

Elizabete Rosária de Miranda

**ESTUDO DE FAMÍLIAS MINEIRAS COM NEOPLASIA
ENDÓCRINA MÚLTIPLA TIPO 2A, TIPO 2B E
CARCINOMA MEDULAR FAMILIAR: CORRELAÇÃO
GENÓTIPO, FENÓTIPO E ISOFORMAS DA PROTEÍNA
RET (RET 9 E RET 51)**

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina da UFMG
2010

Elizabeth Rosária de Miranda

**ESTUDO DE FAMÍLIAS MINEIRAS COM NEOPLASIA ENDÓCRINA
MÚLTIPLA TIPO 2A, TIPO 2B E CARCINOMA MEDULAR
FAMILIAR: CORRELAÇÃO GENÓTIPO, FENÓTIPO E ISOFORMAS
DA PROTEÍNA RET (RET 9 E RET 51)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação das Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto (PrPG CASA) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de Concentração: Clínica Médica

Orientadora: Profa. Maria Marta Sarquis Soares

Co-orientador: Prof. Luiz Armando De Marco

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina da UFMG
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Magnífica Reitora

Clélio Campolina

Pró-Reitora de Pós-Graduação

Elizabeth Ribeiro

Pró-Reitor de Pesquisa

Carlos Alberto Tavares

Faculdade de Medicina

Diretor

Francisco José Penna

Vice Diretor

Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação

Manoel Otávio de Almeida Paz

Chefe do Departamento de Clínica Médica

Anelise Impeliziere Nogueira

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto (PrPG CASA)

Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Membros do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto (PrPG CASA)

Teresa Cristina de Abreu Ferrari- Coordenadora

Valéria Maria Azeredo Passos - Vice-coordenadora

Suely Rezende

Luiz Gonzaga Vaz Coelho

Carlos Faria Santos do Amaral

Newton Alves Rezende

Representante Discente

Elizabete Rosária de Miranda

Dedico a minha tese aos pacientes, que muito carinhosamente,
permitiram que essa investigação deixasse de
ser um sonho e se tornasse realidade

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Andy Petroianu por ter estado ao meu lado durante grande parte do desenrolar do meu Doutorado. Sou muito grata também pelo seu carinho, dedicação e seriedade na correção da minha tese. Sem a sua ajuda e o seu exemplo de vida, a minha tarefa teria sido muito mais difícil.

Ao Prof. Dr. Luiz Armando De Marco, por ter permitido que eu permanecesse por todos esses anos trabalhando em seu laboratório.

À Profa. Dra. Maria Marta Sarquis Soares que me abriu as portas para o mundo da pesquisa, estando sempre ao meu lado.

À Profa. Paula Vieira Teixeira Vidigal que com muito carinho e competência fez a leitura dos meus achados de imunoistoquímica. Sem a sua ajuda, esse trabalho não teria acontecido.

Aos alunos de iniciação científica, Joana Starling e Breno Ferreira, sem os quais esse trabalho não teria sido possível.

Ao Prof. Marco Aurélio Romano Silva por abrir as portas de seu laboratório para que eu pudesse desenvolver a minha pesquisa.

À minha família: pais, irmãos e sobrinhos que são muito importantes no meu crescimento pessoal e profissional.

À FAPEMIG pelo custeio de parte dos nossos gastos no desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Alexandre Magno que carinhosamente me acolheu e me ajudou durante a análise dos meus resultados.

Aos queridos amigos do laboratório: Juliana, Lu, Franciele, Daniela, Patrícia, Cíntia, Karen, Raquel, Cida, Victor e todos os ICs, pelo carinho recebido.

Ao Prof. Dr. Carlos Faria Santos do Amaral por acreditar no meu potencial sempre me oferecendo oportunidades de crescimento.

Às meninas da Secretaria da Pós-Graduação, Jussara, Élen, Mary, Cinthia e Viviane, pela dedicação e carinho no atendimento às nossas necessidades estudantis.

Aos alunos de Pós-Graduação que acreditam no meu trabalho permitindo que eu os representasse no Colegiado nos últimos cinco anos.

Aos membros do Colegiado do programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas À Saúde do Adulto, Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari, Profa. Valéria Maria de Azeredo Passos, Profa. Suely Rezende, Prof. Nilton Alves de Rezende, Prof. Carlos Faria dos Santos do Amaral, Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho, por terem permitido que eu participasse da representação discente e por terem acreditado em mim.

À Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari, que carinhosamente me acolheu e me ajudou para que eu pudesse concretizar o sonho de iniciar o curso de Filosofia.

Ao Prof. Rui Maciel e à Profa. Janete Cerutti por terem colaborado com a minha formação na área de Biologia Molécula, permitindo que eu frequentasse o laboratório da Escola Paulista de Medicina.

Aos meus amigos da Fundação Hospitalar Mário Penna: Cristina, Juliana Rocha, Bruna Galvão, Maria Eterna, Gustavo e Marcelo, pelo carinho e apoio recebidos.

Aos Laboratórios de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas, Hermes Pardini, Madre Teresa, que gentilmente me cederam os blocos de parafina dos pacientes da minha pesquisa.

Aos meus eternos e queridos amigos Sandro, Paulo, Maria José e Teresa, por estarem sempre ao meu lado.

E a todos que pelo meu caminho cruzaram, e me ensinaram a ter perseverança e esperança, no caminhar da vida. Certamente eles são muitos e não há espaço suficiente para nomeá-los.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	3
1.1	Neoplasia endócrina múltipla tipo 2	3
1.2	Manifestações Clínicas	3
1.2.1	Carcinoma Medular da Tireoide (CMT).....	3
1.2.2	Feocromocitoma.....	6
1.2.3	Hiperparatireoidismo	7
1.2.4	Neuromas mucosos... ..	8.....
1.3	Rastreamento Clínico	8
1.4	Aspectos Moleculares	10
1.4.1	Gene <i>RET</i> e Mutações Gênicas e polimorfismos.....	10
1.5	Famílias com NEM 2	12
2	OBJETIVOS	18
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	20
3.1	Métodos para Estudo Molecular	21
3.1.1	Extração do DNA Genômico	21
3.1.2	Amplificação Gênica.....	22
3.1.3	Purificação.....	24
3.1.4	Sequenciamento Gênico.....	25
3.1.4.1	Preparação da reação de Sequenciamento	26
3.2	Imunoistoquímica	28
4	RESULTADOS	31

4.1	Resultados Clínicos e moleculares.....	31
4.2	Resultado da expressão das isoformas RET e Tyr 1062	34
5	DISCUSSÃO.....	39
6	CONCLUSÕES.....	45
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
	APÊNDICES.....	56

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 Mutações no RET associadas ao CMT hereditário	14
TABELA 2 Correlação genótipo-fenótipo na neoplasia endócrina múltipla tipo 2(MEN-2)	15
TABELA 3 Iniciadores utilizados na reação de cadeia da polimerase (PCR)	24
TABELA 4 Distribuição de sexo, faixa etária durante o diagnóstico do carcinoma medular da tireoide e dos SNPs nos casos considerados esporádicos e nos considerados familiares.	34
TABELA 5 Distribuição dos SNPs nos casos esporádicos e familiares e valor de significância	34
TABELA 6 Fenótipo, idade do indivíduo afetado, idade do indivíduo portador, genótipo e SNP encontrados nas cinco famílias com neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (MEN-2)	36
TABELA 7. Correlação fenótipo, genótipo e expressão das isoformas da proteína RET 9, RET 51 e resíduo Tyr Y1062 na tireoide, linfonodo e suprarenal em blocos de parafina obtidos do tratamento cirúrgico dos pacientes com carcinoma medular da tireoide esporádico (CMT) e nos pacientes com neoplasia endócrina múltipla tipo 2(MEN-2A, MEN-2B e FMTC)	37

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1** Representação esquemática do *splice* alternativo do RNAm no exon 19 que determina a formação da isoforma RET 9.....15
- FIGURA 2** Representação esquemática das três isoforma RET (RET 9, RET 43 e RET 51) e sua relação com a neoplasia endócrina múltipla tipo 2A (MEN2A).....16
- FIGURA 3** Heredograma das famílias com neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (MEN-2), mutação encontrada e fenótipo.....33

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
Células NIH 3T3	Linhagem de células que não expressam o gene <i>RET</i>
CEA	Antígeno carcinoembriogênico
CMT	Carcinoma medular da tireoide
DAB	3,3'-diaminobenzidina em solução de cromógeno
dATP	Deoxi-adenina trifosfato
dCTP	Deoxi-citosina trifosfato
ddATP	Dideoxi-adenina trifosfato
ddCTP	Dideoxi-citosina trifosfato
ddGTP	Dideoxi-guanina trifosfato
ddTTP	Dideoxi-timina trifosfato
dGTP	Deoxi-guanina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxi-nucleotídeo trifosfato
dTTP	Desoxi-tirosina trifosfato
EDTA	Ácido tetra etileno diamino
FMTC	Carcinoma medular da tireoide familiar
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HPT	Hiperparatireoidismo
MEN 2	Neoplasia endócrina múltipla tipo 2
MEN 2 A	Neoplasia endócrina múltipla tipo 2 A
MEN 2B	Neoplasia endócrina múltipla tipo 2B

MMX	Controle negativo na reação de PCR
PAAF	Punção aspirativa de agulha fina
PAGE	Gel de poliacrilamida
PERIDROL	H ₂ O ₂ 30%
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PTH	Hormônio da paratireoide
RET	REarranged After Transfeccion.
TGF-β	Transforming growth factor-β
TSH	Hormônio tireotrófico
SNP	Polimorfismo único dos nucleotídeos

RESUMO

A neoplasia endócrina múltipla Tipo 2 (MEN-2) é uma síndrome hereditária que compreende: carcinoma medular da tireoide (CMT), hiperparatireoidismo primário, feocromocitoma e outras doenças não-endócrinas. Está subdividida em três desordens fenotípicas relacionadas: MEN-2A, MEN-2B e apresentação única do carcinoma medular familiar da tireoide (FMTC). A MEN-2A compreende CMT (95% a 100% dos casos), feocromocitoma (30% a 50%) e a hiperplasia da paratireoide (10% a 30%). A MEN-2B apresenta CMT (95% a 100%), feocromocitoma (30% a 50%), neurofibromatose de mucosas e do trato gastrointestinal e anomalias músculo-esqueléticas em 100% dos casos. A MEN-2 está associada a mutações no proto-oncogene *RET* (10q11.2), que determinam a ativação permanente do receptor RET. O proto-oncogene *RET* gene codifica cerca de 10 isoformas, sendo as isoformas RET 9 e RET 51, as mais importantes no desenvolvimento da MEN-2. Para a determinação da correlação genótipo-fenótipo e isoformas da proteína RET (RET 9, RET 51 e resíduo Tyr Y1062) foram estudados 58 indivíduos residentes no Estado de Minas Gerais (33 casos de CMT isolados e 25 familiares). Foram utilizadas as técnicas de sequenciamento genético do sangue periférico e imunistoquímica dos blocos de parafina provenientes do tratamento cirúrgico a que haviam sido submetidos os pacientes. O fenótipo mais prevalente foi o FMTC e a mutação observada foi a L790F. Vinte e três pacientes apresentaram o SNP L790F, seis pacientes o SNPG691S e quatro pacientes o SNP A764A, não relatado na literatura. O número reduzido de pacientes com MEN-2 dos quais se obteve material parafinizado não permitiu a interpretação da correlação entre o fenótipo, o genótipo e a expressão das isoformas da proteína RET. Acredita-se que o trabalho tenha relevância clínica e laboratorial por ser a primeira tentativa de investigação e registro dos pacientes com CMT esporádico e CMT familiar (MEN-2) no Estado de Minas Gerais.

Palavras chaves: RET; Neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (MEN-2); Carcinoma medular da tireoide; Isoformas da proteína RET.

ABSTRACT

The multiple endocrine neoplasia Type 2 (MEN-2) is a hereditary syndrome comprising: medullary thyroid carcinoma (MTC), primary hyperparathyroidism, pheochromocytoma and other non-endocrine diseases. Is subdivided into three phenotypic related disorders: MEN-2A, MEN-2B and familial medullary thyroid carcinoma (FMTC). The MEN-2A comprises MTC (95% to 100% of cases), pheochromocytoma (30% to 50%) and parathyroid hyperplasia (10% to 30%). The MEN-2B presents MTC (95% to 100%), pheochromocytoma (30% to 50%), ganglioneuromatosis of the gastrointestinal tract, and an asthenic "Marfanoid" body habitus. in 100% of cases. The MEN-2 is associated with mutations in proto-oncogene RET (10q11), which determine the standing of the RET receptor activation. The proto-oncogene RET gene encodes around 10 isoformas, and isoformas RET 9 and RET 51, the most important in the development of MEN-2. For the determination of correlation genotype-phenotype and isoformas protein RET (RET 9, RET 51 and residue Tyr Y1062) were studied 58 individuals resident in the State of Minas Gerais (33 cases of MTC isolated and 25 family). Were used genetic sequencing techniques of peripheral blood and immunohistochemistry of paraffin blocks from surgical treatment that had undergone patients. The most prevalent phenotype was FMTC and mutation observed was the L790F. Twenty-three patients presented the SNP L790F, six SNPG691S patients and four patients the SNP A764A, not reported in the literature. The small number of patients with MEN-2 from whom the paraffin blocks were obtained has not allowed the interpretation of the correlation between genotype and phenotype, and the expression of isoformas protein ret. The work has relevance clinical and laboratory for being the first attempt to research and patient record with CMT sporadic and CMT family (MEN-2) in the State of Minas Gerais.

Key words: RET; Multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN-2); Thyroid medullary carcinoma; RET isoforms.

1. Introdução

A neoplasia endócrina múltipla Tipo 2 (MEN-2) é uma síndrome hereditária que compreende: carcinoma medular da tireoide (CMT), hiperparatireoidismo primário, feocromocitoma e outras doenças não-endócrinas. Está subdividida em três desordens fenotípicas relacionadas: MEN-2A, MEN-2B, e apresentação única do carcinoma medular da tireoide (FMTC), que deve estar presente em pelo menos quatro indivíduos da mesma família (1).

A MEN-2A compreende CMT, o qual ocorre em 95% a 100% dos casos, o feocromocitoma (30% a 50%) e a hiperplasia da paratireoide (10% a 30%). Pacientes com MEN-2B também apresentam o CMT (95% a 100%) e o feocromocitoma (30% a 50%), mas não há o acometimento das glândulas paratireoides, ocorrendo sim, a presença de neurofibromatose de mucosas e do trato gastrointestinal, bem como, anomalias músculo-esqueléticas em 100% dos casos (2,3).

