



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UniCEUB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E DA SAÚDE – FACES

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - PIC

LAUAR DE BRITO MONTEIRO
DANIEL FREITAS DA COSTA

ESTUDO DO POLIMORFISMO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO
GENE DA NEOPLASIA ENDÓCRINA MÚLTIPLA TIPO 2B

BRASÍLIA-DF
2016

**LAUAR DE BRITO MONTEIRO
DANIEL FREITAS DA COSTA**

**ESTUDO DO POLIMORFISMO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO
GENE DA NEOPLASIA ENDÓCRINA MÚLTIPLA TIPO 2B**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica
apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e
Pesquisa pela Faculdade de Ciências da
Educação e da Saúde – FACES.

Orientação: Professor Dr. Paulo Roberto Martins
Queiroz

BRASÍLIA-DF

ESTUDO DO POLIMORFISMO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO GENE CAUSADOR DA NEOPLASIA ENDÓCRINA MÚLTIPLA TIPO 2B

Lauar de Brito Monteiro – UniCEUB, PIC voluntário
lauarbm@gmail.com

Daniel Freitas da Costa – UniCEUB, PIC voluntário
dancostafc@gmail.com

Paulo Roberto Queiroz – UniCEUB, professor orientador
pqsilva@uol.com.br

A neoplasia endócrina múltipla tipo 2B é uma desordem de caráter autossômico dominante e é também a variante mais agressiva de todas as neoplasias endócrinas múltiplas. Ela é causada por mutações de linhagem germinativa que induzem ganho de função do proto-oncogene *RET*, responsável por codificar uma proteína do tipo tirosina quinase que proporciona o controle da proliferação, diferenciação, migração e apoptose celular de células derivadas da crista neural. Aproximadamente metade dos casos são causados por mutações *de novo* no gene, portanto não possuem histórico familiar. Entretanto, o rastreamento genético para esta doença em grupos de risco consiste na busca por mutações no proto-oncogene *RET* durante os primeiros anos de vida. O objetivo desta pesquisa foi determinar o polimorfismo e a frequência do gene causador da neoplasia endócrina múltipla tipo 2B em um grupo de indivíduos fumantes por método molecular e definir padrões de influência genética e ambiental no aparecimento de mutações no gene *RET*. Primeiramente houve a produção de um artigo de revisão listando os mecanismos moleculares do gene de interesse e os principais métodos de rastreamento e diagnóstico bioquímico e genético. A segunda parte do estudo realizado contou com a participação de vinte voluntários fumantes que estavam de acordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido proposto pelo Comitê de Ética. Foi encontrado um perfil de normalidade nas análises bioquímicas e hematológicas dos indivíduos e o questionário de controle de qualidade de vida revelou que os voluntários se expõem com frequência à radiação solar e não mantêm um estilo de vida saudável, fatores que predisõem o aparecimento de mutações no genoma. A análise por PCR-RFLP seguida de eletroforese em gel de agarose do material genético dos participantes não revelou a presença da mutação causadora da neoplasia endócrina múltipla tipo 2B.

Palavras-chave: PCR-RFLP. Proto-oncogene *RET*. Diagnóstico molecular.

Sumário

iii

LISTA DE IMAGENS.....	iv
LISTA DE GRÁFICOS, TABELAS E QUADROS.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	2
3. METODOLOGIA DE PESQUISA.....	4
4. RESULTADOS.....	8
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	11
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	17
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
8. APÊNDICE.....	21

LISTA DE IMAGENS

- Imagem 1:** Representação da proteína RET, seu ligante GDNF e a localização das principais mutações causadoras de neoplasias endócrinas múltiplas.....X
- Imagem 2:** Eletroforese em Gel de Agarose.....X
- Imagem 3:** Representação da proteína RET normal e com mutação Met918Thr levando à autofosforilação dos resíduos de tirosina.....X
- Imagem 4:** Protocolo para o rastreio genético de mutação no *RET*.....X

LISTA DE GRÁFICOS, TABELAS E QUADROS

Gráfico 1: Representação da frequência das principais mutações que levam ao quadro de NEM 2B na população.....X

Tabela 1: Resultados do questionário de avaliação de qualidade de vida.....X

Tabela 2: Valores médios encontrados a partir dos exames laboratoriais dos voluntários.....X

1. INTRODUÇÃO

As Neoplasias Endócrinas Múltiplas (NEM) são disfunções de caráter autossômico dominante que acarretam no aparecimento de diversas neoplasias em diferentes tecidos glandulares comprometendo o sistema endócrino por inteiro. A NEM pode aparecer na forma de NEM 1 e NEM 2 – que pode ser classificada como NEM 2A e NEM 2B (dos Santos, 2006).

A NEM 2B caracteriza-se por ser um tipo de NEM de extrema agressividade e que sua idade de ocorrência é cerca de 10 anos mais precoce que a NEM 2A. Esta síndrome é responsável por mortes de pacientes jovens anualmente devido à intensidade das metástases por parte dos tumores medulares da tireoide (Maia et al., 2005).

A Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2B foi primeiramente assim referida por Steiner e colaboradores em 1968. Pacientes com NEM 2B apresentam carcinoma medular da tireóide (CMT) - tumor maligno nas células parafoliculares da tireóide (Maia et al., 2005), feocromocitoma - tumores produtores de catecolaminas, principalmente adrenalina e/ou noradrenalina (Faíçal; Shiota, 1997), ganglioneuromas - tumor do SN Simpático que leva à hipersecreção de substâncias vasoativas (Silva et al., 2010) e hábitos marfanóides (Maia et al., 2002).

As NEM 2 são causadas por mutações de linhagem germinativa que induzem ganho de função do proto-oncogene *RET* (*re-arranged during transfection*) (Peppas et al., 2008; Toledo et al., 2006). Este gene é o codificador da proteína RET, um receptor do tipo tirosina-quinase, expresso em células da crista neural e em células neoplásicas derivadas de células da crista neural. O proto-oncogene *RET* tem papel importante na indução à mitose e apoptose. Logo quando ativado pode desencadear uma cascata de sinalizações e levar à carcinogênese (Goldenstein et al., 2001; Maia et al., 2002).

Esse gene apresenta 21 éxons e as mutações descritas encontram-se nos éxons 10, 11 (domínio extracelular) e 16 (domínio intracelular), sendo que uma mutação no éxon 16 que afeta um único aminoácido da região intracelular do receptor (Met918Thr) é responsável por cerca de 95% dos casos de NEM 2B (Cranston et al., 2006).

As mutações do proto-oncogene *RET* podem afetar quatro tipos de tecidos: células C tireoidianas, células das paratireóides, células cromafins da medula adrenal e plexo autonômico entérico (Maia et al., 2005).

O diagnóstico da NEM 2B deve ser realizado precocemente e pode ser feito por meio de testes genéticos e bioquímicos. O rastreamento das diferentes formas de expressão do proto-oncogene *RET* por meio das técnicas moleculares fornecem informações essenciais para um diagnóstico precoce. O histórico familiar também é muito importante, porém o elevado número de casos provenientes de mutações *de novo* impossibilita o rastreamento genético precoce por se tratarem de casos isolados (HERMES, 2015; Lee et al., 2010).

O objetivo desta pesquisa é determinar a frequência do polimorfismo do gene causador da neoplasia endócrina múltipla tipo 2B em um grupo de indivíduos fumantes por método molecular e definir padrões de influência genética e ambiental no aparecimento de mutações no gene *RET*, assim como revisar os principais métodos moleculares para o diagnóstico da NEM 2B. Este trabalho torna-se importante tendo em vista que por meio do estudo do polimorfismo, pode-se proporcionar uma ampliação concomitante da expectativa e qualidade de vida nestes pacientes.

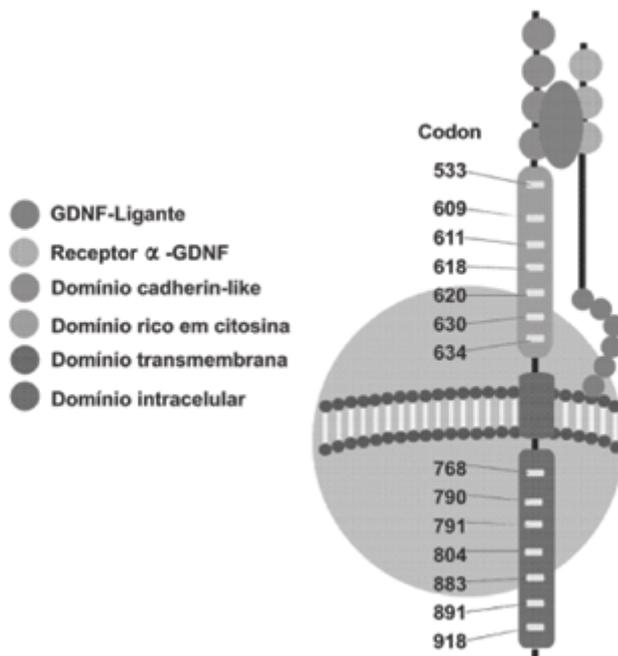
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (NEM 2) consiste em uma síndrome clínica caracterizada pela associação de certas patologias como o carcinoma medular da tireoide (CMT), feocromocitoma e hiperparatireoidismo. A NEM 2 pode ser classificada em dois subgrupos principais e um adicional: pacientes com CMT, feocromocitoma, hiperparatireoidismo e aparência normal (NEM 2A), pacientes sem acometimento das paratireóides, com presença de CMT, feocromocitoma e fenótipo caracterizado por ganglioneuromatoses e hábitos marfanóides (NEM 2B) e pacientes que são diagnosticados apenas com carcinoma medular da tireóide familiar (CMTF) (Maia et al., 2005).

