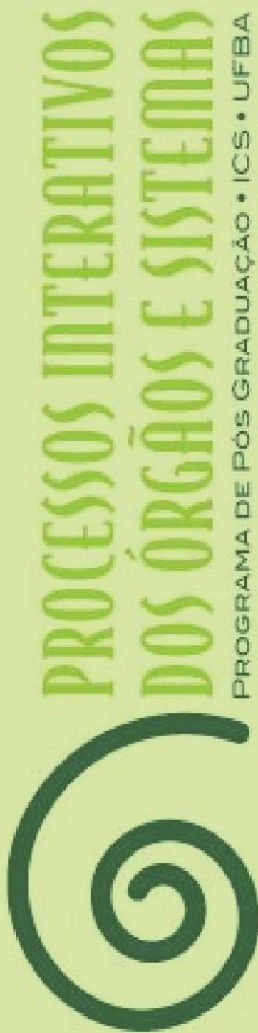


UFBA

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde

RAFAEL REIS CAMPOS DA MATTA

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DE
PACIENTES COM CARCINOMA MEDULAR
DE TIROIDE DO ESTADO DA BAHIA**



Salvador
2023



**PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO • ICS • UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS
INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**

RAFAEL REIS CAMPOS DA MATTA

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DE PACIENTES
COM CARCINOMA MEDULAR DE TIREOIDE DO ESTADO DA
BAHIA**

Salvador
2023

RAFAEL REIS CAMPOS DA MATTA

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DE PACIENTES
COM CARCINOMA MEDULAR DE TIREOIDE DO ESTADO DA
BAHIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Helton Estrela Ramos

Coorientadora: Dra. Taíse Lima de Oliveira Cerqueira

Salvador
2023

Esta pesquisa contou com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M435c Matta, Rafael Reis Campos da.
Caracterização clínica e molecular de pacientes com carcinoma medular de tireoide do estado da Bahia. / Rafael Reis Campos da. – Salvador, 2023.
84 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Helton Estrela Ramos
Coorientadora: Profa. Dra. Taíse Lima de Oliveira Cerqueira
Dissertação (Mestrado) – PPGPIOS/UFBA

1. Carcinoma Medular. 2. Mutação. 3. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. 4. Tireoidectomia. I. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde. II. Ramos, Helton Estrela. III. Cerqueira, Taíse Lima de Oliveira. IV. Título.

CDU 616.006.6(043)

Antonio José Menezes de Castro Neves – CRB-5/1821



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Instituto de Ciências da Saúde



PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS



TERMO DE APROVAÇÃO DA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO

RAFAEL REIS CAMPOS DA MATTA

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM CARCINOMA
MEDULAR DE TIREOIDE DO ESTADO DA BAHIA**

Salvador, Bahia, 27 de fevereiro de 2023

COMISSÃO EXAMINADORA:

DocuSigned by:

PROF. DR. HELTON ESTRELA RAMOS (Examinador Interno)

DocuSigned by:

PROFA. DRA. ACÁCIA FERNANDES LACERDA DE CARVALHO (Examinadora Interna)

DocuSigned by:

PROF. DR. CLEBER PINTO CAMACHO (Examinador Externo)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar todos os meus passos e permitir que eu concluísse mais uma jornada.

À minha mãe Rosana, à minha avó Dineusa e ao meu irmão Diego, pelo carinho, apoio e pelas palavras de incentivo ao longo do mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Helton Estrela, por acreditar no meu potencial e me confiar um projeto de grande relevância.

À minha coorientadora, Dra. Taíse Lima, pelos ensinamentos e pela presteza.

À Dra. Marli Viapina Camelier, à Prof^a. Dra. Ana Luiza Maia e a toda equipe do Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo suporte técnico e científico.

A Luciana Toralles, Juliana e a toda equipe do laboratório DNA, pela parceria nas coletas.

À Prof^a. Dra. Camila Alexandrina, ao Prof. Dr. Ryan dos Santos Costa e a toda equipe do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, pelo suporte nas etapas de centrifugação e coleta de *buffy coat*.

À Prof^a Dra. Acácia Fernandes e ao Prof. Dr. Cléber Camacho, pelas valiosas contribuições concedidas na qualificação e na defesa desta dissertação.

A Laiane Cruz, pelos ensinamentos, pelas sugestões, por todo apoio e cuidado e por sempre acreditar em mim.

Aos colegas Gabriel Rodriguez e Juliana Von Amon pela troca de experiências, pela ajuda na etapa inicial do projeto e pela parceria nos seminários e no tirocínio docente.

Ao colega Jocyel Brito, pelo auxílio na submissão do projeto na Plataforma Brasil.

À minha amiga Marcella Andrade pelas risadas e pela parceira nos trabalhos acadêmicos.

A todos os endocrinologistas, oncologistas e cirurgiões de cabeça e pescoço que encaminharam pacientes para este estudo.

Aos pacientes que participaram deste estudo, pela confiança, colaboração e presteza.

Ao funcionário do Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Carlos Alberto, por sempre se colocar a disposição para solucionar problemas, pelo profissionalismo e pelo incentivo.

Meu muito obrigado!!!

MATTA, Rafael Reis Campos da. **Caracterização clínica e molecular de pacientes com carcinoma medular de tireoide do estado da Bahia**. 84 f. il. Orientador: Helton Estrela Ramos. 2023. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

RESUMO

Introdução: O carcinoma medular de tireoide é um câncer raro que tem origem nas células C e pode se apresentar na forma esporádica (75%) ou hereditária (25%), como componente das síndromes de neoplasia endócrina múltipla tipo 2. Tanto a doença esporádica quanto a doença hereditária têm como principal causa as mutações no proto-oncogene *RET*. Sua incidência e suas bases moleculares ainda são desconhecidas e pouco investigadas, sobretudo em estados do Nordeste do país. Na Bahia, ainda não há registro de estudos que tenham investigado o comportamento e as características dessa doença na região. **Objetivo:** Caracterizar clínica e molecularmente pacientes com carcinoma medular de tireoide no estado da Bahia. **Metodologia:** Estudo transversal e descritivo que envolveu pacientes com diagnóstico histopatológico da doença, encaminhados para realização do teste molecular, no período de 2020 a 2022. Os dados clínicos-patológicos foram coletados a partir dos laudos anatomopatológicos e imuno-histoquímicos dos pacientes. O DNA genômico foi extraído a partir do sangue periférico. Os éxons 10, 11, 13, 14 e 15 do *RET* foram amplificados por reação em cadeia da polimerase e, posteriormente, sequenciados pelo método de Sanger. **Resultados:** Incluíram-se 29 pacientes no estudo (82,8% do sexo feminino). A idade média do diagnóstico foi de $46,5 \pm 13,1$ anos e o tamanho médio do tumor de $2,1 \pm 1,4$ cm. Invasão capsular, invasão extratireoidiana e invasão angiolinfática ocorreram em 13,8%, 3,4% e 6,9% dos casos, respectivamente. De acordo com a classificação TNM, 38% dos tumores foram estadiados como T1a, 27,6% T1b, 24,1% T2 e 10,3% T3. Metástase linfonodal regional (N1) esteve presente em 44,8% dos casos. A presença de metástase a distância (M1) para o mediastino foi observada em um caso (3,4%). Variantes do proto-oncogene *RET* foram identificadas em 55,2% dos pacientes. A variante patogênica C634R foi identificada em um paciente (3,4%). Polimorfismos do *RET* foram identificados em 51,7% dos pacientes, sendo L769L o polimorfismo mais frequente. **Discussão:** *RET* C634R está associada ao diagnóstico de neoplasia endócrina múltipla tipo 2A, sendo descrita na literatura como a variante patogênica mais frequente (30-50%) entre os pacientes afetados. **Conclusão:** Este estudo descreveu, pela primeira vez, o perfil clínico e molecular de pacientes com carcinoma medular de tireoide na Bahia. Uma variante patogênica germinativa do *RET* foi identificada confirmando o diagnóstico de neoplasia endócrina múltipla tipo 2A em um paciente. Polimorfismos do proto-oncogene *RET* foram identificados em 51,7% dos pacientes.

Descritores: carcinoma medular; mutação; polimorfismo de nucleotídeo único; tireoidectomia.

MATTA, Rafael Reis Campos da. **Clinical and molecular characterization of patients with medullary carcinoma of the thyroid in the state of Bahia.** 84 s. ill. Advisor: Helton Estrela Ramos. 2023. Dissertation (Master's degree) - Postgraduate Program in Interactive Processes of Organs and Systems, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2023.

ABSTRACT

Introduction: Medullary carcinoma of the thyroid (MCT) is a rare cancer that originates from C cells and may be sporadic (75%) or hereditary (25%) as a component of multiple endocrine neoplasia syndrome. Both sporadic disease and hereditary disease are due to mutations in the RET protooncogene mainly. MCT incidence and its molecular basis is still unknown and little investigated, especially in the northeastern states of the country. In Bahia, there are still no records of studies that have investigated the behavior and characteristics of this disease in the region. **Objective:** To characterize clinically and molecularly patients with MCT in the state of Bahia. **Methodology:** Cross-sectional and descriptive study involving patients with histopathological diagnosis of MCT which were submitted to DNA analysis from 2020 to 2022. Clinical pathology data were collected from the patients' anatomopathological and immunohistochemical reports. Genomic DNA was extracted from peripheral blood. Exons 10, 11, 13, 14 and 15 from the RET were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) and subsequently they were sequenced by the Sanger method. **Results:** Clinical data: 29 patients were included in the study (82.8% female). The mean age from diagnosis was 46.5 ± 13.1 years and mean tumor size was 2.1 ± 1.4 cm. Capsular, blood vessel and lymphatic invasion and extrathyroidal invasion occurred in 13.8%, 6.9% and 3.4% of cases, respectively. According to the TNM classification, 38% of the tumors were staged as T1a, 27.6% T1b, 24.1% T2 and 10.3% T3. Regional lymph node metastasis (N1) was present in 44.8% of cases. The presence of distant metastasis (M1) to the mediastinum was observed in one case (3.4%). RET protooncogene variants were identified in 55.2% of patients. The pathogenic variant C634R was identified in one patient (3.4%). RET polymorphisms were identified in 51.7% of patients, from which L769L was the most frequent polymorphism. **Discussion:** RET C634R is associated with the diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 2A and it is described in literature of the area as the most frequent pathogenic variant (30-50%) among affected patients. **Conclusion:** The study described unprecedentedly the clinical and molecular profile of patients with medullary carcinoma of the thyroid in Bahia. A germline pathogenic variant of RET was identified confirming the diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 2A in one patient. RET protooncogene polymorphisms were identified in 51.7% of patients.

Descriptors: medullary carcinoma; mutation; single-nucleotide polymorphism; thyroidectomy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura do receptor RET.....	26
Figura 2	Ligantes do receptor RET e seu mecanismo de ativação	28
Figura 3	Vias de sinalização ativadas pela autofosforilação de resíduos de tirosina.....	29
Figura 4	Mutações pontuais do proto-oncogene <i>RET</i> associadas a NEM2	30
Figura 5	Associação entre presença e ausência de metástase linfonodal e idade ao diagnóstico e tamanho do tumor.....	49
Figura 6	Eletroferograma evidenciando a variante patogênica C634R identificada em heterozigose no paciente 15.....	51
Figura 7	Heredograma do paciente portador da variante patogênica C634R	52
Figura 8	Análise dos polimorfismos do gene <i>RET</i> e aspectos clínicos como idade ao diagnóstico e tamanho do tumor.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Visão geral dos tumores de tireoide segundo a classificação de tumores da OMS 2022	14
Tabela 2	Fenótipos e manifestações clínicas da NEM2	20
Tabela 3	Correlação genótipo-fenótipo e risco de CMT agressivo na NEM2	33
Tabela 4	Momento de realização da tireoidectomia profilática na NEM2, de acordo com as recomendações da American Thyroid Association	34
Tabela 5	Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR	42
Tabela 6	Dados clínico-patológicos dos 29 pacientes com CMT do estado da Bahia	46
Tabela 7	Achados histopatológicos e imuno-histoquímicos nos 29 casos de CMT do estado da Bahia.....	48
Tabela 8	Frequência alélica mínima global e classificação das variantes do proto-oncogene <i>RET</i> identificadas via sequenciamento de Sanger	50
Tabela 9	Variantes do proto-oncogene <i>RET</i> identificadas nos 29 pacientes com CMT do estado da Bahia.....	51
Tabela 10	Análise de predição da patogenicidade das variantes C634R, G691S e Y791. 54	
Tabela 11	Análise de predição dos efeitos das variantes C634R, G691S e Y791N sobre a estabilidade da proteína	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
AMP	Association for Molecular Pathology
ARTN	<i>Artemin</i>
Bp	<i>Base pairs</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CFT	Carcinoma folicular de tireoide
CK	<i>Cytokeratin</i>
CLA	<i>Cutaneous lichen amyloidosis</i>
CLD	<i>Cadherin Like-Domains</i>
CMT	Carcinoma medular de tireoide
CMTF	Carcinoma medular de tireoide familiar
CPT	Carcinoma papilífero de tireoide
CRD	<i>Cystein Rich-Domain</i>
Ct	Calcitonina
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
DOK1	<i>Docking protein 1</i>
DOK2	<i>Docking protein 2</i>
DOK3	<i>Docking protein 3</i>
DOK4	<i>Docking protein 4</i>
DOK5	<i>Docking protein 5</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FEO	Feocromocitoma
FRS2	<i>Fibroblast growth factor substrate 2</i>
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GFL	<i>GDNF-family ligand</i>
GFRα	<i>GDNF-family receptor-α</i>
GMAF	<i>Global minor allele frequency</i>
GPI	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>

Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
Grb7	<i>Growth factor receptor-bound protein 7</i>
Grb10	<i>Growth factor receptor-bound protein 10</i>
H	<i>High</i>
HD	<i>Hirschsprung's disease</i>
HPTP	Hiperparatireoidismo primário
HST	<i>Highest</i>
IC	Intervalo de Confiança
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
ID	<i>Identifier</i>
IM	Índice mitótico
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP3	<i>Inositol 1,4,5-triphosphate</i>
IRS1	<i>Insulin receptor substrate 1</i>
IRS2	<i>Insulin receptor substrate 2</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
Kb	<i>Kilobase</i>
kDa	<i>Kilodalton</i>
LET	Laboratório de Estudo da Tireoide
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MOD	<i>Moderate</i>
mRNA	RNA mensageiro
NEM2	Neoplasia endócrina múltipla tipo 2
NEM2A	Neoplasia endócrina múltipla tipo 2A
NEM2B	Neoplasia endócrina múltipla tipo 2B
NRTN	<i>Neurturin</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PLCγ	<i>Phospholipase C γ</i>
PSPN	<i>Persephin</i>

RAP1GAP	<i>RAP1 GTPaseactivating protein 1</i>
RAS	<i>RAt Sarcoma</i>
RET	<i>REarranged during Transfection</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
Shank3	<i>SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3</i>
SHC	<i>Src-homologous and collagen-like protein</i>
SHP2	<i>Src homology region 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-2</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SP	<i>Signal peptide</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TK	<i>Tyrosine kinase</i>
TKD	<i>Tyrosine kinase domain.</i>
TMD	<i>Transmembrane domain</i>
TNM	<i>Tumor, node, metastasis</i>
TTF-1	<i>Thyroid transcription factor 1</i>
UFBA	Universidade Federal da Bahia
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 CARCINOMA MEDULAR DE TIREOIDE	18
2.1 EPIDEMIOLOGIA.....	18
2.2 ESPECTRO CLÍNICO DO CMT.....	19
2.2.1 CMT Esporádico	19
2.2.2 CMT Hereditário	19
2.3 MARCADORES BIOQUÍMICOS DO CMT	21
2.4 MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS DO CMT	23
3 PROTO-ONCOGENE <i>RET</i>	25
3.1 RECEPTOR TIROSINA QUINASE <i>RET</i> : ESTRUTURA, FUNÇÃO E SINALIZAÇÃO	25
3.2 MUTAÇÕES DO PROTO-ONCOGENE <i>RET</i> NO CMT	29
3.3 CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO NO CMT	32
3.4 POLIMORFISMOS DO PROTO-ONCOGENE <i>RET</i> NO CMT	35
4 OBJETIVOS	39
4.1 OBJETIVO GERAL.....	39
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
5 MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1 DESENHO DO ESTUDO	40
5.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	40
5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E NÃO INCLUSÃO.....	40
5.4 COLETA DOS DADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS	40
5.5 COLETA DE SANGUE E EXTRAÇÃO DE DNA.....	41
5.6 GENOTIPAGEM	41
5.6.1 Reação em Cadeia da Polimerase	41
5.6.2 Sequenciamento do DNA	42
5.7 CLASSIFICAÇÃO DAS VARIANTES DO <i>RET</i>	43
5.8 ANÁLISE <i>IN SÍLICO</i>	43
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5.10 ASPECTOS ÉTICOS	44
6 RESULTADOS	45
6.1 DADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS.....	45

6.2 GENOTIPAGEM DO PROTO-ONCOGENE <i>RET</i>	50
6.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIANTES DO <i>RET</i> E AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS PACIENTES	52
6.4 ANÁLISE <i>IN SÍLICO</i> DAS VARIANTES DO <i>RET</i>	53
7 DISCUSSÃO	55
8 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	76
ANEXO - Parecer Consubstanciado do CEP-ICS/UFBA	81

1 INTRODUÇÃO

O câncer de tireoide é o mais comum do sistema endócrino. Nas últimas décadas, sua incidência aumentou substancialmente em todo o mundo, passando de 95.030 casos no ano de 1990 para 255.490 casos em 2017¹. Estatísticas recentes indicam que o câncer de tireoide é responsável por 586 mil novos casos de câncer em todo o mundo, correspondendo a 3% da incidência global de todos os cânceres².

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de novos casos de câncer de tireoide estimados para o Brasil, em cada ano do triênio 2020 a 2022, é de 1.830 casos novos em homens e de 11.950 em mulheres³. Esses valores correspondem a um risco estimado de 1,72 casos novos em cada 100 mil homens e 11,15 para cada 100 mil mulheres³.

Com base em sua citogênese, suas características histológicas e (ou) moleculares e seu comportamento biológico, os tumores da tireoide podem ser classificados em: anormalidades do desenvolvimento, neoplasias derivadas de células foliculares, carcinoma derivado de células C da tireoide, carcinomas mistos derivados de células medulares e foliculares, carcinomas da tireoide tipo glândula salivar, tumores de tireoide de histogênese incerta, tumores tímicos na tireoide e neoplasias embrionárias da tireoide⁴ (Tabela 1).

Tabela 1. Visão geral dos tumores de tireoide segundo a classificação de tumores da OMS 2022.

1. Anormalidades do desenvolvimento

- a) Cisto do ducto tireoglossos
- b) Outras anormalidades congênitas da tireoide

2. Neoplasias derivadas de células foliculares

2.1 Tumores benignos

- a) Doença nodular folicular da tireoide
- b) Adenoma folicular da tireoide
- c) Adenoma folicular com arquitetura papilar
- d) Adenoma oncocítico da tireoide

2.2 Neoplasias de baixo risco

- a) Neoplasia folicular não invasiva da tireoide com características nucleares semelhantes às papilares
- b) Tumores de tireoide de potencial maligno incerto
 - I) Tumor folicular de potencial maligno incerto
 - II) Tumor bem diferenciado de potencial maligno incerto
- c) Tumor Trabecular Hialinizante

Continua

Tabela 1. Visão geral dos tumores de tireoide segundo a classificação de tumores da OMS 2022.

Continuação

2.3 Neoplasias Malignas

- a) Carcinoma folicular da tireoide
- b) Carcinoma papilífero variante folicular encapsulado invasivo
- c) Carcinoma papilar da tireoide
- d) Carcinoma oncocítico da tireoide
- e) Carcinomas de origem folicular de alto grau
 - I) Carcinoma diferenciado de tireoide de alto grau
 - II) Carcinoma de tireoide pouco diferenciado
- f) Carcinoma de tireoide derivado de células foliculares anaplásicas

3. Carcinoma derivado de células C da tireoide

- a) Carcinoma medular da tireoide

4. Carcinomas mistos derivados de células medulares e foliculares

- a) Carcinoma misto medular-folicular
- b) Carcinoma misto medular-papilar

5. Carcinomas da tireoide tipo glândula salivar

- a) Carcinoma mucoepidermóide da tireoide
- b) Carcinoma secretor do tipo glândula salivar

6. Tumores de tireoide de histogênese incerta

- a) Carcinoma mucoepidermóide esclerosante com eosinofilia
- b) Carcinoma morular de tireoide cribriforme

7. Tumores tímicos na tireoide

- a) Família Timoma
- b) Tumor epitelial fusiforme com elementos semelhantes ao timo
- c) Família de carcinoma tímico
 - I) Carcinoma tímico intratireoidiano

8. Neoplasias embrionárias da tireoide

- a) Tiroblastoma

Fonte: Adaptado de World Health Organization (2022)⁴.

O carcinoma medular de tireoide (CMT) é um tipo de câncer raro, cuja origem está nas células C produtoras do hormônio calcitonina, que, assim, torna-se importante marcador, sensível e específico para a presença da doença⁵. O CMT pode ocorrer como doença esporádica ou como parte de um distúrbio hereditário denominado neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (NEM2). Tanto a doença esporádica, quanto a hereditária têm como principal causa as mutações no proto-oncogene *RET*.

O proto-oncogene *RET* codifica o receptor tirosina quinase RET, proteína

transmembrar cuja ativação estimula vias de sinalização mediadoras da sobrevivência, diferenciação, proliferação e migração celular⁶. Desde a descoberta do *RET* em 1985⁷, diversos estudos mostraram que mutações nesse proto-oncogene estão associadas ao CMT. Os estudos também demonstraram que existe uma clara associação genótipo-fenótipo no CMT, uma vez que mutações específicas do *RET* levam a apresentações clínicas diferentes, com variações na apresentação clínica da doença como a idade de início e a agressividade do tumor.

Ainda não se sabe a etiologia do CMT esporádico, mas o proto-oncogene *RET* é reconhecidamente o gene que determina suscetibilidade para todas as formas de CMT familiar, seja quando estas fazem parte da NEM2, seja quando se apresentam como manifestação isolada⁸. Além disso, mutações somáticas no proto-oncogene *RET* em CMT esporádicos foram descritas em um número variável (19,4 a 88,9%) em diferentes populações⁹⁻¹⁶.

A demonstração de que a grande maioria dos pacientes com as formas hereditárias de CMT e uma parte dos CMT esporádicos apresentam mutações no proto-oncogene *RET* tornou possível a utilização desse gene como teste diagnóstico de rastreamento. A acurácia desse tipo de teste diagnóstico é próxima de 98-100%¹⁷. Também tem se recomendado a tireoidectomia profilática baseada no diagnóstico genético, uma vez que existe uma correlação entre o genótipo (o códon mutado do *RET*) com o fenótipo (a agressividade do CMT)^{18,19}. Além do resultado do teste genético, a decisão de submeter um paciente a tireoidectomia profilática também é baseada em dados clínicos adicionais, que incluem os achados ultrassonográficos cervicais e as concentrações séricas de calcitonina (Ct)¹⁸.

A identificação de mutações no proto-oncogene *RET* somada à avaliação clínica completa do paciente formam a base para o tratamento individualizado (medicina de precisão) no CMT. O momento de realização da tireoidectomia em crianças portadoras de mutações *RET* associadas a risco moderado de CMT agressivo, por exemplo, deve ser baseado na detecção de concentração séricas elevadas de Ct, além de ser influenciado pelo histórico familiar e/ou preferência dos pais¹⁸.

A triagem genética do *RET* é considerada, portanto, ferramenta chave para o diagnóstico do CMT e tem implicações importantes para o manejo clínico dos pacientes e de suas famílias. Quando uma mutação *RET* é identificada em um paciente, todos os seus parentes de primeiro grau são orientados a realizar a avaliação genética, o que favorece o diagnóstico e o tratamento precoce desses familiares²⁰.