1.2 Manifestações Clínicas da MEN-2

1.2.1 Carcinoma medular da Tireoide (CMT)

O CMT é a manifestação clínica mais frequente da MEN-2, seja da MEN-2A ou da MEN-2B. É a única com característica de malignidade (4), podendo ser encontrada em quase 100% dos casos (5,6). O CMT é a neoplasia maligna tumor das células C parafoliculares (7) em que se observa a produção do hormônio calcitonina (8), o qual pode ser usado como marcador tumoral (9,10,11). As células C compreendem menos que 1% de todas as células da tireoide e são encontradas nas regiões parafolicular, interfolicular ou intrafolicular (4). A hiperplasia multifocal das células C é precursora da lesão maligna no CMT hereditário (12,13). O CMT geralmente acomete ambos os lobos, e diferentemente de outros tipos de doenças da tireoide, ocorre igualmente em ambos os sexos (4). Manifesta-se como um nódulo ou massa cervical e, frequentemente, os pacientes já apresentam comprometimento em linfonodos cervicais ao diagnóstico. As metástases do CMT podem ocorrer também para os linfonodos mediastinais ou mais distalmente para os pulmões, fígado, rim e ossos (14,15). As metástases a distância são eventos mais tardios na doença (16,17).

A presença de nódulos na tireoide associada à elevação dos níveis plasmáticos de calcitonina são muitas vezes capazes de confirmar o diagnóstico do CMT. Até a idade de 35 anos quase 100% dos pacientes com CMT na MEN-2 já apresentam o aumento da calcitonina (18,19).

O CMT pode secretar grande variedade de substâncias péptides e não péptides, como o hormônio adenocorticotrófico (ACTH), somatostatina, neurotensina e o péptido liberador de gastrina, além de outras substâncias como, prostaglandinas, serotonina e o antígeno carcinoembriogênico (CEA). O paciente pode ainda apresentar períodos de diarreia, provavelmente devido à secreção de substâncias estimuladoras intestinais produzidas pelo CMT (4).

A prevenção e cura do CMT na MEN-2 são feitas por meio da cirurgia, sendo que, o sucesso é dependente do momento de sua realização. A cirurgia do CMT deve ocorrer antes da idade de progressão da hiperplasia das células C para a malignidade (20). Stjernholm *et al.* (1980) (21) descreveram CMT familiar em pacientes com idade inferior a dois anos.

Uma vez que o paciente com CMT apresente o nível de calcitonina elevado, basal ou estimulada, ele deve ser submetido à tireoidectomia total (10), já que a tireoidectomia total realizada no momento da detecção de anormalidade da calcitonina pode ser curativa (22). Os valores de calcitonina são quase sempre elevados no CMT manifesto (23,24,25).

A microscopia do CMT é caracterizada por células poligonais uniformes ou ovais com citoplasma eosinofílico finamente granulado. As figuras mitóticas não são frequentes. A presença de amiloide é considerada uma característica histopatológica distintiva do CMT, embora possa estar ausente em alguns casos. Algumas vezes há dificuldade de distinção histológica do CMT e outros tipos de carcinoma da tireoide,

por causa de padrões de crescimento atípicos papilares ou foliculares, que podem estar presentes. O estudo imunoistoquímico para calcitonina na peça cirúrgica muitas vezes se faz necessário em situações de histologia não esclarecedora (4).

O rastreamento molecular de famílias com MEN-2, disponível desde a identificação de mutações no gene *RET* (26,27,28), muitas vezes resulta no diagnóstico de indivíduos portadores de mutação, os quais são considerados indivíduos em risco de desenvolver o CMT (20). Muitos autores demonstraram a importância desse rastreamento, pois ele permite identificar os indivíduos que necessitarão da tireoidectomia profilática, devido à alta penetrância do CMT nessas famílias (16,29,30). O rastreamento molecular também é útil para distinguir o CMT hereditário do CMT esporádico (31).

Para Brandi *et al.* (2001) (32), uma determinada mutação em um códon do gene *RET* tem correlação específica de desenvolvimento e agressividade do CMT. Dessa forma, o tipo de mutação encontrada em certa família, deve ser cuidadosamente avaliado e considerado ao se escolher o melhor momento para a realização da tireoidectomia profilática. Somente dessa maneira, esse procedimento será curativo ou preventivo do CMT (33,34,35). O aumento da calcitonina indica a presença de doença da célula C já estabelecida. O diagnóstico molecular é mais precoce do que a dosagem da calcitonina na identificação do CMT (33). O CMT não responde a outros tratamentos não cirúrgicos, como a iodoterapia, a quimioterapia ou a radioterapia (4,14,15).

1.2.2 Feocromocitoma

O feocromocitoma é a segunda manifestação fenotípica mais comum da MEN-2, seja na MEN-2A ou na MEN-2B, e está presente em cerca de 30% a 50% dos casos. Ele não ocorre no FMTC. Acomete as células medulares da adrenal, as quais são derivadas do neuroectoderma (6).

O feocromocitoma na MEN-2 pode ser unilateral ou bilateral e apresenta taxa de malignidade inferior a 10% (5,6,36,37,38,39,40). Ele é precedido pela hiperplasia medular suprarrenal difusa e multifocal, e raramente, é extra suprarrenal (4,36). O feocromocitoma pode desenvolver-se antes, após, ou simultaneamente ao CMT. Nesse último caso, o feocromocitoma deve ser ressecado primeiro, para que se evite crise hipertensiva durante a tireoidectomia (4). Em um paciente portador de mutação no gene *RET*, a investigação clínica do feocromocitoma deve anteceder a tireoidectomia profilática (41).

A presença do feocromocitoma nos pacientes com MEN-2 também está associada a maior chance de complicações relacionadas ao excesso de catecolaminas como o infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral, especialmente em pacientes clinicamente não diagnosticados que se submetem a um procedimento cirúrgico, ou até mesmo, em mulheres durante o trabalho de parto (36). Os pacientes com feocromocitoma podem apresentar cefaleia intermitente, palpitações e nervosismo. O encontro de hipertensão arterial é um achado incomum (22). Nos pacientes com MEN-2 existe uma correlação genótipo-fenótipo no que diz respeito ao feocromocitoma, sendo que essa enfermidade ocorre mais comumente quando há a presença de mutações específicas do gene *RET*, como aquelas encontradas no exon 11(16).

O diagnóstico laboratorial do feocromocitoma na MEN-2 é semelhante ao diagnóstico do feocromocitoma esporádico. Para a identificação desse fenótipo, são

feitas dosagens de catecolaminas e metanefrinas plasmáticas, e em urina de 24 horas. Se a dosagem estiver acima dos valores de referência ou se o paciente com MEN-2 apresentar os sintomas compatíveis com o feocromocitoma, deve-se recorrer a exames de imagem, como a tomografia computadorizada, ressonância nuclear magnética das suprarrenais, ou meta iodo benzilguanidina (MIBG).

Os pacientes com MEN-2 devem ser submetidos a pesquisa anual para feocromocitoma, ou mais frequentemente, quando eles são portadores de mutações no gene *RET* relacionadas ao seu aparecimento. Essa investigação inicia aos 10 anos de idade. O feocromocitoma nesses pacientes tem um desenvolvimento lento e não leva ao aumento significativo da morbidade e mortalidade se supervisionado cuidadosamente (37).

1.2.3 Hiperparatireoidismo

O hiperparatireoidismo ocorre em 20% a 30% dos casos de MEN-2A e MEN-2B, mas não está presente no FMTC. A maioria desses pacientes é assintomática, embora, a hipercalcúria e a litíase renal possam ocorrer (4,32). A lesão histológica mais comumente observada nos estádios iniciais do hiperparatireoidismo associado à MEN-2 é a hiperplasia das glândulas paratireoides. Se a doença for diagnosticada tardiamente, a lesão adenomatosa superpõe-se à hiperplasia (17,42).

Os critérios diagnósticos e as indicações para a cirurgia do hiperparatireoidismo na MEN-2 são os mesmos daqueles do hiperparatireoidismo esporádico (43,44). Para o diagnóstico do hiperparatireoidismo deve-se dosar o cálcio plasmático (total e iônico), bem como o paratormônio (PTH). Essas dosagens devem ser anuais entre os pacientes

com MEN-2, ou mais freqüentemente em pacientes portadores de mutação no gene *RET* predisponente ao hiperparatireoidismo.

Os exames de imagem, como a cintilografia das paratireoides com sestamibi e a ultrassonografia das paratireoides, não são informativos na escolha da extensão do procedimento cirúrgico nos casos de hiperparatireoidismo em pacientes com MEN-2 (32).

1.2.4 Neuromas Mucosos

Os neuromas mucosos são característicos da MEN-2B, não estando presentes na MEN-2A, e nem na FMTC. Eles podem ocorrer na porção distal da língua, nos lábios e em áreas subconjuntivais, além de todo o restante do trato gastrointestinal. A ganglioneuromatose do trato gastrointestinal pode causar obstrução ou dilatação do cólon, podendo ser as primeiras manifestações da MEN-2B nas crianças. Outras características físicas típicas da NEM-B incluem o hábito marfanoide, peito escavado e alongamento das extremidades (2).

1.3 RASTREAMENTO CLÍNICO

Antes da descoberta do gene responsável pela MEN-2 a maioria dos programas de rastreamento clínico dos indivíduos em risco de CMT hereditário sugeria o início da investigação clínica na infância, com dosagens anuais de calcitonina a partir dos cinco anos de idade, até os 35 anos (18,19). Esse teste apresenta algumas dificuldades de realização, bem como uma baixa especificidade e sensibilidade (falso-positivos e falso-negativos podem ser observados em 5% a 85% dos casos) (16,17,45).

A partir da identificação do gene *RET* e de suas mutações, a investigação clínica dos pacientes em risco é feita mediante rastreamento molecular, independentemente da idade do paciente, e em apenas uma ocasião (26,27,28,29,46). Esse rastreamento molecular tem grande acurácia e é reprodutível (47). Os pacientes em risco em uma família com MEN-2 que tiverem o teste molecular negativo para as mutações no gene *RET* deverão ser tranquilizados, pois eles e seus descendentes têm risco de desenvolver o CMT semelhante ao da população geral. Os pacientes que tiverem o teste positivo deverão ser encaminhados para a tireoidectomia profilática, no momento adequado, considerando a idade do paciente e o tipo de mutação encontrada (20,30,32,33,48) (tabela 1).

A investigação clínica para o feocromocitoma deve ser realizada anualmente nos pacientes com MEN-2, com dosagem de catecolaminas e metanefrinas plasmáticas e urinárias. A pesquisa clínica para o hiperparatireoidismo é anual, por meio das dosagens de cálcio sérico, total e iônico, e a do PTH, especialmente naqueles pacientes portadores de mutação que se correlaciona ao aparecimento dessas manifestações clínicas.

A possibilidade de identificação de mutações no gene *RET* nos indivíduos em risco das famílias com MEN-2 não modificou a necessidade da pesquisa anual para o feocromocitoma e o hiperparatireoidismo, em portadores de mutações. Essa pesquisa deve ser feita em intervalo de tempo menor nos que apresentam mutações mais fortemente associadas a essas enfermidades como, por exemplo, mutação no códon 634 (16,37,46) (tabela 2).

1.4 ASPECTOS MOLECULARES

1.4.1 Gene *RET*, mutações e polimorfismos

O proto-oncogene *RET* (*rearranged after transfeccion*) foi inicialmente descrito por Takahashi et al. (1985) (49), que observaram que células da linhagem NIH 3T3 expressavam dois segmentos de DNA ainda não conhecidos, quando transfectadas com DNA de linfoma humano. Segundo esses autores, os dois novos segmentos tornavam-se ativos após a recombinação de dois segmentos de DNA não ligados, provavelmente por cointegração durante a transfecção. O gene *RET* foi localizado no cromossomo 10 (10q11.2), tanto por análise de ligação, quanto por mapeamento físico (50,51,52), tendo sido clonado em 1988. É formado por 21 exons e codifica um receptor de membrana tirosina-quinase expresso nas células derivadas da crista neural, incluindo tumores neuroendócrinos originados dessas células (53).

O ligante da proteína RET, identificado em 1996, é um peptídeo da superfamília do TGF- β (fator transformador de crescimento) denominado fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), atuando via receptor GDNF- α (54,55). O GDNF- α , acoplado ao seu receptor específico, liga-se à porção extracelular do receptor RET, causando a dimerização desse receptor com posterior autofosforilação dos resíduos tirosinaquinase liberando fosfato, um substrato importante na cadeia do crescimento e diferenciação celular. Mutações no proto-oncogene *RET* determinam a ativação permanente do receptor RET, desencadeando o processo neoplásico visto na MEN-2 (56,57).

O proto-oncogene *RET* codifica cerca de 10 isoformas de um receptor de membrana da família das tirosinaquinases associadas à proliferação e diferenciação celular e é expresso nas células da crista neural. As três isoformas mais importantes são

as isoformas RET 9, RET 43 e RET 51. Elas surgem a partir de *splices* alternativos da região terminal 3' do exon 19 e diferem entre si por seus aminoácidos terminais. As isoformas do RET têm propriedades de sinalização distintas, sendo que o RET 51 parece ser dispensável no processo da embriogênese, enquanto, o RET 9 é necessário no desenvolvimento do sistema nervoso entérico e do sistema excretório renal (58).

Existem 16 tirosinas nos domínios intracelulares do RET 9 e do RET 43, enquanto o RET 51 possui 18. Entre essas tirosinas, as tirosinas 1015 e 1062 (Y 1015 e Y 1062) são as mais importantes para a sinalização celular da proteína RET (59). A tirosina Y1015 representa um sítio de ligação para o PLCc e a tirosina Y 1062 é um sítio para a ligação de uma série de adaptadores de proteínas como o SHC, SNT/FRS2, IRS1, DOK1, 4 e 5, e o Enigma (59). Vários caminhos de ativação celular, incluindo o RAS/ERK, PI-3K/AKT, p38MAPK, JNK ERK5 são ativados, principalmente via fosforilação da Y 1062 (60). O sítio de *splicing* das três isoformas ocorre abaixo do resíduo Y 1062 (61).

As proteínas mutantes RET 51MEN-2A e RET 51 MEN-2B têm poder de ativação maior do que as proteínas mutantes RET 9 MEN-2A e RET 9 MEN-2B (62). Entretanto, a atividade do RET 43 parece ser muito baixa. Esse fato sugere que o RET 51 contribui mais para o desenvolvimento tumoral na MEN-2, talvez por apresentar um sítio adicional de fosforilação, o domínio 1096 (Tyr 1096) (62,63,64). Além disso, parece que os transcritos que codificam o RET 9 e RET 51 são mais abundantes do que os transcritos das outras isoformas na MEN-2 (65).

O RET 9 é assim chamado por ter nove aminoácidos carboxiterminais e é conhecido como isoforma curta. Ele possui 1072 aminoácidos (63,66,67). O RET 51 é formado por 51 aminoácidos carboxiterminais e é chamado de isoforma longa, por ser maior do que o RET 9, possuindo 1114 aminoácidos. A expressão do RET 43 (isoforma

de tamanho intermediário com 1.106 aminoácidos) parece não ser de importância considerável (figuras 1 e 2).