O proto-oncogene *RET* (10q11.2) foi identificado como o gene responsável pela NEM 2, apresentando 21 éxons e codificando um receptor tirosina-quinase expresso nas células derivadas da crista neural (Salehian; Samoa, 2013; Toledo et al., 2006). A proteína RET é constituída por três domínios: um domínio extracelular que contém

o peptídeo sinalizador, um domínio transmembrana e uma porção intracelular com dois sítios tirosina-quinase. O ligante da RET é um peptídeo da superfamília do TGF- β (*transforming growth factor*), denominado *glial neurotrophic derived fator* (GDNF) e age junto ao seu receptor específico ligando-se à porção extracelular da proteína RET, o que leva à dimerização do receptor com posterior auto fosforilação dos resíduos tirosina-quinase. Esta reação causa a liberação de fosfato, um substrato importante na cadeia do crescimento e da diferenciação celular. As possíveis mutações no gene determinam uma ativação permanente da RET desencadeando o processo neoplásico (Figura 1) (de Miranda, 2010; Maia et al., 2002; Peppia et al., 2008).

Figura 1: Representação da proteína RET, seu ligante GDNF e a localização das principais mutações causadoras de neoplasias endócrinas múltiplas.



Fonte: Adaptado de Cote; Gagel (2003).

Nos casos em que há mutação no códon 918 deve-se realizar a cirurgia profilática de tireoidectomia preferencialmente antes do primeiro mês de vida. Pacientes com NEM 2B normalmente não possuem histórico familiar de CMT, e 50% deles apresentam mutação *de novo*. Notavelmente, a prole dos indivíduos com NEM 2B pode ter um desenvolvimento precoce e agressivo da doença, necessitando de atenção muito cedo (Salehian; Samoa, 2013).

O proto-oncogene *RET* pode sofrer mutações de linhagens germinativa e somática. Essas mutações podem gerar genes quiméricos a partir de translocações

ou podem ser mutações que mantêm ativo o gene *RET*. O gene ativado mutado produz a proteína RET também mutada que é responsável por casos herdados ou esporádicos de Carcinoma Medular da Tireóide e NEM (2A ou 2B), ao passo que a proteína ganha função de auto fosforilação dos resíduos de tirosina (Maciel et al., 2005; Salehian; Samoa, 2013).

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são compostos oxigenados altamente reativos no ambiente e no organismo humano. O cigarro comum produz cerca de 120 -150 nmol de EROs quando consumido por inteiro. A radiação é capaz de alterar a molécula de DNA e isso é um estímulo que pode gerar um processo tumoral de origem esporádica na célula (Cohen, 2011; Zhao; Hopke, 2012). Levando isso em consideração, a avaliação gênica de pessoas fumantes e que se expõem com frequência à radiação pode ser um novo parâmetro para classificação de um grupo de risco para o desenvolvimento de neoplasias de origem esporádica.

3. METODOLOGIA

Revisão narrativa

Para a realização do artigo de revisão narrativa que, de acordo com Rother (2007), consiste na análise de publicações amplas com o intuito de descrever e discutir um temasob uma perspectiva teórica ou contextual, foi feita uma busca de artigos em diferentes bases de dados nacionais e internacionais. Entre elas, EBSCO, Portal de Teses CAPES, Portal de Teses USP, Scielo e PubMed. Para a seleção dos artigos foram utilizadas as seguintes palavras-chave: proto-oncogene *RET*, proteína RET, NEM 2B e diagnóstico molecular, nos idiomas inglês e português. Foram utilizados artigos publicados entre os anos 2000 e 2015, contudo trabalhos anteriores a este período também foram utilizados de acordo com a relevância literária que apresentaram.

Seleção dos sujeitos voluntários da pesquisa

Critérios de inclusão e exclusão:

Os participantes da pesquisa foram voluntários da comunidade, fumantes e com idade entre 18 e 23 anos. Todos os procedimentos realizados foram previamente apresentados aos voluntários para que tivessem ciência do estudo em andamento.

Todas as amostras foram coletadas com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado. Não foram coletadas amostras de pessoas com menos de 18 anos, não fumantes e na ausência do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido devidamente assinado.

Aprovação ética

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB. Todos os procedimentos foram realizados mantendo-se a integridade, individualidade e inviolabilidade dos dados obtidos a partir dos sujeitos de pesquisa. O projeto foi aprovado em 08 de Março de 2016, sob o CAAE: 51121015.1.0000.0023 e parecer número 1.442.902 (Apêndice I).

O número amostral foi reduzido para somente 20 participantes, e não 30, como se tinha em mente inicialmente, devido a questões de disponibilidade de se encontrar os participantes específicos e as questões documentais que garantem a viabilidade da execução do projeto.

Questionário de avaliação

Anteriormente à coleta de sangue, os sujeitos da pesquisa responderam a um questionário visando o levantamento da qualidade de vida e hábitos de saúde (Apêndice II).

Coleta de sangue

Para a realização de todos os exames foram coletados um total de três tubos de sangue (aproximadamente 15 mL de volume total) de cada participante, sendo dois tubos de EDTA, destinados à extração do material genético e avaliação hematológica, e um tubo com gel, para os exames bioquímicos, de um total de 20 indivíduos. O número de participantes da pesquisa foi determinado levando em consideração as limitações de recursos e da infra-estrutura e os critérios de inclusão e exclusão.

A coleta de sangue foi realizada pelos alunos pesquisadores que possuem treinamento para a execução do procedimento e ficaram sob a responsabilidade e monitoramento do orientador responsável pela pesquisa.

Procedimento para extração de DNA genômico dos leucócitos

A extração do DNA genômico de leucócitos foi realizada segundo o método descrito por Miller et al. (1988), com algumas modificações.

A coleta de 5,0 mL de sangue periférico foi transferida para dois tubos de 15 mL estéreis (2,5 mL em cada tubo) com adição de tampão lise I gelado até completar o volume de 12,5 mL. Após homogeneizada, a solução foi centrifugada a 3200 rpm por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante resultante foi desprezado e 2,25 mL de tampão lise II foram adicionados ao sedimento, para ressuspender o precipitado; seguido da adição de 62,5 µL de SDS 10%. Após agitação vigorosa por 10 segundos em temperatura ambiente, 1,0 mL de NaCl 6 mol/L foi adicionado e a mistura resultante foi novamente agitada e centrifugada a 2600 rpm em temperatura ambiente por 5 minutos. O sobrenadante foi derramado em tubo limpo de 15 mL, evitando o pellet. Após adição de 3,5 mL de isopropanol absoluto o tubo foi fechado e a mistura foi realizada por inversão. O DNA precipitado foi então removido para um tubo de Eppendorf, retirando o excesso de isopropanol. O DNA foi lavado com 1,0 mL de etanol absoluto a 75%, centrifugado a 5000 rpm, por 5 minutos.

Este procedimento foi repetido e o excesso de etanol, removido cuidadosamente. O DNA foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 200 µL de água milli-Q autoclavada para realização dos procedimentos descritos a seguir.

Diagnóstico de mutação no proto-oncogene *RET*

A presença da mutação foi determinada pela amplificação de fragmentos do éxon 16 do gene que codifica a proteína RET pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

A reação foi feita em 25 µL contendo tampão 1X, 2 mg/mL de Albumina Sérica Bovina (BSA), 8 pM de cada iniciador, 0,2 mM de dNTP's, 1 U da enzima *Taq* DNA polimerase, água milliQ e 100 ng de DNA.

Os parâmetros utilizados na reação foram: uma etapa inicial de 2 minutos a 94 °C, quarenta ciclos de 1 minuto (desnaturação) a 94 °C, 1 minuto (anelamento) a 66 °C e 1 minuto (extensão) a 72 °C. A reação sofrerá uma etapa extra de extensão por 10 minutos, 72 °C.