Tendo em vista que até o presente momento, não há registro de estudos e projetos de

pesquisa envolvendo a investigação do proto-oncogene *RET* em pacientes com CMT, no estado da Bahia, e que o rastreio molecular das mutações do proto-oncogene *RET* ainda não foi implementado na rotina diagnóstica dos pacientes do estado, o presente estudo teve como objetivo caracterizar clínica e molecularmente pacientes com diagnóstico anatomopatológico de CMT do estado da Bahia.

2 CARCINOMA MEDULAR DE TIROIDE

Esta seção constitui-se na base teórica da pesquisa e compreende aspectos relacionados à epidemiologia, à apresentação clínica e às características bioquímicas e imuno-histoquímicas do CMT, distribuídos em quatro subseções, conforme detalhamento a seguir.

2.1 EPIDEMIOLOGIA

O CMT é um tumor raro, derivado das células C ou parafoliculares da glândula. Essa neoplasia representa 1 a 2% de todas as malignidades da tireoide nos EUA¹⁸ e estima-se que seja diagnosticada em 0,4 a 1,4% dos pacientes com nódulos tireoidianos²¹. A incidência exata do CMT é desconhecida, embora tenha sido relatado um aumento de 0,14 para 0,21 por 100 mil habitantes entre 1983 e 2012, nos EUA²².

Embora possa ocorrer em qualquer idade, o CMT tem pico de incidência entre a 4ª e a 5ª década de vida²¹ com idade média do diagnóstico entre 50 e 54 anos²². O CMT representa, aproximadamente, 13% do total de mortes atribuíveis ao câncer de tireoide²³ e a taxa de mortalidade específica pela doença em cinco anos é de 13,5%²⁴.

Estudo recente sobre as tendências na incidência do câncer de tireoide por subtipo histológico em 25 países²⁵ mostrou que entre os anos 2008 a 2012 as taxas de incidência padronizadas por idade para o CMT nunca excederam 1 caso por 100 mil mulheres, com valores na faixa de 0,2 a 0,6 casos por 100 mil mulheres para 18 dos 25 países (o valor mais alto foi de 0,82 casos por 100 mil mulheres na Itália). No mesmo período, as taxas de CMT padronizadas por idade variaram entre 0,2 e 0,4 casos por 100 mil homens em 18 dos 25 países, com o valor mais alto registrado na Áustria (0,62 por 100 mil homens)²⁵.

Entre os países da América Central e do Sul, o Brasil foi o que mais apresentou casos de CMT entre os anos 2003 e 2007²⁶. Foram 147 casos em pacientes do sexo feminino e 53 em pacientes do sexo masculino. As taxas de incidência padronizadas por idade para o CMT no país foram de 0,2 casos por 100 mil mulheres e 0,1 casos por 100 mil homens²⁶.

Borges *et al.*²⁷, em estudo descritivo dos casos de câncer de tireoide no Brasil informados por registros hospitalares entre os anos 2000 a 2016, demonstraram que o CMT foi diagnosticado em 2% dos casos. O estudo também mostrou que o número de casos de CMT foi maior na região Sudeste (51,7%), com a região Nordeste aparecendo em segundo lugar (23,8%)²⁷.

2.2 ESPECTRO CLÍNICO DO CMT

O CMT pode ser esporádico ou hereditário em 75 a 80% e 20 a 25% dos casos, respectivamente²⁸.

2.2.1 CMT Esporádico

O CMT esporádico pode apresentar-se clinicamente como um nódulo tireoidiano solitário suspeito, com ou sem linfonodo cervical acometido²⁹. Os pacientes normalmente apresentam massa cervical palpável, além de rouquidão, disfagia e (ou) problemas respiratórios³⁰. Rubor, diarreia e (ou) perda de peso são sintomas que também podem ocorrer em razão das altas concentrações de calcitonina secretadas por esses tumores³¹. O CMT esporádico normalmente é unifocal e tem pico de incidência entre a 4ª e a 6ª décadas de vida^{30,32}.

A doença esporádica é também caracterizada pela manifestação precoce de acometimento cervical em seu curso clínico²⁹. No diagnóstico inicial, 35 a 50% dos pacientes apresentam acometimento dos linfonodos³⁰. Além disso, 10 a 15% dos pacientes podem apresentar metástases a distância no momento do diagnóstico³¹. As metástases a distância ocorrem mais comumente no mediastino, pulmões, fígado e ossos^{29,31}. O CMT esporádico apresenta curso clínico, muitas vezes imprevisível, havendo casos de progressão rápida e letal da doença ou com sobrevida longa por várias décadas, apesar de incurável, ou casos mais indolentes, curáveis após tireoidectomia³³.

2.2.2 CMT Hereditário

O CMT hereditário é transmitido como uma herança autossômica dominante, sendo o principal componente da síndrome da NEM2. Diferentemente do CMT esporádico que, normalmente, manifesta-se como um nódulo unilateral solitário, o CMT hereditário é, geralmente, multifocal e bilateral, com o tumor permanecendo restrito à glândula tireoide por tempo indeterminado, antes de metastatizar para os linfonodos cervicais e, posteriormente, para locais distantes, como fígado, pulmão, osso e cérebro³⁴.

O CMT hereditário tende a ocorrer em idade mais precoce do que a forma esporádica e os pacientes também podem apresentar diarreia, rubor e (ou) perda de peso decorrentes da excessiva secreção de calcitonina pelo tumor^{30,31}. É importante ressaltar que na forma

hereditária do CMT, há grau variável de expressividade e penetrância²⁸.

A NEM2 apresenta incidência de 1 a cada 800 mil nascidos vivos³⁵. De acordo com as características clínicas e a presença de outras endocrinopatias associadas, é classificada em NEM2A e NEM2B. A NEM2A corresponde a aproximadamente 95% de todos os casos e é dividida em quatro subtipos: NEM2A clássica, NEM2A com líquen amiloide cutâneo (CLA, do inglês *Cutaneous lichen amyloidosis*), NEM2A com doença de Hirschsprung (HD, do inglês *Hirschsprung's disease*) e câncer medular de tireoide familiar (CMTF)³⁶. A Tabela 1 descreve as principais manifestações clínicas associadas à NEM2.

Tabela 2- Fenótipos e manifestações clínicas da NEM2.

NEM2A				NEM2B
NEM2A clássica	NEM2A com CLA	NEM2A com HD	CMTF	
CMT	CMT	CMT	CMT	CMT
FEO	FEO	FEO	Sem FEO	FEO
HPTP	HPTP	HPTP	Sem HPTP	Sem HPTP
	Prurido	Aganglionose intestinal		Ganglioneuromatose
	Lesões cutâneas			Hábito marfanoide
				Hipertrofia do nervo corneano
				Alacrimia

Fonte: Adaptado de Mathiesen *et al.*³⁶ (2022).

Legenda: NEM2A = Neoplasia endócrina múltipla tipo 2A; NEM2B = Neoplasia endócrina múltipla tipo 2B; CLA = *Cutaneous lichen amyloidosis*; HD = *Hirschsprung's disease*; CMTF = Carcinoma medular de tireoide familiar; CMT = Carcinoma medular de tireoide; FEO = Feocromocitoma; HPTP = Hiperparatireoidismo primário.

A **NEM2A clássica** é o subtipo mais comum e é caracterizada por CMT em associação com feocromocitoma (FEO) e hiperparatireoidismo primário (HPTP)³⁷. Nesse subtipo, as frequências de CMT, FEO e HPTP, são, respectivamente, 95 a 100%, 30 a 50% e 10 a 30%^{5,38}. O diagnóstico clínico da NEM2A pode ser feito caso o paciente ou seus parentes de primeiro grau apresentem, no mínimo, duas características clínicas clássicas da doença³⁷.

A **NEM2A com CLA** é um subtipo raro caracterizado pela presença de lesões cutâneas na região escapular do dorso, como consequência da deposição de amiloide, que

resultam em prurido e coceira repetitiva³⁴. O prurido melhora com a exposição ao sol e piora em períodos de estresse³⁸.

A **NEM2A com HD** é outro subtipo raro, caracterizado pela ausência de gânglios autônomos que afetam o sistema nervoso entérico, resultando em obstrução intestinal, constipação e motilidade intestinal alterada, além de outros sintomas gastrointestinais³⁹.

O **CMTF** é caracterizado pela presença de CMT isolado em quatro ou mais membros de uma família afetada. No CMTF, o CMT tem início tardio e curso clínico menos agressivo, apresentando prognóstico mais favorável em relação às outras formas de CMT^{19,25}. Considerado uma síndrome autônoma no passado, hoje o CMTF é reconhecido como uma variante fenotípica do espectro NEM2A¹⁸.

A NEM2B é responsável por 5% de todos os casos de NEM2²⁸. Pacientes com NEM2B apresentam um fenótipo complexo, que inclui CMT, FEO, ganglioneuromatose generalizada, hábito marfanoide e anormalidades oftalmológicas^{18,34}. As frequências de CMT, feocromocitoma, ganglioneuromatose e hábito marfanoide são, respectivamente, de 90 a 97%, 45 a 50%, 97 a 100% e 65 a 73%^{28,40}. A NEM2B é caracterizada pelo desenvolvimento de CMT agressivo de início precoce, geralmente na infância¹⁸. Nessa síndrome, o CMT está frequentemente associado à extensão extratireoidiana e a metástases regionais e a distância³².

2.3 MARCADORES BIOQUÍMICOS DO CMT

As células C da glândula tireoide secretam a Ct, peptídeo monomérico de 32 aminoácidos, que age como antagonista do paratormônio. A Ct é produzida tanto por células C normais, quanto por células C neoplásicas⁴¹, sendo um importante marcador tumoral para o diagnóstico do CMT.

Concentrações basais de Ct estão elevadas no CMT. Normalmente, concentrações >100 pg/ml são encontrados na maioria dos pacientes diagnosticados com essa neoplasia³⁰. Um estudo demonstrou que concentrações de corte pré-definidos de Ct basal específicos para o sexo (>23 pg/ml para mulheres e >43 pg/ml para homens) foram úteis para a detecção precoce do CMT⁴². Ainda segundo o mesmo estudo, concentrações de corte de Ct >85 pg/ml para mulheres e >100 pg/ml para homens foram sugestivos para prever metástases em linfonodos laterais cervicais⁴².

A Ct pré-operatória também pode ser utilizada como marcador prognóstico. Park *et al.*⁴³ demonstraram que as concentrações séricas de Ct pré-operatórias estavam intimamente associadas ao tamanho do tumor primário e ao número metástases linfonodais; ademais, o

aumento da Ct sérica pré-operatória estava correlacionado com a extensão do tumor. Ainda segundo esses autores, pacientes com metástase linfonodal lateral ipsilateral, metástase linfonodal lateral contralateral e metástase a distância apresentavam limiares séricos de Ct pré-operatórios de 20,1; 200,1 e 500,1 pg/ml, respectivamente⁴³.

A Ct é considerada um marcador bioquímico altamente sensível e específico para o CMT. Entretanto, existem muitas limitações quanto à utilização da dosagem de Ct como método de diagnóstico. Os fatores limitantes incluem problemas de padronização dos valores de referência, métodos laboratoriais, falsos positivos, relação entre custo e benefício na sua utilização como rastreio, sobretudo ao considerar a baixa prevalência do CMT^{20,44}. Além disso, diferentes condições fisiológicas e patológicas elevam as concentrações de Ct, tais como período neonatal, lactação, insuficiência renal grave, distúrbios autoimunes da tireoide ou tumor folicular, hipercalcemia crônica, hipergastrinemia e tumores neuroendócrinos que surgem do pâncreas, do intestino anterior ou do trato respiratório^{32,45}.

Apesar de não existir um consenso a respeito da utilização da dosagem da Ct sérica na avaliação de nódulos da tireoide, a Ct segue como marcador tumoral mais importante no CMT, uma vez que é útil para o diagnóstico e para o planejamento das ações de manejo clínico²⁸.

Além da Ct, as células C neoplásicas do CMT também secretam o antígeno carcinoembrionário (CEA, do inglês *carcinoembryonic antigen*). Embora o CEA seja um marcador tumoral menos sensível que a Ct, a dosagem de suas concentrações séricas pode ser utilizada na estratificação de risco de pacientes com CMT²⁰.

As concentrações de CEA encontram-se elevadas em >50% dos pacientes com CMT³⁰. Nos casos em que há presença de metástase em linfonodos centrais e laterais (ipsilaterais), as concentrações de CEA são >30 ng/ml⁴⁶. Pacientes com metástases linfonodais laterais (contralaterais) e a distância apresentam níveis de CEA >100 ng/ml^{31,46}.

Um estudo demonstrou que os níveis pré-operatórios de Ct e CEA foram significativamente correlacionados com a extensão da doença no CMT⁴⁴. De acordo com esse estudo, concentrações de CEA >271 ng/ml estão associados a tamanho e a estadiamento avançado do tumor, à metástase para o compartimento cervical contralateral e à diminuição da chance de cura bioquímica. Ainda segundo o referido estudo, concentrações de CEA >500 ng/ml estão associados à mortalidade significativa do paciente⁴⁴.

Como o CEA não é um marcador bioquímico específico para o CMT, sua dosagem não tem utilidade para o diagnóstico precoce dessa doença¹⁸. Entretanto, a investigação das concentrações séricas de CEA é útil no acompanhamento dos pacientes, uma vez que altas

concentrações de CEA são indicativos de progressão rápida da doença e pior prognóstico^{41,45}.

Embora não exista relação próxima CEA e Ct, elevações simultâneas das concentrações séricas de ambos os marcadores tumorais indicam progressão do CMT¹⁸. Em alguns pacientes, o aumento progressivo das concentrações de CEA e a estabilidade ou queda das concentrações de Ct sugerem desdiferenciação tumoral e estão associados à doença avançada e a pior prognóstico^{31,41}.

2.4 MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS DO CMT

Por vezes, podem ocorrer variações no padrão histológico do CMT, fazendo com que ele seja confundido com carcinoma papilífero de tireoide (CPT), carcinoma folicular de tireoide (CFT), paraganglioma, linfoma ou sarcoma¹⁸. Nesses casos, o diagnóstico deve ser determinado por imuno-histoquímica. Diferentes proteínas podem apresentar imunocoloração positiva no CMT. Entretanto, apenas um pequeno número é útil ao diagnóstico e prognóstico da doença⁴⁷. Os marcadores imuno-histoquímicos mais úteis são Ct, CEA e cromogranina A¹⁸.

A maioria dos CMT apresenta coloração imuno-histoquímica positiva para Ct e CEA. A imunorreatividade das células do CMT para esses marcadores correlaciona-se às elevadas concentrações séricas de Ct e CEA, encontradas nos pacientes⁴⁷. A imunocoloração para Ct é extremamente valiosa no CMT, uma vez que, além de confirmar o diagnóstico, permite a identificação de eventos de angioinvasão tumoral e disseminação extracapsular de células tumorais⁴⁷.

A cromogranina A é um poderoso marcador universal de tecidos e tumores neuroendócrinos⁴⁸. Pacientes com CMT apresentam elevadas concentrações de cromogranina A e sua dosagem é útil no acompanhamento da progressão do tumor¹⁹. As células tumorais do CMT também apresentam imunorreatividade para citoqueratinas (CK, do inglês *cytokeratin*), principalmente CK7 e CK20, e para o fator de transcrição da tireoide 1 (TTF-1, *thyroid transcription factor 1*)¹⁸. Outro importante achado imuno-histoquímico em células do CMT é a ausência de expressão da tireoglobulina^{18,47}.

O Ki-67 é um marcador imuno-histoquímico de proliferação, muito utilizado nas investigações de tumores tireoidianos. O Ki-67 é utilizado para diferenciar lesões neoplásicas da tireoide das não neoplásicas, bem como para distinguir tumores de baixo grau dos de alto grau⁴⁹. No CMT, altos índices de Ki-67 foram associados a metástases linfonodais recorrentes, disseminação extratireoidiana, metástase a distância, estágio avançado da doença

e baixa sobrevida global^{50,51}.

Além de ser utilizado como marcador prognóstico, o Ki-67 também é útil na classificação de risco dos pacientes com CMT^{50,51}. O índice Ki-67 é um dos parâmetros utilizados pelo *Sistema Internacional de Classificação de Carcinoma Medular de Tireoide*, proposto e validado recentemente por um grande estudo multicêntrico⁵². Além do Ki-67, esse sistema se baseia também no valor de índice mitótico (IM) e na presença ou ausência de necrose tumoral para classificar os CMT em baixo grau e alto grau. O CMT é considerado de baixo grau quando apresenta $IM < 5$ mitoses/mm², $Ki-67 < 5\%$ e ausência de necrose tumoral, enquanto é considerado de alto grau se apresentar, pelo menos, uma das três características a seguir: $IM \geq 5$ mitoses/mm², $Ki-67 \geq 5\%$ ou presença de necrose tumoral⁵².

3 PROTO-ONCOGENE *RET*

O proto-oncogene *RET* (*REarranged during Transfection*) foi identificado pela primeira vez em 1985, a partir da transfecção de células NIH 3T3 com DNA de linfoma humano⁷. Ele codifica o receptor tirosina quinase RET, uma proteína transmembranar expressa principalmente em células derivadas da crista neural e urogenitais⁵³⁻⁵⁵. A expressão do receptor RET também foi observada em tumores neuroendócrinos, incluindo neuroblastoma, feocromocitoma e CMT⁵⁶⁻⁵⁸.

O proto-oncogene *RET* está localizado no cromossomo 10 (10q11.2) humano, é formado por 21 éxons e tem tamanho estimado em cerca de 52kb^{6,59}. *RET* é evolutivamente conservado e formas homólogas desse gene foram encontradas em outras espécies, como moscas-da-fruta (*Drosophila melanogaster*), peixes-zebra (*Danio rerio*), ratos (*Rattus norvegicus*) e camundongos (*Mus musculus*)⁶⁰⁻⁶⁴.

3.1 RECEPTOR TIROSINA QUINASE RET: ESTRUTURA, FUNÇÃO E SINALIZAÇÃO

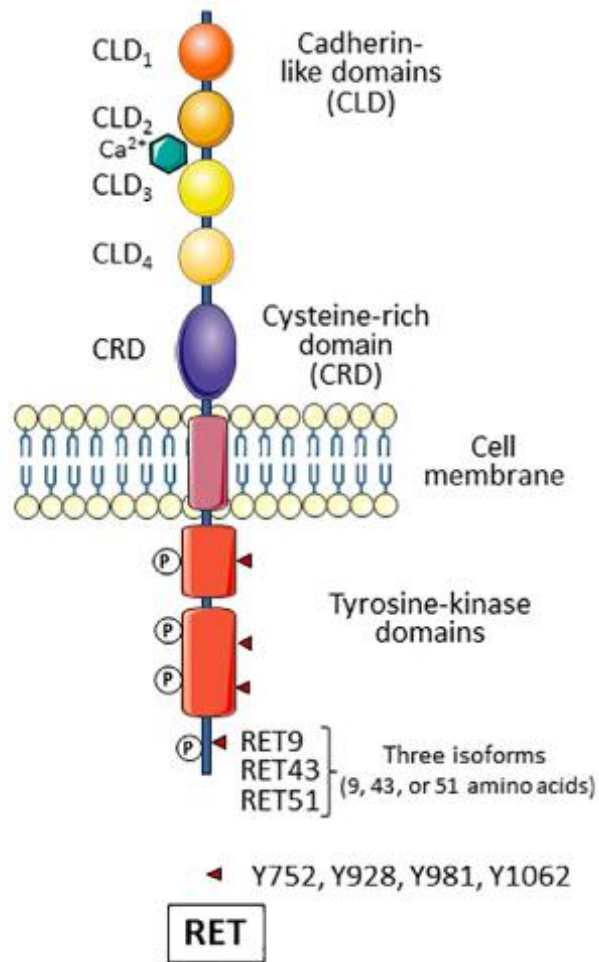
O receptor tirosina quinase RET, como proteína transmembrana, é composto por um domínio extracelular de ligação; um domínio transmembranar e um domínio intracelular tirosina quinase^{65,66} (Figura 1). O domínio extracelular, correspondente a região N-terminal de RET, apresenta quatro repetições do tipo caderina, denominadas domínios semelhantes à caderina (CLD, do inglês *cadherin like-domains*), cada um com 110 aminoácidos^{67,68}. Um sítio de ligação ao cálcio está localizado entre o CLD 2 e o CLD 3^{67,68}. A ligação ao cálcio é fundamental para a funcionalidade do receptor RET e para sua capacidade de interação com o ligante⁶⁹.

Após os CLD, há um domínio rico em cisteína (CRD, do inglês *cystein rich-domain*) com 120 resíduos ligados ao domínio transmembranar^{68,69}. Nesse domínio, as cisteínas unem-se entre elas através de ligações covalentes intramoleculares, ajudando a gerar a estrutura terciária do RET à medida que também dobra-se ao redor da bolsa de ligação ao ligante. Portanto, o domínio rico em cisteína é essencial à conformação terciária e à dimerização da tirosina quinase RET, através da formação de ligações dissulfeto⁶⁶.

O domínio extracelular do receptor RET contém 12 sítios de glicosilação responsáveis por sua maturação⁶⁸. Após N-glicosilação do domínio extracelular no aparato de Golgi e posterior modificação pós-traducional, RET torna-se uma proteína madura e funcional de 170 kDa⁷⁰. Cabe ressaltar que a forma imatura não glicosilada de RET (150 kDa) é encontrada

apenas no retículo endoplasmático⁷⁰.

Figura 1- Estrutura do receptor RET. O receptor RET é uma proteína tirosina quinase transmembrana composta de um domínio extracelular, um domínio transmembranar e um domínio intracelular tirosina quinase. O domínio extracelular é formado por quatro CLDs (1, 2, 3 e 4), um sítio de ligação ao cálcio e um CRD. O *splicing* alternativo do *RET* produz três isoformas com 9, 43 e 51 aminoácidos em suas caudas C-terminais (RET 9, RET 43 e RET 51, respectivamente).



Fonte: Adaptado de Rochete *et al.*⁷¹ (2020).

O domínio intracelular do receptor RET apresenta uma região justamembranar formada por 50 aminoácidos, um domínio tirosina quinase (do inglês, *tyrosine kinase-domain*) separado por um ligante de 14 aminoácidos e uma cauda C-terminal composta por 100 aminoácidos⁶⁹. O domínio tirosina quinase está associado à ativação de diversas vias de sinalização intracelular, através de resíduos de tirosina específicos, nos quais se ligam proteínas adaptadoras⁶⁵.

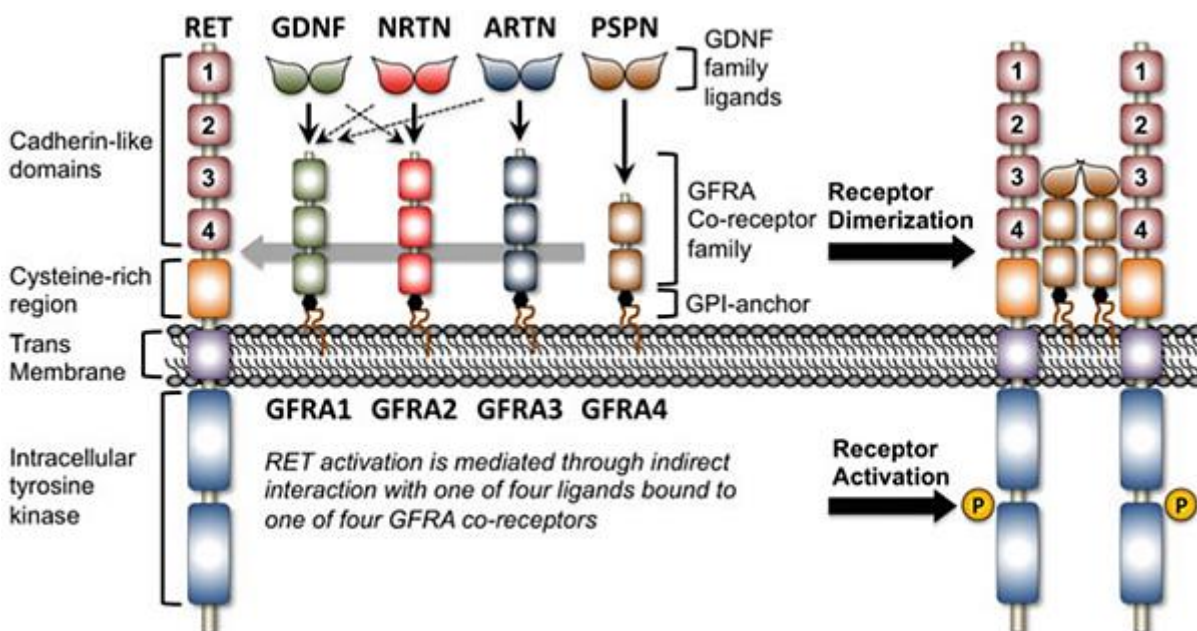
Três isoformas da proteína RET são geradas por *splicing* alternativo na região 3'.