Muitos autores investigam o papel dos polimorfismos únicos dos nucleotídeos (SNPs) na gênese e evolução clínica do CMT, na tentativa de encontrar correlações entre eles e a doença. Entretanto, os achados têm sido discordantes (68,69,70,71,72,73). A importância dos SNPs G691S (exon 11) e L769L (exon 13) têm sido frequentemente citada na literatura por terem apresentado desequilíbrio de ligação em várias investigações (68,69,70). Tem sido demonstrado que os SNPs levam à produção de diferentes quantidades de RNAm, com diferentes propriedades, o que ocasiona modificações em sítios de *splicing* (71,74).

Não há relatos sobre o estudo da expressão e ativação das isoformas RET 9 e RET 51 em tecidos obtidos no tratamento cirúrgico dos pacientes acometidos pelo CMT esporádico ou familiar, nem mesmo, a relação entre o fenótipo, o genótipo e a proteína RET. Acredita-se que o entendimento mais aprofundado da interação destes acontecimentos auxiliará a compreensão da variabilidade fenotípica observada nessa síndrome propiciando abordagens clínicas e cirúrgicas mais adequadas dos pacientes.

1.5 FAMÍLIAS COM MEN-2

A primeira menção na literatura de famílias com MEN-2 ocorreu em 1975 (75). Desde então, várias famílias em todo o mundo vem sendo identificadas e estudadas clinicamente. A descoberta do proto-oncogene *RET* e a identificação de mutações como causadoras da MEN-2, na década de 90, permitiram um maior entendimento dos aspectos moleculares dessa síndrome. Decorrente disso houve a abordagem mais adequada dos pacientes por ela acometidos, bem como de seus familiares em risco de desenvolverem-na, os quais puderam se beneficiar da possibilidade da realização da tireoidectomia profilática.

O Consórcio Internacional de Mutações (1996), estudo que envolveu 477 famílias com MEN-2 de 18 centros de referência em diversos países, mostrou existir a correlação entre fenótipo e genótipo nessas famílias (5).

Alguns grupos de pesquisadores brasileiros das regiões sul e sudeste, hoje se dedicam à busca das famílias com MEN-2 no país (48,76). Entretanto, ainda não foram encontrados na literatura relatos sobre o estudo das famílias mineiras com a MEN-2.

Dessa forma, foi proposto a identificação das famílias mineiras com MEN-2, o sequenciamento genético do proto-oncogene *RET* nos indivíduos acometidos, bem como o estudo das isoformas RET 9 e RET 51 nos tecidos de tireoide, linfonodo, paratireoide e suprarrenal, provenientes do tratamento cirúrgico a que foram submetidos os pacientes.

TABELA 1

Mutações no gene *RET* associadas ao carcinoma medular da tireoide hereditário

Nível de risco para CMT	Codon da mutação	Idade(tireoidectomia profilática)
Altíssimo risco (3)	883 918 922	Nos primeiros 6 meses de vida (preferencialmente no primeiro)
Alto risco (2)	611 618 620 634	Em torno dos 5 anos de idade
Risco (1)	609 630 768 790 791 804 891	Entre 5 e 10 anos de idade

Fonte: Brandi *et al*, J Clin Endocrinol Metab 2001

TABELA 2

Correlação genótipo-fenótipo na neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (MEN-2)

Códon com mutação (genótipo)	Subtipo da MEN-2 (fenótipo)
609, 649, 768, 791, 790, 804, 891	FMTC, MEN-2A
634, 611, 618, 620, 630, 631	MEN-2A
918, 883	MEN-2B

Fonte: Raue e Raue, Fam Cancer. 2010
Update multiple endocrine neoplasia type 2

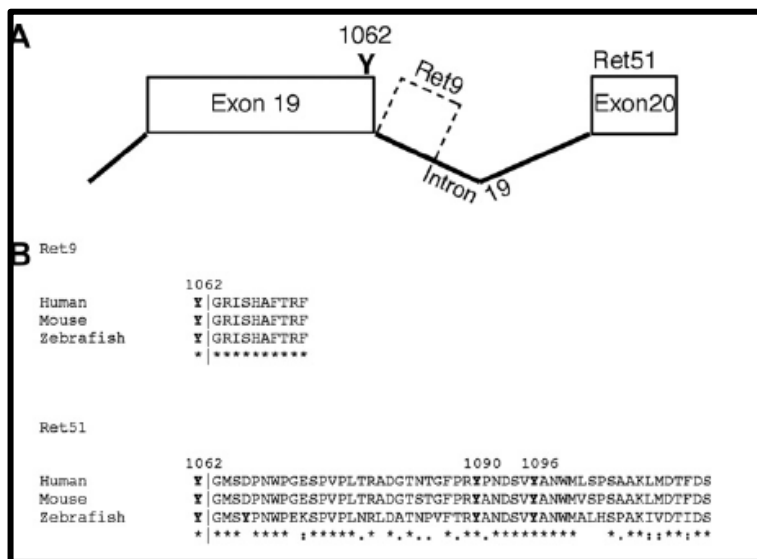


Figura 1- Representação esquemática do *splice* alternativo do RNAm no exon 19, que determina a formação da isoforma RET 9.

A ausência desse *splice* leva à formação do RET 51.

Fonte: Heanue e Pachnis, 2008.

A Figura 2 mostra esquematicamente as três isoformas RET 9, RET 43 e RET 51 com suas semelhanças e diferenças.

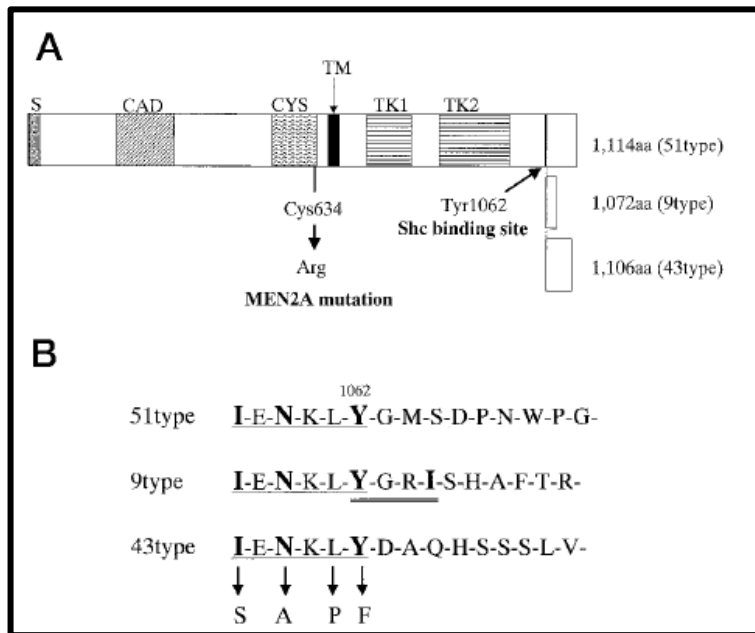


Figura 2- Representação esquemática das três isoformas do RET (RET 9, RET 43 e RET 51) e sua relação com a neoplasia endócrina múltipla tipo 2A MEN-2A)
 Fonte: Kurokawa *et al.*, 2003.

2. Objetivos:

1. Verificar se os pacientes com carcinoma medular da tireoide apresentam a forma esporádica ou familiar da doença (MEN-2)
2. Estabelecer o padrão genético de probabilidade da doença na família
3. Criar o banco de dados das famílias com MEN-2 no Estado de Minas Gerais, estabelecendo a relação entre seu fenótipo e genótipo.
4. Determinar a expressão das isoformas RET 9, RET 51 e do resíduo Y1062, nos blocos de parafina obtidos do tratamento cirúrgico dos pacientes com CMT e correlacionar o fenótipo e o genótipo encontrados.

3. Casuística e Métodos

A pesquisadora solicitou por meio de cartas, telefonemas, e-mail e pessoalmente a todos os endocrinologistas e cirurgiões do Estado de Minas Gerais, que fossem enviados pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de carcinoma medular da tireoide, seja a forma hereditária ou não.

Os pacientes foram entrevistados e somente após o consentimento verbal e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A), foram coletados 5 ml de sangue periférico pelos técnicos do Laboratório Central da Faculdade de Medicina da UFMG. Esse material foi apropriadamente acondicionado e levado ao Laboratório de Neurociência da Faculdade de Medicina da UFMG. O sangue foi processado para permitir as etapas: extração do DNA de leucócito, purificação do DNA extraído, reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento genético do proto-oncogene *RET*.

Os pacientes forneceram os blocos de parafina obtidos no tratamento cirúrgico a que foram submetidos, tendo sido o material devidamente processado para a imunohistoquímica. Foram utilizados os anticorpos anti-calcitonina, RET (C-19) (isoforma C), RET (C-20) (isoforma A), e p-RET (TYR 1062)-R (Apêndice B). Apenas parte do bloco de parafina foi utilizada, sendo o restante devolvido, sem que houvesse qualquer prejuízo para o paciente.

Este trabalho teve aprovação dos Comitês de Ética dos Hospitais das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Hospital Felício Rocho, Hospital Vera Cruz, e Fundação Hospitalar Mário Penna (Apêndice C).

3.1 Métodos para estudo molecular

A análise molecular consistiu no isolamento do DNA genômico de indivíduos afetados por CMT esporádico, bem como dos indivíduos com CMT familiar (MEN-2) e seus familiares.

3.1.1 Extração do DNA genômico

A extração de DNA é um método básico e essencial para a realização de estudos envolvendo a Biologia Molecular. A extração de DNA consiste no isolamento da molécula de DNA do núcleo das células. É possível extrair o DNA de vários materiais biológicos como, leucócito, tecidos parafinados, urina, bulbo capilar e secreções (77).

O DNA, obtido a partir dos leucócitos do sangue periférico dos pacientes foi extraído usando-se o WIZARD® GENOMIC DNA PURIFICATION KIT (PROMEGA WI) que contém: solução de lise celular, solução de lise nuclear, solução RNase, Protein solução de precipitação, solução de rehidratação. Escolhemos este Kit por ser de fácil manuseio e eficiente, permitindo uma recuperação de 10-15 µg de DNA para cada 300 µl de sangue total. Foi seguido o protocolo recomendado pelo fabricante:

Promega Corporation

2800 Woods Hollow Road

Madison WI 53711, USA.

Phone: 608.274.4330;

Fax: 608.277.2516

www.promega.com

3.1.2 Amplificação gênica

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método amplamente utilizado em Biologia Molecular, que permite a obtenção de uma sequência específica do DNA por amplificação enzimática, visando a produção de milhões de cópias desta sequência.

Foi idealizada por Kary Mullis e totalmente descrita em 1987 (78). A técnica se baseia na capacidade de autoduplicação do DNA. Assim, o método utiliza uma fita de DNA como molde, visando a síntese de novas cadeias complementares. Essa reação ocorre sob a ação da enzima DNA polimerase, que é capaz de adicionar os nucleotídeos presentes na reação, segundo a fita molde, gerando cadeia de DNA de dupla fita (77).

Embora os oligonucleotídeos que atuam como iniciadores possam ser muito pequenos, eles devem ser suficientemente grandes para identificar uma sequência complementar no genoma humano, garantindo dessa forma a amplificação específica do fragmento desejado. Usualmente os iniciadores utilizados tem cerca de 20 pares de bases (pb). A escolha dos iniciadores é um dos pontos críticos para a eficácia do método de PCR (77).

O tubo com a reação é incubado em um aparelho que controla automaticamente as mudanças de temperatura em cada ciclo. No final do processo, o DNA produzido pode ser observado por meio da eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, como uma banda única que corresponde ao tamanho da sequência amplificada, a qual pode atingir até algumas kilobases (77).

O DNA genômico extraído foi utilizado para amplificar os exons 10, 11, 13, 14, 15 e 16 do gene *RET* (tabela 3). A reação de PCR foi realizada com o Kit HotStart Taq Master Mix (Qiagen), conforme orientação do fabricante, e 0,2 μ M de cada um dos iniciadores (senso e antissenso). Para cada reação foi realizado um controle negativo

(MMX), contendo todos os componentes da reação, exceto a amostra de DNA. O resultado obtido pela análise do controle negativo indica a confiabilidade do procedimento, no sentido de o material amplificado ser proveniente da amostra de DNA utilizada e não de DNA contaminante.

As reações foram realizadas no termociclador PCT-100-Programmable Thermal Controller- MJ Research, USA. O programa de PCR utilizado foi:

- 1ª fase – temperatura de ativação da Taq DNA polimerase: 95° C, 15 minutos;
- 2ª fase – temperatura de desnaturação: 94° C, 30 segundos;
- 3ª fase – temperatura de anelamento: 59° C, 45 segundos;
- 4ª fase – temperatura de extensão: 72° C, 1 minuto;
- 5ª fase – 40 ciclos repetitivos, partindo da 2ª até a 4ª fases amplificando exponencialmente o DNA molde;
- 6ª fase- fase extensão final com 72° C, 10 minutos.

Os iniciadores utilizados foram:

TABELA 3

Iniciadores utilizados na reação de cadeia da polimerase (PCR)

Exon	Senso	Antissenso
10	5'-AGAGAATGGTCAGTAGGGGACACT-3'	5'-GGACCTCAGATGTGCTGTT-3'
11	5' - GCATACGCAGCCTGTACC-3'	5'-CAGGATCTTGAAGGCATCC-3'
13	5'-CGTCTTTGCAGGCCTCTCTG-3'	5'-ACAGGCCTGTATGGAGCCCC-3'
14	5'-AAGACCCAAGTGCCTGAC-3'	5'-GCTGGGTGCAGAGCCATAT-3'
15	5'-GTGACCGCCTGGCCATGG-3'	5'-AGGCTTCCCAAGGGCACTG-3'
16	5'-AGGGATAGGGCCTGGCCTTC-3'	5'-TAACCTCCACCCAAGAGAG-3'

Os iniciadores foram construídos com auxílio do programa de construção de iniciadores *PRIMER 3*.

3.1.3 Purificação

O produto de PCR obtido, foi purificado, para a retirada dos *Primers* e dos dNTPs e a permanência somente de DNA. Utilizou-se o *kit* de Purificação, WIZARD® SV GEL and PCR Clean-Up System (PROMEGA WI), que se baseia no sistema de

membrana de sílica com alta afinidade para as moléculas negativas, como são as de DNA. Este *kit* contém: solução de ligação de membrana, minicoluna SV, tubo para minicoluna, solução para lavar membrana e água livre de nuclease. Seguimos o protocolo recomendado pelo fabricante.

As amostras de DNA do PCR, purificadas, foram quantificadas por espectrofotometria (Gene Quant- Pharmacia Biotech, USA), nos comprimentos de onda 260 e 280nm.

3.1.4 Sequenciamento gênico

A técnica de sequenciamento gênico pelo método enzimático foi descrita por SANGER (1977) (79). Ela permite a identificação do sequenciamento de uma região gênica de interesse por meio da síntese de fitas de DNA *in vitro*. A reação de sequenciamento se baseia na utilização de produtos de PCR purificados, nucleotídeos, enzima DNA polimerase, solução tampão e dideoxynucleotídeos. Os dideoxynucleotídeos (ddATP, ddTTP, ddCTP e ddGTP) diferem dos nucleotídeos dATP, dTTP, dCTP, dGTP pela substituição do grupo hidroxila do carbono 3 por um hidrogênio. Assim, toda vez que um dideoxynucleotídeo é incorporado a uma fita de DNA em formação há parada do processo de síntese desse DNA por impossibilidade de ocorrer novas ligações fosfodiéster. Onde for incorporado um nucleotídeo, a síntese da fita de DNA prossegue. No entanto, ao ser incorporado um dideoxynucleotídeo, a síntese da fita de DNA é interrompida.