As sequências dos primers escolhidos para esta reação foram específicas para o éxon 16: M2BF-5'-AGG GAT AGG GCC TGG GCT TC-3' e M2BR-5-TAA CCT CCA CCC CAA GAG AG-3'(PUÑALES; GRAF; GROSS; MAIA, 2002), por ser a sequência

onde a mutação Met918Thr, causadora de 95% dos casos de NEM 2B, pode acontecer (Figura 1).

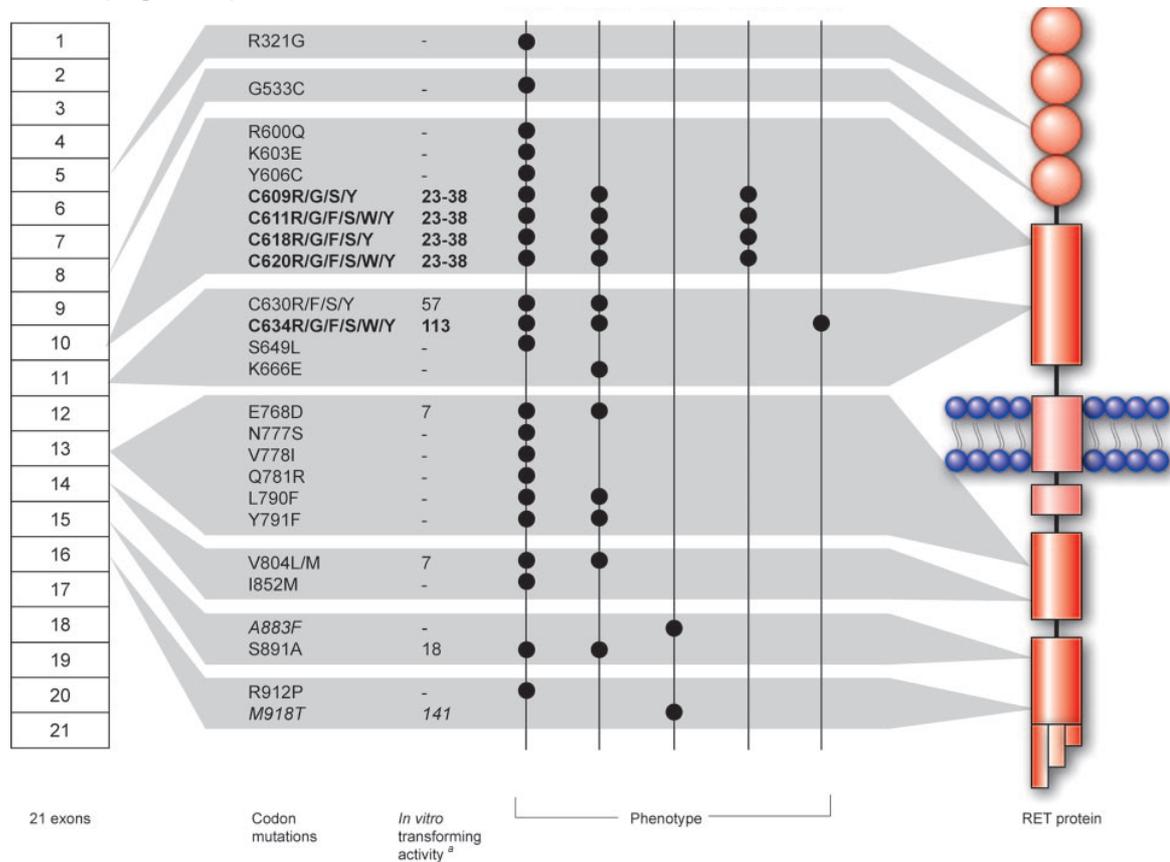


Figura 1 - Visão geral das mutações conhecidas no gene *RET* e suas doenças humanas associadas. A estrutura do RNAm e a proteína RET estão representados esquematicamente. As mutações responsáveis para as diversas síndromes de câncer herdadas e a localização das mutações em relação aos éxons e os domínios funcionais são mostrados. As mutações mais comuns que são encontrados em cerca de 95% dos casos NEM 2A e CMTF estão representadas em negrito, e mutações NEM 2B estão representados em itálico. Os primers de PCR foram selecionados para amplificar a região do éxon 16 correspondente à mutação M918T.

O fragmento amplificado foi digerido com a enzima de restrição *FokI* (Biolabs®) de acordo com as instruções do fabricante, seguida de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Gibco-BRL), corado com brometo de etídio, para visualização em transiluminador ultravioleta (Ultra Lum).

Contagem de hemácias

Para a contagem de hemácias, primeiro foi feita uma diluição de 10 µL de sangue em 1,99 mL de líquido de Hayem (Diluição final 1:200). As células foram contadas na câmara de Neubauer. A contagem foi feita em cinco quadrantes. Para o cálculo final do número de eritrócitos por mm³ de sangue, o número de eritrócitos contados foi multiplicado por 10.000 (5x10x200 = 10.000).

Dosagem de hemoglobina

Para a dosagem de hemoglobina foram utilizados 5 mL do reagente de cor do kit Doles e 20 μ L do sangue total. A absorbância foi lida em espectrofotômetro em 540 nm.

Para o cálculo do fator foi empregada a fórmula: Fator (F) = valor do padrão/absorbância do padrão.

Em para o cálculo da hemoglobina foi utilizada a fórmula $Hg \text{ (g/dl)} = \text{absorbância T} \times \text{Fator (F)}$.

Não foi possível determinar os índices hematimétricos devido à falta dos resultados do hematócrito pela ausência de microcentrífuga de capilar no laboratório.

Contagem diferencial dos leucócitos

O distendido sanguíneo para contagem de células leucocitárias foi feito com uma gota do sangue coletado no tubo contendo anticoagulante. A lâmina na qual o distendido foi feito foi corada com coloração hematológica panótica e levada para visualização em microscópio óptico. Foram então contadas 100 células, diferenciando-as entre neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos. O número de células foi transformado em porcentagem.

8

Contagem total de leucócitos

Para a contagem dos leucócitos foi feita uma diluição de 10 μ L de sangue em 190 μ L de líquido de Türk (diluição final 1:20). A contagem foi feita em câmara de Neubauer nos quatro retículos maiores. Para se obter o número total de leucócitos, o número obtido foi multiplicado por 200, já que a diluição foi de 1:20.

Cálculo do número absoluto

Para se calcular o número absoluto de cada leucócito encontrado, foi utilizado o seguinte cálculo: $P \times L/100 = Va/mm$

P = porcentagem do leucócito encontrado

L = contagem total de leucócitos

Va = Valor absoluto do leucócito

Dosagens bioquímicas

Os procedimentos para o HDL, LDL, glicose, ureia e ácido úrico foram realizados de acordo com as instruções do fabricante conforme orientações descritas na bula dos diferentes kits da Doles.

Não foi possível realizar a dosagem de TGO/TGP do soro dos indivíduos, pois este kit estava em falta no laboratório.

4. RESULTADOS

A partir da análise de qualidade de vida dos voluntários observou-se que 80% (16) dos avaliados fazem consumo de alimentos industrializados com frequência, 90% (18) fazem consumo de bebidas alcoólicas, 70% (14) trabalham ou estudam em local com intensa movimentação de veículos, somente 15% (3) são expostos com frequência aos raios-X e 70% (14) dos voluntários consideram-se pessoas saudáveis. Os resultados desta avaliação estão descritos com mais detalhes na tabela 1.

Tabela 1: Resultados do questionário de avaliação de qualidade de vida.