Denominadas de isoformas curta, média e longa, RET 9, RET 43 e RET 51, apresentam, respectivamente, 9, 43 e 51 aminoácidos distintos em suas caudas C-terminais^{72,73} (Figura 1). As três isoformas são coexpressas na maioria dos tecidos adultos. Entretanto os transcritos RET 9 e RET 51 são relativamente mais abundantes quando comparados a RET 43⁷³. RET 9 e RET 51 são altamente conservados em todos os vertebrados, sugerindo papéis funcionais importantes para essas isoformas, enquanto o RET 43 é expresso apenas em primatas⁷⁴.

O receptor RET é expresso em linhagens de células neurais, neuroendócrinas e urogenitais. Sua expressão ocorre em altos níveis no início da embriogênese e diminui para níveis muito baixos em tecidos adultos normais^{75,76}. Alta expressão de RET foi observada em neurônios entéricos e motores oriundos de tecidos embrionários e adultos de roedores^{54,75-78}, sugerindo papel fundamental da proteína na diferenciação e sobrevivência desses neurônios⁷⁹. RET também é expresso no sistema geniturinário, onde exerce papel crítico na morfogênese renal⁸⁰⁻⁸² e na regulação da espermatogênese⁸³⁻⁸⁵.

O receptor RET é ativado por ligantes pertencentes à família do fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais (GDNF, do inglês *glial cell line-derived neurotrophic factor*). Os ligantes da família GDNF (GFL, do inglês *GDNF-family ligand*) incluem GDNF, neurturina (NRTN, *neurturin*), artemina (ARTN, *artemin*) e perfesina (PSPN, *persephin*) (Figura 2). Como os GFLs não conseguem se ligar diretamente ao RET, correceptores adicionais de ligação ao ligante do grupo do receptor- α da família GDNF (GFR α , do inglês *GDNF-family receptor- α*) são recrutados⁶⁹. Os GFR α s são proteínas transmembrana de domínio intracelular curto⁷¹, que estão ancorados à membrana plasmática por glicosilfosfatidilinositol (GPI, do inglês *glycosylphosphatidylinositol*)⁸⁶ e promovem a formação do complexo GFL-GFR α , necessária à ativação do receptor RET. Quatro receptores GFR α foram identificados (GFR α 1-4) e cada um deles apresenta especificidade para um determinado GFL. A interação do complexo GFL-GFR α com o domínio extracelular de RET induz a dimerização do receptor e a consequente ativação da tirosina quinase intracelular^{66,86} (Figura 2).

Figura 2- Ligantes do receptor RET e seu mecanismo de ativação. RET é ativado por ligantes da família GDNF (GFLs). Os GFLs não interagem diretamente com o RET. Em vez disso, ligam-se a correceptores GFRA específicos (1 a 4), que ficam ancorados à membrana plasmática por GPI. O complexo GFL-GFRA se liga ao receptor RET, induzindo sua dimerização e a consequente fosforilação do domínio tirosina quinase intracelular. Setas sólidas indicam interação GFL e GFRA primária. Setas pontilhadas indicam interação GFL e GFRA secundária.



Fonte: Raue⁸ (2015).

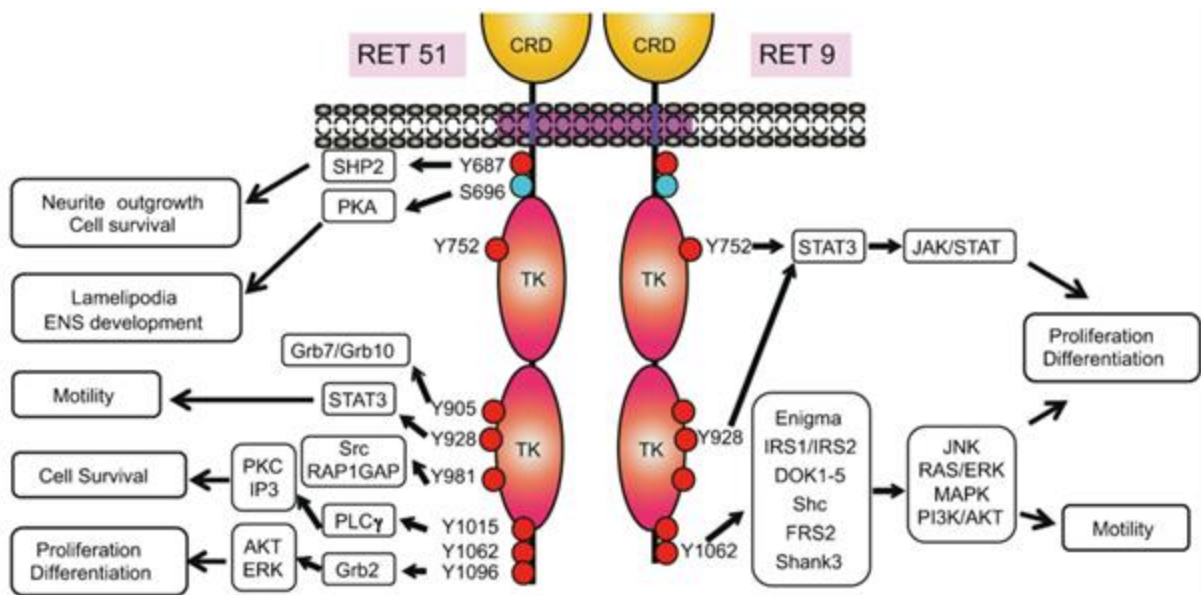
Legenda: GDNF = *Glial cell line-derived neurotrophic factor*; NRTN = *neurturin*; ARTN = *artemin*; PSPN = *persephin*; GFRA = *GDNF-family receptor- α* , GPI = *glycosylphosphatidylinositol*.

Após a dimerização de RET, resíduos de tirosina (Y) específicos são autofosforilados no domínio intracelular levando à ativação da via de sinalização a jusante⁷⁹. Existem 18 resíduos de tirosina no domínio intracelular do RET, dois estão localizados no domínio justamembranar, onze estão no domínio quinase e cinco estão na cauda C-terminal⁶. Das cinco tirosinas da cauda C-terminal do receptor RET, Y1015, Y1029 e Y1062 são comuns entre RET9 e RET51, porém dois resíduos, Y1096 e Y1102, são encontrados apenas na cauda C-terminal de RET 51⁶.

Entre os 18 resíduos de tirosina localizados no domínio intracelular, os resíduos Y687, Y752, Y806, Y809, Y826, Y900, Y905, Y928, Y981, Y1015 e Y1062 são autofosforilados após a dimerização de RET e servem como sítios de ligação para proteínas adaptadoras que, por sua vez, ativam a via de sinalização a jusante⁶⁸ (Figura 3). O resíduo Y1062 é o sítio de ancoragem de diferentes proteínas adaptadoras, incluindo SHC (do inglês, *Src-homologous and collagen-like protein*), FRS2 (*Fibroblast growth factor substrate 2*), DOK4 (*Docking protein 4*), DOK5 (*Docking protein 5*), IRS1/2 (*Insulin receptor substrate 1/2*) e Enigma^{79,86}. Essas proteínas são capazes de ativar vias de sinalização mediadoras da

motilidade, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, como MAPK, PI3K/AKT, RAS/ERK e JNK⁶⁶ (Figura 3).

Figura 3- Vias de sinalização ativadas pela autofosforilação de resíduos de tirosina. RET 51 (isoforma longa) e RET 9 (isoforma curta) diferem nas regiões C-terminais. A dimerização do RET leva à autofosforilação dos resíduos de tirosina do domínio intracelular, que servem de sítios de ligação para proteínas adaptadoras que são capazes de estimular vias de sinalização a jusante. O resíduo Y1062 é sítio de ligação das proteínas adaptadoras Enigma, IRS1/IRS2, DOK1-5, Shc, FRS2 e Shank3 (do inglês, *SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3*). Os sítios de autofosforilação da tirosina estão representados por círculos vermelhos, enquanto a serina 696 é representada por um círculo azul.



Fonte: Kawai e Takahashi⁶ (2020).

Legenda: CRD = Cysteine-rich domain; SHP2 = Src homology region 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-2; PKA = Protein kinase A; Grb7 = Growth factor receptor-bound protein 7; Grb10 = Growth factor receptor-bound protein 10; STAT3 = Signal transducer and activator of transcription 3; PKC = Protein kinase C; IP3 = Inositol 1,4,5-triphosphate; RAP1GAP = RAP1 GTPaseactivating protein 1; AKT = Serine/threonine kinase AKT; ERK = Extracellular signal-regulated kinase; PLC γ = Phospholipase C γ ; Grb2 = Growth factor receptor-bound protein 2; TK = tyrosine kinase; JAK = Janus kinase; STAT = Signal transducer and activator of transcription; IRS1 = Insulin receptor substrate 1; IRS2 = Insulin receptor substrate 2; DOK1-5 = Docking protein 1-5; Shc = Src-homologous and collagen-like protein; FRS2 = Fibroblast growth factor substrate; Shank3 = SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3; JNK = c-Jun N-terminal kinase; RAS = RAt Sarcoma; MAPK = Mitogen-activated protein kinase; PI3K = Phosphatidylinositol 3-kinase.

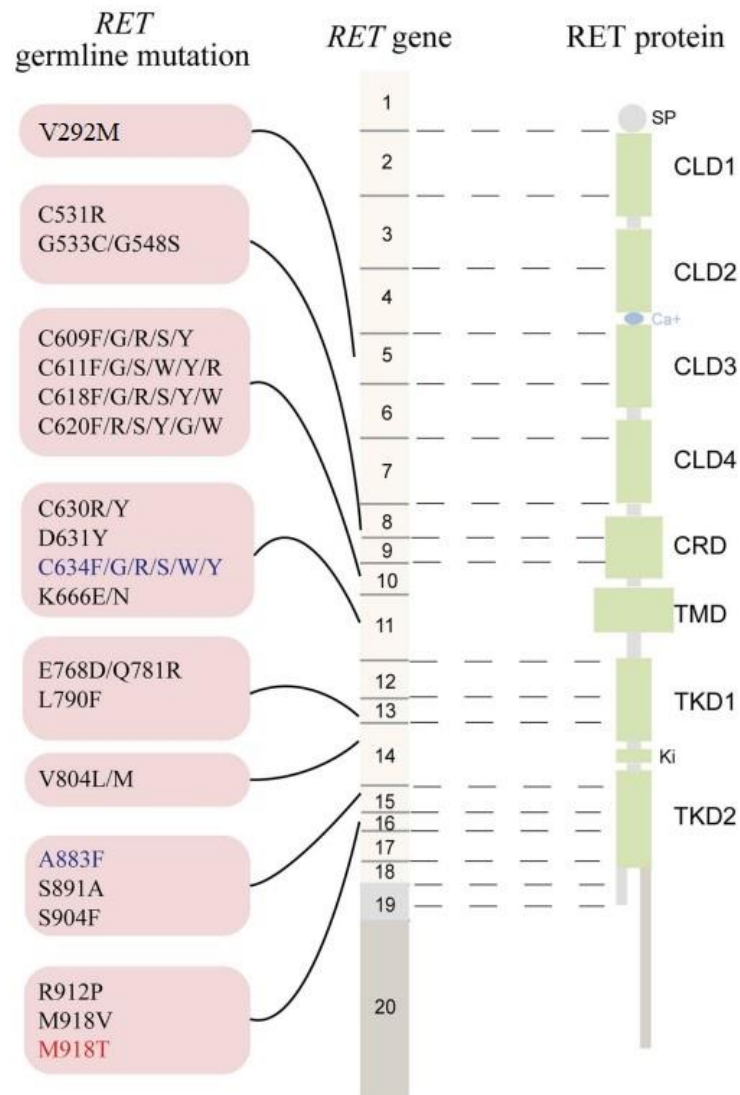
3.2 MUTAÇÕES DO PROTO-ONCOGENE *RET* NO CMT

As mutações no proto-oncogene *RET* são a principal causa do CMT. Mais de 100 mutações *RET* de ganho de função foram relatadas em pacientes com CMT, incluindo mutações germinativas em pacientes com doenças hereditárias e mutações somáticas em

pacientes com doença esporádica⁸⁷.

Mutações germinativas específicas do *RET* estão associadas a NEM2. A maioria dessas mutações são pontuais (tipo *missense*) e levam à ativação constitutiva do receptor *RET* e vias de sinalização a jusante. Mutações pontuais associadas a NEM2 foram encontradas nos éxons 5, 8, 10, 11, 13, 14, 15 e 16 do *RET*⁸⁸⁻⁹⁰ (Figura 4).

Figura 4- Mutações pontuais do proto-oncogene *RET* associadas a NEM2. O gene *RET* codifica a proteína *RET*, um receptor tirosina quinase transmembrana. O *splicing* alternativo do *RET* produz três isoformas: *RET* 9, *RET* 43 e *RET* 51. Nesta figura, *RET* 9 e *RET* 51 são indicados em cinza claro e cinza escuro, respectivamente. As mutações pontuais *RET* associadas a NEM2 são mostradas à esquerda do gene *RET*. As mutações destacadas em vermelho, azul e preto representam, respectivamente, risco muito alto, risco alto e risco moderado de CMT agressivo, segundo as diretrizes revisadas da *American Thyroid Association*¹⁸.



Fonte: Adaptado de Li *et al.*⁹⁰ (2020).

Legenda: SP = *signal peptide*; CLD = *cadherin-like domain*; CRD = *cysteine-rich domain*; TMD = *transmembrane domain*; TKD = *tyrosine kinase domain*.

Em 95% dos pacientes com NEM2A clássica, são encontradas mutações *RET* nos códons 609, 611, 618 e 620 do éxon 10 ou no códon 634 do éxon 11^{34,91}. Essas mutações promovem a substituição dos resíduos de cisteína por resíduos de não cisteína no CRD do *RET*. Como consequência dessa alteração, uma cisteína parceira, responsável pela formação de uma ligação dissulfeto intramolecular, é liberada e passa a fazer uma ligação dissulfeto covalente intramolecular entre dois *RET* mutantes, induzindo sua dimerização e ativação constitutiva^{92,93}.

As mutações no códon 634 são as mais frequentes, ocorrendo em mais de 80% dos casos de NEM2A clássica^{19,45}. A mutação C634R (rs75076352), que resulta na troca de uma cisteína por uma arginina (TGC→CGC), é a mais comum do códon 634 e representa 50% de todas as mutações em NEM2A²⁰. Mutações nos códons 533, 630, 631, 666, 790, 804 e 891 também têm sido associadas a NEM2A clássica, porém com baixa frequência³⁶.

A NEM2A com CLA está associada a mutações germinativas no códon 634 (C634G/R/W/Y)³⁸. Entretanto, mutações germinativas nos códons 611 (C611Y) e 804 (V804M) foram reportadas em alguns casos^{94,95}. Mutações nos códons 609, 611, 618 e 620 foram associadas a NEM2A com HD^{39,96}. Nesse subtipo de NEM 2A, o códon 620 é que apresenta maior frequência de mutações (48%), seguido pelos códons 618 (32%), 609 (18%) e 611 (2%)³⁹.

As mutações causais do CMTF estão distribuídas por todo o proto-oncogene *RET*. Entretanto, as principais mutações estão localizadas no CRD ou no domínio tirosina quinase intracelular⁸⁷. No CRD, as mutações *RET* mais comuns afetam os códons do éxon 10 (618 e 620), enquanto as mutações *RET* no domínio tirosina quinase são encontradas nos éxon 13 (códons 768, 790 e 791) e 14 (códons 804 e 844)^{8,97}.

Cerca de 95% dos pacientes com NEM2B apresentam a mutação *RET* M918T (códon 908, éxon 16), resultando na substituição de uma metionina por uma treonina (ATG→ACG), enquanto menos de 5% dos pacientes apresentam a mutação *RET* A883F (códon 883, éxon 15), que leva à troca de uma alanina por uma fenilalanina⁹⁸⁻¹⁰¹. Aproximadamente 75% dos casos de NEM2B são esporádicos e os pacientes afetados apresentam mutações *de novo* no proto-oncogene *RET*, enquanto 25% dos casos ocorrem em famílias com manifestações anteriores ou atuais de NEM2B¹⁸. Mutações *de novo* do *RET* ocorrem em 84% dos indivíduos com a mutação M918T e em 45% dos indivíduos com a mutação A883F^{40,102}.

As mutações M918T e A883F afetam o domínio catalítico do domínio tirosina quinase, levando a uma série de alterações que provocam a ativação constitutiva do *RET*, independente do ligante, incluindo mudança conformacional na bolsa quinase responsável

pela estabilização do complexo receptor-ATP, alterações conformacionais de proteínas que reduzem a autoinibição, ativação da quinase independente de dimerização, aumento da atividade quinase e da ligação do ATP em dez vezes, além de alterações no reconhecimento do substrato peptídico^{93,103-105}.

Alguns raros pacientes com NEM2B podem apresentar mutações germinativas duplas, que aparecem em conjunto, no mesmo alelo. Acredita-se que essas mutações exerçam efeito sinérgico na capacidade de transformação oncogênica do *RET*¹⁰⁶. Entre as variantes duplas identificadas como causadoras de NEM2B estão: E786D/L790F, V804M/Q781R, V804M/E805K, V804M/Y806C e V804M/S904C¹⁰⁶⁻¹¹¹.

Os mecanismos moleculares envolvidos no CMT esporádico ainda não foram completamente elucidados. A identificação de tumores esporádicos que abrigam, simultaneamente, regiões com mutação positiva e mutação negativa, sugere que eles podem não ter origem clonal em uma única célula tumoral iniciadora com uma mutação *RET*⁸. Portanto, acredita-se que o CMT esporádico pode ter origem policlonal e que as mutações *RET* representam eventos secundários da tumorigênese do CMT, associados à progressão do tumor¹¹². Outros genes devem desempenhar um papel significativo no início do CMT⁸.

Cerca de 23-66% dos pacientes com CMT esporádico apresentam a mutação somática M918T^{113,114}. Essa mutação é idêntica à mutação germinativa encontrada em pacientes com NEM2B. Outra mutação somática frequentemente encontrada é a A883F. Além disso, mutações nos códons 618, 630, 634, 768, 804 e deleção parcial do proto-oncogene *RET* foram descritas em alguns tumores¹¹⁵⁻¹¹⁹.

3.3 CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO NO CMT

Associações entre mutações específicas do *RET* (genótipo) e a idade de início, agressividade do CMT e a presença de outras neoplasias endócrinas (fenótipo), como FEO e HPTP, estão bem documentadas na NEM2^{100,120-122}.

A presença de qualquer mutação germinativa no códon 634 está altamente associada ao desenvolvimento de FEO e HPTP na NEM2A¹⁰⁰. A mutação C634W, que leva à substituição de uma cisteína por um triptofano (TGC→TGG), por exemplo, está associada à alta penetrância para o FEO¹²³, enquanto o HPTP está mais frequentemente associado à mutação C634R¹²⁴. Em pacientes com NEM2A, a mutação C634R também está associada a maiores taxas de metástases ao diagnóstico, quando comparada às mutações C634W e C634Y¹²⁵.

As mutações *RET* M918T e A883F estão associadas a um pior prognóstico característico da síndrome NEM2B. De modo geral, essas mutações estão mais associadas com metástases linfonodais e persistência da doença no pós-operatório⁸⁷. Praticamente todos os portadores da mutação M918T desenvolvem CMT agressivo em idade muito precoce³⁶. Por sua vez, os portadores da mutação A883F parecem desenvolver CMT menos agressivo e em idade mais tardia^{102,126}.

No CMT esporádico, pacientes com a mutação somática M918T apresentam crescimento tumoral mais agressivo e prognóstico ruim^{112,115,117,118,127}. A frequência dessas mutações varia conforme o tamanho do tumor, uma vez que tumores pequenos (1 < cm) raramente têm a mutação (11,3%), enquanto que, em tumores maiores (>3 cm), foram detectadas mutações M918T (58,8%)¹²⁸.

Tabela 3 - Correlação genótipo e fenótipo e risco de CMT agressivo na NEM2.

Mutação <i>RET</i>	Éxon	Nível de risco ^a	Incidência de FEO ^b	Incidência de HPTP ^b	Ocorrência de CLA	Ocorrência de HD
G533C	8	MOD	+	-	N	N
C609F/G/R/S/Y	10	MOD	+ / ++	+	N	S
C611F/G/S/Y/W	10	MOD	+ / ++	+	N	S
C618F/R/S	10	MOD	+ / ++	+	N	S
C620F/R/S	10	MOD	+ / ++	+	N	S
C630R/Y	11	MOD	+ / ++	+	N	N
D631Y	11	MOD	+++	-	N	N
C634F/G/R/S/W/Y	11	H	+++	++	S	N
K666E	11	MOD	+	-	N	N
E768D	13	MOD	-	-	N	N
L790F	13	MOD	+	-	N	N
V804L	14	MOD	+	+	N	N
V804M	14	MOD	+	+	S	N
A883F	15	H	+++	-	N	N
S891A	15	MOD	+	+	N	N
R912P	16	MOD	-	-	N	N
M918T	16	HST	+++	-	N	N

Fonte: Adaptado de Wells *et al.*¹⁸ (2015).

Legenda: FEO = feocromocitoma; HPTP = hiperparatireoidismo primário; CLA = *Cutaneous lichen amyloidosis*; HD = *Hirschsprung's disease*; MOD = *moderate*; H = *high*, HST = *highest*; N = não; S = sim. ^a Risco de CMT agressivo. ^b Incidência de FEO e HPTP: + = ~10%; ++ = ~20%-30%; +++ = ~50%

A correlação genótipo-fenótipo no CMT tem implicações importantes para o manejo clínico dos pacientes. Com base no conhecimento obtido por meio dos numerosos estudos que reportaram fortes associações entre a idade de início, a agressividade do CMT, presença de outras neoplasias endócrinas, como FEO e HPTP, e ocorrência de CLA e HD, as mutações

RET foram estratificadas em três níveis de risco, que refletem a agressividade do CMT: risco muito alto (HST, do inglês *highest*), risco alto (H, *high*) e risco moderado (MOD, *moderate*)¹⁸ (Tabela 3). Essa classificação fornece recomendações sobre o momento de realização da tireoidectomia profilática (Tabela 4).

Tabela 4- Momento de realização da tireoidectomia profilática na NEM2, de acordo com as recomendações da American Thyroid Association¹⁸.

Níveis de risco	Local da mutação	Tempo recomendado para a cirurgia
HST	Códons 918	Antes de 1 ano.
H	Códons: 634, 883	Antes dos 5 anos de idade, dependendo da história familiar e da concentração de Ct.
MOD	Códons: 512, 533, 609, 611, 618, 620, 621, 666, 768, 790, 791, 804, 891	Com o aumento de Ct, dependendo da concentração de Ct, história familiar e preferências dos pais.

Fonte: Adaptado de Czarniecka *et al.*⁵ (2019).

Legenda: HST = *highest*; H = *high*; MOD = *moderate*; Ct = calcitonina.

O nível de risco **muito alto** inclui pacientes com a mutação *RET* M918T. Como foi mencionado anteriormente, essa mutação está associada ao desenvolvimento de CMT agressivo e pior prognóstico. Tendo em vista que os portadores dessa mutação podem apresentar metástases nos primeiros anos de vida, a tireoidectomia é indicada o mais precocemente possível, preferencialmente no primeiro ano após o nascimento^{18,129}.