Os sequenciadores automáticos baseiam-se no princípio descrito por Sanger e utilizam iniciadores marcados de dideoxynucleotídeos ligados a moléculas fluorescentes de alta sensibilidade. Os produtos de PCR dos exons 10, 11, 13, 14, 15 e 16 foram

utilizados para a realização do sequenciamento genético. Utilizamos o Sequenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyser.

3.1.4.1 Preparação da reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento propriamente dita foi realizada para um volume final de 20 µl contendo: 2 µl de *Big dye*, 3 µl de tampão *save money*, 3,2 µl de solução inicial de iniciador senso ou antissenso a 1 pmol/µl, 4 µl do produto de PCR purificado, completando-se o volume final com água MilliQ.

A seguir procedeu-se à amplificação do material em termociclador PCT-100-Programmable Thermal Controller- MJ Research, USA. O programa de PCR utilizado foi:

- 1ª fase – temperatura de desnaturação: 98° C 10 minutos;
- 2ª fase – temperatura de desnaturação: 96° C 30 segundos;
- 3ª fase – temperatura de anelamento: 60° C 4 minutos;
- 4ª fase - 24 ciclos repetitivos partindo da 2ª até a 3ª fase amplificando exponencialmente o DNA molde;

Reação de precipitação com isopropanol/etanol

A precipitação consistiu nas seguintes etapas:

- A- Foram pipetados 80 µl de isopropanol a 75% e adicionados ao produto de PCR obtido da reação de sequenciamento acima.
- B- A solução foi homogeneizada, submetida a uma centrifugação e deixada à temperatura ambiente por, no mínimo, 20 minutos protegida da luz.

- C- O material foi então submetido à centrifugação (13.000 x G) por 25 minutos), a 25° C, seguido de remoção de todo o isopropanol.
- D- Foram adicionados 150 µl de etanol a 70% sendo o material centrifugado por 5 minutos a 13.000 x G. Após isto, todo o etanol foi removido.
- E- As amostras foram colocadas na máquina termocicladora por 2 minutos a 80° C.
- F- As amostras foram eluídas em uma solução denominada *template reagent supression* (TSR), que é uma solução desnaturante. A solução obtida foi homogeneizada e submetida a uma temperatura de 95°C por 5 minutos para desnaturação.

As amostras foram colocadas no sequenciador, que processou o sequenciamento das mesmas. Desta forma, o DNA foi aspirado do tubo *Eppendorf* por um sistema de condução elétrica (injeção eletrocinética) para um capilar que apresenta em seu interior um polímero (POP-6™ polymer – Applied Biosystems) que permite que as moléculas de DNA migrem ao longo do mesmo, quando submetidas a uma eletroforese. Quando o laser incide sobre as moléculas de rodaminas ligadas aos dideoxinucleotídeos elas emitem fluorescência, que é captada por um sistema de filtros. Como cada uma das rodaminas apresenta capacidade de emitir fluorescência em comprimentos de onda diferentes, o filtro virtual consegue diferenciá-las e determinar a cada um desses espectros uma coloração específica. Assim, o ddATP (R6G) será representado como verde, o ddCTP (ROX) como azul, o ddGTP (R110) como preto e ddTTP (TAMRA) como vermelho e são apresentados nestas mesmas cores no eletroferograma para identificação da sequência gênica analisada. Equipamentos utilizados nas etapas de PCR e amplificação gênica estão listados no Apêndice D.

3.2 Imunoistoquímica

A recuperação antigênica de materiais fixados em solução de formalina a 4% e processado para inclusão em parafina (técnica mais utilizada na rotina histológica) obtiveram um avanço considerável quando, em 1991, Shi SR e colaboradores (80) desenvolveram o método de recuperação antigênica (epítomos) com o uso de calor. Essa técnica é de grande utilidade na maioria dos anticorpos (4,81,82). Por se tratar de uma técnica de grande valor no estudo de neoplasias, decidiu-se pela sua utilização no estudo da expressão das isoformas da proteína RET no CMT.

Foram utilizados cortes histológicos de 4 µm dos tecidos fornecidos pelos pacientes (tireóide, linfonodo, paratireóide e suprarenal). Antes do estudo das isoformas da proteína RET nesses tecidos, certificou-se tratar do CMT, e optou-se pela marcação da calcitonina. Foi utilizado o anticorpo anticalcitonina (Mouse clone- CAL3-F5), conforme protocolo estabelecido. Para a compreensão da expressão das isoformas RET 9 e RET 51 foram utilizados os anticorpos citoplasmáticos carboxiterminais RET C-19, RET C-20 e Tyr 1062, todos da Santa Cruz Biotechnology (sc-167, sc-1290 e sc-2052R, respectivamente), conforme protocolos estabelecidos (Apêndice G). Foram usados os Kits Novolink^M Polymer Detection System, contendo o anticorpo pós-primário e o polímero, para o bloqueio da peroxidase endógena e a ligação no anticorpo, respectivamente. Para a visualização da expressão da isoforma, foram empregados o Dakocytomation Liquid DAB+Substrate Chromogen System da Biogen.

Os cortes foram analisados por patologista não conhecedor do sequenciamento do gene *RET*, tendo sido utilizado o microscópio óptico com aumento de 50 e 100 vezes. Foram analisados todos os campos de cada lâmina. Foram conferidos a eles graus de 1 a 4, conforme o número de células no campo impregnadas pelos anticorpos, da seguinte maneira:

Grau 1: 0 a 25% de células marcadas

Grau 2: 25% a 50% de células marcadas

Grau 3: 50% a 75% de células marcadas

Grau 4: 75% a 100% de células marcadas

O tecido normal circunjacente ao tecido neoplásico, do mesmo corte, foi utilizado como controle negativo na imunohistoquímica.

4. Resultados

4.1 Resultados Clínicos e Moleculares

Foram estudados 58 indivíduos, sendo 33 casos isolados de CMT e 25 familiares desses casos. Decidiu-se inicialmente pelo sequenciamento dos exons 10 e 11 dos casos isolados, já que esses exons são considerados os mais frequentemente alterados na MEN-2. Nos pacientes sem nenhuma mutação, estendeu-se o sequenciamento para os exons 13, 14, 15 e 16. Entretanto, em uma paciente foi observado o fenótipo MEN-2B. Dessa maneira, iniciou-se o sequenciamento pelo exon 16, já que nesse fenótipo, esse é o exon onde estão concentrados cerca de 100% das mutações.

Em oito casos isolados foi encontrada mutação, tendo sido esses, portanto, considerados casos familiares. Foram estudadas cinco dessas oito famílias e construídos os heredogramas (figura 3). Durante o estudo dessas famílias, foram encontrados dois outros indivíduos afetados pelo CMT (indivíduo II 3 da família 3 e indivíduo I 1 da família 4) (figura 3). Nos familiares dos casos isolados de CMT e mutação, foi sequenciado apenas o exon já sabidamente mutado.

Vinte e três casos isolados de CMT foram considerados esporádicos, já que não houve mutação nos exons estudados. Entretanto, em seis deles foi encontrado o SNP G691S (rs 1799939), onde se observa a troca do aminoácido glicina pelo aminoácido serina no códon 691 do exon 11. Em 16 pacientes com CMT esporádico foi encontrado o SNP L769L (rs 1800861), localizado no códon 769 do exon 13, onde não se observa a troca de aminoácidos (tabelas 4 e 5). Dos 23 pacientes com CMT esporádico, 17 apresentavam idade superior a 45 anos no momento do diagnóstico do CMT. (tabela 6).

Na família 1, identificou-se que apenas o caso isolado (II 2) era afetado pelo fenótipo MEN-2B. A mutação encontrada foi a M918T, com troca da metionina por treonina no códon 918 do exon 16 (tabela 6; figura 3 e apêndice E).

Na família 2, encontrou-se no caso isolado (II 2) o fenótipo FMTC, com a mutação L790F. Houve troca da por leucina por fenilalanina, no códon 790 do exon 13. Houve presença do SNP L769L. Os familiares (II 3, II 4 II 5 e III 1) não eram portadores da mutação L790F, mas apresentaram o SNP L769L, embora como descrito não havia troca de aminoácido (tabela 6; figura 3 e apêndice E).

Na família 3, o fenótipo FMTC esteve presente nos indivíduos II 2 e II 3, e a mutação encontrada foi a C609Y. Nessa mutação houve troca da cisteína pela tirosina, no códon 609 do exon 10. Os indivíduos III 1 e III 2, de seis e nove anos de idade respectivamente, eram portadores da mutação. Em todos os pacientes dessa família o SNP L769L foi observado (tabela 6; figura 3 e apêndice E).

Na família 4, foram estudados dez indivíduos das gerações I, II e III. Foi encontrado o fenótipo FMTC em 2 deles (I 1 e II 6), sendo que sua mutação foi a L790F. Os indivíduos II 4, III 3, III 4 e III 5 eram portadores dessa mutação. Foi observado que em todos os indivíduos dessa família com a mutação L790F, foi encontrado também o SNP A764A. Todos os indivíduos investigados, portadores ou não da mutação L790F, apresentaram o SNP L769L (tabela 6; figura 3 e apêndice E).

Na família 5, foi encontrado, no caso isolado (II 2) o fenótipo FMTC e a mutação C634Y, com troca da cisteína por tirosina, no codon 634 do exon 11. Nenhum familiar estudado (I 2, II 1, III 1 e III 2), era portador da mutação C634Y. Entretanto, no indivíduo III 1, com 5 anos de idade, foi encontrado o SNP L769L (tabela 6; figura 3 e apêndice E).

Em dois pacientes também considerados CMT familiar, dos quais não foram investigadas as famílias, foi observado o fenótipo FMTC, a mutação L790F, bem como os SNPs L769L e A764A.

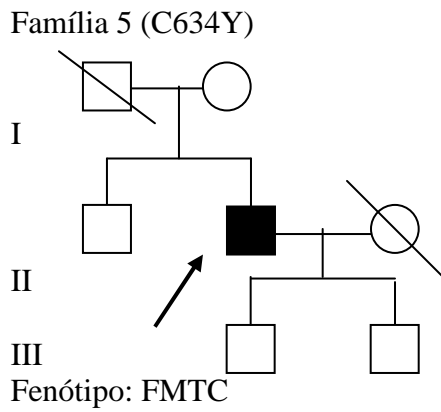
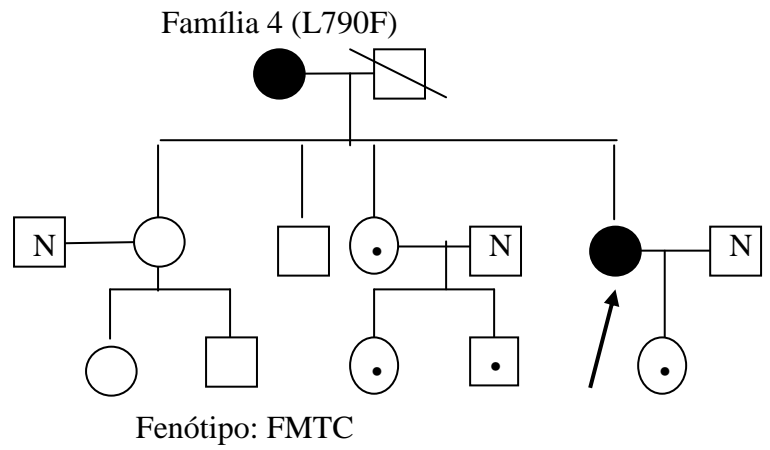
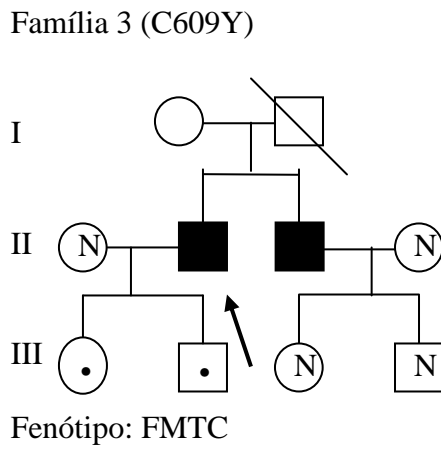
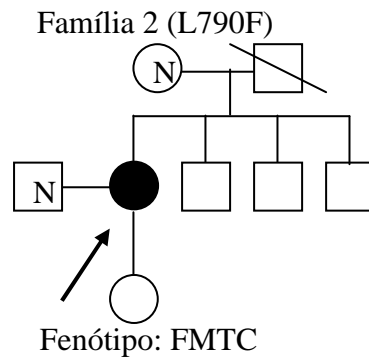
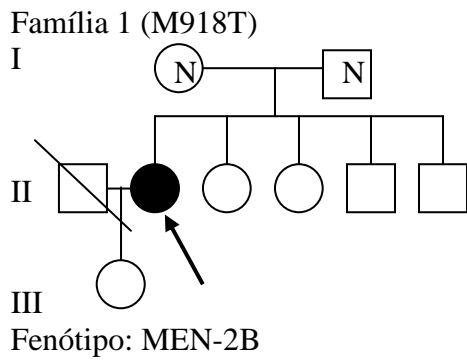


Figura 3: Heredograma das famílias com neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (MEN-2), (mutação encontrada) e fenótipo.

□ Normal

○ Portador

■ Afetado

□ N Não investigado

□ Falecido

↗ Caso isolado

FMTC: carcinoma medular da tireoide familiar

4.2 Resultado da expressão das isoformas RET 9, RET 51 e do resíduo Tyr Y 1062:

Foram estudadas a expressão das isoformas da proteína RET 9, RET 51 e do resíduo tirosina 1062 (Tyr Y1062) nos blocos de parafina obtidos do tratamento cirúrgico a que foram submetidos os pacientes. Foi utilizada a técnica da imunohistoquímica e conferiu-se 4 graus de resposta dessa expressão, variando de 1 a 4, onde 1 significa a menor expressão (0 a 25% das células marcadas) e 4 a maior (75% a 100% das células marcadas).

Foram obtidos blocos de parafina de 13 pacientes. Três pacientes não autorizaram a utilização de seu material para a investigação. Em quatro blocos foram estudados linfonodos acometidos por invasão do CMT e em dois blocos as suprarrenais. Não foi observada paratireoide no material investigado.

Foi realizada a correlação do fenótipo, genótipo e da expressão das isoformas da proteína RET 9, RET 51 e do resíduo Tyr Y1062, na tireoide, linfonodo e suprarrenal dos blocos obtidos (tabela 7 e apêndice G).