Voluntário	Sexo	2. Consome bebidas alcoólicas	2.1 Frequência	3. Alimentação saudável	3.1 Produtos orgânicos	3. Frequência alimentos industrializados ²	4. Exercícios físicos	4.1 Frequência exercícios físicos	5. Desconforto físico	6. Dor no corpo nos últimos 2 meses	7. Exposição à luz solar	8. movimentação de veículos onde mora	9. Movimentação de veículos onde trabalha/ estuda	10. Frequência exame de rotina	11. Frequência exposição à raio-X	12. Saúde considerada
1 RE	M	Sim	Sempre	Não	Não	Sempre	Sim	Frequentemente	Não	Nenhuma	Sempre	Não	Sim	Frequentemente	Raramente	Muito boa
2 RE	M	Não	Frequentemente	Depende	As vezes	Frequentemente	Não	Raramente	Não	Leve	Frequentemente	Moderada	Sim	Frequentemente	As vezes	Boa
3 RE	M	Sim	Frequentemente	Depende	As vezes	Frequentemente	Não	Raramente	As vezes	Leve	Frequentemente	Não	Sim	Nunca	Nunca	Boa
4 RE	M	Sim	Sempre	Não	As vezes	Frequentemente	Sim	Sempre	Sim	Moderada	Sempre	Sim	Sim	Frequentemente	Frequentemente	Ruim
5	M	Sim	Frequentemente	Depende	Sim	Frequentemente	Sim	Frequentemente	As vezes	Leve	Frequentemente	Não	Moderada	Raramente	Raramente	Boa
6	F	Sim	Frequentemente	Sim	Sim	Frequentemente	Sim	Frequentemente	Não	Leve	Sempre	Sim	Sim	Frequentemente	Raramente	Muito boa
7	F	Sim	As vezes	Sim	Sim	Frequentemente	Sim	Frequentemente	Sim	Leve	Sempre	Sim	Sim	As vezes	Nunca	Boa
8	F	Sim	Frequentemente	Depende	Não	Frequentemente	Não	X	X	Leve	Frequentemente	Sim	Moderada	Frequentemente	Nunca	Razoável
9	F	Sim	Frequentemente	Depende	As vezes	Frequentemente	Não	Raramente	Não	Leve	Sempre	Moderada	Moderada	Sempre	As vezes	Muito boa
10	F	Sim	Sempre	Não	Não	Frequentemente	Sim	Sempre	Sim	Intensa	Sempre	Moderada	Sim	Frequentemente	Frequentemente	Boa
11	F	Sim	Frequentemente	Sim	Sim	Frequentemente	Sim	As vezes	As vezes	Leve	As vezes	Sim	Sim	As vezes	Raramente	Razoável
12	F	Sim	As vezes	Depende	Sim	Frequentemente	Não	X	Não	Moderada	Frequentemente	Sim	Moderada	Frequentemente	Raramente	Razoável
13	X	Sim	Frequentemente	Sim	Sim	Raramente	Sim	Sempre	Não	Leve	Sempre	Sim	?	As vezes	As vezes	Boa
14	M	Sim	Frequentemente	Depende	Sim	As vezes	Sim	Sempre	As vezes	Leve	Frequentemente	Sim	Sim	Frequentemente	Raramente	Muito boa
15	F	Sim	As vezes	Depende	As vezes	Sempre	Não	Raramente	As vezes	Leve	Frequentemente	Moderada	Sim	Raramente	Raramente	Razoável
16	M	Sim	Sempre	Sim	Sim	As vezes	Sim	Sempre	As vezes	Leve	Frequentemente	Moderada	Sim	As vezes	Raramente	Boa
17	F	Sim	As vezes	Depende	As vezes	Frequentemente	Sim	Raramente	Não	Moderada	Raramente	Não	Sim	Nunca	Nunca	Muito boa
18	M	Sim	As vezes	Sim	Sim	Raramente	Sim	Sempre	Não	Nenhuma	Sempre	Sim	Moderada	X	Frequentemente	Boa
19	M	Não	Raramente	Sim	As vezes	Frequentemente	Não	As vezes	As vezes	Leve	Sempre	Não	Sim	As vezes	Raramente	Razoável
20	M	Sim	Frequentemente	Sim	Sim	Frequentemente	Sim	Frequentemente	As vezes	Leve	Frequentemente	Não	Sim	As vezes	Nunca	Muito boa

M = Masculino; F = Feminino; X = Não respondeu; ? = Marcou mais de um item.
 O modelo do questionário completo encontra-se como apêndice I ao final do texto.

Acerca das análises bioquímicas e hematológicas dos voluntários, todos os resultados ficaram dentro dos limites esperados de normalidade (Tabela 2). Isso vai de acordo com as expectativas do estudo, levando em conta que os voluntários eram pessoas jovens, ativas e sem nenhum registro de enfermidades graves no passado. Os voluntários que não se consideravam pessoas saudáveis, afirmaram que isso deve pelos hábitos de vida, como tabagismo, consumo excessivo de álcool e sedentarismo.

Tabela 2: Valores médios encontrados a partir dos exames laboratoriais dos voluntários.

Parâmetro analisado	Valor de referência	
Dosagem de hemoglobina	13,06 g/dL	
Hemácias	4.150.000 milhões/mm ³	
Contagem total de leucócitos	6.450 /mm ³	
Contagem diferencial de leucócitos	Monócitos	6%
	Eosinófilos	4%
	Neutrófilos	57%
	Linfócitos	33%
	Basófilos	ϕ
Dosagem de Glicose	86,92 mg/dL	
Dosagem de uréia	32,7 mg/dL	
Dosagem de urato	4,86 mg/dL	
Dosagem de LDL	91,2 mg/dL	
Dosagem de HDL	125 mg/dL	

Após o procedimento de eletroforese dos fragmentos de DNA amplificados por PCR (192 pb), observou-se que nenhum dos voluntários é portador de mutação no éxon 16 do proto-oncogene *RET*.

A enzima de restrição *Fok1* utilizada teve a função de clivar o fragmento de DNA. Caso estivesse presente a mutação estudada no éxon 16 (Met918Thr), o fragmento de DNA não seria clivado. O perfil de digestão pode ser observado e comparado no gel de agarose com bandas (Figura 2).

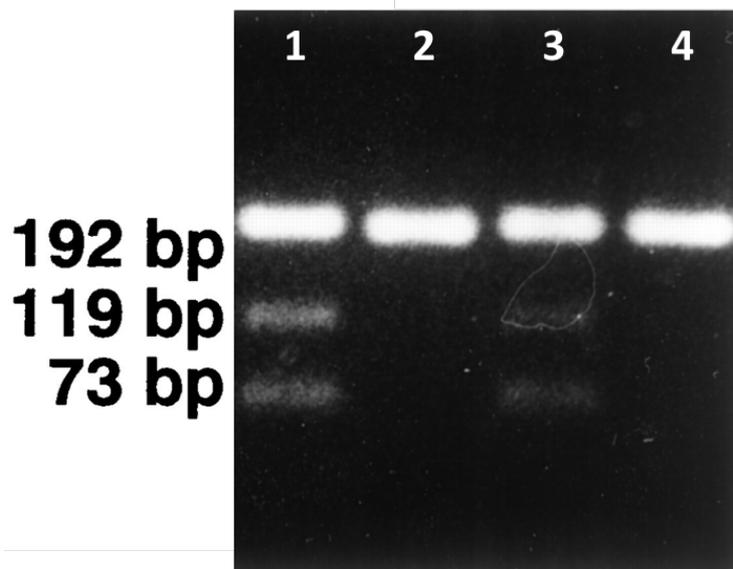


Figura 1 – Perfil de digestão do gene RET com a enzima de restrição *Fok1*. Em 1 e 3, perfil de digestão do fragmento de 192 pb gerando os fragmentos de 119 pb e 73 pb. Em 2 e 4, o perfil de amplificação sem digestão com a enzima *Fok1*. O alelo normal tem a sequência 5'GGAT**G**3' e o alelo mutado 5'GGAT**C**3'. A enzima *Fok1* cliva no sítio de restrição 5'GGAT**G**(N)9|3'.

Levando em consideração que nenhum dos sujeitos da pesquisa apresentava histórico de NEM 2B na família, a ausência da mutação Met918Thr sugere não ter ocorrido mutação espontânea no gene *RET* dos indivíduos. Apesar disso, não se pode excluir a possibilidade de alteração do funcionamento da proteína RET, pois ainda não se sabe até que ponto o tabagismo pode modular a atividade desta proteína e causar um caso esporádico da doença.

5. DISCUSSÃO

A NEM 2B apresenta um fenótipo único que inclui ganglioneuromatose difusa da língua, lábios, olhos e do trato gastrointestinal. Quando há o envolvimento gastrointestinal, são notáveis os sintomas como a diarreia, constipação intermitente, dor abdominal, megacólon e ocasionalmente obstrução intestinal. Acredita-se que a diarreia presente a partir desse envolvimento, ocorra em resposta a uma liberação de fatores humorais como a calcitonina. No âmbito geral, as condições intestinais dos pacientes estão relacionadas a uma contratilidade baixa e peristaltismo defeituoso devido à ganglioneuromatose e uma possível fibromatose (Barrows et al., 2006; Maia et al., 2005).

Outro fenótipo característico deste subgrupo é o hábito marfanóide com extremidades longas, hiperextensão de articulações e anormalidades epifisárias (Maia et al., 2002). CMT costuma aparecer muito cedo em pacientes com NEM 2B, geralmente durante o primeiro ano de vida (Toledo et al., 2006; Waguespack et al., 2011; Zhu et al., 2010). Sendo menos comum, mas passível de ser detectado, pode ocorrer o aumento da pressão intraocular, manchas oculares e o enrijecimento dos nervos da córnea, o que demonstra a importância de uma observação e conhecimento dos sinais e sintomas extra-tireóide pelo clínico responsável (Barrows et al., 2006). Foi encontrado também na literatura, um caso de emergência respiratória aguda, em virtude da compressão traqueal por um linfoma e um timoma em um paciente diagnosticado com NEM 2B (Dharmshaktu et al., 2013).