O nível de risco **alto** inclui pacientes com as mutações *RET* C634 e A883F. Portadores de mutações no códon 634 podem desenvolver CMT nos primeiros anos de vida, e, portanto, devem ser submetidos a tireoidectomia antes dos cinco anos de idade, com base na detecção da elevação das concentrações séricas de calcitonina¹⁸.

Pacientes com mutações *RET* diferentes de M918T, C634 e A883F são incluídos no nível de risco **moderado**. As mutações classificadas nesse nível estão associadas a menor risco de desenvolvimento de CMT e início mais tardio da doença¹²⁹. Além disso, o CMT tende a ser menos agressivo quando comparado com os níveis de risco muito alto e alto. Portadores de mutações classificadas como de risco moderado devem ser submetidos a tireoidectomia na infância ou na idade adulta jovem, tendo como base as concentrações séricas de calcitonina¹⁸.

Apesar da clara associação genótipo e fenótipo no CMT, alguns estudos relataram variabilidade intra e interfamiliar na idade de início e agressividade do CMT, entre indivíduos que têm a mesma mutação^{40,130-135}. Em um desses estudos, foi relatado que uma menina portadora da mutação V804L apresentou CMT extenso e agressivo aos 12 anos de idade, enquanto sua avó, aos 80 anos, portadora da mesma mutação, não apresentara nenhuma evidência de doença de células C¹³⁰. Em outro exemplo, um paciente com a mutação C618S começou a ser tratado tardiamente e morreu de CMT aos 49 anos, enquanto sua mãe, portadora da mesma mutação, morreu de outras causas aos 90 anos¹³¹. Por fim, estudo recente relatou o caso de duas pacientes: uma jovem de 14 anos portadora da mutação L790F, que apresentou CMT agressivo, metástases regionais e à distância, e uma mulher de 70 anos, assintomática e sem complicações decorrentes do CMT quanto à mesma mutação do *RET*¹³⁵.

A maioria dos estudos supracitados demonstram que a variabilidade fenotípica é mais comum entre portadores de mutações *RET* classificadas como de risco moderado. No entanto, essa variabilidade também foi observada entre portadores de mutações de risco muito alto e risco alto^{40,134}. Diversos estudos têm procurado elucidar o mecanismo de variabilidade fenotípica no CMT. Polimorfismos de *RET* têm sido descritos como potenciais modificadores genéticos do CMT, entretanto, variações no número de cópias, variantes somáticas, fatores epigenéticos e geográficos também vem sendo investigados³⁶.

3.4 POLIMORFISMOS DO PROTO-ONCOGENE *RET* NO CMT

A associação entre a presença de polimorfismos de *RET* e a susceptibilidade para o desenvolvimento e progressão do CMT tem sido amplamente estudada nas últimas décadas. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single nucleotide polymorphism*) de *RET*, notadamente as variantes G691S (exon 11, rs1799939), L769L (exon 13, rs1800861), S836S (exon 14, rs1800862) e S904S (exon 15, rs1800863) vêm sendo referidos como potenciais modificadores genéticos do CMT¹³⁶⁻¹⁴⁵.

Colombo *et al.*¹³⁶ demonstraram que a variante não sinônima G691S (GGT→AGT), aumenta o potencial oncogênico *in vitro* da mutação germinativa *RET* S891A. Além disso, os autores também mostraram que portadores da mutação *RET* S891A, associada ao polimorfismo G691S, apresentam uma tendência para idade mais precoce no diagnóstico do CMT e envolvimento da medula adrenal. Outro estudo demonstrou que os SNP nos éxon 11 (G691S), 15 (S904S) e 19 (STOP+388bp) conferiram entre 1,6 e 2,5 vezes maiores riscos de desenvolver CMT esporádico¹³⁷.

Em 2003, Robledo *et al.*¹³⁸ descreveram co-segregação positiva significativa entre G691S e a variante sinônima S904S (TCC→TCG), relatando forte desequilíbrio de ligação (não independência de alelos) entre esses polimorfismos. Os autores ainda demonstraram maior prevalência do estado homozigoto G691S/S904S entre os pacientes com CMT esporádico (OR = 2,36, $p = 0,045$) do que nos controles saudáveis, sugerindo que essas variantes poderiam desempenhar um papel como um gene de baixa penetrância. Além disso, também sugeriram que a presença dos polimorfismos G691S/S904S do RET pode estar relacionada ao aparecimento precoce de sintomas em pacientes com NEM2A¹³⁸.

Em uma população italiana também foi relatada co-segregação positiva ($p = 0,001$) entre os polimorfismos G691S e S904S¹³⁹. Os autores também demonstraram que a variante G691S apresentava maior frequência entre pacientes com CMT esporádico do que nos controles normais (27,83% vs. 18,86%, $p = 0,029$).

Um estudo francês mostrou que a presença do SNP G691S foi associada a um maior risco de desenvolver feocromocitoma ($p = 0,036$) em pacientes com NEM2A¹⁴⁰. E ainda demonstraram que os pacientes com feocromocitoma apresentaram um número de SNP mais alto (1,38 – 1,06) do que pacientes sem feocromocitoma (1,05 – 0,95), sugerindo que a combinação de SNP de *RET* confere maior risco para o desenvolvimento do tumor adrenal.

A variante sinônima L769L (CTT → CTG) tem sido associada ao início precoce do CMT esporádico¹⁴¹⁻¹⁴³. Um estudo relatou que uma paciente portadora da mutação *RET* V804M, associada ao polimorfismo L769L, apresentou CMT aos 32 anos, em contraste com sua mãe assintomática, que tinha apenas a mutação V804M e teve CMT diagnosticada por punção aspirativa com agulha fina, aos 60 anos de idade¹⁴¹. Wiench *et al.*¹⁴² observaram frequências de 36% e 4,5% das variantes sinônimas polimórficas L769L e S836S (AGC → AGT) em pacientes com CMT esporádico, com menos de 30 anos, sendo que a frequência para L769L foi maior do que em pacientes mais velhos.

Outro estudo associou a presença do polimorfismo L769L à predisposição para o desenvolvimento do CMT esporádico¹⁴³. Os autores ainda demonstraram que a idade de início da doença em portadores do polimorfismo L769L em homozigose (CTG/CTG) foi 11,5 anos menor do que a idade de início da doença em indivíduos com a sequência de nucleotídeos do tipo selvagem CTT/CTT. Além disso, os autores também sugeriram que esse polimorfismo modifica a estrutura mRNA, o que pode levar a alterações na atividade da quinase e (ou) especificidade da proteína e, como resultado, influenciar os sintomas da doença¹⁴³.

O polimorfismo S836S foi associado ao início precoce e ao aumento do risco de

doença metastática em idade mais jovem, em indivíduos com CMT hereditário ou esporádico¹⁴⁴. Segundo esse estudo, os pacientes portadores do alelo polimórfico eram mais jovens ao diagnóstico e apresentavam metástase local e a distância precoce ($p = 0,02$ e $p = 0,04$, respectivamente). Outro estudo mostrou que os SNP L769L e S836S foram associados ao aumento do risco de CMT (OR = 1,95, IC 95%: 1,2–3,1, $p = 0,005$ e OR = 2,29, IC 95%: 1,2–4,5, $p = 0,017$, respectivamente), sendo que o OR ajustado para indivíduos portadores de haplótipos, com três ou mais alelos polimórficos, foi de 3,79 (IC 95%: 1,5–9,5; $p = 0,004$), indicando um efeito aditivo dessas variantes no risco de CMT¹⁴⁵.

Embora vários estudos tenham relatado associação entre os SNP do *RET* e o CMT, alguns autores não conseguiram demonstrar associação entre essas variantes e o desenvolvimento e (ou) progressão da doença^{139,146-148}. Além disso, estudos com populações de diferentes países não mostraram diferenças significativas quanto à frequência desses polimorfismos entre pacientes com CMT e controles normais¹⁴⁹⁻¹⁵³.

Em seu estudo com indivíduos italianos, Elisei *et al.*¹³⁹ excluíram a influência do polimorfismo G691S na expressão do RNA mensageiro (mRNA) do *RET*, no desenvolvimento da mutação somática do *RET*, na ligação com a mutação germinativa do *RET*, no início mais jovem do CMT e no desfecho clínico da doença.

Os polimorfismos L769L e G691S/S904S também não exerceram influência sob as características clínicas e oncológicas de pacientes com CMT hereditário do Brasil¹⁴⁴.

Em 2012, estudo realizado por Machens *et al.*¹⁴⁶ demonstrou não haver relação dose-resposta estatisticamente significativa entre as variantes polimórficas G691S, L767L, S836S e S904S e idade do paciente no diagnóstico de CMT, sexo, tamanho do tumor primário, extensão extratireoidiana, número de linfonodos envolvidos e removidos ou metástase distante. Os autores ainda relataram que, tanto em portadores quanto em não portadores desses polimorfismos, o CMT esporádico se mostrou clínica e patologicamente indistinguível.

Mais recentemente, um estudo com pacientes poloneses mostrou que nenhum dos polimorfismos *RET* foi estatisticamente significativo associado ao desfecho clínico do CMT, quando analisados de forma independente¹⁴⁸.

Outra questão que permanece incerta diz respeito ao mecanismo de ação dos polimorfismos *RET* no desenvolvimento e (ou) na progressão do CMT. Em ensaio *in silico*, Cebrian *et al.*¹³⁷ sugeriram que a troca de aminoácidos em G691S poderiam afetar a flexibilidade e a acessibilidade do solvente da proteína *RET*, e, como consequência, este SNP poderia modificar a conformação ativo/desativo do receptor, independentemente do

ligante. Em outro estudo *in silico*, sugeriu-se que a presença do polimorfismo G691S altera o padrão de fosforilação do receptor RET, o que pode resultar na hiperativação da via RAS-ERK¹⁵⁴.

Roblebo *et al.*¹³⁸ propuseram um efeito específico do polimorfismo G691S em pacientes com NEM2A. Segundo esses autores, a variante G691S coopera com a dimerização do receptor RET gerada por mutações oncogênicas no CRD da proteína. Outra hipótese formulada por eles é que a mudança de glicina para serina no códon 691 origina um novo sítio suscetível à fosforilação da serina e, assim, pode ativar ou ter algum efeito nos eventos de sinalização a jusante¹³⁸.

Um mecanismo proposto sugere que os polimorfismos do *RET* poderiam afetar a estabilidade da molécula de mRNA¹⁵⁵. Entretanto, Elisei *et al.*¹³⁹ não demonstraram diferenças na expressão do mRNA do RET em tecidos tumorais de pacientes com e sem polimorfismos.

Por fim, outra hipótese considera que a substituição de nucleotídeos na molécula de DNA poderia bloquear e/ou originar um sítio de *splicing*, desencadeando a formação de uma proteína alterada ou, então, que o nucleotídeo modificado esteja em desequilíbrio de ligação com uma variante funcional ainda desconhecida¹⁵⁶.

4 OBJETIVOS

Esta seção apresenta os objetivos estabelecidos, com fins de nortear as buscas constitutivas da base teórica deste estudo.

4.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar clínica e molecularmente pacientes com CMT do estado da Bahia.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as características clínicas e patológicas dos casos de CMT na amostra selecionada.
- Determinar a frequência de variantes do proto-oncogene *RET* na população de pacientes com diagnóstico de CMT.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Esta seção compreende o percurso metodológico adotado para dar cumprimento aos objetivos estabelecidos, estando detalhada a seguir.

5.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo transversal, descritivo e analítico.

5.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Entre 2020 e 2022, 29 pacientes com CMT foram encaminhados por endocrinologistas, oncologistas e cirurgiões de cabeça e pescoço de diferentes hospitais, clínicas e centros de referência públicos e privados do estado da Bahia (amostragem não probabilística, por conveniência) para o Laboratório de Estudo da Tireoide (LET), localizado no Instituto de Ciências da Saúde (ICS), da Universidade Federal da Bahia (UFBA). No LET, os pacientes foram esclarecidos quanto aos objetivos, etapas, procedimentos, riscos e benefícios do estudo e, em seguida, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice).

5.3 CRITÉRIO DE INCLUSÃO E NÃO INCLUSÃO

Os seguintes critérios de inclusão foram adotados: (i) idade ≥ 18 anos no momento do diagnóstico e (ii) diagnóstico anatomopatológico de CMT. Os seguintes critérios de não inclusão foram aplicados: (i) ausência de confirmação anatomopatológica de CMT e (ii) ausência de laudo anatomopatológico.

5.4. COLETA DOS DADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS

Os dados clínicos e patológicos foram obtidos com base nos laudos anatomopatológicos dos pacientes. Coletaram-se dados sobre as características demográficas dos pacientes (sexo e idade ao diagnóstico), bem como sobre as características histológicas (data da tireoidectomia, tamanho do tumor, multifocalidade, presença/ausência de cápsula, invasão capsular, invasão extra-tireoidiana, invasão angiolinfática, invasão perineural,

metástases linfonodais, metástases a distância, estadiamento tumoral, associação com CPT, presença de tireoidite de Hashimoto). Dados sobre a presença/ausência de imureatividade para calcitonina, CEA, Cromogranina A, Sinaptofisina e TTF-1 foram obtidos a partir dos laudos imuno-histoquímicos dos pacientes.

5.5 COLETA DE SANGUE E EXTRAÇÃO DE DNA

Os pacientes recrutados foram encaminhados para o Laboratório DNA, instituição privada localizada na cidade de Salvador e parceira do estudo, para realização da coleta de sangue periférico. Foram coletados 10 ml de sangue de cada paciente, em tubos contendo anticoagulante EDTA (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*). Em seguida, as amostras foram levadas ao LET (ICS/UFBA) para centrifugação e separação das frações. Após a centrifugação, a camada leucoplaquetária (*buffy coat*) de cada amostra foi coletada para microtubos de 1,5ml devidamente estéreis livres de DNase e RNase. Essas amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento da extração de DNA.

O DNA foi extraído de leucócitos do sangue periférico usando o PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA), conforme instruções do fabricante. O volume inicial de amostra utilizado foi 200µl e a eluição foi realizada em 100µl. Após a extração, foram utilizados 2µl da amostra para determinação da concentração e pureza do DNA, extraído mediante leitura em Nano Espectrofotômetro KASVI Modelo K23-0002 (KASVI, São José dos Pinhais, Brazil). Foram consideradas amostras de boa qualidade aquelas que apresentaram os seguintes valores: a) 1,7-2,0 para A260/A280 e b) 2,0-2,2 para A260-A230. Ao final da etapa de quantificação, as amostras foram armazenadas em freezer -20 °C, no Biorrepositório do LET (ICS/UFBA), até a sua utilização.

5.6 GENOTIPAGEM

Esta seção reúne as técnicas utilizadas na genotipagem do proto-oncogene *RET* e está organizada em duas subseções, conforme detalhamento a seguir.

5.6.1 Reação em Cadeia da Polimerase

Após a extração do DNA, alíquotas das amostras foram preparadas e encaminhadas para o Serviço de Endocrinologia do Hospital das Clínicas de Porto Alegre, da Universidade

Federal do Rio Grande Sul, onde foram amplificadas e sequenciadas.

A amplificação dos fragmentos de DNA correspondentes aos éxons 10, 11, 13, 14 e 15 do *RET* foi realizada separadamente por reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase chain reaction*), utilizando o kit Taq DNA polimerase 500 U (Ludwig Biotec, Alvorada, Brazil) e *primers* específicos (Tabela 5). A reação de PCR foi realizada empregando 100 ng de DNA genômico em um volume de 50 µl, contendo 100 mM de Tris-HCl (pH 8,5), 500 mM de KCl, 1,5mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer* específico e 2,5 U Taq DNA Polimerase. As condições de ciclagem incluíram uma fase inicial de 5 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C e 30 s a 72°C. A PCR foi realizada no equipamento DNA Engine Thermal Cycler (BIO-RAD, California, USA).

A detecção dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose (UltraPure™ Agarose, Invitrogen, Carlsbad, USA) 2% corado com GelRed Nucleic Acid (0,1 µL/10mL) (Biotium, California, USA). Os parâmetros de eletroforese foram 100 Volts por 20 minutos. A análise do gel foi realizada no equipamento ImageQuant Las 500 (GE Healthcare, Reino Unido, UK).

Tabela 5- Sequência dos *primers* utilizados nas reações de PCR.

Éxon	Primer (Sequência 5'-3')	
	Forward	Reverse
10	TTGCGACACCAGTTGCCGAG	CAGCAATTCCTCCCTTGTTG
11	GAGCCATGAGGCAGAGCATA	CCCTCACCAGGATCTTGAAGG
13	TGAACTTGGGCAAGGCGATG	GGGAGAACAGGGCTGTATGGAG
14	AAGACCCAAGCTGGCTGAG	GCTGGGTGCAGAGCCATAT
15	CTCTGCTGGTCACACCAGGC	GGTATCTTTCCTAGGCTTCCC

Fonte: Dados da pesquisa.

5.6.2 Sequenciamento do DNA

Os produtos de PCR foram purificados com o GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Reino Unido, UK), conforme instruções do fabricante, e seguiram para a etapa de sequenciamento direto do DNA pelo método de Sanger. O sequenciamento do DNA foi realizado no equipamento ABI 3500 *Genetic Analyzer*, com capilares de 50 centímetros e polímero POP7 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Os produtos de PCR, contendo *primer*, foram marcados com 1 µl do reagente BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA), em um

volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador do modelo Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, USA), sob as seguintes condições: uma fase inicial de 1 min a 96°C, seguida de 35 ciclos de 15 s a 96°C, 15 s a 50°C e 4 min a 60°C. Após marcadas, as amostras foram purificadas com o BigDye XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) e eletroinjetadas no analisador genético.

Cada amostra sequenciada foi analisada pela ferramenta de bioinformática BioEdit Sequence Alignment Editor (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) e foi comparada às sequências contidas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), por meio da ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) para identificação das mutações.

5.7 CLASSIFICAÇÃO DAS VARIANTES DO *RET*

De acordo com as diretrizes do American College of Medical Genetics and Genomics e (ACMG) e da Association for Molecular Pathology (AMP)¹⁵⁷ e do banco de dados ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>), três termos específicos foram usados para classificar as variantes do proto-oncogene *RET*: “variante patogênica”, referente às variantes que afetam a estrutura e a função do receptor RET e são bem definidas como causadoras da NEM2; “variante benigna”, referente aos SNP; e variantes que não afetam a estrutura e a função do receptor RET; e “variante de significado incerto”, referente às variantes consideradas provavelmente benignas ou provavelmente patogênicas.

5.8 ANÁLISE *IN SILICO*

Os programas PHD-SNP (<https://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html>), PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), PMut (<http://mmb.irbbarcelona.org/PMut/>) e SNPs&Go (<https://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/>) foram utilizados para prever a patogenicidade das variantes não-sinônimas de *RET*. Para prever o efeito funcional da variante sobre a estabilidade da proteína, foram utilizados os programas I-Mutant 2.0 (<https://folding.biofold.org/i-mutant/i-mutant2.0.html>) e MUPro (<https://mupro.proteomics.ics.uci.edu/>).

PHD-SNP, PMut e SNPs&GO preveem se a troca de aminoácidos tem efeito neutro ou patogênico. O PolyPhen-2 segue o mesmo princípio, entretanto, o resultado é apresentado

como um valor situado na escala de 0 a 1. Um resultado próximo de 0 indica que a troca de aminoácidos é benigna; um resultado próximo de 1 indica que a substituição de aminoácidos é possivelmente prejudicial.

Nos programas I-Mutant 2.0 e MUPro, a predição é realizada em função do valor de Delta Delta G ($\Delta\Delta G$), uma métrica que prevê como uma mutação pontual afetará a estabilidade da proteína. Valor de $\Delta\Delta G$ positivo indica que a proteína mutada tem maior estabilidade. Por outro lado, valor negativo para $\Delta\Delta G$ prediz que a proteína tem menor estabilidade.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em média (desvio padrão). Usou-se o teste t para comparações entre grupos de variáveis com distribuição normal e o teste de Mann-Whitney, (U) para comparações entre grupos de variáveis com distribuição não normal. O qui-quadrado e a correção de continuidade de Yates foram usados para variáveis não paramétricas. O teste de Pearson foi aplicado para avaliar o coeficiente de correlação linear entre as variáveis analisadas. O nível de significância de $p < 0,05$ foi aceito como estatisticamente significativo. Utilizou-se o programa estatístico GraphPad Prism, v.7.00 (2016) para a realização dos testes estatísticos.

5.10 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi executado de acordo com a Resolução N° 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). O projeto foi submetido para análise ética no sistema eletrônico da Plataforma Brasil, base nacional e unificada de registros de pesquisas envolvendo seres humanos, apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia (CEP/ICS), conforme CAAE n° 46193121.2.0000.5662 e parecer consubstanciado n° 4.835.687 (Anexo).

6 RESULTADOS

Os resultados apresentados nesta seção estão organizados em quatro abordagens que dão cobertura aos dados levantados.

6.1 DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

A amostra do estudo foi composta por 29 pacientes com diagnóstico de CMT, 24 mulheres (82,8%) e 5 homens (17,2%), com idade média no diagnóstico de $46,5 \pm 13,1$ anos (mediana 46, intervalo 20-70).

O tamanho médio do tumor foi de $2,1 \pm 1,4$ cm (mediana 1,8, intervalo 0,1-5,0). A maioria dos tumores foram unifocais (79,3%) e não capsulados (89,7%). Invasão capsular, invasão extra-tireoidiana e invasão angiolinfática ocorreram em 13,8%, 3,4% e 6,9% dos casos, respectivamente. Segundo a classificação TNM¹⁵⁸, 38% dos tumores foram estadiados como T1a, 27,6% T1b, 24,1% T2 e 10,3% T3. Metástase linfonodal regional (N1) esteve presente em 44,8% dos casos. Em 30,8% destes casos, ocorreu metástase para linfonodos pré-traqueais, paratraqueais e pré-laríngeos (N1a). Em outros 30,8%, foram observadas metástases para linfonodos cervicais unilaterais, bilaterais ou contralaterais (N1b). Presença de metástase distante (M1) para o mediastino foi observada em um caso (3,4%).

Associação com CPT e presença de Tireoidite de Hashimoto foram observadas em 27,6% dos casos. Laudos imuno-histoquímicos de 15 pacientes estavam disponíveis para análise. Nos 15 pacientes foi detectada imureatividade para calcitonina. Também foi observada imunorreação positiva para CEA em 5 pacientes (33,3%), Cromogranina A em 12 pacientes (80%), Sinaptofisina em 10 pacientes (66,7%) e TTF-1 em 12 pacientes (80%). A Tabela 6 resume as características clínico-patológicas dos 29 pacientes com CMT. A Tabela 7 apresenta a frequência dessas características entre os pacientes.

Tabela 6- Dados clínico-patológicos dos 29 pacientes com CMT do estado da Bahia.