TABELA 4

Distribuição do sexo, da faixa etária de diagnóstico do carcinoma medular da tireóide e dos SNPs nos casos considerados esporádicos e nos considerados familiares

CMT	Sexo		Faixa etária (diagnóstico do CMT)		SNP		
	Feminino (%)	Masculino (%)	<45 anos (%)	>45anos (%)	G691S (%)	L769L (%)	A764A (%)
Casos esporádicos	18 (78)	5 (22)	6 (26)	17 (74)	6 (26)	16 (70)	0 (0)
Casos familiares	5 (50)	5 (50)	5 (50)	5 (50)	0 (0)	7 (70)	4 (17)

SNP: polimorfismo único dos nucleotídeos
 CMT: carcinoma medular da tireóide
 rs: número de referência da sequência do SNP

TABELA 5

Distribuição dos SNPs nos casos esporádicos e familiares e valor de significância

	SNP								
	G691S (%)	χ^2	<i>p</i>	L769L (%)	χ^2	<i>p</i>	A764A (%)	χ^2	<i>p</i>
Casos esporádicos	(26,1)	3,18	0,074	(69,6)	0,01	0,980	(0)	10,469	0,001
Casos familiares	(0)			(70)			(40)		

χ^2 : teste do qui-quadrado
p: p-valor ($p < 0.05$)

TABELA 6

Fenótipo, idade do indivíduo afetado, idade do indivíduo portador, genótipo e SNP encontrados nas cinco famílias com neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (MEN-2)

Família	Fenótipo	Indivíduo afetado (idade anos)	Indivíduo portador (idade anos)	Genótipo (exon)	SNP (rs)
1	MEN-2B	II 2 (36)	Inexistência de portador	M918T (16)	Não encontrado
2	FMTC	II 2 (55)	Inexistência de portador	L790F (13)	L769L (1800861)
3	FMTC	II 2 (40) II 3 (45)	III 1 (6) III 2 (9)	C609Y (10)	L769L (1800861)
4	FMTC	I 1 (73) II 6 (40)	II 4 (38) III 3 (17) III 4 (22) III 5 (10)	L790F (13)	L769L (1800861) A764A
5	FMTC	II 2 (38)	Inexistência de portador	C634Y (11)	L769L (1800861)

FMTC: carcinoma medular familiar da tireoide

SNP: polimorfismo único dos nucleotídeos

TABELA 7

Correlação fenótipo, genótipo e expressão das isoformas da proteína RET 9, RET 51 e resíduo Tyr Y1062 na tireoide, linfonodo e suprarenal em blocos de parafina obtidos do tratamento cirúrgico dos pacientes com carcinoma medular da tireoide esporádico (CMT) e nos pacientes com neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (MEN-2A, MEN-2B e FMTC)

Paciente	Fenótipo	Genótipo	RET 9 Grau (1 a 4)	RET 51 Grau (1 a 4)	TyrY1062 Grau (1 a 4)	Local (tecido)
1	CMT	s/mut.	4	1	2	linfonodo
2	MEN-2A	C634Y	4 4 4	2 1 1	3 3 4	tireoide linfonodo suprarenal
3	CMT	s/mut.	4	2	2	tireoide
4	CMT	s/mut.	4 4	2 2	3 3	tireoide linfonodo
5	CMT	s/mut.	4	2	1	linfonodo
6	CMT	s/mut.	4	2	1	tireoide
7	CMT	s/mut.	4	2	2	tireoide
8	MEN-2B	M918T	4 4	3 2	2 4	linfonodo suprarenal
9	CMT	s/mut.	4 4	3 3	3 2	tireoide linfonodo
10	CMT	s/mut.	4	1	2	tireoide
11	CMT	s/mut	4	2	2	tireoide
12	CMT	s/mut.	4	1	2	tireoide
13	FMTC	L790F	4	1	2	tireoide

s/mut. : ausência de mutação nos exons (10, 11, 13, 14, 15 e 16)

FMTC: carcinoma medular familiar da tireoide

SNP: polimorfismo único dos nucleotídeos

Grau 1: 0 a 25% das células marcadas

Grau 2: 25% a 50% das células marcadas

Grau 3: 50% a 75% das células marcadas

Grau 4: 75% a 100% das células marcadas

5. Discussão

Assim como é descrito na literatura, nos 33 pacientes com CMT isolados, optou-se pelo sequenciamento do gene *RET* para o esclarecimento de tratar-se ou não de CMT familiar (29,30).

Nos pacientes com CMT e mutação decidiu-se pelo rastreamento familiar na busca de indivíduos em risco de desenvolver o CMT, já que o diagnóstico molecular é mais precoce do que a dosagem da calcitonina na identificação do CMT. (20,30,33). Nos familiares onde foi encontrada mutação, foi recomendado tireoidectomia profilática, seguindo os critérios internacionais de grau de grau de risco do CMT para a mutação encontrada (32). Entretanto, houve dificuldade de aceitação dessa opção terapêutica por parte dos pais dos indivíduos portadores com idade inferior a dez anos, o que dificultou o aconselhamento genético. Os familiares que não apresentaram mutação foram tranquilizados e orientados para o risco de desenvolvimento do CMT semelhante ao risco da população geral (6,10,30). As famílias dos dois casos de CMT onde foram encontradas mutações deverão ser investigadas.

O sequenciamento do gene *RET* nos casos de CMT esporádicos e nos casos de CMT familiares, bem como nos parentes desses, permitiu o encontro de SNPs, cujas importâncias funcionais no CMT têm sido discordantes (68,69,70,71,72,73).

A explicação do papel do SNP G691S (exon 11), encontrado em seis pacientes, parece ser a ação cooperativa e aditiva na dimerização da proteína RET, quando da sua presença em concomitância com uma mutação extracelular do resíduo rico em cisteína no receptor (68). Outra hipótese seria a troca da glicina por serina no códon 691 originando um novo sítio susceptível de fosforilação da proteína, podendo contribuir para o efeito de sinalização celular (64,68). Entretanto, em todos os pacientes

investigados em que esse SNP foi encontrado, não houve nenhuma mutação nos exons 10,11,13,14,15 e 16. Tem sido também verificado que os SNPS levam à produção de diferentes quantidades de RNAm, com diferentes propriedades, o que ocasiona modificações em sítios de *splicing* (71,74).

Encontrou-se a presença do SNP A764A, ainda não relatado na literatura. Observou-se significância estatística desse SNP nos casos familiares de CMT, se comparados com os casos esporádicos. Além disso, a sua presença esteve condicionada à presença da mutação L790F. Dessa maneira, acredita-se que o SNP A764A possa estar envolvido na gênese do CMT familiar. Entretanto, novas investigações devem ser feitas na tentativa de esclarecer o seu papel funcional no CMT.

Na tentativa de compreensão da variabilidade fenotípica e genotípica na MEN-2, optou-se pelo estudo da proteína RET, com o uso da imunistoquímica em tecido embebido na parafina, obtido do tratamento cirúrgico a que foram submetidos os pacientes.

A imunistoquímica tornou-se um método auxiliar de diagnóstico de extrema importância e utilidade. A técnica da imunistoquímica por envolver fatores variados (uma grande gama de anticorpos com origens variadas, utilizados sob condições não uniformemente estabelecidas e em uma variedade de situações), embora seja uma ferramenta de grande valor, ainda mostra áreas com problemas não solucionados (80).

A sensibilidade e a especificidade em procedimentos de imunistoquímica têm aspectos próprios. A sensibilidade é a capacidade do teste em produzir o resultado desejado e há dois componentes a serem avaliados: no anticorpo a identificação da percentagem de resultados positivos verdadeiros e no método o mínimo detectável de antígeno na lâmina. A especificidade é afetada por duas variáveis: fixação e

processamento do tecido e a metodologia usada (clone dos anticorpos e sistema de detecção). A fixação dos tecidos nos laboratórios de patologia não é uniformizada; dessa forma, os tecidos estão ou fixados em excesso ou pouco fixados. A fixação em excesso não traz problemas mais sérios para a realização da técnica de imunistoquímica, já a fixação reduzida, é extremamente deletéria para esse tipo de exame, pois pode ocorrer autólise tecidual, com perda da antigenicidade (falsos negativos). Um outro processo no preparo do tecido que interfere com alguns dos anticorpos utilizados é a descalcificação, e os efeitos são variados, devendo-se evitar a descalcificação prolongada e o uso de ácidos muito fortes (81).

Os limiares de positividade para imunistoquímica podem ser definidos como: negativo; positividade focal (0 a 25%); positividade variável (25% a 75%) e uniformemente positiva (mais de 75%). Uma reação positiva verdadeira mostra deposição do cromógeno em células ou estruturas que contem o antígeno de interesse. Já em uma reação falso-positiva há deposição do cromógeno em estruturas que não deveriam conter o antígeno (células tumorais positivas e estroma intercelular). Alguns dos motivos para essa falsa positividade são: peroxidase endógena; biotina endógena (presente em concentrações altas no fígado e rim); concentração inadequada (alta) do anticorpo e identificação equivocada de pigmentos (melanina; hemossiderina) como positividade do anticorpo (81). Os anticorpos têm sua expressão em locais específicos da célula, tais como: citoplasma (citoqueratinas); núcleo e citoplasma (proteína S100); núcleo (receptor de estrógeno); membrana citoplasmática (CD20); membrana e Golgi (CD30); membrana com localização apical (vilina) e marcação extracelular (colágeno tipo IV). Essas diferenças relacionam-se aos aspectos da célula em questão: produção, transporte e adesão celular.

Dessa forma, pode-se inferir que a técnica da imunohistoquímica é um auxiliar indispensável no diagnóstico patológico em muitas situações, especialmente no caso de neoplasias. Porém, devido às múltiplas variáveis envolvidas, deve ser utilizada com prudência e sempre dentro de um contexto completo de informações, preferencialmente em certos casos, com o auxílio de outras técnicas complementares de diagnóstico (80).

Constatou-se que, entre as isoformas investigadas, a isoforma RET 9 foi a que apresentou a maior expressão na tireoide, linfonodo e suprarenal. Essa expressão foi semelhante à expressão da calcitonina, que é o hormônio produzido pelas células C parafoliculares marcador do CMT (7,8). Por isso, acredita-se que essa isoforma possa vir a ser um instrumento auxiliar à calcitonina nos casos de CMT.

Entretanto, acredita-se que, para que se estabeleça a correlação entre o fenótipo, o genótipo e a expressão das isoformas da proteína RET 9, RET 51 e do resíduo Tyr 1062, é necessário a inclusão de maior número de pacientes com CMT, o que permitirá maior aquisição de tecidos parafinizados acometidos por essa enfermidade.

Há o interesse de que se possa trabalhar de maneira integralizada com os pesquisadores brasileiros, para que seja criado o banco de dados nacional de pacientes com NEM-2, o que permitirá conhecer com profundidade a doença nessa população. Até o momento, não foi encontrado estudo semelhante na literatura. Entende-se que esses fatos contribuem para o maior entendimento dos mecanismos clínicos e moleculares presentes no CMT esporádico e no CMT familiar (MEN-2).

6. Conclusões

1. A partir do sequenciamento do gene *RET* nos pacientes com CMT, foi possível classificar os indivíduos em CMT esporádico e familiar (MEN-2) e estabelecer o aconselhamento genético.
2. Por meio do sequenciamento do gene *RET* foi possível estabelecer a probabilidade genética do CMT nos familiares
3. Foram identificadas cinco famílias com MEN-2 no estado de Minas Gerais, o que permitiu a criação do banco de dados mineiro. O fenótipo mais prevalente foi o FMTC e a mutação observada foi a L790F.
4. O número reduzido de pacientes com MEN-2 dos quais se obteve material parafinizado, não permitiu a interpretação da correlação entre o fenótipo, o genótipo e a expressão das isoformas RET 9, RET 51 e resíduo Tyr Y1062.

7. Referências bibliográficas

1. Raue F, Frank-Raue, K. Update multiple endocrine neoplasia type 2. *Fam Cancer*. 2010 Jan 20. [Epub ahead of print].
2. Schimke RN. Genetic aspects of multiple endocrine neoplasia. *Annu. Rev. Med.* 1984;35:25-31.
3. Camacho CP, Hoff AO, Lindsey SC, Signorini PS, Valente FO, Oliveira MN, et al. Multiple Endocrine Neoplasia Type 2B. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 2008;52(8):1393-8.
4. Saad RK, Ordonez NG, Rashid RK, Guido JJ, Hill Jr CS, Hickey RC Et Al. Medullary carcinoma of the thyroid: a study of the clinical features and prognostic factors in 161 patients. *Medicine*. 1984;63(6):319-42.
5. 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. *JAMA*. 1996;276(19):1575-79.
6. Mulligan LM, Marsh DJ, Robinson BG, Schuffenecker I, Zedenius J, Lips CJ et al. Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2: report of the International RET Mutation Consortium. *J. Intern. Med.* 1995;238, (4):343-46.
7. Williams ED. Histogenesis of the medullary carcinoma of the thyroid. *J. Clin. Pathol.* 1966;19:114-18.
8. Tashjian AHJr, Melvin KEW. Medullary carcinoma of the thyroid studies of thyrocalcitonin in plasma and tumor extracts. *N Eng J Med*. 1968; 279(6):279-83.
9. Melvin KEW, Miller HH, Tashjian AH. Early diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland by means of calcitonin assay. *N Engl J Med*. 1971; 285: 1115-20.
10. Wells Jr. SA, Ontjes DA, Cooper CW. et al. The early diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland in patients with multiple endocrine neoplasia type II. *Ann. Surg.* 1975;182:362-70.
11. Sizemore GW, Carney JA, Heath III H. Epidemiology of medullary carcinoma of the thyroid: A 5-year experience. *Surg. Clin. Nort. Am.* 1977;57(4):633-45.
12. Andreas, M.; Niccoli-SirE, P.; Josef, H. et al. Early malignant of hereditary medullary thyroid cancer. *N. Engl. J Med*. 2003;349(16):1517-25.
13. Ashworth, M. The pathology of preclinical medullary thyroid carcinoma. *Endoc Pathol.* 2004;15(3): 227-31.