Estima-se que nos Estados Unidos as neoplasias endócrinas múltiplas afetem 1 a cada 30000 indivíduos. A mais rara de todas as NEMs é a NEM 2B e ela representa 5% de todos os casos de NEM 2. O carcinoma medular de tireóide (CMT) associado à NEM-2 possui incidência de 1:30.000 indivíduos, ocorrendo expressão de doença em mais de 90% dos portadores de mutações no proto-oncogene *RET*. A mortalidade das NEM 2 chegava a 20%, porém com a disponibilidade do rastreamento genético para mutações no *RET*, essa taxa caiu para 5% (dos Santos, 2006; Prabhu et al., 2004; Toledo et al., 2006).

A proteína codificada pelo gene *RET* é muito expressa em diferentes estágios do desenvolvimento, principalmente durante a migração embriológica. Esse gene tem importante papel no desenvolvimento de células derivadas da crista neural e células paratireoideanas derivadas dos arcos braquiais. O *RET* proporciona o controle da proliferação, diferenciação, migração e apoptose celular. Ele também interage com a proteína GDNF (*Glial cell line-derived neurotrophic factor*) e seu receptor GFR α -1 (*GDNF family receptor alpha one*) proporcionando a sobrevivência de células neurais (Toledo et al., 2006).

O gene *RET* é então caracterizado como um proto-oncogene e seu processo de *splicing* alternativo dá origem à diferentes isoformas da proteína, sendo as três principais isoformas a RET9, RET49 e RET51 que se diferenciam pela quantidade de aminoácidos presentes na região C-terminal (de Miranda, 2010; Salehian; Samoa, 2013). A proteína RET possui um domínio N-terminal extracelular que tem o GDNF como ligante, um domínio transmembrana hidrofóbico e um domínio intracelular tirosina quinase, que possui resíduos de tirosina que variam de acordo com a isoforma proteica (Salehian; Samoa, 2013). Quando esse gene sofre mutações constitutivas ativadoras esse processo de controle celular é

perdido e isso está fortemente associado ao desenvolvimento de neoplasias endócrinas tipo 2 (Cranston et al., 2006; Toledo et al., 2006).

Fumo e radiação

Apesar de existirem discussões sobre o fato de haver ou não um limiar para a dose de radiação que vai de fato levar a um processo tumoral, sabe-se que existe uma forte relação entre radiação e câncer. Em casos de cânceres esporádicos costuma-se observar no paciente um longo período de latência até o surgimento dos primeiros sinais e sintomas da doença, o que mostra a importância da utilização de mecanismos moleculares para o diagnóstico mais precoce (Cohen, 2011).

No desenvolvimento de diversos tipos de tumores, tem sido evidente a participação de MicroRNAs na oncogênese. MicroRNAs são uma classe de RNA não-codante pequeno e endógeno envolvidos com processos de reparação, regulação e silenciamento de genes. Diferentes estudos recentes mostram a diferença dos níveis de tais MicroRNA's após a radiação ionizante, o que sugere e reforça a conhecida relação entre radiação e tumorigênese (Kwak et al., 2010; Marta et al., 2015).

Pacientes com NEM 2B esporádica são raros, pois mesmo após exposição à radiação o organismo ainda possui diversas ferramentas de reparo de DNA que incluem enzimas reparadoras, células especializadas do sistema imune que reconhecem outras células tumorais e a apoptose (Cohen, 2011; Salehian; Samoa, 2013). Logo, para que se estabeleça a doença, as células tumorais têm de sobreviver mesmo na presença de 13 tantos fatores adversos.

Sabe-se que os radicais livres possuem potencial de gerar diversos processos tumorais, porém o próprio organismo humano é capaz de balancear a quantidade desses compostos nas células com a produção de antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos, como superóxido dismutase (SOD), catalase e tioredoxina (Qiao et al., 2014; Ushio-Fukai; Nakamura, 2008).

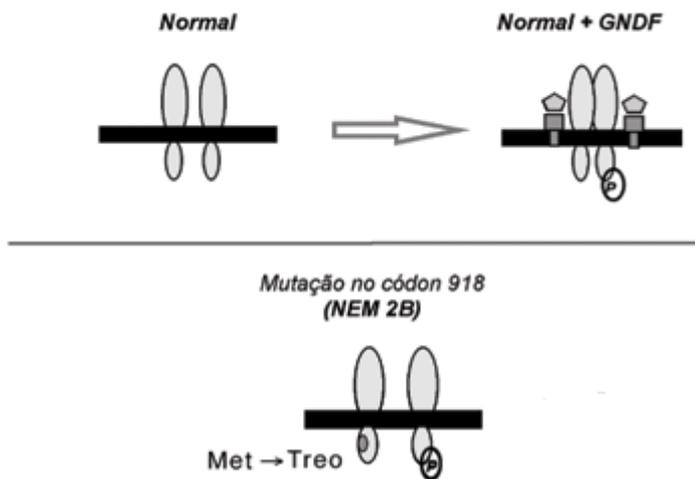
Estudos revelaram recentemente que as concentrações intracelulares de EROs e H_2O_2 , que pode gerar OH^\cdot , podem modular a atividade da proteína RET, responsável pelo desenvolvimento de diversas enfermidades humanas, incluindo NEM 2A, NEM 2B, Carcinoma Medular da Tireóide Familiar e Doença de Hirschsprung, pelo fato de induzirem auto-fosforilação da proteína RET mutada (Bedard; Krause, 2007; Murakumo et al., 2006). Além disso, linhagens celulares contendo proteína RET mutada apresentam concentrações diminuídas de SOD, favorecendo a ação de radicais livres nessas células (Qiao et al., 2014).

Mutações

A NEM 2B é causada por mutações *missense* de linhagem germinativa no gene *RET* e acredita-se que essas mutações possam transformar o *RET* em um proto-oncogene dominante. A NEM2B é quase sempre decorrente de uma mutação de novo, sendo comum não encontrar outros casos na família de um indivíduo afetado. Essa falta de histórico familiar torna o rastreamento difícil em recém nascidos (Cranston et al., 2006; Lee et al., 2010).

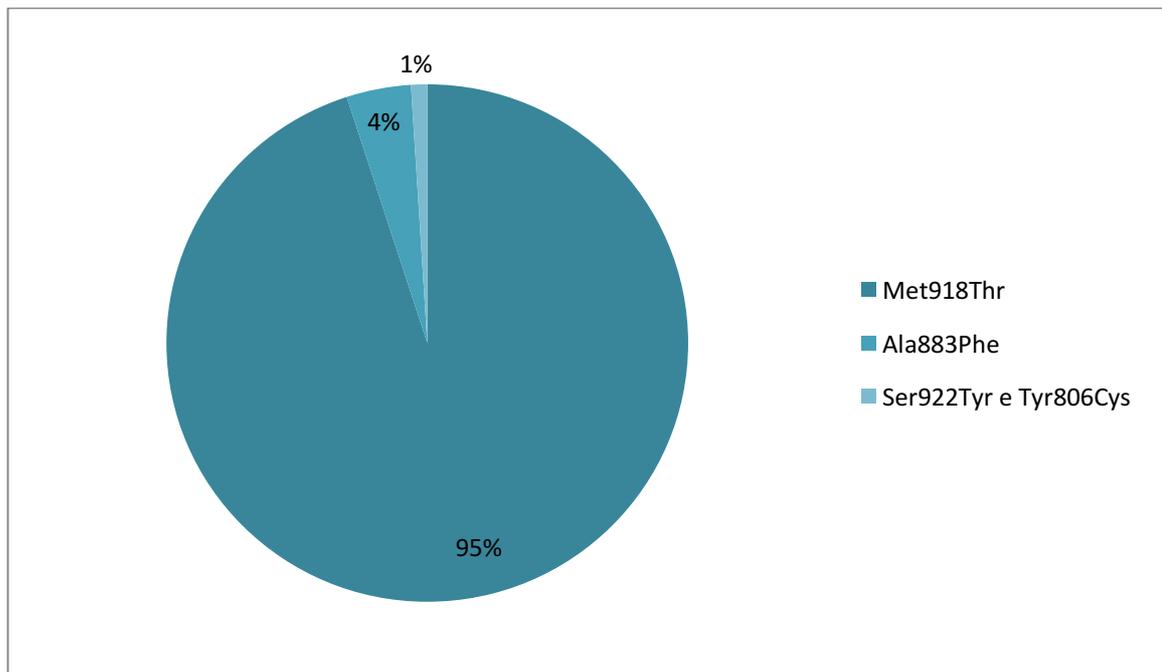
Uma mutação em um único aminoácido da região intracelular do receptor (Met918Thr) é responsável por cerca de 95% dos casos de NEM 2B (Figura 3) (Cranston et al., 2006). A mutação Ala883Phe está presente em cerca de 4% de todos os casos de NEM2B e mutações já relatadas, porém raríssimas, incluem Ser922Tyr e Tyr806Cys (Gráfico 1) (dos Santos, 2006).