Paciente	Sexo	Idade ao diagnóstico (anos)	Tamanho do tumor (cm)	Focalidade tumoral	Cápsula tumoral	Invasão Capsular	Invasão tireoidiana	Invasão angiolinfática	Estadiamento		
									T	N	M
1	F	48	2,4	Unifocal	A	A	A	A	T2	N0	Mx
2	F	55	4	Unifocal	A	P	A	A	T2	N0	Mx
3	F	56	0,9	Unifocal	A	A	A	A	T1a	N1a	Mx
4	F	56	1,7	Unifocal	A	A	A	P	T1b	N1	Mx
5	M	20	0,6	Unifocal	A	A	A	A	T1a	N1b	Mx
6	F	44	2	Unifocal	A	A	A	A	T1b	N1b	Mx
7	M	56	0,1	Unifocal	A	A	A	A	T1a	N0	Mx
8	F	39	2,3	Unifocal	A	A	A	A	T2	N0	Mx
9	F	46	0,9	Unifocal	P	A	A	A	T1a	N0	Mx
10	F	23	1,5	Unifocal	P	A	A	A	T1b	N0	Mx
11	F	42	3,5	Unifocal	A	A	A	A	T2	N1b	Mx
12	F	55	0,7	Multifocal	A	A	A	A	T1a	N0	Mx
13	M	21	0,8	Multifocal	A	P	A	A	T1a	N1	Mx
14	M	53	5	Unifocal	A	P	A	A	T3	N1b	M1
15	M	41	0,8	Multifocal	A	A	A	A	T1a	N0	Mx
16	F	62	2,9	Unifocal	A	P	P	A	T2	N1a	Mx
17	F	53	1,8	Unifocal	A	A	A	A	T1b	N0	Mx
18	F	35	1,3	Unifocal	A	A	A	A	T1b	N0	Mx
19	F	44	1	Unifocal	A	A	A	A	T1a	N0	Mx
20	F	57	3,8	Multifocal	A	A	A	A	T2	N1	Mx
21	F	33	2	Unifocal	A	A	A	A	T1b	N0	Mx
22	F	37	2	Multifocal	A	A	A	A	T1b	N1	Mx
23	F	64	3,5	Unifocal	P	A	A	A	T2	N1a	Mx
24	F	37	4,3	Unifocal	A	A	A	P	T3	N1	Mx
25	F	54	0,3	Unifocal	A	A	A	A	T1a	N0	Mx
26	F	67	0,9	Unifocal	A	A	A	A	T1a	N0	Mx
27	F	40	1,5	Unifocal	A	A	A	A	T1b	N0	Mx
28	F	70	4,5	Unifocal	A	A	A	A	T3	N1a	Mx
29	F	41	3	Multifocal	A	A	A	A	T1a	N0	Mx

Continua

Tabela 6- Dados clínico-patológicos dos 29 pacientes com CMT do estado da Bahia.

Paciente	Associação com CPT	Tireoidite de Hashimoto	Imuno-histoquímica				TTF-1	Continuação
			Calcitonina	CEA	Cromogranina A	Sinaptofisina		
1	Sim	P	*	*	*	*	*	
2	Sim	A	*	*	*	*	*	
3	Não	A	*	*	*	*	*	
4	Não	A	*	*	*	*	*	
5	Não	A	*	*	*	*	*	
6	Não	A	*	*	*	*	*	
7	Sim	A	Positivo	×	Positivo	×	Negativo	
8	Não	P	Positivo	×	Positivo	×	Positivo	
9	Não	P	*	*	*	*	*	
10	Não	A	*	*	*	*	*	
11	Não	A	*	*	*	*	*	
12	Não	A	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	
13	Não	A	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	
14	Não	A	*	*	*	*	*	
15	Não	A	Positivo	×	Positivo	Positivo	Positivo	
16	Não	P	Positivo	Positivo	Positivo	×	Positivo	
17	Não	P	Positivo	×	Positivo	Positivo	Positivo	
18	Não	A	*	*	*	*	*	
19	Não	P	Positivo	×	Positivo	Positivo	Positivo	
20	Não	A	Positivo	Positivo	×	Positivo	Positivo	
21	Não	A	Positivo	Positivo	Positivo	×	Positivo	
22	Sim	A	Positivo	×	×	Positivo	×	
23	Sim	A	Positivo	×	Positivo	×	Positivo	
24	Não	A	Positivo	×	Positivo	×	Positivo	
25	Sim	A	Positivo	×	Positivo	Positivo	Positivo	
26	Não	P	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	
27	Sim	A	*	*	*	*	*	
28	Sim	A	*	*	*	*	*	
29	Não	P	*	*	*	*	*	

Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: F = feminino, M = masculino, A = ausente, P = presente.

Símbolos: * = dado indisponível, × = marcador não utilizado.

Tabela 7- Achados histopatológicos e imuno-histoquímicos nos 29 casos de CMT do estado da Bahia.

Dados clínico-patológicos	Número de pacientes (%)
Sexo	
<i>Masculino</i>	5 (17,2%)
<i>Feminino</i>	24 (82,8%)
Idade ao diagnóstico (anos)	
<i>Média ± Desvio Padrão</i>	46,5 ± 13,1 anos
<i>Mediana</i>	46
<i>Intervalo</i>	20-70
Tamanho do tumor (cm)	
<i>Média ± Desvio Padrão</i>	2,1 ± 1,4 cm
<i>Mediana</i>	1,8
<i>Intervalo</i>	0,1-5,0
Focalidade Tumoral	
<i>Unifocal</i>	23 (79,3%)
<i>Multifocal</i>	6 (20,7%)
Cápsula Tumoral	
<i>Ausente</i>	26 (89,7%)
<i>Presente</i>	3 (10,3%)
Invasão capsular	
<i>Ausente</i>	25 (86,2%)
<i>Presente</i>	4 (13,8%)
Invasão extra-tireoidiana	
<i>Ausente</i>	28 (96,6%)
<i>Presente</i>	1 (3,4%)
Invasão angiolinfática	
<i>Ausente</i>	27 (93,1%)
<i>Presente</i>	2 (6,9%)
Estadiamento TNM	
<i>T1a</i>	11 (38%)
<i>T1b</i>	8 (27,6%)
<i>T2</i>	7 (24,1%)
<i>T3</i>	3 (10,3%)
<i>N0</i>	16 (55,2%)
<i>N1</i>	13 (44,8%)
<i>N1a</i>	4 (30,8%)
<i>N1b</i>	4 (30,8%)
<i>Mx</i>	28 (96,6%)
<i>M1</i>	1 (3,4%)

Continua

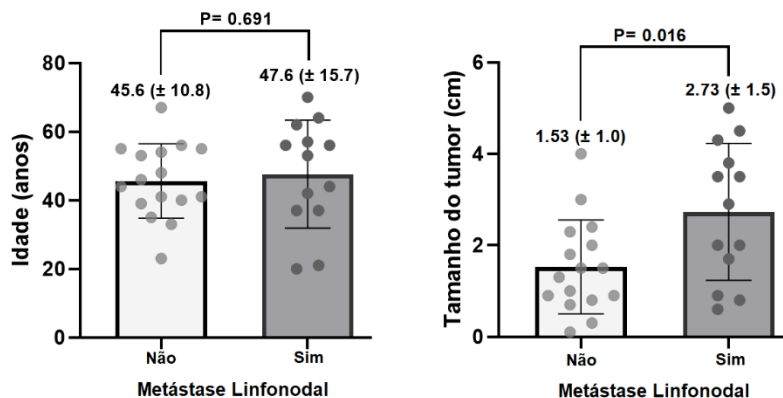
Tabela 7- Achados histopatológicos e imuno-histoquímicos nos 29 casos de CMT do estado da Bahia.

Continuação	
Dados clínico-patológicos	Número de pacientes (%)
Associação com CPT	
<i>Não</i>	21 (72,4%)
<i>Sim</i>	8 (27,6%)
Tireoidite de Hashimoto	
<i>Ausente</i>	21 (72,4%)
<i>Presente</i>	8 (27,6%)
Imuno-histoquímica (n=15)	
<i>Calcitonina</i>	15 (100%)
<i>CEA</i>	5 (33,3%)
<i>Cromogranina A</i>	12 (80%)
<i>Sinaptofisina</i>	10 (66,7%)
<i>TTF-1</i>	12 (80%)

Fonte: Dados da pesquisa.

Investigou-se se a presença de metástase linfonodal poderia estar associada à idade, ao diagnóstico e ao tamanho do tumor. Para tanto, os pacientes foram separados em dois subgrupos: sem metástase linfonodal e com metástase linfonodal. Não se observaram diferenças na idade ao diagnóstico ($45,6 \pm 10,8$ vs. $47,6 \pm 15,7$ anos, $p = 0,691$) e no tamanho do tumor ($1,53 \pm 1,0$ vs. $2,73 \pm 1,5$ cm, $p = 0,016$) entre os subgrupos, respectivamente (Figura 5).

Figura 5 - Associação entre presença e ausência de metástase linfonodal e idade ao diagnóstico e tamanho do tumor.



Fonte: Dados da pesquisa.

6.2 GENOTIPAGEM DO PROTO-ONCOGENE *RET*

Seis variantes do proto-oncogene *RET* foram detectadas na presente amostra, sendo 1 patogênica, 4 benignas e 1 de significado incerto. A substituição de nucleotídeos, a frequência alélica mínima global (GMAF, do inglês *Global minor allele frequency*) e a classificação de acordo com as diretrizes do ACMG e da AMP¹⁵⁷ e do banco de dados Clinvar de cada uma das variantes são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Frequência alélica mínima global e classificação das variantes do proto-oncogene *RET* identificadas via sequenciamento de Sanger.

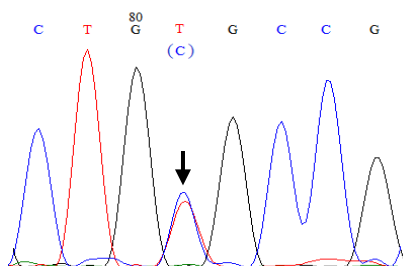
ÉXON	VARIANTE	ALTERAÇÃO DO DNA	SNP ID	GMAF (ALELO)	CLASSIFICAÇÃO ACMG / CLINVAR
11	C634R	c.1900T>C	rs75076352	--	Patogênica
11	G691S	c.2071G>A	rs1799939	0.16913 (A)	Benigna
13	L769L	c.2307G>T	rs1800861	0.28754 (G)	Benigna
13	Y791N	c.2371T>A	rs377767417	--	Significado incerto
14	S836S	c.2508C>T	rs1800862	0.03594 (T)	Benigna
15	S904S	c.2712C>G	rs1800863	0.17252 (G)	Benigna

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: SNP = *Single nucleotide polymorphism*, ID = *identifier*, GMAF = *Global minor allele frequency*, ACMG = *American College of Medical Genetics and Genomics*.

Estas variantes foram identificadas em 55,2% dos pacientes. A variante patogênica C634R foi identificada em um paciente (3,4%) (Figura 6). Polimorfismos do *RET* foram identificados em 15 pacientes (51,7%) . O SNP L769L foi a variante benigna mais frequente, ocorrendo como única variante do *RET* em 8 pacientes (27,6%). Em dois pacientes (6,9%), L769L co-segregou com o SNP S836S e em um paciente (3,4%) L769L co-ocorreu com a variante de significado incerto Y791N (rs377767417). Os SNP G691S e S904S co-segregaram em 3 pacientes (10,3%) e a co-segregação de G691S, L769L e S904S foi observada em um paciente (3,4%). A Tabela 9 reúne os achados genéticos dos pacientes deste estudo.

Figura 6 - Eletroferograma evidenciando a variante patogênica C634R identificada em heterozigose no paciente 15. A seta indica a alteração envolvendo o códon TGC > CGC do éxon 11 do *RET*.



Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 9- Variantes do proto-oncogene *RET* identificadas nos 29 pacientes com CMT do estado da Bahia.

Paciente	Éxons analisados				
	10	11	13	14	15
1	×	×	L769L	×	×
2	×	×	×	×	×
3	×	×	L769L	×	×
4	×	×	×	×	×
5	×	×	L769L	×	×
6	×	×	L769L	×	×
7	×	×	×	×	×
8	×	G691S	×	×	S904S
9	×	G691S	×	×	S904S
10	×	×	L769L / Y791N	×	×
11	×	G691S	L769L	×	S904S
12	×	×	×	×	×
13	×	×	×	×	×
14	×	×	×	×	×
15	×	C634R	×	×	×
16	×	×	×	×	×
17	×	×	L769L	×	×
18	×	×	×	×	×
19	×	×	×	×	×
20	×	×	×	×	×
21	×	×	L769L	×	S836S
22	×	×	×	×	×
23	×	G691S	×	×	S904S
24	×	×	L769L	×	×
25	×	×	L769L	×	×
26	×	×	L769L	×	×
27	×	×	L769L	×	S836S
28	×	×	×	×	×
29	×	×	×	×	×

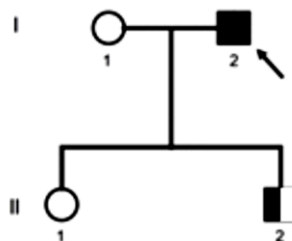
Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: Símbolo: × = ausência de variante

6.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIANTES DO *RET* E AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS PACIENTES

A variante patogênica C634R foi encontrada no paciente 15 (Figura 7). O paciente em questão era um homem de 42 anos de idade ao diagnóstico de CMT. Estudo anatomopatológico da tireoide confirmou o carcinoma medular, descrevendo um tumor multifocal (T1 = 0,8 cm em lobo direito; T2 = 0,6 em lobo esquerdo), não encapsulado, com margens cirúrgicas livres de neoplasia e sem acometimento linfonodal. Não foram observadas invasões capsular, extra-tireoidiana e angiolinfática.

Figura 7 - Heredograma do paciente portador da variante patogênica C634R. A seta indica o paciente no qual foi identificada a mutação *RET* C634R. Análise genética posterior, revelou que seu filho (II-2) também era portador dessa variante.

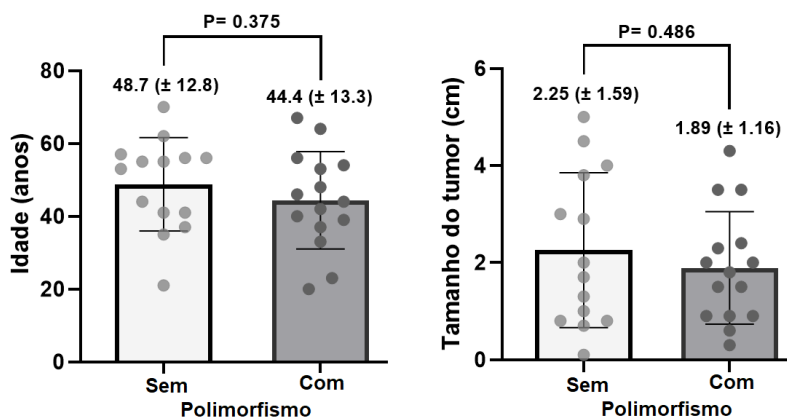


Fonte: Dados da pesquisa.

O paciente foi submetido à tireoidectomia total no ano de 2021. Entretanto, já havia sido submetido à adrenalectomia bilateral no ano de 2020. Laudo anatomopatológico das glândulas adrenais foi conclusivo para FEO bilateral. Essas observações sugerem que o paciente manifestou primariamente o FEO e depois o CMT. Geralmente, o FEO é diagnosticado concomitantemente ou após o CMT¹⁵⁹. No entanto, FEO foi descrito como primeiro sintoma em 13-27% dos indivíduos com NEM2A¹⁶⁰⁻¹⁶³.

Avaliou-se também se a presença de SNP do proto-oncogene *RET* poderia estar associada à idade e ao tamanho do tumor. Para isto, os pacientes foram separados em dois subgrupos: sem polimorfismos e com polimorfismos. Não foram encontradas diferenças na idade ao diagnóstico ($48,7 \pm 12,8$ vs. $44,4 \pm 13,3$ anos; $p = 0,375$) e no tamanho do tumor ($2,25 \pm 1,59$ vs. $2,0 \pm 1,89$ cm; $p = 0,486$) entre os subgrupos, respectivamente (Figura 8).

Figura 8 - Análise dos polimorfismos do proto-oncogene *RET* e aspectos clínicos como idade ao diagnóstico e tamanho do tumor.



Fonte: Dados da pesquisa.

6.4 ANÁLISE *IN SÍLICO* DAS VARIANTES DO *RET*

As variantes C634R, G691S e Y791N foram submetidas à análise em quatro programas de predição de patogenicidade. Como os programas preditivos não avaliam variantes sinônimas, as variantes L769L, S836S e S904S não foram testadas.

Nos programas PHD-SNP, PMut e SNPs&Go, a variante G691S foi considerada neutra e no programa PolyPhen-2 foi classificada benigna. De fato, pacientes portadores dessa variante não apresentaram características clínico-patológicas associadas à maior agressividade tumoral e (ou) pior prognóstico.

As variantes C634R e Y791N foram associadas à doença nos programas PHD-SNP, PMut e SNPs&Go. No programa PolyPhen-2, C634R e Y791N, foram qualificadas, respectivamente, como patogênica e provavelmente patogênica (Tabela 10). A variante patogênica C634R é uma mutação do *RET* bem conhecida e clinicamente bem caracterizada, associada a NEM2A. O paciente portador dessa variante apresentou características clínicas e patológicas típicas de NEM2A, como a idade jovem ao diagnóstico do CMT e o desenvolvimento de feocromocitoma. Quanto à variante Y791N, não há evidências funcionais (*in vitro*) de sua patogenicidade variante na literatura. Nos raros estudos em que Y791N foi detectada, ela não foi associada a aspectos clínicos e bioquímicos do CMT hereditário^{164,165}. No presente estudo, a paciente portadora dessa variante não apresentou características tumorais agressivas e (ou) pior prognóstico.

Tabela 10 - Análise de predição da patogenicidade das variantes C634R, G691S e Y791N.

Éxon	Variante	PHD-SNP	Pmut	SNPs&GO	PolyPhen-2 (Score)
11	C634R	Doença	Doença	Doença	Patogênica (1,000)
11	G691S	Neutro	Neutro	Neutro	Benigno (0,062)
13	Y791N	Doença	Doença	Doença	Provavelmente patogênica (0,998)

Fonte: Dados da pesquisa.

Quanto ao efeito funcional da variante sobre o a estabilidade da proteína, C634R G691S e Y791N foram previstos para diminuir a estabilidade da proteína RET, tanto no I-Mutant 2.0, quanto no MUPro (Tabela 11).

Embora tenha sido considerada não patogênica, G691S potencialmente parece diminuir a estabilidade da proteína RET. Um mecanismo proposto supõe que a presença da glicina na proteína RET selvagem e da serina na variante polimórfica de RET pode conferir diferentes estruturas eletroquímicas e conformacionais à proteína RET¹³⁹.

A variante C634R induz a substituição de aminoácidos no CRD do RET, resultando em perda de ligações intramoleculares e na liberação de uma cisteína que fica disponível para interagir intermolecularmente com outras proteínas RET mutantes^{92,93}. Quanto à variante Y791N, não há relatos disponíveis na literatura sobre os possíveis mecanismos pelo qual esta variante afeta a estabilidade da proteína RET.

Tabela 11- Análise de predição dos efeitos das variantes C634R, G691S e Y791N sobre a estabilidade da proteína.

Éxon	Variante	I-Mutant 2.0 ($\Delta\Delta G$ value)	MUPro ($\Delta\Delta G$ value)
11	C634R	Diminuição (-0,55)	Diminuição (-1,6269546)
11	G691S	Diminuição (-0,41)	Diminuição (-0,82558099)
13	Y791N	Diminuição (-0,95)	Diminuição (-0,76067218)

Fonte: Dados da pesquisa.

7 DISCUSSÃO

A incidência do CMT no Brasil é desconhecida. Embora um estudo tenha mostrado que a região Nordeste é a segunda em número de casos registrados de CMT²⁷, ainda são escassos os estudos que investigam o comportamento e as características dessa doença em populações nordestinas. No presente estudo, descrevem-se pela primeira vez, as características clínico-patológicas e moleculares de pacientes com CMT no estado da Bahia.

Apesar do tamanho reduzido da amostra, as mulheres representaram a maioria dos casos, assim como observado em outros estudos brasileiros^{166,167}. Embora no CMT hereditário não haja predileção por sexo, devido ao seu padrão de herança autossômico dominante, no CMT esporádico a proporção sexual é de 1:1,4 (masculino/feminino), mostrando uma sutil predominância do sexo feminino¹⁶⁸. Além disso, o câncer de tireoide é, de modo geral, mais frequente em mulheres do que em homens, sendo o quinto tipo de câncer mais frequente em mulheres da região Nordeste (7,98/100 mil)³.

A idade média ao diagnóstico ($46,5 \pm 13,1$ anos) se manteve próxima dos valores encontrados entre os pacientes do Ceará¹⁶⁷ (CMT esporádico 48 ± 15 anos, CMT hereditário 43 ± 14 anos), do Rio Grande do Sul¹⁴⁵ ($46,2 \pm 15,8$ anos) e de São Paulo¹⁶⁹ ($43,9 \pm 10,8$ anos). O tamanho médio do tumor em nossa amostra (2,1 cm) foi inferior às médias encontradas por Ceolin *et al.*¹⁴⁵ no Rio Grande do Sul (3,0 cm) e por Cavalheiro *et al.*¹⁷⁰ em São Paulo (2,9 cm). Além disso, o tamanho do tumor variou entre 0,1 a 5,0 cm, contrastando com os resultados de outro estudo paulista¹⁶⁹ (0,6 a 15 cm). O fato dos estudos em questão contarem com amostras maiores parece explicar as discrepâncias observadas. No entanto, a presença de possíveis mutações somáticas associadas à comportamento tumoral menos agressivo e (ou) o diagnóstico precoce do CMT em alguns pacientes são outras explicações possíveis. Além disso, influências epigenéticas, metabólicas e ambientais também devem ser consideradas.

Encontrou-se maior frequência de tumores unifocais no presente estudo (79,3%). Esse resultado divergiu dos achados de Martins-Costa *et al.*¹⁶⁷ que observaram maior frequência de tumores multifocais entre pacientes com CMT esporádico (86%) e com CMT hereditário (96%), e dos achados de Cavalheiro *et al.*¹⁷⁰ que observaram doença multifocal em 18,5% dos pacientes com CMT. As frequências de invasão de cápsula de tireoide e de extensão extratireoidiana no presente estudo (13,8% e 3,4%, respectivamente) foram menores que as observadas por Brandão *et al.*¹⁶⁶ em São Paulo (32,1% e 13,2%, respectivamente).

A maioria dos tumores foram classificados como T1 e T2, achado semelhante ao

observado entre os pacientes do Ceará¹⁶⁷ (>60% T1/T2). Entretanto, esse resultado diferiu daquele observado por Cavalheiro *et al.*¹⁷⁰, que relataram maior frequência de tumores T3 (18,5%) e T4a (20,4%) entre os pacientes com CMT atendidos em um hospital terciário de São Paulo.

A frequência de pacientes que apresentaram metástase linfonodal (44,8%) foi superior ao observado por Correia-Deur *et al.*¹⁶⁹ em São Paulo (38,5%) e inferior a encontrada por Ceolin *et al.*¹⁴⁵ no Rio Grande do Sul (58,3%). No presente estudo, apenas um paciente (3,4%) apresentou metástase a distância. Essa frequência foi significativamente mais baixa quando comparada com a encontrada por Cavalheiro *et al.*¹⁷⁰ (68,5%), embora o estudo dos referidos autores tenha envolvido um número maior de casos de CMT. O resultado do presente estudo, ainda foi menor que o registrado no Rio Grande do Sul¹⁴⁵ (27,7%).

Embora seja raro, observaram-se CMT e CPT simultâneos em 8 pacientes (27,6%); no Ceará, Martins-Costa *et al.*¹⁶⁷ verificaram a co-existência entre CMT e CPT em 9 pacientes (11,5%). O termo “tumor de colisão” tem sido empregado na literatura para descrever a coexistência de dois tumores histologicamente distintos no mesmo órgão¹⁷¹. Os tumores de colisão representam cerca de 1% de todos os tumores da tireoide, sendo a co-existência de CMT e CPT a mais frequentemente relatada¹⁷²⁻¹⁷⁴.

Outro resultado peculiar foi a coexistência de CMT e Tireoidite de Hashimoto (27,6%). São poucos os estudos que relatam casos de pacientes portando simultaneamente essas doenças¹⁷⁵⁻¹⁷⁸. Zayed *et al.*¹⁷⁶ observaram que dos 863 pacientes submetidos à tireoidectomia entre os anos 2000 e 2012, 15 (1,74%) foram diagnosticados com CMT, três (20%) dos quais apresentavam Tireoidite de Hashimoto coexistente. Embora tenham encontrado uma associação entre CMT e Tireoidite de Hashimoto em pacientes do sexo feminino ($p = 0,04$), os autores sugerem que a associação deve ser considerada com cautela devido aos seguintes fatores: (i) o número limitado de pacientes com CMT incluídos no estudo (apenas 15, sendo 9 mulheres); (ii) a Tireoidite de Hashimoto é mais comum em mulheres; e (iii) não está claro se a associação entre Tireoidite de Hashimoto e CMT em mulheres é coincidência ou se existe uma relação patogênica entre as duas doenças¹⁷⁶. Neste último caso, também não está claro se a Tireoidite de Hashimoto predispõe uma pessoa ao CMT ou se a Tireoidite de Hashimoto é uma defesa contra a neoplasia¹⁷⁶.