14. Nocera M, Baudin E, Pellegriti G, Cailleux AF. et al. Treatment of advanced medullary thyroid cancer with an alternating combination of doxorubicin-streptozocin and 5 FU-dacarbazine. *Br J Cancer*. 2000;83:715-18.
15. Wu LT, Averbuch SD, Ball DW, De Bustros A, Baylin SB. et al. Treatment of advanced medullary carcinoma with a combination of cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine. *Cancer*. 1994;73:432-36.
16. Heshmati HM, GhariB H, Van Heerden JA, Sizemore GW. Advances and controversies in the diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma. *Am J Med*.1997;1031:60-9.
17. Machens A, Gimm O, Hinze R, Hoppner W, Boehm BO, Dralle H. Genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid carcinoma: oncological features and biochemical properties. *J. Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(3):1104-9.
18. Ponder BAJ, Ponder MA, Coffey R. et al. Risk estimation and screening in families of patients with medullary thyroid carcinoma. *Lancet*. 1988;1:397-401.
19. Easton DF, Ponder MA, Cumming T, GageL RF, Hansen HH, Reichlin S. et al. The clinical and screning age-at-onset distribution for MEN-2 syndrome. *Am J Hum Genet* 1989;44:2:208-15.
20. Niccoli-Sire P, Murat A, Baudin. E. et al. Early or prophylactic thyroidectomy in MEN 2/FMTC gene carriers: results in 71 thyroidectomized patients. *Eur J End*. 1999;141:468-474.
21. Stjernholm MR, Freudembourg JC, Mooney HS, Kinney FJ, Deftos LJ. Medullary carcinoma of the thyroid before age 2 years. *J Clin Endocrinol Metab*. 1980;51(2):252-53.
22. Gagel RF, Tashjian Jr AH, Cummings T. et al. The clinical outcome of prospective screening for multiple endocrine neoplasia type 2a: an 18-year experience. *N. Engl J Med*. 1988;318:478-84.
23. Niccoli P, Wion-Barbot N, Caron P. et al. Interest of routine measurement of serum calcitonin study in a large series of thyroidectomized patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:338-41.
24. Vierhapper H, Raber W, Bieglmayer C. et al. Routine measurement of plasm calcitonin in nodular thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:1589-93.
25. GraueR A, Raue F, Ziegler R. Clinical usefulness of a new chemiluminescent two-site immunoassay for human calcitonin. *Exp Clin Endocrinol Diab*. 1998;106:353-59.

26. Donis-Keller H, Dou S, Chi D. et al. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet.* 1993;2:851-56.
27. Mulligan LM, Kwok JBJ, 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.
28. Asai N, Iwashita T, Matsuyama M, Takahashi M. Mecanism of activation of the ret proto-oncogene by multiple endocrine neoplasia 2A mutations. *Mol Cell Biol.* 1995;15(3):1613-19.
29. Wells Jr SA, chi DD, Toshima K, Dehner LP, coffin CM, Downton SB. et al. Predictive DNA testing and prophylactic thyroidectomy in patients at risk for multiple endocrine neoplasia Type 2A. *Ann Surg.* 1994;220(3):237-50.
30. Learoyd DL, Marsh DJ, Richardson AL, Twigg SM, Delbridge L, Robinson BG. Genetic testing for familial cancer: consequences of RET proto-oncogene mutation analysis in multiple endocrine neoplasia, type 2. *Arch Surg.* 1997;132(9):1022-25.
31. Komminoth P, Kunz EK, Matias-Guiu X, Hiort O, Christiansen G, Colomer A. et al. Analysis of RET protooncogene point mutations distinguishes heritable from nonheritable medullary thyroid carcinomas. *Cancer.* 1995;76(3):479-89.
32. Brandi ML, Gagel RF,Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, bordi C. et al. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(12):5658-71.
33. Wells Jr. SA, Chi DD, Toshima K, Dehner LP, Coffin CM, Downton SB. et al. Predictive DNA testing and prophylactic thyroidectomy in patients at risk for multiple endocrine neoplasia Type 2A. *Ann Surg.* 1994;220(3):237-50.
34. Cohen MS, Moley JF. Surgical treatment of medullary carcinoma. *J Inter Med.* 2003;253:616-626.
35. MASSOL N, MAZZAFERRI EL. Diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma. *Clin Lab Med.* 2004;24(1):49-83.
36. Lairmore TC, Ball DW, Baylin SB, Wells Jr, SA. management of pheochromocitomas in patients with multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes. *Ann. Surg.* 1993;217:595-601.
37. Evans DB, Lee JE, Merrelli RC, Hickey RC. Adrenal medullary disease in multiple endocrine neoplasia type 2A. Appropriate management. *End Metab Clin North.* 1194;23:167-176.

38. Frank-Raue K, Kratt T, Höppner W, Buhr H, Ziegler R, Raue F. Diagnosis and management of pheochromocytomas in patients with multiple endocrine neoplasia type 2: relevance of specific mutations in the RET proto-oncogene. *Eur J Endocrinol.* 1196;135:222-225.
39. Machens A, Gimm O, Hinze R, Hoppner W, Boehm BO, Dralle H. Genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid carcinoma: oncological features and biochemical properties. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(3):1104-09.
40. Casanova S, Rosenberg-Bourgin M, Farkas D. et al. Pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2A: survey of 100 cases. *Clin Endocrinol.* 1993;38:531-535.
41. Correia MJ, Lopes LO, Bugalho, MJ. et al. Feocromocitoma na âmbito da neoplasia endócrina múltipla familiar do tipo 2A. Estudo de uma família. *Rev. Port. Cardiol.* 2000;19(1):11-31.
42. Ponder BA. The phenotypes associated with RET mutations in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes. *Cancer Res.* 1999;59:1736-1742.
43. O'Riordain DS, O'Brien T, Grant CS. et al. Surgical management of primary hyperparathyroidism in multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Surgery.* 1993; 114:1031-37.
44. Raue F, Kraimps JL, Dralle H. et al. Primary hyperparathyroidism in multiple endocrine neoplasia type 2A. *J. Intern.Med.* 1995;238:369-73.
45. Lips CJM, Höppener JoWM, Thijssen JHH. Medullary thyroid carcinoma: role of genetic testing and calcitonin measurement. *Ann Clin Biochem.* 2001;38:168-179.
46. Mulligan LM, Eng C, Healey CS. et al. Specific mutations of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC. *Nature Genet.* 1994;6:70-74.
47. Fitze G. Management of patients with hereditary medullary thyroid carcinoma. *Eur. J. Pediatr. Surg.* 2004;14(6):375-83.
48. Puñales MK, Rocha AP, Gross JL, Maia AL. Carcinoma medular de tireóide: aspectos moleculares, clínico-oncológicos e terapêuticos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004;48(1):137-46.
49. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell.* 1985;42(2):581-88.

50. Mathew CGP, Chin KS, Easton DF, Thorpe K, Carter C, Liou GI et al. A linked genetic marker for multiple endocrine neoplasia type 2A on chromosome 10. *Nature*. 1987;328(6130):527-528.
51. Simpson NE, Kidd KK, Goodfellow PJ, Mcdermid H, Myers S, Kidd JR. et al. Assignment of multiple endocrine neoplasia type 2A to chromosome 10 by linkage. *Nature*. 1987;328(6130):528-530.
52. Ishizaka Y, Tahira T, Ikeda I. Et al. Human *ret* proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. *Oncogene*. 1989;4:1519-21.
53. Takahashi M, Buma Y, Iwamoto T, Inaguma Y. Cloning and expression of the RET proto-oncogene encoding a tyrosine-kinase with two potential transmembrane domain. *Oncogene*. 1988;3:571-76.
54. Durbec P, Marcos Gutierrez CV, Kikenny C. et al. GDNF signalling through the RET receptor tyrosine kinase. *Nature*. 1996;381:789-92.
55. Takahashi, M. The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. *Cytok Growth Fact Rev*. 2001;12:361-373.
56. Santoro M, Carlomagno F, Melillo RM, Billaud M, Vecchio G, Fusco A. Molecular mechanisms of RET activation in human neoplasia. *J Endocrinol Invest*. 1999;22:811-19.
57. Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Fusco A, Vecchio G. Molecular mechanism of RET activation in human cancer. *Ann N Y Acad. Scie*. 2002; 116-121.
58. Srinivas S, Wu Z, Chen CM, D'agati V, Costantini F. Dominant effects of RET receptor misexpression and ligand-independent RET signaling in ureteric bud development. *Development*. 1996;126(7):1375-1386.
59. Asai N, Murakami H, Iwashita T, Takahashi M. A mutation at tyrosine 1062 in MEN2A-Ret and MEN2B-Ret impairs their transforming activity and association with Shc adaptor proteins. *J Biol Chem*. 1996;271(30):17644-49.
60. Hayashi H, Ichihara M, Iwashita T, Murakami H, Shimono Y, Kawai K, et al. Characterization of intracellular signals via tyrosine 1062 in RET activated by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Oncogene*. 2000;19(39):4469-75.
61. Kurokawa K, Kawai K, Hashimoto M, Ito Y, Takahashi M. Cell signaling and gene expression mediated by RET tyrosine kinase. *J Int Med*. 2003;253(6):627-33.
62. Ishiguro Y, Iwashita T, Murakami H, Asai N, Iida K, Goto H., et al. The role of amino acids surrounding tyrosine 1062 in Ret in specific binding of the Shc phosphotyrosine-binding domain. *Endocrinol*. 1999;140(9):3992-98.

63. Bongarzone I, Vigano E, Alberti L, Borrello MG, Pasini B, Greco A, Mondellini P, Smith DP, Ponder BA, Romeo G, Pierotti MA. Full activation of MEN2B mutant RET by an additional MEN2A mutation or by ligand GDNF stimulation *Oncogene*. 1998;16(18):2295-95-301.
64. Bocciardi R, Mograbi B, Pasini B, Borrello MG, Pierotti MA, Bourget I, Fischer S, Romeo G, Rossi B. *Oncogene*. 1997;15(19): 2257-65.
65. Lorenzo MJ, Eng C, Mulligan LM, Stonehouse TJ, Healey CS, Ponder BA, et al. Multiple mRNA isoforms of the human RET proto-oncogene generated by alternate splicing. *Oncogene*., 1995;10(7):1377-83.
66. Heanue TA, Pachnis V., Ret isoform function and marker gene expression in the enteric nervous system is conserved across diverse vertebrate species *Mech Dev*. 2008;125(8):687-99.
67. Miranda ER, De Marco L, Soares MM. Splicing variants impact in thyroid normal physiology and pathological conditions *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009; 53 (6):709-15.
68. Robledo M; Gil L; Pollan M; Cebrian A; Ruiz S; Azanedo M; Benitez J; Menarguez J; Rojas JM. Polymorphisms G691S=S904S of RET as genetic modifiers of MEN 2A. *Cancer Res*. 2003;63:1814–17.
69. Gimm O, Neuberger DS, Marsh DJ, Dahia PL, Hoang-Vu C, Raue F, Hinze R, Dralle H, Eng C. Over-representation of a germline RET sequence variant in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma and somatic RET codon 918 mutation. *Oncogene*. 1999;18:1369–73.
70. Bounacer A, Du Villard JA, Wicker R, Caillou B, Schlumberger M, Sarasin A, Suarez HG. Association of RET codon 691 polymorphism in radiation-induced human thyroid tumours with C-cell hyperplasia in peritumoural tissue. *Br J Cancer*. 2002;86:1929–36.
71. Leviev I., Negro F, James R. W. Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA. An explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 1997;17:2935–39.
72. Tamanaha R, Camacho CP, Pereira AC, da Silva AM, Maciel RM, Cerutti JM. Evaluation of *RET* polymorphisms in a six-generation family with G533C *RET* mutation: specific *RET* variants may modulate age at onset and clinical presentation. *Clin Endocrinol*. 2009;71(1):56-64.
73. Weinhaeusel A, Scheuba C, Lauss M, Kriegner A, Kaserer K, Vierlinger K, Haas OA, Niederle B. The influence of gender, age, and RET polymorphisms on C-cell hyperplasia and medullary thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2008;18(12):1269-76.

74. SHEN LX, BASILION JP, STANTON, VP Jr. Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999;96:7871-76.
75. Chong GC, Beaven MA, Sizemore GW et al. Medullary carcinoma of the thyroid gland. *Cancer.* 1975;35:695-704.
76. Da Silva AM, Maciel RM, Da Silva MR, Toledo SR, De Carvalho MB, Cerutti JM. A novel germ-line point mutation in RET exon 8 (Gly(533)Cys) in a large kindred with familial medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(11):5438-43
77. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
78. Mullis KB, Faloona F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
79. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. acad. Sci.* 1977;74(12):5463-67.
80. Shi SR, Key MC, Kalra KL. Antigen Retrieval in Foormalin-fixed, Paraffin-embedded Tissues: An Enhancement Method for Immunohistochemical Staining Based on Microwave Oven Heating Tissues. *J Histochem Cytochem.* 1991;39(6): 741-48
81. Barra MB. O uso da imunoistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. *Revista da AMRIGS.* 2006;50(2):173-84.
82. Gown AM, Bacchi CE. United States and Canadian Academy of Pathology. Educational Materials, 2005. Short Courses. Diagnostic Immunohistochemistry of Solid Tumors. [http// www.uscap.org](http://www.uscap.org)
83. SUSTER S, MORAN CA, WICK editores. *Seminars in Diagnóstico Pathology.* Immunohistochem Tumor Diagn. 2000;17(3):169-256.

Apêndice A – Termos de Consentimentos**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO**

A neoplasia endócrina múltipla tipo 2 é uma doença que atinge várias pessoas de uma mesma família (transmissão genética), onde as pessoas podem apresentar o câncer da tireóide (glândula localizada no pescoço), a doença das glândulas adrenais (localizadas acima dos rins), conhecida como feocromocitoma. Este se apresenta pelo aparecimento de aumento da pressão arterial, disparo do coração e rosto vermelho, e pela doença das glândulas paratireóides (localizadas próximo à tireóide), conhecida como hiperparatireoidismo (tendências à formação de pedras nos rins). Há 12 anos descobriu-se que existem mutações no cromossoma 10 (mutações genéticas são alterações que podem existir em regiões que controlam o funcionamento das suas células - pequenas partes do corpo). Estas mutações levam à produção de proteínas. Proteínas são substâncias que fazem parte de nosso corpo e que alteram as células da glândula tireóide, as células da glândula adrenal e as da glândula paratireóide. Existem dois tipos diferentes destas proteínas que são conhecidas como proteína RET 9 e proteína RET 51.

O objetivo de nosso estudo é identificar e quantificar estas proteínas na tireóide, na adrenal e na paratireóide que foi retirada durante seu tratamento cirúrgico para estas doenças, em você que já foi considerado pelo seu médico assistente como pertencer a uma família com neoplasia endócrina múltipla. Para isso, necessitaremos de que você nos mande o bloco de parafina (maneira em que foi guardado o material da cirurgia) que se encontra no hospital onde você foi operado. Utilizaremos somente parte deste material, o que não inutilizará a peça operatória, sendo o restante devolvido ao hospital de origem. Também faremos a quantificação dos RNA mensageiros em células do sangue (RNA mensageiros

são substâncias presentes nas células do nosso sangue que controlam a formação das proteínas RET). Para isso, necessitaremos da amostra de 05ml de sangue colhido em uma veia.

Este estudo não modificará o resultado que você recebeu na cirurgia, mas nos ajudará a entender mais adequadamente o que aconteceu nas suas glândulas tireóide, adrenal e paratireóide. Isso nos permitirá orientar seu médico sobre as doenças presentes (câncer da tireóide, feocromocitoma e hiperparatireoidismo).

Procedimentos:

Para a realização do estudo é importante que você nos envie o material resultante da sua cirurgia para o tratamento das manifestações da sua doença (peça operatória em bloco de parafina). Este material se encontra no hospital onde você operou. Também necessitaremos colher 05ml de sangue em uma de suas veias.

Riscos e desconfortos:

Este procedimento não apresenta nenhum risco ou desconforto para você. Você será instruído por nós pesquisadores sobre a maneira correta e o local para onde deverá enviar a sua peça operatória. Esta peça não ficará inutilizada pois, usaremos apenas parte dela.