Figura 3: Representação da proteína RET normal e com mutação Met918Thr levando à autofosforilação dos resíduos de tirosina. 14



Fonte: Adaptado de Santoro et al. (2002).

Gráfico 1: Representação da frequência das principais mutações que levam ao quadro de NEM 2B na população.



Fonte: dos Santos (2006).

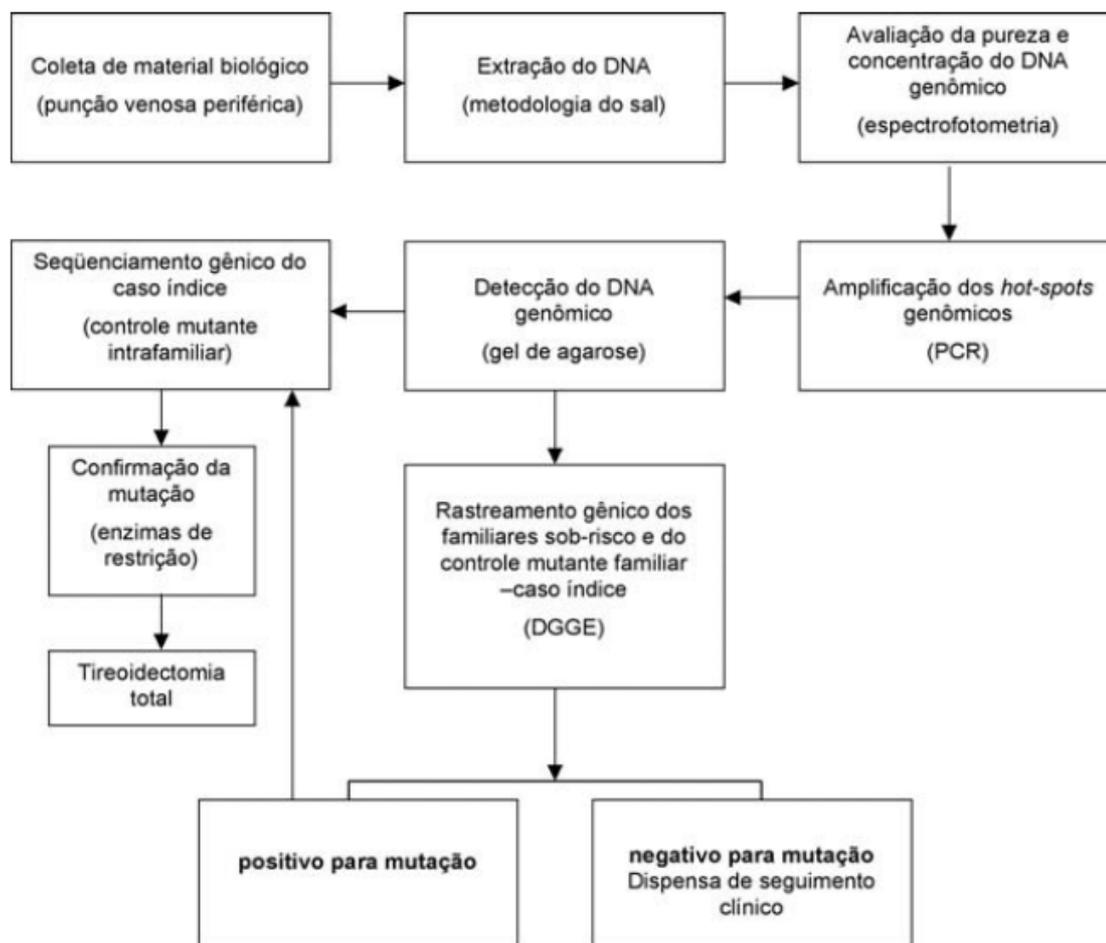
Diagnóstico molecular

Em casos de NEM 2 ou CMT, a investigação profilática torna-se obrigatória quando há confirmação de pelo menos um caso na família. O diagnóstico precoce visa diminuir as taxas de morbidade e mortalidade nos grupos de risco, principalmente em se tratando da NEM 2B, que costuma apresentar quadros metastáticos agressivos ainda muito cedo na infância (Hauache et al., 2003; Maia et al., 2002; Salehian; Samoa 2013). Além disso, o diagnóstico molecular da NEM 2B é uma ferramenta importante na confirmação de diagnóstico clínico de CMT e auxilia na indicação de tireoidectomia preventiva (dos Santos et al., 2007; Toledo et al., 2006).

15

O rastreio genético para a NEM 2 (descrito na figura 4) em grupos de risco consiste na busca por mutações no proto-oncogene *RET* durante os primeiros anos de vida. Sendo o resultado do rastreio negativo, considera-se para o indivíduo que a possibilidade de desenvolver a doença é a mesma da população geral. Ou seja, inclui a probabilidade de apresentar mutação *de novo* no gene *RET* (Elisei et al., 2007; Lee et al., 2010; Maia et al., 2002).

Figura 4: Protocolo para o rastreio genético de mutação no *RET*.



Fonte: dos Santos (2006).

Estima-se que 95% dos indivíduos afetados pela NEM 2 possuam mutação detectável no gene *RET*, sendo as mais prevalentes mutações nos éxons 10, 11 e 16 (Toledo et al., 2006).

O padrão-ouro para detecção de mutações causadoras de doenças é o sequenciamento de DNA direto, entretanto para famílias com alto risco de herança de mutação já estão sendo aplicados diferentes métodos moleculares de rastreio genético, como *conformation sensitive gel electrophoresis* (CSGE), *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE) e *single strand conformational polymorphism* (SSCP) (Chen et al., 2010; dos Santos et al., 2007). Apesar disso, no estudo de Lee et al. (2010), a avaliação histológica dos tecidos acometidos também foi incluída para que o paciente fosse encaminhado paratireoidectomia total.

O sequenciamento gênico é feito nas fitas *sense* e *anti-sense* e há incorporação de dideoxinucleotídeos (ddNTPs) marcados durante a reação de extensão. Posteriormente

ocorre a análise dos ddNTPs adicionados e com auxílio de programas computacionais é possível reconhecer alterações nos códons, caso haja mutação gênica (dos Santos, 2006).

O CSGE é um método utilizado para avaliar a variação de sequências em genes com vários éxons e parece apresentar maior sensibilidade do que outros métodos como SSCP, DGGE e enzimas de restrição. Um estudo de Santos e colaboradores (2007) demonstrou que essa técnica é eficiente na detecção de mutações *hot spots* do gene *RET*. O CSGE consiste na utilização de um gel de acrilamida enriquecido que proporciona um ambiente desnaturante. Essa desnaturação promove variações na conformação das fitas de DNA detectáveis até mesmo em polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) que são visualizadas a partir do diferente padrão de migração das cadeias no gel (dos Santos et al., 2007; Galeano et al., 2009; Ganguly, 2002).

A técnica de SSCP se baseia na diferença conformacional de estrutura terciária de fragmentos de DNA fita simples mutados que são detectados por eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante (dos Santos, 2006; Galeano et al., 2009). Essa técnica já é amplamente utilizada no rastreamento de mutações em grupos de risco para a NEM2B, ela possui 80% de sensibilidade, portanto é importante não descartar a possibilidade de resultados falso-negativos (dos Santos, 2006;) HERMES, 2015).

A DGGE é uma técnica que tem como objetivo criar um ambiente composto por substâncias desnaturantes em que a temperatura de desnaturação é superior à temperatura de desnaturação do DNA dupla fita. Dessa forma, as cadeias de DNA são completamente separadas em fitas simples e, na presença de mutação, irão apresentar diferentes temperaturas de desnaturação que pode ser observada pela diferença de mobilidade pelo gel e pelo contraste com a fita de DNA controle. Essa técnica já se mostrou muito eficiente no rastreamento de mutações *hot spots* do *RET* (dos Santos, 2006).

Diagnóstico Bioquímico

A utilização da calcitonina como marcador tumoral é muito importante na investigação da NEM 2B. A dosagem dessa substância é um método relativamente barato e eficaz para avaliar hiperplasia de células C e presença de tumor na tireoide. A calcitonina é um hormônio secretado pelas células C ou parafoliculares tireoideanas e suas concentrações encontram-se elevadas em pacientes que apresentam CMT isolado ou em conjunto com alguma NEM 2 (Hauache et al., 2003).

As análises de cálcio sérico e concentração de catecolaminas também fazem parte do rastreamento da doença, mas por não se mostrarem tão sensíveis quanto a dosagem de

calcitonina são frequentemente excluídos da bateria de exames para diagnóstico ou acompanhamento (Maia et al., 2002).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No início dos anos 2000 houve uma grande produção de artigos científicos abordando os aspectos da NEM 2B no Brasil, porém observa-se uma queda de estudos recentes acerca do assunto. A NEM 2B é uma doença agressiva e que se manifesta muito precocemente nos portadores de mutação no proto-oncogene *RET*.