No presente estudo, uma variante patogênica do *RET* foi identificada. A variante C634R foi detectada em um homem de 41 anos de idade no momento do diagnóstico, com histórico de feocromocitoma bilateral e colecistite crônica. Em conjunto, as características clínicas, patológicas e moleculares do paciente em questão foram compatíveis com a

síndrome da NEM2A. Diante deste resultado, investigou-se a presença de variantes patogênicas germinativas do proto-oncogene *RET* nos dois filhos do paciente (um do sexo masculino e outro do sexo feminino), conforme as recomendações das diretrizes americanas¹⁸ e brasileiras²⁰. A variante C634R também foi encontrada no filho, enquanto que, na filha, não foram detectadas variantes do *RET*.

As mutações no códon 634 são as mais frequentes na NEM2, sendo identificadas entre 30 a 50% dos pacientes afetados¹⁷⁹. Mutações neste códon estão associadas à alta incidência de feocromocitoma (~50%)³². No Brasil, essas mutações foram encontradas em 262 pacientes (43,6%) que fizeram parte de um grande estudo multicêntrico¹⁸⁰. A mutação C634R, especificamente, foi a segunda mais comum entre os pacientes com NEM2A de dois estudos do Rio Grande do Sul^{125,181} e a terceira mais frequente no Ceará¹⁶⁷.

Embora a ausência de variantes patogênicas germinativas nos demais pacientes seja sugestiva para doença esporádica, alguns pacientes apresentaram uma ou mais características que sugerem doença familiar, como idade jovem ao diagnóstico do CMT (pacientes 5, 8, 10, 13, 21, 22 e 24) ou multifocalidade do tumor (pacientes 12, 13, 15, 20, 22 e 29). É possível que esses casos aparentemente esporádicos sejam portadores de variantes patogênicas em éxons do *RET* que não foram analisadas neste estudo. Entretanto, mutações em outros genes associados ao CMT, presença de hiperplasia de células C e características ambientais da região à qual pertence a amostra, são alguns dos fatores que podem explicar as características observadas nesses pacientes.

O SNP L769L foi o mais frequente na amostra em pauta. Esse polimorfismo também foi o mais frequente (20,1%) entre os pacientes com NEM2 atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no Rio Grande do Sul, e no Hospital Universitário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em São Paulo¹⁸¹. Semelhantes aos estudos Ceolin *et al.*¹⁴⁵ e de Siqueira *et al.*¹⁸¹, ambos do Rio Grande do Sul, também observou-se co-segregação dos SNP G691S/S904S na presente amostra.

A coocorrência de L769L e Y791N e as co-segregações L769L/S836S e G691S/L769L/S904S são achados interessantes de presente estudo. A ocorrência simultânea de L769L e Y791N no CMT parece ser um evento raro, uma vez que não foram encontrados registros de estudos que relatassem a presença simultânea dessas variantes em pacientes afetados. De modo semelhante, não foram encontrados estudos envolvendo pacientes brasileiros com CMT que apresentassem as co-segregações L769L/S836S ou G691S/L769L/S904S. Estas co-segregações já foram descritas por Costa *et al.*¹⁸² em pacientes portugueses. Entretanto, esses autores não apresentaram evidências ou hipóteses de como

essas co-segregações podem afetar a proteína RET.

A associação entre os polimorfismos do proto-oncogene *RET* e a susceptibilidade para o desenvolvimento e a progressão do CMT é uma questão controversa. Enquanto diferentes estudos demonstram haver associação^{136,140-143}, outros estudos mostraram não haver influência dos polimorfismos sobre as características clínicas e oncológicas do CMT¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Já no presente estudo não foram encontradas diferenças quando relacionadas a presença e a ausência de polimorfismos à idade ao diagnóstico e ao tamanho do tumor. Entretanto, o tamanho reduzido de presente amostra pode ter sido um fator limitante às associações propostas.

As análises preditivas demonstraram que G691S é uma variante neutra, entretanto, foi associado à diminuição da estabilidade da proteína RET. Utilizando-se de programas preditivos, Lantieri *et al.*¹⁵⁴ verificaram uma alteração do padrão de fosforilação da proteína RET, como consequência da substituição de aminoácidos em G691S. Segundo esses autores, G691S parece introduzir dois novos alvos de fosforilação nas serinas 686 e 691 e suprime um evento de fosforilação na tirosina 687. Os dados desses autores estão em concordância com os achados de Cebrian *et al.*¹³⁷ e Robledo *et al.*¹³⁸ que relataram mudanças estruturais, conformacionais e no padrão de fosforilação na proteína RET como consequência da troca de aminoácidos em G691S.

Quanto à variante Y791N, as análises preditivas mostraram que ela pode ser patogênica e está associada à diminuição da estabilidade da proteína RET. Resultado semelhante foi observado por Hatanaka¹⁸³ que, além de verificar patogenicidade de Y791N nos programas PMut e PolyPhen-2, também verificou patogenicidade dessa variante nos programas preditivos SNAP (prevista como não neutra) e Align-GVGD (prevista como muito provável de interferir na função da proteína). Como os poucos relatos sobre Y791N não mostraram associação entre a presença dessa variante e manifestações clínicas e bioquímicas do CMT^{164,165}, novos estudos são necessários para avaliar se Y791N é de fato uma variante patogênica.

O presente estudo foi limitado pelo pequeno tamanho da amostra e intervalo limitado de dados. Por se tratar de uma amostra de conveniência, não tivemos acesso aos dados de seguimento clínico do pacientes, como a ocorrência de recidivas ou remissão da doença. Também não tivemos acesso aos dados bioquímicos dos pacientes, como os valores de calcitonina pré e pós-operatória, por exemplo. Além disso, apesar de termos sequenciado os éxons do *RET* nos quais se localizam a maioria das mutações associadas ao CMT hereditário, não analisamos outros éxons do *RET* que também estão associados ao desenvolvimento e a

progressão da doença, particularmente os éxons 8 e 16.

Tendo em vista que a identificação de mutações do proto-oncogene *RET* é a ferramenta chave para o diagnóstico do CMT, a implementação do teste molecular para o rastreio dessas mutações no SUS traria benefícios à população, incluindo a oferta de acesso ao teste molecular, especialmente para a população de baixa renda, com a possibilidade de diagnóstico precoce. Além disso, a implementação da triagem genética de *RET* no SUS, ao possibilitar o diagnóstico precoce do CMT, pode colaborar com a redução da mortalidade e da incapacidade causadas por esse tipo de câncer, o que é preconizado pela *Política Nacional para Prevenção e Controle do Câncer*¹⁸⁴.

8 CONCLUSÃO

O CMT é um tumor com características peculiares e de apresentação clínica variável, dependente da mutação *RET* causadora. Nesse sentido, a genotipagem do proto-oncogene *RET* é considerada ferramenta chave para o diagnóstico do CMT e têm implicações importantes para o manejo clínico dos pacientes.

Neste estudo, descreveu-se o perfil clínico e molecular de pacientes com CMT do estado da Bahia. Uma variante patogênica germinativa do *RET* foi identificada, confirmando o diagnóstico de NEM2A em um paciente (3,4%). Em 15 pacientes (51,7%), identificaram-se polimorfismos do proto-oncogene *RET*, sendo L769L o mais frequente na presente amostra.

Recomenda-se fortemente a realização de novos estudos, envolvendo pacientes com CMT da Bahia, com objetivo de suprir a falta de dados acerca dessa doença no estado – principalmente em pacientes atendidos pelo SUS –, bem como subsidiar o desenvolvimento de ações assistenciais voltadas aos indivíduos afetados.

REFERÊNCIAS

1. Deng Y, Li H, Wang M, Li N, Tian T, Wu Y, et al. Global burden of thyroid cancer from 1990 to 2017. *JAMA Netw Open*. 2020;3(6):e208759. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.8759
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49. doi:10.3322/caac.21660
3. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes Da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa>
4. World Health Organization. Classification of tumours. Endocrine tumours. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2022. Disponível em: <https://tumourclassification.iarc.who.int/welcome/>
5. Czarniecka A, Oczko-Wojciechowska M, Hajduk A, Zeman M, Jarzab B. Current surgical management in RET mutation carriers. *Endokrynol Pol*. 2019;70(4):367-79. doi:10.5603/EP.a2019.0021
6. Kawai K, Takahashi M. Intracellular RET signaling pathways activated by GDNF. *Cell Tissue Res*. 2020;382(1):113-23. doi:10.1007/s00441-020-03262-1
7. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell*. 1985;42(2):581-88. doi:10.1016/0092-8674(85)90115-1
8. Raue F, editor. Medullary thyroid carcinoma. Recent results cancer res. Cham: Springer International Publishing; 2015. 204 p. doi.org/10.1007/978-3-319-22542-5
9. Hofstra RM, Landsvater RM, Ceccherini I, Stulp RP, Stelwagen T, Luo Y, 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. doi: 10.1038/367375a0.
10. Kebebew E, Ituarte PH, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH. Medullary thyroid carcinoma: clinical characteristics, treatment, prognostic factors, and a comparison of staging systems. *Cancer*. 2000;88(5):1139-48. doi: 10.1002/(sici)1097-0142(20000301)88:5<1139::aid-cncr26>3.0.co;2-z.
11. Romei C, Cosci B, Renzini G, Bottici V, Molinaro E, Agate L, et al. RET genetic screening of sporadic medullary thyroid cancer (MTC) allows the preclinical diagnosis of unsuspected gene carriers and the identification of a relevant percentage of hidden familial MTC (FMTC). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011;74(2):241-7. doi: 10.1111/j.1365-2265.2010.03900.x
12. Simbolo M, Mian C, Barollo S, Fassan M, Mafficini A, Neves D, et al. High-throughput mutation profiling improves diagnostic stratification of sporadic medullary thyroid

carcinomas. *Virchows Arch.* 2014;465(1):73-8. doi: 10.1007/s00428-014-1589-3.

13. Wei S, LiVolsi VA, Montone KT, Morrissette JJ, Baloch ZW. Detection of Molecular Alterations in Medullary Thyroid Carcinoma Using Next-Generation Sequencing: an Institutional Experience. *Endocr Pathol.* 2016;27(4):359-362. doi: 10.1007/s12022-016-9446-3.

14. Romei C, Casella F, Tacito A, Bottici V, Valerio L, Viola D, et al. New insights in the molecular signature of advanced medullary thyroid cancer: evidence of a bad outcome of cases with double RET mutations. *J Med Genet.* 2016;53(11):729-734. doi: 10.1136/jmedgenet-2016-103833.

15. Hedayati M, Zarif Yeganeh M, Sheikholeslami S, Afsari F. Diversity of mutations in the RET proto-oncogene and its oncogenic mechanism in medullary thyroid cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2016;53(4):217-27. doi: 10.3109/10408363.2015.1129529.

16. Qu N, Shi X, Zhao JJ, Guan H, Zhang TT, Wen SS, et al. Genomic and Transcriptomic Characterization of Sporadic Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid.* 2020;30(7):1025-1036. doi: 10.1089/thy.2019.0531.

17. Kouvaraki MA, Shapiro SE, Perrier ND, Cote GJ, Gagel RF, Hoff AO, et al. RET proto-oncogene: a review and update of genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid cancer and associated endocrine tumors. *Thyroid.* 2005;15(6):531-44. doi: 10.1089/thy.2005.15.531.

18. Wells AS Junior, Asa SL, Dralle H, Elisei R, Evans DB, Gagel RF, et al. Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2015;25(6):567-10. doi:10.1089/thy.2014.0335

19. Chen H, Sippel RS, O'Dorisio MS, Vinick AI, Lloyd RV, Pacak K, et al. The North American Neuroendocrine Tumor Society consensus guideline for the diagnosis and management of neuroendocrine tumors: pheochromocytoma, paraganglioma, and medullary thyroid cancer. *Pancreas.* 2010;39(6):775-83. doi: 10.1097/MPA.0b013e3181ebb4f0

20. Maia AL, Siqueira DR, Kulcsar MA, Tincani AJ, Mazeto GM, Maciel LM. Diagnosis, treatment, and follow-up of medullary thyroid carcinoma: recommendations by the Thyroid Department of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism. *Arch Endocrinol Metab.* 2014;58(7):667-700. doi:10.1590/0004-2730000003427

21. Viola D, Elisei R. Management of Medullary Thyroid Cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2019;48(1):285-301. doi:10.1016/j.ecl.2018.11.006

22. Randle RW, Balentine CJ, Levenson GE, Havlena JA, Sippel RS, Schneider DF, et al. Trends in the presentation, treatment, and survival of patients with medullary thyroid cancer over the past 30 years. *Surgery.* 2017;161(1):137-46. doi:10.1016/j.surg.2016.04.053

23. Gilliland FD, Hunt WC, Morris DM, Key CR. Prognostic factors for thyroid carcinoma. A population-based study of 15,698 cases from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program 1973-1991. *Cancer.* 1997;79(3):564-73. doi:10.1002/(sici)1097-0142(19970201)79:3<564::aid-cnrcr20>3.0.co;2-0

24. Kuo EJ, Sho S, Li N, Zanoocco KA, Yeh MW, Livhits MJ. Risk Factors Associated With Reoperation and Disease-Specific Mortality in Patients With Medullary Thyroid Carcinoma. *JAMA Surg.* 2018;153(1):52-9. doi:10.1001/jamasurg.2017.3555
25. Miranda-Filho A, Lortet-Tieulent J, Bray F, et al. Thyroid cancer incidence trends by histology in 25 countries: a population-based study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2021;9(4):225-234. doi:10.1016/S2213-8587(21)00027-9
26. Sierra MS, Soerjomataram I, Forman D. Thyroid cancer burden in Central and South America. *Cancer Epidemiol.* 2016;44 Suppl 1:S150-S157. doi:10.1016/j.canep.2016.07.017
27. Borges AKDM, Ferreira JD, Koifman S, Koifman RJ. Thyroid cancer in Brazil: a descriptive study of cases held on hospital-based cancer registries, 2000-2016. *Epidemiol Serv Saude.* 2020;29(4):e2019503. doi:10.5123/s1679-49742020000400012
28. Ceolin L, Duval MADS, Benini AF, Ferreira CV, Maia AL. Medullary thyroid carcinoma beyond surgery: advances, challenges, and perspectives. *Endocr Relat Cancer.* 2019;26(9):R499-R518. doi:10.1530/ERC-18-0574
29. Ball DW. Medullary thyroid cancer: monitoring and therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2007;36(3):823-viii. doi:10.1016/j.ecl.2007.04.001
30. Sippel RS, Kunnimalaiyaan M, Chen H. Current management of medullary thyroid cancer. *Oncologist.* 2008;13(5):539-47. doi:10.1634/theoncologist.2007-0239
31. Roy M, Chen H, Sippel RS. Current understanding and management of medullary thyroid cancer. *Oncologist.* 2013;18(10):1093-100. doi:10.1634/theoncologist.2013-0053
32. Leboulleux S, Baudin E, Travagli JP, Schlumberger M. Medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004;61(3):299-310. doi:10.1111/j.1365-2265.2004.02037.x
33. Fussey JM, Vaidya B, Kim D, Clark J, Ellard S, Smith JA. The role of molecular genetics in the clinical management of sporadic medullary thyroid carcinoma: a systematic review. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2019;91(6):697-707. doi:10.1111/cen.14060
34. Wells SA Jr, Pacini F, Robinson BG, Santoro M. Multiple endocrine neoplasia type 2 and familial medullary thyroid carcinoma: an update. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(8):3149-64. doi:10.1210/jc.2013-1204
35. Newey PJ. Multiple endocrine neoplasia. *Medicine.* 2021;49(9):539-43. doi.org/10.1016/j.mpmed.2021.06.003
36. Mathiesen JS, Effraimidis G, Rossing M, Rasmussen AK, Hoejberg L, Bastholt L, et al. Multiple endocrine neoplasia type 2: a review. *Semin Cancer Biol.* 2022;79:163-79. doi:10.1016/j.semcancer.2021.03.035
37. Raue F, Frank-Raue K. Update multiple endocrine neoplasia type 2. *Fam Cancer.* 2010;9(3):449-57. doi:10.1007/s10689-010-9320-2

38. Scapineli JO, Ceolin L, Puñales MK, Dora JM, Maia AL. MEN 2A-related cutaneous lichen amyloidosis: report of three kindred and systematic literature review of clinical, biochemical and molecular characteristics. *Fam Cancer*. 2016;15(4):625-33. doi:10.1007/s10689-016-9892-6
39. Coyle D, Friedmacher F, Puri P. The association between Hirschsprung's disease and multiple endocrine neoplasia type 2a: a systematic review. *Pediatr Surg Int*. 2014;30(8):751-6. doi:10.1007/s00383-014-3538-2
40. Castinetti F, Waguespack SG, Machens A, Uchino S, Hasse-Lazar K, Sando G, et al. Natural history, treatment, and long-term follow up of patients with multiple endocrine neoplasia type 2B: an international, multicentre, retrospective study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019;7(3):213-20. doi:10.1016/S2213-8587(18)30336-X
41. Hadoux J, Pacini F, Tuttle RM, Schlumberger M. Management of advanced medullary thyroid cancer. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016;4(1):64-71. doi:10.1016/S2213-8587(15)00337-X
42. Niederle MB, Scheuba C, Riss P, Selberherr A, Koperek O, Niederle B. Early Diagnosis of Medullary Thyroid Cancer: Are Calcitonin Stimulation Tests Still Indicated in the Era of Highly Sensitive Calcitonin Immunoassays? *Thyroid*. 2020;30(7):974-984. doi:10.1089/thy.2019.0785.
43. Park H, Park J, Choi MS, Kim J, Kim H, Shin JH, et al. Preoperative Serum Calcitonin and Its Correlation with Extent of Lymph Node Metastasis in Medullary Thyroid Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10):2894. doi:10.3390/cancers12102894.
44. Turkdogan S, Forest VI, Hier MP, Tamilia M, Florea A, Payne RJ. Carcinoembryonic antigen levels correlated with advanced disease in medullary thyroid cancer. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2018;47(1):55. doi:10.1186/s40463-018-0303-x
45. Pacini F, Castagna MG, Cipri C, Schumberger M. Medullary thyroid carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2010;22(6):475-85. doi:10.1016/j.clon.2010.05.002
46. Machens A, Ukkat J, Hauptmann S, Dralle H. Abnormal carcinoembryonic antigen levels and medullary thyroid cancer progression: a multivariate analysis. *Arch Surg*. 2007;142(3):289-94. doi:10.1001/archsurg.142.3.289
47. Buzdugă CM, Costea CF, Cărăuleanu A, Lozneau L, Turliuc MD, Cucu AI, et al. Protean cytological, histological and immunohistochemical appearances of medullary thyroid carcinoma: current updates. *Rom J Morphol Embryol*. 2019;60(2):369-81.
48. Klöppel G. Tumour biology and histopathology of neuroendocrine tumours. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2007;21(1):15-31. doi:10.1016/j.beem.2007.01.004
49. Agarwal S, Bychkov A, Jung CK. Emerging Biomarkers in thyroid practice and research. *Cancers (Basel)*. 2021;14(1):204. doi:10.3390/cancers14010204
50. Tisell LE, Oden A, Muth A, Altiparmak G, Mölne J, Ahlman H, et al. The Ki67 index a prognostic marker in medullary thyroid carcinoma. *Br J Cancer*. 2003;89(11):2093-7.

doi:10.1038/sj.bjc.6601453

51. Mian C, Pennelli G, Barollo S, Altiparmak G, Mölne J, Ahlman H, et al. Combined RET and Ki-67 assessment in sporadic medullary thyroid carcinoma: a useful tool for patient risk stratification. *Eur J Endocrinol.* 2011;164(6):971-6. doi:10.1530/EJE-11-0079
52. Xu B, Fuchs TL, Ahmadi S, Alghamdi M, Alzumaili B, Mohamed-Amine B, et al. International medullary thyroid carcinoma grading system: a validated grading system for medullary thyroid carcinoma. *J Clin Oncol.* 2022;40(1):96-104. doi:10.1200/JCO.21.01329
53. Takahashi M. Structure and expression of the ret transforming gene. *IARC Sci Publ.* 1988;(92):189-97.
54. Avantaggiato V, Dathan NA, Grieco M, Fabien N, Lazzaro D, Fusco A, et al. Developmental expression of the RET protooncogene. *Cell Growth Differ.* 1994;5(3):305-11.
55. Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature.* 1994;367(6461):380-83. doi:10.1038/367380a0
56. Ikeda I, Ishizaka Y, Tahira T, Suzuki T, Onda M, Sugimura T, et al. Specific expression of the ret proto-oncogene in human neuroblastoma cell lines. *Oncogene.* 1990;5(9):1291-6.
57. Santoro M, Rosati R, Grieco M, Berlingieri MT, D'Amato GL, Franciscis V de, et al. The ret proto-oncogene is consistently expressed in human pheochromocytomas and thyroid medullary carcinomas. *Oncogene.* 1990;5(10):1595-8.
58. Takahashi M, Buma Y, Taniguchi M. Identification of the ret proto-oncogene products in neuroblastoma and leukemia cells. *Oncogene.* 1991;6(2):297-301.
59. Pasini B, Hofstra RM, Yin L, et al. The physical map of the human RET proto-oncogene. *Oncogene.* 1995;11(9):1737-1743.
60. Takahashi M, Buma Y, Iwamoto T, Inaguma Y, Ikeda H, Hiai H. Cloning and expression of the ret proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. *Oncogene.* 1988;3(5):571-8.
61. Iwamoto T, Taniguchi M, Asai N, Ohkusu K, Nakashima I, Takahashi M. cDNA cloning of mouse ret proto-oncogene and its sequence similarity to the cadherin superfamily. *Oncogene.* 1993;8(4):1087-91.
62. Sugaya R, Ishimaru S, Hosoya T, Saigo K, Emori Y. A Drosophila homolog of human proto-oncogene ret transiently expressed in embryonic neuronal precursor cells including neuroblasts and CNS cells. *Mech Dev.* 1994;45(2):139-45. doi:10.1016/0925-4773(94)90027-2
63. Marcos-Gutiérrez CV, Wilson SW, Holder N, Pachnis V. The zebrafish homologue of the ret receptor and its pattern of expression during embryogenesis. *Oncogene.* 1997;14(8):879-89. doi:10.1038/sj.onc.1201048

64. Hahn M, Bishop J. Expression pattern of *Drosophila ret* suggests a common ancestral origin between the metamorphosis precursors in insect endoderm and the vertebrate enteric neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(3):1053-8. doi: 10.1073/pnas.98.3.1053
65. Machens A, Lorenz K, Dralle H. Constitutive RET tyrosine kinase activation in hereditary medullary thyroid cancer: clinical opportunities. *J Intern Med*. 2009;266(1):114-25. doi:10.1111/j.1365-2796.2009.02113.x
66. Phay JE, Shah MH. Targeting RET receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16(24):5936-41. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0786
67. Anders J, Kjar S, Ibáñez CF. Molecular modeling of the extracellular domain of the RET receptor tyrosine kinase reveals multiple cadherin-like domains and a calcium-binding site. *J Biol Chem*. 2001;276(38):35808-17. doi:10.1074/jbc.M104968200
68. Mahato AK, Sidorova YA. RET receptor tyrosine kinase: role in neurodegeneration, obesity, and cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(19):7108. doi:10.3390/ijms21197108
69. Ibáñez CF. Structure and physiology of the RET receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(2):a009134. doi:10.1101/cshperspect.a009134
70. Takahashi M, Asai N, Iwashita T, Isomura T, Miyazaki K, Matsuyama M. Characterization of the ret proto-oncogene products expressed in mouse L cells. *Oncogene*. 1993;8(11):2925-9.
71. Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Insights into mechanisms of GDF15 and receptor gfral: therapeutic targets. *Trends Endocrinol Metab*. 2020;31(12):939-51. doi:10.1016/j.tem.2020.10.004
72. Tahira T, Ishizaka Y, Itoh F, Sugimura T, Nagao M. Characterization of ret proto-oncogene mRNAs encoding two isoforms of the protein product in a human neuroblastoma cell line. *Oncogene*. 1990;5(1):97-102.
73. Myers SM, Eng C, Ponder BA, Mulligan LM. Characterization of RET proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C-terminus for RET. *Oncogene*. 1995;11(10):2039-45.
74. Carter MT, Yome JL, Marcil MN, Martin CA, Vanhorne JB, Mulligan LM. Conservation of RET proto-oncogene splicing variants and implications for RET isoform function. *Cytogenet Cell Genet*. 2001;95(3-4):169-176. doi:10.1159/000059341
75. Pachnis V, Mankoo B, Costantini F. Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development*. 1993;119(4):1005-17. doi:10.1242/dev.119.4.1005
76. Tsuzuki T, Takahashi M, Asai N, Iwashita T, Matsuyama M, Asai J. Spatial and temporal expression of the ret proto-oncogene product in embryonic, infant and adult rat tissues. *Oncogene*. 1995;10(1):191-8.
77. Trupp M, Belluardo N, Funakoshi H, Ibáñez CF. Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-oncogene, and

GDNF receptor-alpha indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS. *J Neurosci.* 1997;17(10):3554-67. doi:10.1523/JNEUROSCI.17-10-03554.1997

78. Bennett DL, Michael GJ, Ramachandran N, Munson JB, Averill S, Yan Q, et al. A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury. *J Neurosci.* 1998;18(8):3059-72. doi:10.1523/JNEUROSCI.18-08-03059.1998

79. Ichihara M, Murakumo Y, Takahashi M. RET and neuroendocrine tumors. *Cancer Lett.* 2004;204(2):197-211. doi:10.1016/S0304-3835(03)00456-7

80. Schuchardt A, D'Agati V, Pachnis V, Costantini F. Renal agenesis and hypodysplasia in ret-k- mutant mice result from defects in ureteric bud development. *Development.* 1996;122(6):1919-29. doi:10.1242/dev.122.6.1919

81. Chi X, Michos O, Shakya R, Riccio P, Enomoto H, Licht JD, et al. Ret-dependent cell rearrangements in the wolffian duct epithelium initiate ureteric bud morphogenesis. *Dev Cell.* 2009;17(2):199-209. doi:10.1016/j.devcel.2009.07.013

82. Davis TK, Hoshi M, Jain S. To bud or not to bud: the RET perspective in CAKUT. *Pediatr Nephrol.* 2014;29(4):597-608. doi:10.1007/s00467-013-2606-5

83. Meng X, Lindahl M, Hyvönen ME, Parvinen M, Rooij MD de, Hess MW, et al. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science.* 2000;287(5457):1489-93. doi:10.1126/science.287.5457.1489

84. Naughton CK, Jain S, Strickland AM, Gupta A, Milbrandt J. Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate. *Biol Reprod.* 2006;74(2):314-21. doi:10.1095/biolreprod.105.047365

85. Jijiwa M, Kawai K, Fukihara J, Nakamura A, Hasegawa M, Suzuki C, et al. GDNF-mediated signaling via RET tyrosine 1062 is essential for maintenance of spermatogonial stem cells. *Genes Cells.* 2008;13(4):365-74. doi:10.1111/j.1365-2443.2008.01171.

86. Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3(5):383-94. doi:10.1038/nrn812

87. Accardo G, Conzo G, Esposito D, Gambardella C, Mazzella M, Castaldo F, et al. Genetics of medullary thyroid cancer: an overview. *Int J Surg.* 2017;41:(Suppl 1):S2-S6. doi:10.1016/j.ijssu.2017.02.064

88. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature.* 1993;363(6428):458-60. doi:10.1038/363458a0

89. Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore, TC, et al. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet.* 1993;2(7):851-6. doi:10.1093/hmg/2.7.851

90. Li SY, Ding YQ, Si YL, Ye MJ, Xu CM, Qi XP. 5P Strategies for Management of

- Multiple Endocrine Neoplasia Type 2: A Paradigm of Precision Medicine. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:543246. doi:10.3389/fendo.2020.543246
91. Raue F, Frank-Raue K. Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(Suppl 1):69-75. doi: 10.6061/clinics/2012(sup01)13
92. Asai N, Iwashita T, Matsuyama M, Takahashi M. Mechanism of activation of the ret proto-oncogene by multiple endocrine neoplasia 2A mutations. *Mol Cell Biol*. 1995;15(3):1613-9. doi:10.1128/MCB.15.3.1613
93. Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro DP, Dathan NA, Grieco M, et al. Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science*. 1995;267(5196):381-3. doi:10.1126/science.7824936
94. Rothberg AE, Raymond VM, Gruber SB, Sisson J. Familial medullary thyroid carcinoma associated with cutaneous lichen amyloidosis. *Thyroid*. 2009;19(6):651-5. doi:10.1089/thy.2009.0021
95. Qi XP, Peng JZ, Yang XW, Cao Z-L, Yu X-H, Fang X-D, et al. The RET C611Y mutation causes MEN 2A and associated cutaneous. *Endocr Connect*. 2018;7(9):998-1005. doi:10.1530/EC-18-0220
96. Frank-Raue K, Rybicki LA, Erlic Z, Schweizer H, Winter A, Milos I, et al. Risk profiles and penetrance estimations in multiple endocrine neoplasia type 2A caused by germline RET mutations located in exon 10. *Hum Mutat*. 2011;32(1):51-8. doi:10.0002/humu.21385
97. Raue F, Frank-Raue K. Genotype-phenotype relationship in multiple endocrine neoplasia type 2. Implications for clinical management. *Hormones (Athens)*. 2009;8(1):23-8. doi:10.14310/horm.2002.1218
98. Carlson KM, Dou S, Chi D, Scavarda N, Toshima K, Jackson CE, et al. Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the RET protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(4):1579-83. doi:10.1073/pnas.91.4.1579
99. Smith DP, Houghton C, Ponder BA. Germline mutation of RET codon 883 in two cases of de novo MEN 2B. *Oncogene*. 1997;15(10):1213-17. doi:10.1038/sj.onc.1201481
100. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *JAMA*. 1996;276(19):1575-9. doi:10.1001/jama.1996.03540190047028
101. Gimm O, Marsh DJ, Andrew SD, Frilling A, Dahia PL, Mulligan LM, et al. Germline dinucleotide mutation in codon 883 of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B without codon 918 mutation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(11):3902-4. doi:10.1210/jcem.82.11.4508
102. Mathiesen JS, Habra MA, Bassett JHD, Choudhury M, Balasubramanian SP, Howlett TA, et al. Risk profile of the RET A883F germline mutation: an international collaborative

- study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(6):2069-74. doi:10.1210/jc.2016-3640
103. Songyang Z, Carraway KL 3rd, Eck MJ, Harrison SC, Feldman RA, Mohammadi M, et al. Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature.* 1995;373(6514):536-9. doi:10.1038/373536a0
104. Gujral TS, Singh VK, Jia Z, Mulligan LM. Molecular mechanisms of RET receptor-mediated oncogenesis in multiple endocrine neoplasia 2B. *Cancer Res.* 2006;66(22):10741-9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3329
105. Knowles PP, Murray-Rust J, Kjaer S, Scott RP, Hanrahan S, Santoro M, et al. Structure and chemical inhibition of the RET tyrosine kinase domain. *J Biol Chem.* 2006;281(44):33577-87. doi: 10.1074/jbc. M605604200
106. Cranston AN, Carniti C, Oakhill K, Radzio-Andzelm E, Stone EA, McCallionet AS, al. RET is constitutively activated by novel tandem mutations that alter the active site resulting in multiple endocrine neoplasia type 2B. *Cancer Res.* 2006;66(20):10179-87. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0884
107. Miyauchi A, Futami H, Hai N, Radzio-Andzelm E, Stone EA, McCallion AS, et al. 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):1-5. doi:10.1111/j.1349-7006.1999.tb00658.x
108. Iwashita T, Murakami H, Kurokawa K, Kawai K, Miyauchi A, Futami H, et al. A two-hit model for development of multiple endocrine neoplasia type 2B by RET mutations. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;268(3):804-08. doi:10.1006/bbrc.2000.2227
109. Kameyama K, Okinaga H, Takami H. RET oncogene mutations in 75 cases of familial medullary thyroid carcinoma in Japan. *Biomed Pharmacother.* 2004;58(6-7):345-7. doi:10.1016/j.biopha.2004.05.001
110. Nakao KT, Usui T, Ikeda M, Mori Y, Yamamoto T, Kawashima S-T, et al. Novel tandem germline RET proto-oncogene mutations in a patient with multiple endocrine neoplasia type 2B: report of a case and a literature review of tandem RET mutations with in silico analysis. *Head Neck.* 2013;35(12):E363-8. doi:10.1002/hed.23241
111. Mathew A, Latteyer S, Frank-Raue K, Moeller LC, Zwanziger D, Mengel M, et al. A Novel double RET E768D/L790F mutation associated with a MEN2B-Like phenotype. *Thyroid.* 2021;31(2):327-9. doi:10.1089/thy.2019.0472
112. Eng C, Mulligan LM, Healey CS, Houghton C, Frilling A, Raue F, et al. Heterogeneous mutation of the RET proto-oncogene in subpopulations of medullary thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 1996;56(9):2167-70.
113. Eng C, Mulligan LM, Smith DP, Healey CS, Frilling A, Raue F, et al. Mutation of the RET protooncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 1995;12(3):209-12. doi:10.1002/gcc.2870120308
114. Marsh DJ, Learoyd DL, Andrew SD, Krishnan L, Pojer R, Richardson AL, et al.

- Somatic mutations in the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1996;44(3):249-57. doi:10.1046/j.1365-2265.1996.681503.x
115. Romei C, Elisei R, Pinchera A, Ceccherini I, Molinaro E, Mancusi, F, et al. Somatic mutations of the ret protooncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma are not restricted to exon 16 and are associated with tumor recurrence. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(4):1619-22. doi:10.1210/jcem.81.4.8636377
116. Dvorakova S, Vaclavikova E, Sykorova V, Vcelak J, Novak Z, Duskova J, et al. Somatic mutations in the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinomas. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;284(1-2):21-7. doi:10.1016/j.mce.2007.12.016
117. Elisei R, Cosci B, Romei C, Bottici V, Renzini G, Molinaro E, et al. Prognostic significance of somatic RET oncogene mutations in sporadic medullary thyroid cancer: a 10-year follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(3):682-7. doi:10.1210/jc.2007-1714
118. Moura MM, Cavaco BM, Pinto AE, Domingues R, Santos JR, Cid MO, et al. Correlation of RET somatic mutations with clinicopathological features in sporadic medullary thyroid carcinomas. *Br J Cancer*. 2009;100(11):1777-83. doi:10.1038/sj.bjc.6605056
119. Romei C, Ciampi R, Casella F, Tacito A, Torregrossa L, Ugolini C, et al. RET mutation heterogeneity in primary advanced medullary thyroid cancers and their metastases. *Oncotarget*. 2018;9(11):9875-84. doi:10.18632/oncotarget.23986
120. Mulligan LM, Marsh DJ, Robinson BG, Schuffenecker I, Zedenius J, Lips CJM, et al. Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2: report of the International RET Mutation Consortium. *J Intern Med*. 1995;238(4):343-6. doi:10.1111/j.1365-2796.1995.tb01208.x
121. Machens A, Gimm O, Hinze R, Höppner W, Boehm BO, Dralle H. Genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid carcinoma: oncological features and biochemical properties. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(3):1104-9. doi:10.1210/jcem.86.3.7290
122. Yip L, Cote GJ, Shapiro SE, Ayers GD, Herzog CE, Sellin RV, et al. Multiple endocrine neoplasia type 2: evaluation of the genotype-phenotype relationship. *Arch Surg*. 2003;138(4):409-16. doi:10.1001/archsurg.138.4.409
123. Milos IN, Frank-Raue K, Wohllk N, Maia AL, Pusiol E, Patocs A, et al. Age-related neoplastic risk profiles and penetrance estimations in multiple endocrine neoplasia type 2A caused by germ line RET Cys634Trp (TGC>TGG) mutation. *Endocr Relat Cancer*. 2008;15(4):1035-41. doi:10.1677/ERC-08-0105
124. Schuffenecker I, Virally-Monod M, Brohet R, Goldgar D, Conte-Devolx B, Leclerc L, et al. Risk and penetrance of primary hyperparathyroidism in multiple endocrine neoplasia type 2A families with mutations at codon 634 of the RET proto-oncogene. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(2):487-91. doi:10.1210/jcem.83.2.4529
125. 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(6):2644-9. doi:10.1210/jc.2002-021422

126. Jasim S, Ying AK, Waguespack SG, Rich TA, Grubbs EG, Jimenez C, et al. Multiple endocrine neoplasia type 2B with a RET proto-oncogene A883F mutation displays a more indolent form of medullary thyroid carcinoma compared with a RET M918T mutation. *Thyroid*. 2011;21(2):189-92. doi:10.1089/thy.2010.0328
127. Schilling T, Bürck J, Sinn HP, Clemens A. Prognostic value of codon 918 (ATG-->ACG) RET proto-oncogene mutations in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Int J Cancer*. 2001;95(1):62-6. doi:10.1002/1097-0215(20010120)95:1<62::aid-ijc1011>3.0.co;2-1
128. Romei C, Ugolini C, Cosci B, Torregrossa L, Vivaldi A, Ciampi R, et al. Low prevalence of the somatic M918T RET mutation in micro-medullary thyroid cancer. *Thyroid*. 2012;22(5):476-81. doi:10.1089/thy.2011.0358
129. Raue F, Frank-Raue K. Update on multiple endocrine neoplasia type 2: focus on medullary thyroid carcinoma. *J Endocr Soc*. 2018;2(8):933-43. doi:10.1210/js.2018-00178
130. Lombardo F, Baudin E, Chiefari E, Arturi F, Bardet S, Caillou B, et al. Familial medullary thyroid carcinoma: clinical variability and low aggressiveness associated with RET mutation at codon 804. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(4):1674-80. doi:10.1210/jcem.87.4.8403
131. Lindskog S, Nilsson O, Jansson S, Illerskog A-C, Ysander L, Ahlman H, et al. Phenotypic expression of a family with multiple endocrine neoplasia type 2A due to a RET mutation at codon 618. *Br J Surg*. 2004;91(6):713-8. doi:10.1002/bjs.4457
132. Signorini PS, França MI, Camacho CP, Lindsey SC, Valente FOF, Kasamatsu TS, et al. A ten-year clinical update of a large RET p.Gly533Cys kindred with medullary thyroid carcinoma emphasizes the need for an individualized assessment of affected relatives. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014;80(2):235-45. doi:10.1111/cen.12264
133. Long KL, Etzel C, Rich T, et al. All in the family? Analyzing the impact of family history in addition to genotype on medullary thyroid carcinoma aggressiveness in MEN2A patients. *Fam Cancer*. 2017;16(2):283-9. doi:10.1007/s10689-016-9948-7
134. Machens A, Lorenz K, Weber F, Dralle H. Genotype-specific progression of hereditary medullary thyroid cancer. *Hum Mutat*. 2018;39(6):860-9. doi:10.1002/humu.23430
135. Mathiesen JS, Nielsen SG, Rasmussen ÅK, Kiss K, Wadt K, Hermann AP, et al. Variability in medullary thyroid carcinoma in ret I790f carriers: a case comparison study of index patients. *Front Endocrinol*. 2020;11(251):1-7. doi:10.3389/fendo.2020.00251
136. Colombo C, Minna E, Rizzetti MG, et al. The modifier role of RET-G691S polymorphism in hereditary medullary thyroid carcinoma: functional characterization and expression/penetrance studies. *Orphanet J Rare Dis*. 2015;10:25. doi:10.1186/s13023-015-0231-z
137. Cebrian A, Lesueur F, Martin S, et al. Polymorphisms in the initiators of RET (rearranged during transfection) signaling pathway and susceptibility to sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(11):6268-6274. doi:10.1210/jc.2004-

2449

138. Robledo M, Gil L, Pollán M, et al. Polymorphisms G691S/S904S of RET as genetic modifiers of MEN 2A. *Cancer Res.* 2003;63(8):1814-1817.
139. Elisei R, Cosci B, Romei C, et al. RET exon 11 (G691S) polymorphism is significantly more frequent in sporadic medullary thyroid carcinoma than in the general population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(7):3579-3584. doi:10.1210/jc.2003-031898
140. Lebeault M, Pinson S, Guillaud-Bataille M, et al. Nationwide French Study of RET Variants Detected from 2003 to 2013 Suggests a Possible Influence of Polymorphisms as Modifiers. *Thyroid.* 2017;27(12):1511-1522. doi:10.1089/thy.2016.0399
141. Magalhães PK, de Castro M, Elias LL, Soares EG, Maciel LM. Polymorphisms in the RET proto-oncogene and the phenotypic presentation of familial medullary thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2004;14(10):848-852. doi:10.1089/thy.2004.14.848
142. Wiench M, Wygoda Z, Gubala E, et al. Estimation of risk of inherited medullary thyroid carcinoma in apparent sporadic patients. *J Clin Oncol.* 2001;19(5):1374-1380. doi:10.1200/JCO.2001.19.5.1374
143. Sromek M, Czetwertyńska M, Skasko E, Zielińska J, Czapczak D, Steffen J. The frequency of selected polymorphic variants of the RET gene in patients with medullary thyroid carcinoma and in the general population of central. Poland. *Endocr Pathol.* 2010;21(3):178-185. doi:10.1007/s12022-010-9125-8
144. Siqueira DR, Romitti M, da Rocha AP, et al. The RET polymorphic allele S836S is associated with early metastatic disease in patients with hereditary or sporadic medullary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer.* 2010;17(4):953-963. doi:10.1677/ERC-09-0312
145. Ceolin L, Siqueira DR, Ferreira CV, et al. Additive effect of RET polymorphisms on sporadic medullary thyroid carcinoma susceptibility and tumor aggressiveness. *Eur J Endocrinol.* 2012;166(5):847-854. doi:10.1530/EJE-11-1060
146. Machens A, Frank-Raue K, Lorenz K, Rondot S, Raue F, Dralle H. Clinical relevance of RET variants G691S, L769L, S836S and S904S to sporadic medullary thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012;76(5):691-697. doi:10.1111/j.1365-2265.2011.04293.x
147. Zhang Y, Wang S, Chen X, Huang S, Li J. Quantitative assessment of the association between L769L and S836S polymorphisms at RET gene and medullary thyroid carcinoma risk. *Tumour Biol.* 2014;35(7):6641-6647. doi:10.1007/s13277-014-1878-0
148. Skalniak A, Trofimiuk-Müldner M, Przybylik-Mazurek E, Hubalewska-Dydejczyk A. Modifier Role of Common RET Variants in Sporadic Medullary Thyroid Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 30;22(21):11794. doi: 10.3390/ijms222111794.
149. Berard I, Kraimps JL, Savagner F, et al. Germline-sequence variants S836S and L769L in the RE arranged during Transfection (RET) proto-oncogene are not associated with predisposition to sporadic medullary carcinoma in the French population. *Clin Genet.* 2004;65(2):150-152. doi:10.1111/j.0009-9163.2004.00172.x

150. Baumgartner-Parzer SM, Lang R, Wagner L, et al. Polymorphisms in exon 13 and intron 14 of the RET protooncogene: genetic modifiers of medullary thyroid carcinoma?. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(11):6232-6236. doi:10.1210/jc.2005-1278
151. Wohllk, N; Soto, E; Bravo, M; Becker, P. G691S, L769L and S836S ret proto-oncogene polymorphisms are not associated with higher risk to sporadic medullary thyroid carcinoma in Chilean patients. *Rev. Méd. Chile.* 2005;133(4):397-402. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872005000400001>.
152. Weinhaeusel A, Scheuba C, Lauss M, et al. The influence of gender, age, and RET polymorphisms on C-cell hyperplasia and medullary thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2008;18(12):1269-1276. doi:10.1089/thy.2008.0139
153. Sharma BP, Saranath D. RET gene mutations and polymorphisms in medullary thyroid carcinomas in Indian patients. *J Biosci.* 2011;36(4):603-611. doi:10.1007/s12038-011-9095-0
154. Lantieri F, Caroli F, Ceccherini I, Griseri P. The involvement of the RET variant G691S in medullary thyroid carcinoma enlightened by a meta-analysis study. *Int J Cancer.* 2013;132(12):2808-2819. doi:10.1002/ijc.27967
155. Rocha, AP; Magalhães, PK; Maia, AL; Maciel, LM. Genetic polymorphisms: implications in the pathogenesis of medullary thyroid carcinoma. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 2007; 51(5):723-730. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302007000500009>
156. Ceolin, L.; Siqueira, D.R.; Romitti, M.; Ferreira, C.V.; Maia, A.L. Molecular Basis of Medullary Thyroid Carcinoma: The Role of RET Polymorphisms. *Int. J. Mol. Sci.* 2012;13(1):221-239. <https://doi.org/10.3390/ijms13010221>
157. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30.
158. Brierley J, Gospodarowicz M, Wittekind C, editors. *TNM classification of malignant tumours.* Chichester: Wiley; 2017.
159. Amodru V, Taieb D, Guerin C, Romanet P, Paladino N, Brue T, et al. MEN2-related pheochromocytoma: current state of knowledge, specific characteristics in MEN2B, and perspectives. *Endocrine.* 2020;69(3):496-503. doi: 10.1007/s12020-020-02332-2.
160. Inabnet WB, Caragliano P, Pertsemlidis D. Pheochromocytoma: inherited associations, bilaterality, and cortex preservation. *Surgery.* 2000;128(6):1007-1012. doi: 10.1067/msy.2000.110846.
161. Rodriguez JM, Balsalobre M, Ponce JL, Ríos A, Torregrosa NM, Tebar J, et al. Pheochromocytoma in MEN 2A syndrome. Study of 54 patients. *World J Surg.* 2008;32(11):2520-6. doi: 10.1007/s00268-008-9734-2.
162. Frank-Raue K, Rybicki LA, Erlic Z, Schweizer H, Winter A, Milos I, et al. 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(1):51-8. doi: 10.1002/humu.21385. PMID: 20979234.

163. Imai T, Uchino S, Okamoto T, Suzuki S, Kosugi S, Kikumori T, et al. MEN Consortium of Japan. High penetrance of pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia 2 caused by germ line RET codon 634 mutation in Japanese patients. *Eur J Endocrinol.* 2013;168(5):683-7. doi: 10.1530/EJE-12-1106.

164. Ruiz-Ferrer M, Fernández RM, Antiñolo G, López-Alonso M, Eng C, Borrego S. A complex additive model of inheritance for Hirschsprung disease is supported by both RET mutations and predisposing RET haplotypes. *Genet Med.* 2006;8(11):704-10. doi: 10.1097/01.gim.0000245632.06064.f1.

165. Frank-Raue K, Döhring J, Scheumann G, Rondot S, Lorenz A, Schulze E, et al. New mutations in the RET protooncogene-L881V - associated with medullary thyroid carcinoma and -R770Q - in a patient with mixed medullar/follicular thyroid tumour. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2010;118(8):550-3. doi: 10.1055/s-0029-1241851.

166. Brandão LG, Cavalheiro BG, Junqueira CR. Prognostic influence of clinical and pathological factors in medullary thyroid carcinoma: a study of 53 cases. *Clinics (Sao Paulo).* 2009;64(9):849-56. doi: 10.1590/S1807-59322009000900005.

167. Martins-Costa MC, Lindsey SC, Cunha LL, Carreiro-Filho FP, Cortez AP, Holanda ME, et al. A pioneering RET genetic screening study in the State of Ceará, Brazil, evaluating patients with medullary thyroid cancer and at-risk relatives: experience with 247 individuals. *Arch Endocrinol Metab.* 2018;62(6):623-635. doi: 10.20945/2359-3997000000088.