Também será orientado sobre a coleta de 05ml de sangue em uma de suas veias.

Benefícios:

O conhecimento das proteínas RET na sua peça operatória e sangue poderá nos fazer entender com mais detalhes o que aconteceu nas suas glândulas (tireóide, adrenal e paratireóide). Assim, poderemos orientar mais adequadamente seu médico sobre a sua doença. Essas doenças podem ser graves e até levar à morte se seu tratamento demorar a acontecer.

Participação Voluntária:

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. E sem gastos para você. Você pode desistir de participar a qualquer momento. Caso você queira retirar-se do estudo, isto não trará prejuízo à continuação de seu cuidado e tratamento.

Você pode perguntar à investigadora principal ou à sua aluna de doutorado mencionadas abaixo qualquer questão relacionada ao estudo. As pesquisadoras se comprometem a proporcionar-lhe informação atualizada. Se você ainda quiser saber sobre os aspectos éticos dessa pesquisa, você pode entrar em contato com a Comissão de Ética (CEP) da UFMG pelo telefone (31)34994592.

Confidencialidade:

Toda informação obtida sobre você será mantida em poder da pesquisadora principal e sua aluna de doutorado. Apenas pessoas envolvidas neste estudo terão acesso a estas informações. Dados de identificação pessoal serão removidos das fichas, relativas ao estudo, e guardadas em arquivo separado. Dentro dos limites da lei, todo esforço será feito no sentido de manter a confidencialidade das informações.

Eu, _____, portador da carteira de identidade de número _____, emitida pela _____, ou meu representante legal _____ declaro que fui informado (a), de maneira clara, dos objetivos da pesquisa intitulada “Estudo de famílias mineiras com neoplasia endócrina múltipla tipo 2A, tipo 2B e carcinoma medular familiar: Correlação genótipo, fenótipo e isoformas da proteína RET (RET 9 e RET 51)”, que será realizado no Laboratório de Neurociência da Faculdade de Medicina da UFMG e no Hospital Felício Rocho.

Declaro que estou ciente e concordo com o envio da minha peça operatória e a retirada de 05ml de sangue em uma veia, não havendo danos para a minha pessoa. Informo ainda que, a qualquer momento, poderei decidir não mais participar desse estudo.

a) _____ c) _____

(Paciente)

Profa. Maria Marta Sarquis Soares

Pesquisadora principal -CRM-MG- 23530

Telefone: (31) 3295-5206

Dra. Elizabete Rosária de Miranda

Doutoranda-CRM-MG- 23622

Telefone: 99568946

b) _____ d) Médico Assistente _____


(Responsável legal)

Belo Horizonte, _____ de _____ de 200_____

Apêndice B

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

Ret (C-19): sc-167



BACKGROUND

The Ret proto-oncogene is structurally related to the growing family of tyrosine kinase transmembrane receptors and is involved in GDNF signaling. By alternative splicing, two isoforms of the Ret proto-oncogene product are generated. The isoforms differ from each other by having either 9 or 51 carboxy terminal amino acids. The Ret gene products include two glycosylated proteins in tunicamycin treated cells, a non-glycosylated protein consistent with the predicted Ret molecular weight based on sequence analysis. Tumor-specific rearrangements of the Ret proto-oncogene have been identified in papillary thyroid carcinomas leading to the formation of different transforming fusion proteins sharing the tyrosine kinase domain of Ret. In contrast to the Ret proto-oncogene, the rearranged forms are constitutively phosphorylated on tyrosine and are translocated from the membrane to the cytoplasm.

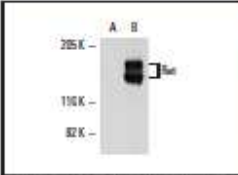
RESEARCH USE

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

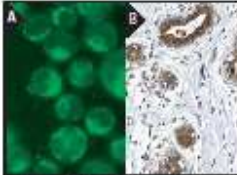
CHROMOSOMAL LOCATION

Genetic locus: RET (human) mapping to 10q11.2; Ret (mouse) mapping to 6 F1.

DATA



Ret (C-19): sc-167-G. Western blot analysis of Ret expression in Ret isoform A (A) and Ret isoform C (B) transfected MH213 cells.



Ret (C-19): sc-167. Immunofluorescence staining of methanol fixed K-562 cells showing membrane localization (A) and immunoprecipitation staining of formalin fixed, paraffin-embedded human breast tissue showing cytoplasmic staining of glandular cells (B). Kindly provided by The Swedish Human Protein Atlas (SHPA) program.

SOURCE

Ret (C-19) is available as either rabbit (sc-167) or goat (sc-167-G) polyclonal affinity purified antibody raised against a peptide mapping at the C-terminus of Ret isoform C of human origin.

SELECT PRODUCT CITATIONS

- Jing, S., et al. 1996. GDNF-induced activation of the Ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR- α , a novel receptor for GDNF. *Cell* 85: 1113-1124.
- Trupp, M., et al. 1996. Functional receptor for GDNF encoded by the c-Ret proto-oncogene. *Nature* 381: 785-789.
- Durbec, P., et al. 1996. GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 381: 789-793.
- LaPerle, K., et al. 2000. Loss of p53 promotes anaplasia and local invasion in Ret/PTC1-induced thyroid carcinomas. *Am. J. Pathol.* 157: 671-677.
- Mograb, B., et al. 2001. The sensitivity of activated Cys Ret mutants to glial cell line-derived neurotrophic factor is mandatory to rescue neuro-ectodermic cells from apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 21: 6719-6730.
- Ludwig, L., et al. 2003. Grap-2, a novel Ret binding protein, is involved in Ret mitogenic signaling. *Oncogene* 22: 5362-5366.
- Diensthuber, M., et al. 2004. Coexpression of transforming growth factor- β 1 and glial cell line-derived neurotrophic factor in vestibular schwannoma. *Otol. Neurotol.* 25: 358-365.
- Tufro, A., et al. 2007. Crosstalk between VEGF-A/VEGFR2 and GDNF/RET signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358: 410-416.
- Donatello, S., et al. 2007. SH2-B1 β adaptor is a key enhancer of RET tyrosine kinase signaling. *Oncogene* 26: 6546-6559.

PRODUCT

Each vial contains 200 μ g IgG in 1.0 ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin.

Blocking peptide available for competition studies, sc-167 P, (100 μ g peptide in 0.5 ml PBS containing < 0.1% sodium azide and 0.2% BSA).

Available as agarose conjugate for immunoprecipitation, sc-167 AC, 500 μ g/0.25 ml agarose in 1 ml.

APPLICATIONS

Ret (C-19) is recommended for detection of Ret isoform C and to a lesser extent Ret isoform A of mouse, rat and human origin by Western Blotting (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1000), immunoprecipitation (1-2 μ g per 100-500 μ g of total protein (1 ml of cell lysate)), immunofluorescence and immunohistochemistry (including paraffin-embedded sections) (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500) and solid phase ELISA (starting dilution 1:30, dilution range 1:30-1:3000).

Suitable for use as control antibody for Ret siRNA (h): sc-36404, Ret siRNA (m): sc-36405, Ret shRNA Plasmid (h): sc-36404-SH, Ret shRNA Plasmid (m): sc-36405-SH, Ret shRNA (h) Lentiviral Particles: sc-36404-V and Ret shRNA (m) Lentiviral Particles: sc-36405-V.

Molecular Weight of Ret precursor: 150 kDa.

Molecular Weight of mature Ret: 170 kDa.

Positive Controls: mouse intestine.

STORAGE

Store at 4° C. ****DO NOT FREEZE****. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

PROTOCOLS

See our web site at www.scbt.com or our catalog for detailed protocols and support products.

Santa Cruz Biotechnology, Inc. 1.800.457.3801 831.457.3800 fax 831.457.3801 Europe +00800 4573 8000 49 6271 4523 0 www.scbt.com

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

Ret (C-20): sc-1290



The Power in Precision

BACKGROUND

The Ret proto-oncogene is structurally related to the growing family of tyrosine kinase transmembrane receptors and is involved in GDNF signaling. By alternative splicing, two isoforms of the Ret proto-oncogene product are generated. The isoforms differ from each other by having either 9 or 51 carboxy terminal amino acids. The Ret gene products include two glycosylated proteins of 150 kDa and 170 kDa and, in tunicamycin treated cells, a non-glycosylated 120 kDa protein consistent with the predicted Ret molecular weight based on sequence analysis. Tumor-specific rearrangements of the Ret proto-oncogene have been identified in papillary thyroid carcinomas leading to the formation of different transforming fusion proteins sharing the tyrosine kinase domain of Ret. In contrast to the Ret proto-oncogene, the rearranged forms are constitutively phosphorylated on tyrosine and are translocated from the membrane to the cytoplasm.

REFERENCES

1. Takahashi, M., et al. 1988. Identification of the Ret proto-oncogene products in neuroblastoma and leukemia cells. *Oncogene* 3: 571-578.
2. Tahira, T., et al. 1990. Characterization of Ret proto-oncogene mRNAs encoding two isoforms of the protein product in a human neuroblastoma cell line. *Oncogene* 5: 97-102.
3. Grieco, M., et al. 1990. PTC is a novel rearranged form of the Ret proto-oncogene and is frequently detected *in vivo* in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 60: 557-563.
4. Hopkin, K. 1994. One gene, four syndromes: the story of ret. *J. NIH Res.* 6: 33-34.

CHROMOSOMAL LOCATION

Genetic locus: RET (human) mapping to 10q11.2; Ret (mouse) mapping to 6 E3-F1.

SOURCE

Ret (C-20) is an affinity purified goat polyclonal antibody raised against a peptide mapping within a C-terminal cytoplasmic domain of Ret isoform A of human origin.

PRODUCT

Each vial contains 200 µg IgG in 1.0 ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin.

Blocking peptide available for competition studies, sc-1290 P (100 µg peptide in 0.5 ml PBS containing < 0.1% sodium azide and 0.2% BSA).

Available as phycoerythrin conjugate for flow cytometry, sc-1290 PE, 100 tests.

RESEARCH USE

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

STORAGE

Store at 4° C. ****DO NOT FREEZE****. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

APPLICATIONS

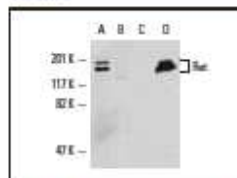
Ret (C-20) is recommended for detection of Ret isoform A of mouse, rat and human origin by Western Blotting (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1000), immunoprecipitation (1–2 µg per 100–500 µg of total protein (1 ml of cell lysate)), immunofluorescence (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500), flow cytometry (1 µg per 1 x 10⁶ cells) and solid phase ELISA (starting dilution 1:30, dilution range 1:30-1:3000).

Suitable for use as control antibody for Ret siRNA (h): sc-36404 and Ret siRNA (m): sc-36405.

Molecular Weight of Ret: 150/170 kDa.

Positive Controls: mouse intestine.

DATA



Western blot analysis of Ret expression in Ret (long) (A, C) and Ret (short) (B, D) transfected NIH/3T3 cells. Antisera tested include Ret (C-20): sc-1290 (A, B) and Ret (C-19): sc-157 (C, D).

SELECT PRODUCT CITATIONS

1. Cosma, M.P., et al. 1998. Mutations in the extracellular domain cause RET loss of function by a dominant negative mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 18: 3321-3329.
2. Urbano, A.G., et al. 2000. GDNF and Ret-gene expression in anterior pituitary-cell types. *Endocrinology* 141: 1893-1896.
3. de Graaf, E., et al. 2001. Differential activities of the RET tyrosine kinase receptor isoforms during mammalian embryogenesis. *Genes and Dev.* 15: 2433-2444.
4. Japon, M.A., et al. 2002. Glial-derived neurotrophic factor and Ret gene expression in normal human anterior pituitary cell types and in pituitary tumors. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 87: 1879-1884.
5. Tsui-Pierchala, B.A., et al. 2002. NGF utilizes c-Ret via a novel GFL-independent, inter-RTK signaling mechanism to maintain the trophic status of mature sympathetic neurons. *Neuron* 33: 261-273.
6. Powell, D.J. Jr, et al. 2003. A thyroid tumor-specific antigen formed by the fusion of two self proteins. *J. Immunol.* 170: 861-869.
7. Paratcha, G., et al. 2003. The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell.* 113: 867-879.
8. Wang, L.M., et al. 2004. Identification of the key amino acids of glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha1 involved in its biological function. *J. Biol. Chem.* 279: 108-116.

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

p-Ret (Tyr 1062)-R: sc-20252-R



The Power to Question

BACKGROUND

The Ret proto-oncogene is structurally related to the growing family of tyrosine kinase transmembrane receptors and is involved in GDNF signaling. By alternative splicing, two isoforms of the Ret proto-oncogene product are generated that differ from each other by having either 9 or 51 carboxy terminal amino acids. The Ret gene products include two glycosylated proteins of 150 kDa and 170 kDa and, in tunicamycin-treated cells, a non-glycosylated 120 kDa protein consistent with the predicted Ret molecular weight based on sequence analysis. Tumor-specific rearrangements of the Ret proto-oncogene have been identified in papillary thyroid carcinomas leading to the formation of different transforming fusion proteins sharing the tyrosine kinase domain of Ret. In contrast to the Ret proto-oncogene, the rearranged forms are constitutively phosphorylated on tyrosine and are translocated from the membrane to the cytoplasm. The putative binding site for either SH2 and PTB domains has been identified as Tyr 586 of Ret/Ptc2 (Tyr 1062 on proto-Ret). Tyr 1062 shows features of a multifunctional docking site and Shc activation plays a key role in the transforming pathways triggered by Ret/Ptc oncoproteins.

CHROMOSOMAL LOCATION

Genetic locus: RET (human) mapping to 10q11.21; Ret (mouse) mapping to 6 F1.

SOURCE

p-Ret (Tyr 1062)-R is a rabbit polyclonal antibody raised against a short amino acid sequence containing phosphorylated Tyr 1062 of Ret of human origin.

PRODUCT

Each vial contains 200 µg IgG in 1.0 ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin.

Blocking peptide available for competition studies, sc-20252 P, (100 µg peptide in 0.5 ml PBS containing < 0.1% sodium azide and 0.2% BSA).

APPLICATIONS

p-Ret (Tyr 1062)-R is recommended for detection of Tyr 1062 phosphorylated Ret of mouse, rat and human origin by Western Blotting (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1000), immunoprecipitation (1-2 µg per 100-500 µg of total protein (1 ml of cell lysate)), immunofluorescence (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500) and solid phase ELISA (starting dilution 1:30, dilution range 1:30-1:3000).

Suitable for use as control antibody for Ret siRNA (h): sc-36404, Ret siRNA (m): sc-36405, Ret siRNA (r): sc-156121, Ret shRNA Plasmid (h): sc-36404-SH, Ret shRNA Plasmid (m): sc-36405-SH, Ret shRNA Plasmid (r): sc-156121-SH, Ret shRNA (h) Lentiviral Particles: sc-36404-V, Ret shRNA (m) Lentiviral Particles: sc-36405-V and Ret shRNA (r) Lentiviral Particles: sc-156121-V.