O rastreamento das diferentes formas do proto-oncogene *RET* por meio das técnicas moleculares fornecem informações essenciais para um diagnóstico precoce. Os diversos métodos moleculares de diagnóstico, como CSGE, DGGE, SSCP e sequenciamento gênico, apesar de serem técnicas relativamente caras, podem ser utilizados no rastreio de mutações que impossibilitam o bom funcionamento da proteína *RET*, ocasionando uma melhora na condição geral do paciente, já que é possível iniciar o tratamento antes mesmo dos primeiros indícios da presença da NEM2B.

Apesar de não ter sido detectada mutação nos fragmentos de DNA dos voluntários deste estudo, outros estudos mostraram possível relação entre o tabagismo e a alteração da atividade da proteína *RET*. Este trabalho ressalta a importância de se investir em maneiras de aumentar a qualidade de vida de pacientes com NEM 2B e pessoas que carregam mutações que levam a este quadro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROWS, F. P; et al. Metastatic medullary thyroid cancer in a pediatric patient with MEN 2B: emphasis on the need for early recognition of extrathyroidal clinical findings associated with MEN 2B. **Clinical Pediatrics**. United States, v. 45, n. 5, p. 463-467, June 2006.

BEDARD, K; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological reviews**. v. 87, n. 1, p. 245-313. Jan. 2007.

CHEN, H; SIPPEL, R. S; PACAK, K. The NANETS consensus guideline for the diagnosis and management of neuroendocrine tumors: pheochromocytoma, paraganglioma & medullary thyroid cancer. **Pancreas**. v. 39, n. 6, p. 775-783. Ago. 2010.

COHEN B. L. The cancer risk from low level radiation In Radiation Dose from Multidetector CT. **Radiation Research**. Heidelberg. v. 39, n. 4, p. 61-79. Jan. 2007

COTE, G. J; GAGEL, R. F. Lessons learned from the management of a rare genetic cancer. **New England Journal of Medicine**. v.349, n. 16, p. 1566-8.

CRANSTON, A. N; et al. RET is constitutively activated by novel tandem mutations that alter the active site resulting in multiple endocrine neoplasia type 2B. **Cancer Research**. United States. v. 66, n. 20, p. 10179-10187, Oct. 2006.

DE MIRANDA, E.R. **Estudo de famílias com neoplasia endócrina múltipla tipo 2A, 2B e carcinoma medular familiar: correlação genótipo, fenótipo e isoformas da proteína RET (RET 9 e RET 51)**. UFMG: Minas Gerais. 2010

DHARMSHAKTU, P; et al. MEN2B syndrome presenting as an acute respiratory emergency. **BMJ Case Reports**. England, Oct. 18, 2013.

SANTOS, M. D; et al. Genetic screening of multiple endocrine neoplasia type 2: experience of the USP Endocrine Genetics Unit. **Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia**. Brasil, v. 50, n. 1, p. 7-16, Fev. 2006.

SANTOS, M. A; et al. Screening of RET gene mutations in multiple endocrine neoplasia type-2 using conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE). **Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia**. Brazil, 51, 9, 1468-1476, Dec. 2007.

ELISEI, R; et al. RET genetic screening in patients with medullary thyroid cancer and their relatives: experience with 807 individuals at one center. **The Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism**. United States, 92, 12, 4725-4729, Dec. 2007.

FAICAL, S.; SHIOTA, D.. Feocromocitoma: atualização diagnóstica e terapêutica. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 237-244, set 1997.

GALEANO, CH; et al. Single strand conformation polymorphism based SNP and Indel markers for genetic mapping and synteny analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Genomics**. England, 10, 629, Dec. 23, 2009

Ganguly A. 2002. An update on conformation sensitive gel electrophoresis. **Human mutation**. Apr;19(4):334-42.

GOLDSTEIN, P. et al. Neoplasias endócrinas múltiplas: papel da genética na gênese das proliferações celulares. **Arquivos médicos do ABC**; São Paulo, v. 2, n. 5, p. 10-17, 2001.

HAUACHE, O. M.; VIEIRA, J. G. H.; MACIEL, R. M.B. Diagnóstico laboratorial do carcinoma medular de tiróide: calcitonina basal e testes de estímulo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 47, n. 5, p. 529-533, Oct. 2003.

HERMES PARDINI. Belo Horizonte. Importância da identificação das mutações do proto-oncogene RET e sua atuação no desenvolvimento dos diversos fenótipos das neoplasias endócrinas múltiplas tipo 2. Disponível em: <hermespardini.com.br/atual_manual/pdf_genetica_novos_exames/PROTO-ONCOGENE_RET,_SEQUENCIAMENTO_DO.pdf.> Acesso em abr. 2015

KWAK, B. P. et al. The microRNA pathway and cancer. **Cancer Science**. Japan. v. 101, n 11, p. 2309–2315, Nov 2010.

LEE, M. J; et al. Multiple Endocrine Neoplasia Type 2B: Early Diagnosis by Multiple Mucosal Neuroma and Its DNA Analysis. **Annals Of Dermatology**. Korea (South), 22, 4, 452-455, Nov. 2010.

MACIEL, R; KIMURA, E.; CERUTTI, J. Patogênese dos tumores diferenciados da tireóide (papilífero e folicular). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 5, p. 691-700, 2005.

PUÑALES, M. K. et al. Neoplasia endócrina múltipla tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 49, n. 5, p. 725-734, out. 2005

MAIA, F. F. R.; JUNIOR, H. J.; ARAUJO, L. R.. Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 2: Manejo Diagnóstico e Terapêutico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 46, n. 5, p. 606-610, Oct. 2002 .

MARTA, G. N. et al. MicroRNAs, cancer and ionizing radiation: Where are we?. **Revista da Associação Médica Brasileira**. São Paulo, v. 61, n. 3, p. 275-281, Jul 2015.

MILLER, S. A; DYKES, D. D; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**. ENGLAND, 16, 3, 1215, Feb. 11, 1988

MURAKUMO, Y. et al. RET and neuroendocrine tumors. **Pituitary**, v. 9, n. 3, p. 179-192, Set. 2006.

PEPPA, M; et al. Multiple endocrine neoplasia type 2A in two families with the familial medullary thyroid carcinoma associated G533C mutation of the RET proto-oncogene. **European Journal Of Endocrinology / European Federation Of Endocrine Societies**. England, 159, 6, 767-771, Dez. 2008

PERSUHN, D. C; et al.,Prevalência do polimorfismo G1793A da metilenotetra-hidrofolato redutase em idosos–Itajaí,(SC).**Revista brasileira de análises clínicas**. v. 38, n. 1, p. 47-50, 2006

PRABHU, M; KHOUZAM, RN; INSEL, J. Multiple endocrine neoplasia type 2 syndrome presenting with bowel obstruction caused by intestinal neuroma: case report. **Southern Medical Journal**. United States, 97, 11, 1130-1132, Nov. 2004.

QIAO, S. et al. The involvement of reactive oxygen species derived from NADPH oxidase-1 activation on the constitutive tyrosine auto-phosphorylation of RET proteins. **Free Radical Research**, v. 48, n. 4, p. 427-434, Abr. 2014.

SALEHIAN, B; SAMOA, R. RET Gene Abnormalities and Thyroid Disease: Who Should be Screened and When. **Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology**. n.5, p. 70-78, Mar. 2013.

SANTORO M; et al. Molecular mechanisms of RET activation in human cancer. **Annals of the New York Academy of Sciences**.v.963,p. 116-21. 2002.

SILVA, J. et al. Hipertensão arterial secundária a tumor raro da glândula adrenal. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 95, n. 6, p. 144-147, dez. 2010.

TOLEDO, S. A; et al. Impact of RET proto-oncogene analysis on the clinical management of multiple endocrine neoplasia type 2. **Clinics** (São Paulo, Brazil). Brazil, 61, 1, 59-70, Feb. 2006.

USHIO-FUKAI, M.; NAKAMURA, Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. **Cancer letters**, v. 266, n. 1, p. 37-52, Jul. 2008

WAGUESPACK, S. G; et al. 2011. Management of medullary thyroid carcinoma and MEN2 syndromes in childhood. **Nature Reviews Endocrinology**. v. 7,n. 10, p. 596-607. Ago, 2011.

ZHAO, J.; HOPKE, P. Concentration of reactive oxygen species (ROS) in mainstream and sidestream cigarette smoke. **Aerosol Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 191-197, Fev. 2012.

ZHU, W; HAI, T;YE, L; COTE, G. J. Medullary thyroid carcinoma cell lines contain a self-renewing CD133+ population that is dependent on ret proto-oncogene activity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**.v.95, p. 439-44. Jan. 2010.

Documento de anuência para utilização das instalações do Labocien.