168. Raue F. German medullary thyroid carcinoma/multiple endocrine neoplasia registry. *Langenbecks Arch Surg.* 1998;383(5):334-336. doi: 10.1007/s004230050143.

169. Correia-Deur JE, Toledo RA, Imazawa AT, Lourenço DM Jr, Ezabella MC, Tavares MR, Toledo SP. Sporadic medullary thyroid carcinoma: clinical data from a university hospital. *Clinics (Sao Paulo).* 2009;64(5):379-86. doi: 10.1590/s1807-59322009000500002.

170. Cavalheiro BG, Matos LL, Leite AK, Kulcsar MA, Cernea CR, Brandão LG. Surgical treatment for thyroid carcinoma: retrospective study with 811 patients in a Brazilian tertiary hospital. *Arch Endocrinol Metab.* 2016;60(5):472-478. doi: 10.1590/2359-3997000000209.

171. Brandwein-Gensler M, Urken M, Wang B. Collision tumor of the thyroid: a case report of metastatic liposarcoma plus papillary thyroid carcinoma. *Head Neck.* 2004;26(7):637-41. doi: 10.1002/hed.20024.

172. Rossi S, Fugazzola L, De Pasquale L, Braidotti P, Cirello V, Beck-Peccoz P, et al. Medullary and papillary carcinoma of the thyroid gland occurring as a collision tumour: report of three cases with molecular analysis and review of the literature. *Endocr Relat Cancer.* 2005;12(2):281-9. doi: 10.1677/erc.1.00901.

173. Dikbas O, Duman AA, Guvendi GF. Medullary Thyroid Carcinoma and Papillary Thyroid Carcinoma in the Same Patient as a Collision Tumour. *Case Rep Endocrinol.*

2019;2019:4038628. doi: 10.1155/2019/4038628.

174. Thomas A, Mittal N, Rane SU, Bal M, Patil A, Ankathi SK, Vaish R. Papillary and Medullary Thyroid Carcinomas Presenting as Collision Tumors: A Case Series of 21 Cases at a Tertiary Care Cancer Center. *Head Neck Pathol.* 2021;15(4):1137-1146. doi: 10.1007/s12105-021-01323-7.

175. Mousa U, Gursoy A, Ozdemir H, Moray G. Medullary thyroid carcinoma in a patient with Hashimoto's thyroiditis diagnosed by calcitonin washout from a thyroid nodule. *Diagn Cytopathol.* 2013;41(7):644-6. doi: 10.1002/dc.21850.

176. Zayed AA, Ali MK, Jaber OI, Suleiman MJ, Ashhab AA, Al Shweiat WM, et al. Is Hashimoto's thyroiditis a risk factor for medullary thyroid carcinoma? Our experience and a literature review. *Endocrine.* 2015;48(2):629-36. doi: 10.1007/s12020-014-0363-2.

177. Dasgupta S, Chakrabarti S, Mandal PK, Das S. Hashimoto's Thyroiditis and Medullary Carcinoma of Thyroid. *JNMA J Nepal Med Assoc.* 2014;52(194):831-3.

178. Malpani S, Tandon A, Panwar H, Khurana U, Kapoor N, Behera G, Gupta V. Medullary thyroid carcinoma co-existent with Hashimoto's thyroiditis diagnosed by a comprehensive cytological approach. *Diagn Cytopathol.* 2020;48(4):386-389. doi: 10.1002/dc.24373.

179. Maciel RMB, Maia AL. Global endocrinology: Geographical variation in the profile of RET variants in patients with medullary thyroid cancer: a comprehensive review. *Eur J Endocrinol.* 2021;186(1):R15-R30. doi: 10.1530/EJE-21-0753.

180. Maciel RMB, Camacho CP, Assumpção LVM, Bufalo NE, Carvalho AL, Carvalho GA, et al. Genotype and phenotype landscape of MEN2 in 554 medullary thyroid cancer patients: the BrasMEN study. *Endocr Connect.* 2019;8(3):289-298. doi: 10.1530/EC-18-0506.

181. Siqueira DR, Ceolin L, Ferreira CV, Romitti M, Maia SC, Maciel LM, et al. Role of RET genetic variants in MEN2-associated pheochromocytoma. *Eur J Endocrinol.* 2014;170(6):821-8. doi: 10.1530/EJE-14-0084.

182. Costa P, Domingues R, Sobrinho LG, Bugalho MJ. RET polymorphisms and sporadic medullary thyroid carcinoma in a Portuguese population. *Endocrine.* 2005;27(3):239-43. doi: 10.1385/ENDO:27:3:239.

183. Hatanaka R. Rastreamento de variantes de significado desconhecido (VUS) no gene RET em indivíduos-controle e em pacientes com carcinoma medular de tireoide. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2015.

184. Ministério da Saúde. Portaria nº 874 de 16 de maio de 2013. Institui a política nacional para a prevenção e controle do câncer na Rede de Atenção à Saúde das Pessoas com Doenças Crônicas no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Brasil: 2013. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2013/prt0874_16_05_2013.html

APÊNDICE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Processos
Interativos dos Órgãos e Sistemas



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DOS PAIS

RASTREAMENTO DAS MUTAÇÕES DO GENE RET NOS PACIENTES COM CARCINOMA MEDULAR DE TIREOIDE

Pesquisador Responsável:

Helton Estrela Ramos: Coordenador do Projeto – Professor Adjunto do Departamento de Bio-regulação do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Em caso de dúvida entrar em Contato: e-mail: ramoshelton@hotmail.com;

Telefones: (71) 3283-8868 Ramal: 227

Proposito e Revisão Geral

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa **RASTREAMENTO DAS MUTAÇÕES DO GENE RET NOS PACIENTES COM CARCINOMA MEDULAR DE TIREOIDE**, sob a responsabilidade do pesquisador Helton Estrela Ramos. Esta pesquisa tem como objetivo identificar as mutações genéticas apresentadas pelos portadores de carcinoma medular de tireoide do estado da Bahia.

Sua participação é voluntária e gratuita. O (A) Sr. (a) está sendo convidado a participar deste estudo devido ao fato do seu médico (a) diagnosticar-lo com carcinoma medular de tireoide. O carcinoma medular da tireoide (CMT) é um tipo de câncer raro e maligno que pode resultar da herança genética familiar ou se apresentar como um evento casual que pode ocorrer em qualquer momento da vida de um indivíduo. Os estudos científicos têm mostrado que a principal causa do CMT são mutações em um gene humano conhecido como RET. Portanto, a identificação das mutações no gene RET através dos testes genéticos é de fundamental importância para confirmação do diagnóstico do CMT e determinação do tratamento adequado.

Este projeto vai rastrear as mutações do gene RET, para isto, será estudado um componente específico, o DNA, que está presente nas células (menor parte do corpo humano, que forma os diversos órgãos, como exemplos de órgãos podem ser citados: o coração, a pele, o olho e o sangue) e que é responsável pelas características de um indivíduo (pessoa), que são transmitidas de pai para filho, desta forma possibilitando que os filhos se assemelhem (sejam parecidos) em algumas características aos pais. O objetivo desta pesquisa é desenvolver e realizar, na Bahia, o diagnóstico molecular de pesquisa de mutações do gene RET nos pacientes portadores do carcinoma medular da tireoide esporádico ou familiar atendidos pelo SUS no Estado da Bahia



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Processos
Interativos dos Órgãos e Sistemas



A participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução Nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Como em qualquer procedimento de coleta de sangue poderá experimentar alguns desconfortos, principalmente relacionados a agulhada da coleta de sangue: dor local, mancha roxa, sensação de visão turva, queda da pressão e infecção local. Já a coleta da saliva na cavidade oral através do swab oral pode levar a estímulos nauseantes ou pequeno desconforto. Para minimizar estes riscos, as coletas serão realizadas somente pelos membros da equipe de pesquisa habilitados e capacitados na realização de tais procedimentos. Se necessário, um profissional habilitado na realização de tais procedimentos será convidado para proceder com a coleta das amostras. Além disso, haverá a presença de pelo menos um médico durante o procedimento de coleta. Com relação ao vazamento das informações dos pacientes, a equipe tomará todas as precauções para minimizar este risco, garantindo que o sigilo dos dados do paciente bem como seu anonimato serão resguardados em todas as etapas e após término do estudo. Todas as informações prestadas serão tratadas com alto rigor de confidencialidade e permanecerão compiladas em um banco de dados protegido por senha cujo acesso somente será permitido a equipe de pesquisa.

Benefícios da participação no estudo: 1) Possibilitar aos pacientes acesso ao teste molecular para rastreamento das mutações no gene RET 2) Permitir o diagnóstico precoce e, conseqüentemente, ter maior probabilidade de terapia efetiva 3) Contribuir para melhoria do prognóstico dos pacientes afetados 4) Possibilitar aos pacientes melhor entendimento sobre a doença, sua(s) causa(s) e a importância do tratamento precoce 5) Auxiliar os profissionais de saúde que acompanham esses pacientes na tomada de decisões e planejamento das estratégias terapêuticas. Você não é obrigado a assinar de imediato este consentimento. Pode e deve levar consigo e consultar os seus familiares, bem como outras pessoas da sua confiança. A sua recusa em participar neste estudo não acarreta qualquer perda dos seus direitos assistenciais, tão pouco interfere com a relação médico-doente. Por outro lado, em qualquer altura poderá recusar-se a participar no estudo, sem que isto seja visto pelos profissionais de saúde como uma recusa de tratamento ou como uma quebra de relacionamento com a Instituição ou incumprimento de qualquer dever do doente.

Ao participar da pesquisa você está autorizando o armazenamento de sangue e DNA coletados para a constituição de um Biobanco e Biorepositório segundo a Resolução CNS Nº 441/2011, onde entende-se por Biobanco: coleção organizada de material biológico humano e informações associadas, coletado e armazenado para fins de pesquisa, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade e gerenciamento institucional, sem fins comerciais. E Biorepositório: coleção de material biológico humano,



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Processos
Interativos dos Órgãos e Sistemas



coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais. Desta forma, sua participação em estudos futuros fica sob seu critério, tendo a possibilidade de optar por: a) necessidade de novo consentimento a cada pesquisa, ou seja, em caso de novo estudo, onde seja necessário a utilização do seu material biológico o pesquisador responsável terá que lhe pedir nova autorização. Em caso de óbito (morte) ou incapacidade você deverá indicar uma ou mais pessoas que possam consentir na utilização ou descarte do seu material biológico, assim como ter acesso aos resultados obtidos e às devidas orientações; ou, b) manifestação de dispensa de novo consentimento a cada pesquisa. O material coletado será processado, analisado e estocado no Laboratório de Estudo da Tireoide do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Em caso de mudança de local você será informado formalmente por meio do Termo de Transferência de Material Biológico (TTMB).

Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os integrantes do estudo terão conhecimento dos dados que forem necessários para realização das atividades pertinentes ao desenvolvimento do presente trabalho. Você terá acesso a todas as informações sobre o projeto e seus dados genéticos assim como, direito de retirar o seu sangue e/ou DNA, do local onde estes se encontram armazenados a qualquer momento. Todas as despesas necessárias para a realização do estudo (exames, testes, etc...) não são da sua responsabilidade. Em resumo, os benefícios esperados ao entrar na pesquisa são: Possibilitar aos pacientes acesso ao teste molecular para rastreamento das mutações no gene RET permitindo o diagnóstico precoce e, conseqüentemente, ter maior probabilidade de terapia efetiva; contribuindo para melhoria do prognóstico dos pacientes afetados, possibilitando aos pacientes melhor entendimento sobre a doença, sua(s) causa(s) e a importância do tratamento precoce, gostaríamos ainda de esclarecer que você NÃO TERÁ NENHUM TIPO DE DESPESA PARA PARTICIPAR DESTA PESQUISA, BEM COMO NADA SERÁ PAGO POR SUA PARTICIPAÇÃO. A sua participação neste estudo é VOLUNTÁRIA. VOCÊ TEM A LIBERDADE DE RECUSAR A PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO, ou se aceitar participar, pode retirar o consentimento e material biológico a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção da continuidade do tratamento seu ou do seu filho (a), que está assegurado. As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada (ou seja, seu nome ou do seu filho (a) não irá ser divulgado), para que a confidencialidade seja mantida. Os dados genéticos e resultados não ficarão acessíveis ou divulgados a terceiros (outras pessoas).



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Processos
Interativos dos Órgãos e Sistemas



Para participar deste estudo o (a) Sr. (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. No entanto, caso o (a) Sr. (a), e seu acompanhante, tenha qualquer gasto será ressarcido. Caso o (a) Sr. (a) venha a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, o (a) Sr. (a) tem direito a receber a assistência integral e imediata, de forma gratuita, pelo tempo que for necessário, tanto após o encerramento do estudo quanto no caso de interrupção da pesquisa, além de lhe ser garantido o direito à indenização.

Em caso de dúvida, o(a) Senhor(a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (CEP/ICS/UFBA). O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) busca defender os interesses dos participantes de pesquisa. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (CEP/ICS/UFBA) está localizado na Avenida Reitor Miguel Calmon, s/n, - Instituto de Ciências da Saúde – Térreo, Vale do Canela. Horário de funcionamento: De Segunda-feira a Sexta-feira das 07h00min às 17h30min. Telefone: (71) 3283-8951. E-mail: cepics@ufba.br

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu recebi uma cópia deste documento, e tenho o direito de negar ou desistir de participar deste estudo em qualquer momento sem qualquer prejuízo para os cuidados a mim dispensados. A PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA É VOLUNTÁRIA.

Eu _____, reafirmo que tenho ciência do acima exposto, concordo em participar desse estudo, e estou ciente que tenho:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros, relacionados com a pesquisa a que serei submetido;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso traga prejuízo à continuação dos meus cuidados;
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com minha privacidade;
4. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Processos
Interativos dos Órgãos e Sistemas



5. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à Saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa e;

6. O conhecimento de que se existem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

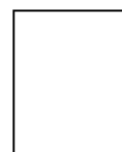
Referente ao Biobanco ou Biorepositório, eu _____ R.G. _____, opto por:

Necessidade de novo consentimento a cada nova pesquisa (estudo), e indico _____ para ser responsável pelas minhas informações em caso de invalidez ou morte;

Dispensa a necessidade de novo consentimento a cada nova pesquisa _____ de _____ de 20____

Participante ou Responsável Legal

Pesquisador Responsável

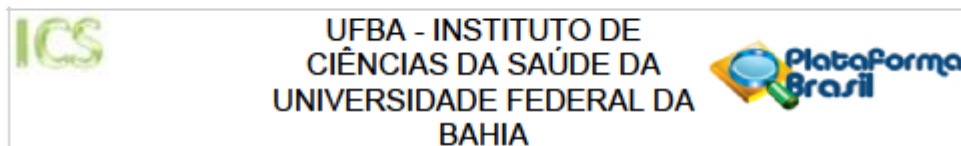


Polegar direito

Prof. Dr. Helton Estrela Ramos
 Área Acadêmica de Biologia (AB)
 Instituto de Ciências da Saúde
 Universidade Federal da Bahia
 40110-110 Salvador, BA

Dr. Helton Estrela Ramos
Pesquisador Responsável
 Coordenador do Laboratório de Estudo da Tireoide
 Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Bahia

ANEXO - Parecer Consubstanciado do CEP-ICS/UFBA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: RASTREAMENTO DAS MUTAÇÕES DO GENE RET NOS PACIENTES COM CARCINOMA MEDULAR DE TIREOIDE

Pesquisador: Helton Estrela Ramos

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 48193121.2.0000.5662

Instituição Proponente: Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.835.687

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do projeto", "Objetivo da pesquisa" e "Avaliação dos riscos e benefícios" foram retirados do arquivo Informações básicas da pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1712791 de 28/04/2021) e/ou do Projeto detalhado de 27/04/2021. O câncer de tireoide é a neoplasia endócrina mais frequente na população geral. O carcinoma medular da tireoide (MTC, do inglês "medullary thyroid carcinoma") é uma doença rara derivada das células C ou parafoliculares. O MTC, apesar de ser um tumor bastante peculiar, pode se apresentar como um evento esporádico ou como resultado de mutações germinativas no gene RET, transmitidas por herança autossômica dominante. A presente proposta visa implementar a caracterização, clínica e molecular, dos casos de MTC no estado da Bahia, e estabelecer as mutações mais frequentes e sua relação genótipo-fenótipo na população baiana. Trata-se de um estudo de coorte, prospectivo que incluirá pacientes maiores de 18 anos diagnosticados com carcinoma medular de tireoide. É estimada a inclusão de 100 pacientes neste estudo. As amostras de sangue ou saliva serão coletadas no laboratório de estudo da tireoide do Instituto de Ciências da Saúde/ UFBA. Para extração de DNA total do sangue ou da saliva, será utilizado o estojo comercial Gentra® Puregene® Kit (QIAGEN, Valencia, CA), conforme instruções do fabricante. Após término do processo de extração, as amostras serão armazenadas em freezer -20°C até a sua utilização.

Uma

Endereço: Miguel Calmon

Bairro: Vale do Canela

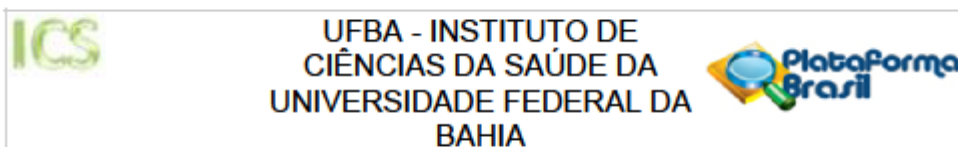
CEP: 40.110-902

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-8951

E-mail: cepics@ufba.br



Continuação do Parecer: 4.835.687

vez de posse de dados clínicos e genéticos, será criado um banco de dados com o objetivo de conhecer com profundidade a doença no estado da Bahia e permitir outros estudos de forma integralizada com pesquisadores brasileiros de outros estados. As informações que constarão neste banco são: idade, sexo, raça, sintomas, estadiamento TNM, data do diagnóstico, data do início do tratamento, tamanho do maior nódulo pelo exame físico e pela ultrassonografia, resultado da análise citopatológica do material aspirado por punção, cirurgia realizada, complicações perioperatórias, resultado do exame de anatomia patológica, resultado da pesquisa de corpo inteiro, radioiodoterapia, data da última informação.

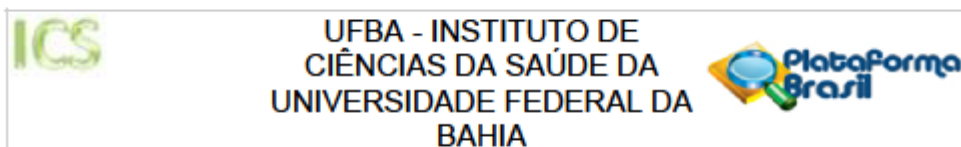
Objetivo da Pesquisa:

1. Desenvolver e realizar, na Bahia, o diagnóstico molecular de pesquisa de mutações do gene RET nos pacientes portadores do carcinoma medular da tireoide esporádico ou familiar atendidos pelo SUS no Estado da Bahia.
2. Correlacionar os resultados do diagnóstico molecular com aspectos clínico-patológicos do carcinoma medular de tireoide nos pacientes atendidos em hospitais públicos no Estado da Bahia.
3. Descrever eventuais polimorfismos do gene RET na população baiana com MEN 2A, MEN 2B e FMTC e determinar suas relações com a expressão da doença.
4. Criar um banco de dados com informações clínicas e laboratoriais de todos os pacientes com diagnóstico de carcinoma medular de tireoide no Estado da Bahia.
5. Criar um plano estadual visando normatizar o rastreamento da mutação RET em pacientes portadores de carcinoma medular da tireoide.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Alguns desconfortos podem acontecer na coleta de sangue como: hematomas (pode ocorrer durante ou após a realização da punção venosa), dor de pequena intensidade (como uma picada de inseto). Já a coleta da saliva na cavidade oral através do swab oral pode levar a estímulos nauseantes ou pequeno desconforto. Para minimizar estes riscos, as coletas serão realizadas somente pelos membros da equipe de pesquisa habilitados e capacitados na realização de tais procedimentos. Se necessário, um profissional habilitado na realização de tais procedimentos será convidado para proceder com a coleta das amostras. Além disso, haverá a presença de pelo menos um médico durante o procedimento de coleta. Com relação ao vazamento das informações dos pacientes, a equipe tomará todas as precauções para minimizar este risco, garantindo que o sigilo dos dados do paciente bem como seu anonimato serão

Endereço: Miguel Calmon
 Bairro: Vale do Canela CEP: 40.110-902
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3283-8951 E-mail: cepics@ufba.br



Continuação do Parecer: 4.835.687

resguardados em todas as etapas e após término do estudo. Todas as informações prestadas serão tratadas com alto rigor de confidencialidade e permanecerão compiladas em um banco de dados protegido por senha cujo acesso somente será permitido a equipe de pesquisa.

Benefícios: Possibilitar aos pacientes acesso ao teste molecular para rastreamento das mutações no gene RET; permitir o diagnóstico precoce e, conseqüentemente, ter maior probabilidade de terapia efetiva; contribuir para melhoria do prognóstico dos pacientes afetados; possibilitar aos pacientes melhor entendimento sobre a doença, sua(s) causa(s) e a importância do tratamento precoce; auxiliar os profissionais de saúde que acompanham esses pacientes na tomada de decisões e planejamento das estratégias terapêuticas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo nacional unicêntrico, de coorte, prospectivo. Caráter acadêmico realizado como Projeto de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas do ICS-UFBA. Financiamento da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), através do edital Programa Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde - PPSUS 02/2020. Realizado no Brasil, com 100 participantes. Não haverá retenção de amostras para armazenamento em banco de material biológico. Previsão de início em setembro de 2021 e encerramento em agosto de 2023.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

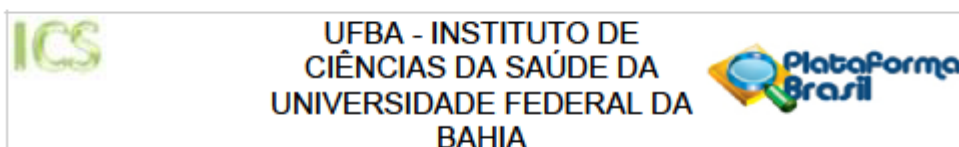
Trata-se de análise de resposta ao parecer pendente número 4.890.568 emitido pelo CEP em 04 de maio de 2021. Todas as pendências apresentadas foram atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1712791.pdf	05/07/2021 14:13:28		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto_RET.pdf	18/06/2021 17:11:45	Helton Estrela Ramos	Aceito

Endereço: Miguel Calmon
 Bairro: Vale do Canela CEP: 40.110-902
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3283-8951 E-mail: cepics@ufba.br



Continuação do Parecer: 4.835.687

Investigador	Projeto_RET.pdf	18/08/2021 17:11:45	Helton Estrela Ramos	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_DE_EXECUCAO_RET.pdf	18/08/2021 17:10:26	Helton Estrela Ramos	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_RET.pdf	18/08/2021 17:10:04	Helton Estrela Ramos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_RET.pdf	18/08/2021 17:09:30	Helton Estrela Ramos	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO_RET.pdf	05/04/2021 15:08:15	Helton Estrela Ramos	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO_RET.pdf	05/04/2021 15:05:32	Helton Estrela Ramos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DECLARACAO_INFRAESTRUTURA.pdf	05/04/2021 15:02:05	Helton Estrela Ramos	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	05/04/2021 14:59:47	Helton Estrela Ramos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SALVADOR, 08 de Julho de 2021

Assinado por:
MARCELLE ALVAREZ ROSSI
(Coordenador(a))

Endereço: Miguel Calmon
 Bairro: Vale do Canela CEP: 40.110-902
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3283-8951 E-mail: cepics@ufba.br



Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100
Salvador, Bahia, Brasil
<http://www.ppgorgsystem.ics.ufba.br>