia type 2A/familial medullary thyroid carcinoma family. *PLoS One*. 2011;6:e20353.

-
46. Rodriguez JM, Balsalobre M, Ponce JL, Rios A, Torregrosa NM, Tebar J, Parrilla P. Pheochromocytoma in MEN 2A syndrome. Study of 54 patients. *World J Surg.* 2008;32:2520-6.
 47. Berndt I, Reuter M, Saller B, Frank-Raue K, Groth P, Grussendorf M, Raue F, Ritter M, Höppner W. A new hot spot for mutations in the RET protooncogene causing familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2A. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:770-4.
 48. Plaza Menacho I, Koster R, van der Sloot AM, Quax WJ, Osinga J, van der Sluis T, Hollema H, Burzynski GM, Gimm O, Buys CH, Eggen BJ, Hofstra RM. RET-familial medullary thyroid carcinoma mutants Y791F and S891A activate a Src/JAK/STAT3 pathway, independent of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Cancer Res.* 2005;65:1729-37.
 49. Cosci B, Vivaldi A, Romei C, Gemignani F, Landi S, Ciampi R, Tacito A, Molinaro E, Agate L, Bottici V, Cappagli V, Viola D, Piaggi P, Vitti P, Pinchera A, Elisei R. In silico and in vitro analysis of rare germline allelic variants of RET oncogene associated with medullary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2011;18:603-12.
 50. Arum SM, Dahia PL, Schneider K, Braverman LE. A RET mutation with decrease penetrance in the family of a patient with a "sporadic" pheochromocytoma. *Endocrine.* 2005;28:193-8.
 51. Tamanaha R, Camacho CP, Ikejiri ES, Maciel RM, Cerutti JM. Y791F RET mutation and early onset of medullary thyroid carcinoma in a Brazilian kindred: evaluation of phenotype-modifying effect of germline variants. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;67:806-8.

-
52. Erlic Z, Hoffmann MM, Sullivan M, Franke G, Peczkowska M, Harsch I, Schott M, Gabbert HE, Valimäki M, Preuss SF, Hasse-Lazar K, Waligorski D, Robledo M, Januszewicz A, Eng C, Neumann HP. Pathogenicity of DNA variants and double mutations in multiple endocrine neoplasia type 2 and von Hippel-Lindau syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:308-13.
 53. Plaza-Menacho I, van der Sluis T, Hollema H, Gimm O, Buys CH, Magee AI, Isacke CM, Hofstra RM, Eggen BJ. Ras/ERK1/2-mediated STAT3 Ser727 phosphorylation by familial medullary thyroid carcinoma-associated RET mutants induces full activation of STAT3 and is required for c-fos promoter activation, cell mitogenicity, and transformation. *J Biol Chem.* 2007;282:6415-24.
 54. Weber F, Eng C. Germline variants within RET: clinical utility or scientific playtoy? [editorial]. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:6334-6.
 55. Baumgartner-Parzer SM, Lang R, Wagner L, Heinze G, Niederle B, Kaserer K, Waldhäusl W, Vierhapper H. Polymorphisms in exon 13 and intron 14 of the RET protooncogene: genetic modifiers of medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:6232-6.
 56. Lecube A, Hernandez C, Oriola J, Galard R, Gémard E, Mesa J, Simó R. V804M RET mutation and familial medullary thyroid carcinoma: report of a large family with expression of the disease only in the homozygous gene carriers. *Surgery.* 2002;131:509-14.
 57. Elisei R, Cosci B, Romei C, Agate L, Piampiani P, Miccoli P, Berti P, Basolo F, Ugolini C, Ciampi R, Nikiforov Y, Pinchera A. Identification of a novel point mutation in the RET gene (Ala883Thr), which is associated with medullary thyroid carcinoma phenotype only in homozygous condition. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:5823-7.