De: Gerencia do Labocien – Profa Magda V. C. Branco Silva Discente (s): Lauer Monteiro e Daniel Costa Orientador: Profo Dr. Paulo Roberto Queiroz Curso: Biomedicina

Para: Coordenadora do CEP/Uniceub – profa Marília Jácome Ref.: de PIC voluntário – 2o/2015

1. PROJETO: Diagnóstico e relação genética e bioquímica da neoplasia endócrina múltipla tipo 2B 1. SÍNTESE/RESUMÃO:

“[...] O objetivo geral deste projeto será determinar o polimorfismo e a frequência do gene causador da NEM2B em um grupo de 30 pessoas com mais de 18 anos, preferencialmente fumantes, da comunidade acadêmica do Centro Universitário de Brasília (UniCEUB). Cada participante doará 3 tubos de sangue (aproximadamente 15 mL) para pesquisa: dois tubos de EDTA, que serão destinados à extração do material genético e avaliação hematológica e um tubo com gel, para os exames bioquímicos. A coleta de sangue será realizada pelos pesquisadores da pesquisa que possuem treinamento para a execução do procedimento e ficarão sob a responsabilidade e monitoramento do pesquisador responsável pela pesquisa.

Com o material biológico coletado serão feitos os seguintes procedimentos:

- Extração de DNA genômico dos leucócitos;

- Diagnóstico de mutação no proto-oncogene RET;

- Contagem de hemácias;

- Dosagem do hematócrito;

- Dosagem de hemoglobina e;

- Dosagens bioquímicas - TGO/TGP. [...]” 2. ANUÊNCIA: Após completa tramitação pelas demais instâncias institucionais consultivas e deliberativas, observando as regras funcionais do Labocien (prazos e disponibilidade dos materiais e espaços compartilhados) o Labocien se posiciona favorável à realização dos procedimentos de coleta e processamento de amostras da pesquisa em questão.

Houve encaminhamento dos insumos para cotação e aquisição ocorrerá respeitando os limites estabelecidos pelo Edital do 14o Programa de Iniciação Científica – 2015- 2016 dentro do limite orçamentário para o PIC. Após término dos trâmites o pesquisador deverá realizar agendamento das atividades na secretaria do Labocien.

Magda Verçosa Carvalho Branco Coordenadora do Labocien Brasília 2015.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA Título da Pesquisa: DIAGNÓSTICO E RELAÇÃO GENÉTICA E BIOQUÍMICA

ENDÓCRINA MÚLTIPLA TIPO 2B **Pesquisador:** Paulo Roberto Queiroz

DA NEOPLASIA

Área Temática: Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise

ética por parte da CONEP;);

Versão: 2 **CAAE:** 51121015.1.0000.0023 **Instituição Proponente:** Centro Universitário de Brasília - UNICEUB **Patrocinador Principal:** Centro Universitário de Brasília - UNICEUB

DADOS DO PARECER Número do Parecer: 1.442.902

Apresentação do Projeto:

As Neoplasias Endócrinas Múltiplas (NEM) são disfunções de caráter autossômico dominante que acarretam no aparecimento de diversas neoplasias em diferentes tecidos glandulares comprometendo o sistema endócrino por inteiro. A NEM pode aparecer na forma de NEM 1 e NEM 2 que pode ser classificada como NEM2A e NEM2B. Pacientes com NEM2B apresentam carcinoma medular da tireóide (CMT), feocromocitoma, ganglioneuromas e hábitos marfanóides. O objetivo geral deste projeto será determinar o polimorfismo e a frequência do gene causador da NEM2B em um grupo de indivíduos por método molecular. Serão recrutados 30 participantes da pesquisa por meio de convite. Após seleção dos voluntários o sangue desses

participantes será coletado e o DNA obtido. Em seguida, será feita uma análise molecular e levantamentos bioquímicos e hematológicos. Os dados gerados pela aplicação de um questionário de hábitos de vida será confrontado com os dados moleculares, bioquímicos e hematológicos visando estabelecer um padrão para o gene NEM2B.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral deste projeto será determinar o polimorfismo e a frequência do

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco 6, sala 6.110, 1o andar **Bairro:** Setor Universitário **CEP:** 70.790-075 **UF:** DF **Município:** BRASILIA **Telefone:** (61)3966-1511 **E-mail:** cep.uniceub@uniceub.br

Página 01 de 04

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UNICEUB

Continuação do Parecer: 1.442.902

gene causador da NEM2B em um grupo de indivíduos por método molecular. O estudo será feito dentro do UniCeub

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Trata-se de um estudo inédito, e os benefícios serão inúmeros para o conhecimento da doença e para os participantes, realização de exame de sangue para detecção das anomalias e, em caso de ocorrência, será encaminhado para atendimento médico. O risco é o inerente da venopunctura, porém, medidas de proteção em decorrência dos procedimentos estão previstas;

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo bem feito desenhado e escrito. Será de fácil realização.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto apresenta toda documentação necessária de forma correta, em consonância com os dispositivos da Resolução no 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Recomendações:

O CEP-UniCEUB ressalta a necessidade de desenvolvimento da pesquisa, de acordo com o protocolo avaliado e aprovado, bem como, atenção às diretrizes éticas nacionais quanto aos incisos XI.1 e XI.2 da Resolução no 466/12 CNS/MS concernentes às responsabilidades do pesquisador no desenvolvimento do projeto:

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais. XI.2 - Cabe ao pesquisador: c) desenvolver o projeto conforme delineado;

d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados. Observação: Ao final da pesquisa enviar Relatório de Finalização da Pesquisa ao CEP. O envio de

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco 6, sala 6.110, 1o andar **Bairro:** Setor Universitário **CEP:** 70.790-075 **UF:** DF **Município:** BRASILIA **Telefone:** (61)3966-1511 **E-mail:** cep.uniceub@uniceub.br

Página 02 de 04

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UNICEUB

Continuação do Parecer: 1.442.902

relatórios deverá ocorrer pela Plataforma Brasil, por meio de notificação de evento. O modelo do relatório encontra-se disponível na página do UniCEUB

http://www.uniceub.br/instituicao/pesquisa/ins030_pesquisacomitebio.aspx, em Relatório de Finalização e Acompanhamento de Pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto não apresenta pendências, estando em condições de ser aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo previamente avaliado por este CEP, com parecer N° 1.442.824/2016, tendo sido homologado na 3a Reunião Ordinária do CEP-UniCEUB, em 04 de março de 2016.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco 6, sala 6.110, 1o andar **Bairro:** Setor Universitário **CEP:** 70.790-075 **UF:** DF **Município:** BRASILIA **Telefone:** (61)3966-1511 **E-mail:** cep.uniceub@uniceub.br

Página 03 de 04

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UNICEUB

Continuação do Parecer: 1.442.902

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 08 de Março de 2016

Assinado por:

Marilia de Queiroz Dias Jacome (Coordenador)

8. APÊNDICE I

Questionário – Qualidade de Vida

Este questionário tem o intuito de avaliar seus hábitos, saúde e qualidade de vida em geral. Por favor, responda todas as questões e, mesmo que você não tenha certeza de alguma resposta, escolha alguma das alternativas que mais se aproxime do real. Muito obrigado pela participação.

Idade: Sexo: F () M ()

1) Você fuma?

Sim () Não () Socialmente ()

2) Faz consumo de bebidas alcoólicas?

Sim () Não ()

2.1) Com que frequência?

Sempre () Frequentemente () Às vezes () Raramente ()
Nunca ()

3) Você se alimenta de maneira saudável?

Sim () Não () Depende ()

3.1) Na escolha dos alimentos, você dá preferência à produtos orgânicos ou naturais?

Sim () Não () Às vezes ()

3.2) Com que frequência você faz consumo de alimentos industrializados?

Sempre () Frequentemente () Às vezes () Raramente ()
Nunca ()

4) Você pratica exercícios físicos?

Sim () Não ()

4.1) Com que frequência?

Sempre () Frequentemente () Às vezes () Raramente ()
Nunca ()

5) Você costuma sentir algum desconforto físico?

Sim () Não () Às vezes ()

6) Quanta dor no corpo você sentiu nos últimos 2 meses?

Nenhuma () Leve () Moderada () Intensa ()

7) Você se expõe à luz solar?

Sempre () Frequentemente () Às vezes () Raramente ()
Nunca ()

8) Há muita movimentação de veículos no local onde você mora?

Sim () Não () Moderada ()

9) Há muita movimentação de veículos no local onde você trabalha/ estuda?

Sim () Não () Moderada ()

10) Com que frequência você faz exames de rotina?

Sempre () Frequentemente () Às vezes () Raramente ()
Nunca ()

11) Você é exposto à Raio X com que frequência?

Sempre () Frequentemente () Às vezes () Raramente ()
Nunca ()

12) Você considera sua saúde:

Excelente () Muito boa () Boa () Razoável () Ruim ()