-
58. Nunes AB, Ezabella MC, Pereira AC, Krieger JE, Toledo SP 2002 A novel Val648Ile substitution in RET protooncogene observed in a Cys634Arg multiple endocrine neoplasia type 2A kindred presenting with an adrenocorticotropin-producing pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:5658-61.
 59. Menko FH, van der Luit RB, de Valk IA, Toorians AW, Sepers JM, van Diest PJ, Lips CJ. 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.
 60. Poturnajova M, Altanerova V, Kostalova L, Breza J, Altanerova C. Novel germline mutation in the transmembrane region of RET gene close to Cys634Ser mutation associated with MEN 2A syndrome. *J Mol Med (Berl).* 2005;83:287-95.
 61. Dvorakova S, Vaclavokova E, Ryska A, Cap J, Vlcek P, Duskova J, Kodetova D, Holub V, Novak Z, Bendlova B. Double germline mutations in the RET proto-oncogene in MEN 2A and MEN 2B kindreds. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2006;114:192-6.
 62. Colombo-Benkmann M, Li Z, Riemann B, Hengst K, Herbst H, Keuser R, Gross U, Rondot S, Raue F, Senninger N, Pützer BM, and Frank-Raue K. Characterization of the RET protooncogene transmembrane domain mutation S649L associated with nonaggressive medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2008;158:811-6.
 63. Tessitore A, Sinisi AA, Pasquali D, Cardone M, Vitale D, Bellastella A, Colantuoni V. A novel case of multiple endocrine neoplasia type 2A associated with two de novo mutations of the RET protooncogene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:3522-7.

-
64. Toledo SP, dos Santos MA, Toledo RA, Lourenço DM Jr. Impact of RET proto-oncogene analysis on the clinical management of multiple endocrine neoplasia type 2. *Clinics (São Paulo)*. 2006;61:59-70.
 65. Yao L, Schiavi F, Cascon A, Qin Y, Inglada-Pérez L, King EE, Toledo RA, Ercolino T, Rapizzi E, Ricketts CJ, Mori L, Giacchè M, Mendola A, Taschin E, Boaretto F, Loli P, Iacobone M, Rossi GP, Biondi B, Lima-Junior JV, Kater CE, Bex M, Vikkula M, Grossman AB, Gruber SB, Barontini M, Persu A, Castellano M, Toledo SP, Maher ER, Mannelli M, Opocher G, Robledo M, Dahia PL. Spectrum and prevalence of FP/TMEM127 gene mutations in pheochromocytomas and paragangliomas. *JAMA*. 2010;304:2611-9.
 66. Lourenço DM Jr, Toledo RA, Coutinho FL, Margarido LC, Siqueira SA, dos Santos MA, Montenegro FL, Machado MC, Toledo SP. The impact of clinical and genetic screenings on the management of the multiple endocrine neoplasia type1. *Clinics (São Paulo)*. 2007;62:465-76.
 67. Santos MA, Nunes AB, Abelin N, Ezabella MC, Toledo RA, Lourenço DM Jr, Hayashida CY, Fonseca II, Toledo SP. Genetic screening of multiple endocrine neoplasia type 2: experience of the USP Endocrine Genetics Unit. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006;50:7-16.
 68. Santos MA, Quedas EP, Toledo RA, Lourenço DM Jr, Toledo SP. Screening of RET gene mutations in multiple endocrine neoplasia type-2 using conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE). *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007;51:1468-76.
 69. Toledo RA, Lourenco DM Jr, Coutinho FL, Quedas E, Mackowiack I, Machado MC, Montenegro F, Cunha-Neto MB, Liberman B, Pereira MA, Correa PH, Toledo SP. Novel MEN1 germline mutations in Brazilian families with multiple endocrine neoplasia type 1. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007;67:377-84.

-
70. Toledo RA, Lourenço DM Jr, Liberman B, Cunha-Neto MB, Cavalcanti MG, Moyses CB, Toledo SP, Dahia PL. Germline mutation in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene in familial somatotropinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:1934-7.
 71. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch. Introduction. *TNM Online.* 2010.p.1-21.
 72. Gujral TS, Singh VK, Jia Z, Mulligan LM. Molecular mechanisms of RET receptor-mediated oncogenesis in multiple endocrine neoplasia 2B. *Cancer Res.* 2006;66:10741-9.
 73. Richardson DS, Lai AZ, Mulligan LM. RET ligand-induced internalization and its consequences for downstream signaling. *Oncogene.* 2006;25:3206-11.
 74. Hickey JG, Myers SM, Tian X, Zhu SJ, V Shaw JL, Andrew SD, Richardson DS, Brettschneider J, Mulligan LM. RET-mediated gene expression pattern is affected by isoform but not oncogenic mutation. *Genes Chromosomes Cancer.* 2009;48:429-40.
 75. Toledo RA, Wagner SM, Coutinho FL, Lourenço DM Jr, Azevedo JA, Longuini VC, Reis MT, Siqueira SA, Lucon AM, Tavares MR, Fragoso MC, Pereira AA, Dahia PL, Mulligan LM, Toledo SP. High penetrance of pheochromocytoma associated with the novel C634Y/Y791F double germline mutation in the RET protooncogene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:1318-27.
 76. Bartsch DK, Hasse C, Schug C, Barth P, Rothmund M, Höppner W. A RET double mutation in the germline of a kindred with FMTC. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2000;108:128-32.

-
77. Kasprzak L, Nolet S, Gaboury L, Pavia C, Villabona C, Rivera-Fillat F, Oriola J, Foulkes WD. Familial medullary thyroid carcinoma and prominent corneal nerves associated with the germline V804M and V778I mutations on the same allele of RET. *J Med Genet.* 2001;38:784-7.
 78. Miyauchi A, Futami H, Hai N, Yokozawa T, Kuma K, Aoki N, Kosugi S, Sugano K, Yamaguchi K. Two germline missense mutations at codons 804 and 806 of the RET proto-oncogene in the same allele in a patient with multiple endocrine neoplasia type 2B without codon 918 mutation. *Jpn J Cancer Res.* 1999;90:1-5.
 79. Mendonça BB, Arnhold IJ, Nicolau W, Avancini VA, Bloise W. Cushing's syndrome due to ectopic ACTH secretion by bilateral pheochromocytomas in multiple endocrine neoplasia type 2A. *N Engl J Med.* 1988;319:1610-1.
 80. Kitamura Y, Scavarda N, Wells SAJr, Jackson CE, Goodfellow PJ. Two maternally derived missense mutations in the tyrosine kinase domain of the RET protooncogene in a patient with de novo MEN 2B. *Hum Mol Genet.* 1995;4:1987-8.
 81. Romei C, Mariotti S, Fugazzola L, Taccaliti A, Pacini F, Opocher G, Mian C, Castellano M, degliUberti E, Ceccherini I, Cremonini N, Seregini E, Orlandi F, Ferolla P, Puxeddu E, Giorgino F, Colao A, Loli P, Bondi F, Cosci B, Bottici V, Cappai A, Pinna G, Persani L, Verga U, Boscaro M, Castagna MG, Cappelli C, Zatelli MC, Faggiano A, Francia G, Brandi ML, Falchetti A, Pinchera A, Elisei R; ItaMEN network. Multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes (MEN 2): results from the ItaMEN network analysis on the prevalence of different genotypes and phenotypes. *Eur J Endocrinol.* 2010;163:301-8. Erratum in: *Eur J Endocrinol.* 2010;163:963.

82. Pereira MA, Souza BF, Freire DS, Lucon AM. Pheochromocytoma. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2004;48:751-75.
83. Pacak K. Preoperative management of the pheochromocytoma patient. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:4069-79.
84. Vaclavikova E, Dvorakova S, Sykorova V, Bilek R, Dvorakova K, Vlcek P, Skaba R, Zelinka T, Bendlova B. RET mutation Tyr791Phe: the genetic cause of different diseases derived from neural crest. *Endocrine.* 2009;36:419-24.
85. Maia AL, Gross JL, Puñales MK. Multiple endocrine neoplasia type 2. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2005;49:725-34.