Molecular Weight of precursor p-Ret: 150 kDa.

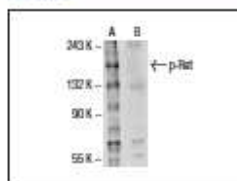
Molecular Weight of mature p-Ret: 170 kDa.

Positive Controls: Hep G2 cell lysate: sc-2227.

STORAGE

Store at 4° C, ****DO NOT FREEZE****. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

DATA



p-Ret (Tyr 1062)-R: sc-20252-R. Western blot analysis of Ret phosphorylation in untreated (A) and lambda protein phosphatase treated (B) Hep G2 whole cell lysates.

SELECT PRODUCT CITATIONS

- Petrangolini, G., et al. 2006. Apoptotic cell death induction and angiogenesis inhibition in large established medullary thyroid carcinoma xenografts by Ret inhibitor RPI-1. *Biochem. Pharmacol.* 72: 405-414.
- Mise, N., et al. 2006. Evaluation of potential mechanisms underlying genotype-phenotype correlations in multiple endocrine neoplasia type 2. *Oncogene* 25: 6637-6647.
- Oppenheimer, O., et al. 2007. The Ret oncogene is a critical component of transcriptional programs associated with retinoic acid-induced differentiation in neuroblastoma. *Mol. Cancer Ther.* 6: 1300-1309.
- Rizzi, E., et al. 2007. Synthesis and Ret protein kinase inhibitory activity of 3-arylidobenzylidene-indolin-2-ones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17: 3962-3968.
- Akero-Stuart, N., et al. 2007. The RET kinase inhibitor NVP-AST487 blocks growth and calcitonin gene expression through distinct mechanisms in medullary thyroid cancer cells. *Cancer Res.* 67: 6956-6964.
- He, Z., et al. 2008. GDNF upregulates c-Fos transcription via the Ras/ERK 1/2 pathway to promote mouse spermatogonial stem cell proliferation. *Stem Cells* 26: 266-278.
- Cincinelli, R., et al. 2008. Synthesis, modeling, and Ret protein kinase inhibitory activity of 3- and 4-substituted β -carboline-1-ones. *J. Med. Chem.* 51: 7777-7787.
- Cassinelli, G., et al. 2009. Ret/PTC1-driven neoplastic transformation and proinvasive phenotype of human thyrocytes involve Met induction and β -catenin nuclear translocation. *Neoplasia* 11: 10-21.
- Boschia, F., et al. 2009. GDNF selectively induces microglial activation and neuronal survival in CA1/CA3 hippocampal regions exposed to NMDA insult through Ret/ERK signalling. *PLoS ONE* 4: e6486.

RESEARCH USE

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

Apêndice C:

Autorização dos Comitês de Ética dos Hospitalais:

1. Fundação Hospitalar Mário Penna
2. Hospital Felício Rocho
3. Hospital das Clínicas da UFMG
4. Hospital Vera Cruz

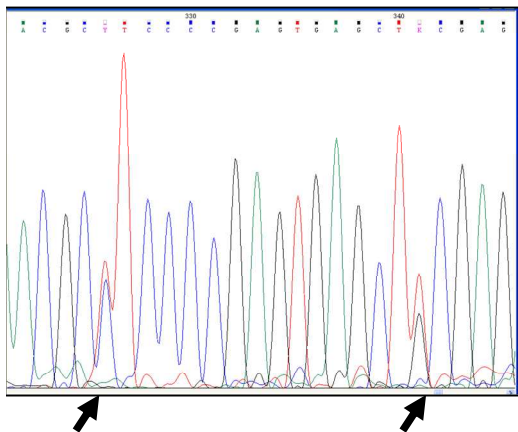
Apêndice D- Equipamentos utilizados nas etapas de reação em cadeia da polimerase e amplificação gênica

- PCT-100- Programmable Thermal Controller- Mj Research, Inc. (PCR)
- Eppendorf centrifuge 5417R (Microcentrífuga)
- Marathon 13 K/M – Fisher Scientific (Microcentrífuga)
- MINOR- MSE (Centrífuga)
- VORTEX-2 GENE- Scientific Industries (Máquina de vortex)
- Fisher Water Bath- Fisher Scientific (Banho de água)
- Thermolyne Type 16500 – Dry-bath (Banho de areia)
- Mini- V 8.10 Vertical Gel Eletrophoresis Apparatus- Life Technologies (Cuba de eletroforese)
- ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Seqüenciador automático).
- Gene Quant- Pharmacia Biotech, USA (usado para quantificar DNA por espectrofotometria)

Apêndice E:

Cromatogramas dos sequenciamentos dos exons 13 e 11 do gene *RET* dos pacientes com carcinoma medular da tireóide esporádico e familiar mostrando os SNPs A764A e L769L e G691S, respectivamente.

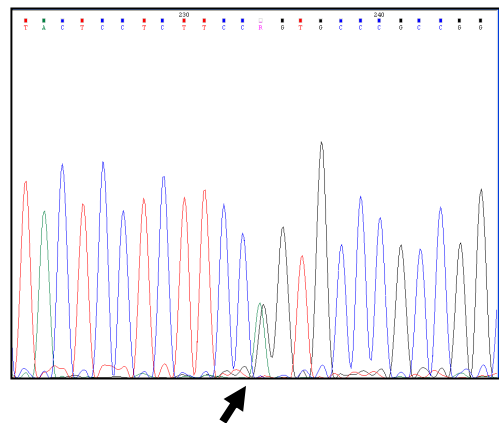
Exon 13



A764A
G691S

L769L

Exon 11



A764A
G691S

ANEXOS F- Protocolos para a imunoistoquímica

Calcitonina

- Desparafinar:
 - Após cortar manter na estufa (70°C) por 5h.
 - 02 banhos em xilol (5min cada).
 - 03 banhos em álcool absoluto (5min cada).
- Lavar uma vez com PBS (2min).
- Delimitar os cortes com caneta.
- Lavar uma vez com PBS (2min).
- Fazer bloqueio com peroxidase endógena (PERIDROL) durante 10 min.
 - PERIDROL: uma parte de H₂O₂ 30% com nove partes de água destilada
- Lavar 3 vezes com PBS (2min cada)
- Incubar os cortes com PBS/BSA 2% durante 30min a temperatura ambiente.
- Retirar o excesso de PBS/BSA 2%.
- Pingar anticorpo primário
 - Diluir o anticorpo primário (anticalcitonina) em BSA. (1:750)
- Deixar na câmara úmida por 30min.
- Lavar 4 vezes com PBS (2min cada)
- Retirar o excesso de PBS.
- Pingar pós primário: 1 ou 2 gotas – deixar 30min
- Lavar 3 vezes com PBS (2min cada)
- Pingar polímero: 1 ou 2 gotas – deixar 30min
- Lavar 3 vezes com PBS (2min cada)
- Retirar o excesso de PBS.
- Revelar com DAB: 1mL de substrato + 1 gota de cromógeno
 - Parar a reação com PBS quando atingir a coloração desejada
- Fazer contra-coloração com hematoxilina (durante 5 min)
- Lavar com água corrente até água ficar limpa
- Passar por 03 banhos em álcool absoluto (5min cada).
- Passar por 02 banhos em xilol (5min cada).

Montar lâmina:

- Forrar mesa com papel
- Colocar lâmina sobre o forro
- Pingar 1 ou 2 gts de Entellan
- Colocar lamínula
- Deixar lâmina secar

RET C-19:

- Desparafinar:
 - Após cortar manter na estufa (70°C) por 5h.
 - 02 banhos em xilol (5min cada).
 - 03 banhos em álcool absoluto (5min cada)
 - Deixar em água de torneira.
- Transferir para cuba com tampão de reativação antigênica (EDTA).
 - Aquecer (após atingir 96°C, aguardar 30min).
 - Retirar do aquecedor e resfriar por 20min.
- Lavar uma vez com PBS (2min).
- Delimitar os cortes com caneta.
- Lavar uma vez com PBS (2min).
- Fazer bloqueio com peroxidase endógena (PERIDROL) durante 10 min.
 - PERIDROL: uma parte de H₂O₂ 30% com nove partes de água destilada
- Lavar 3 vezes com PBS (2min cada)
- Incubar os cortes com PBS/BSA 2% durante 30min a temperatura ambiente.
- Retirar o excesso de PBS/BSA 2%.
- Pingar anticorpo primário
 - Diluir o anticorpo primário em PBS/BSA 2%, na diluição de 1:100
- Deixar na câmara úmida por 30min.
- Lavar 4 vezes com PBS (2min cada)
- Retirar o excesso de PBS.
- Pingar pós primário: 1 ou 2 gotas – deixar 30min
- Lavar 3 vezes com PBS (2min cada)
- Pingar polímero: 1 ou 2 gotas – deixar 30min
- Lavar 3 vezes com PBS (2min cada)
- Retirar o excesso de PBS.
- Revelar com DAB: 1mL de substrato + 1 gota de cromógeno
 - Parar a reação com PBS quando atingir a coloração desejada
- Fazer contra-coloração com hematoxilina
- Lavar com água corrente até água ficar limpa
- Passar por 03 banhos em álcool absoluto (5min cada).
- Passar por 02 banhos em xilol (5min cada).

Montar lâmina:

- Forrar mesa com papel
- Colocar lâmina sobre o forro
- Pingar 1 ou 2 gts de Entellan
- Colocar lamínula
- Deixar lâmina secar

RET C-20

- Desparafinar:
 - Após cortar manter na estufa (70°C) por 5h.
 - 02 banhos em xilol (5min cada).
 - 03 banhos em álcool absoluto (5min cada)
 - Deixar em água de torneira.
- Transferir para cuba com tampão de reativação antigênica (EDTA).
 - Aquecer (após atingir 96°C, aguardar 30min).
 - Retirar do aquecedor e resfriar por 20min.
- Lavar uma vez com PBS (2min).
- Delimitar os cortes com caneta.
- Lavar uma vez com PBS (2min).
- Fazer bloqueio com peroxidase endógena (PERIDROL) durante 10 min.
 - PERIDROL: uma parte de H₂O₂ 30% com nove partes de água destilada
- Lavar 3 vezes com PBS (2min cada)
- Pingar anticorpo primário
 - Diluir o anticorpo primário em PBS, na diluição de 1:80
- Deixar na câmara úmida por 18 Hs.
- Lavar 4 vezes com PBS (2min cada)
- Retirar o excesso de PBS.
- Pingar pós primário : 1 ou 2 gotas – deixar 30min
- Lavar 3 vezes com PBS (2min cada)
- Pingar polímero : 1 ou 2 gotas – deixar 30min
- Lavar 3 vezes com PBS (2min cada)
- Retirar o excesso de PBS.
- Revelar com DAB: 1mL de substrato + 1 gota de cromógeno
 - Parar a reação com PBS quando atingir a coloração desejada
- Fazer contra-coloração com hematoxilina (durante 5 min)
- Lavar com água corrente até água ficar limpa
- Passar por 03 banhos em álcool absoluto (5min cada).
- Passar por 02 banhos em xilol (5min cada).

Montar lâmina:

- Forrar mesa com papel
- Colocar lâmina sobre o forro
- Pingar 1 ou 2 gts de Entellan
- Colocar lamínula
- Deixar lâmina secar

Tyr 1062

- Desparafinar:
 - Após cortar manter na estufa (70°C) por 5h.
 - 02 banhos em xilol (5min cada).
 - 03 banhos em álcool absoluto (5min cada)
 - Deixar em água de torneira.
- Transferir para cuba com tampão de reativação antigênica (EDTA).
 - Aquecer (após atingir 96°C, aguardar 30min).
 - Retirar do aquecedor e resfriar por 20min.
- Lavar uma vez com PBS (2min).
- Delimitar os cortes com caneta.
- Lavar uma vez com PBS (2min).
- Fazer bloqueio com peroxidase endógena (PERIDROL) durante 10 min.
 - PERIDROL: uma parte de H₂O₂ 30% com nove partes de água destilada
- Lavar 3 vezes com PBS (2min cada)
- Incubar os cortes com PBS/BSA 2% durante 30min a temperatura ambiente.
- Retirar o excesso de PBS/BSA 2%. (Não lavar após o bloqueio).
- Pingar anticorpo primário
 - Diluir o anticorpo primário em PBS/BSA 2%, na diluição de 1:80
- Deixar na câmara úmida por 18 Hs.
- Lavar 4 vezes com PBS (2min cada)
- Retirar o excesso de PBS.
- Pingar pós primário: 1 ou 2 gotas – deixar 30min
- Lavar 3 vezes com PBS (2min cada)
- Pingar polímero: 1 ou 2 gotas – deixar 30min
- Lavar 3 vezes com PBS (2min cada)
- Retirar o excesso de PBS.
- Revelar com DAB: 1mL de substrato + 1 gota de cromógeno
 - Parar a reação com PBS quando atingir a coloração desejada
- Fazer contra-coloração com hematoxilina (durante 5 min)
- Lavar com água corrente até água ficar limpa
- Passar por 03 banhos em álcool absoluto (5min cada).
- Passar por 02 banhos em xilol (5min cada).

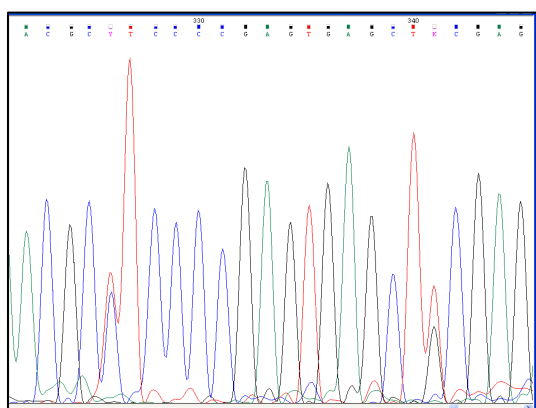
Montar lâmina:

- Forrar mesa com papel
- Colocar lâmina sobre o forro
- Pingar 1 ou 2 gts de Entellan
- Colocar lamínula
- Deixar lâmina secar
-

Apêndice E:

Cromatogramas dos sequenciamentos dos exons 13 e 11 do gene *RET* dos pacientes com carcinoma medular da tireóide esporádico e familiar mostrando os SNPs A764A e L769L e G691S, respectivamente.

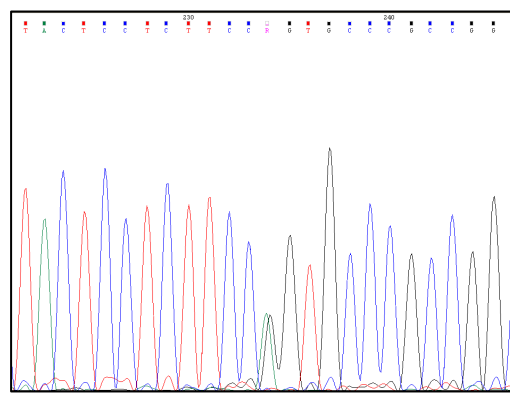
Exon 13



A764A

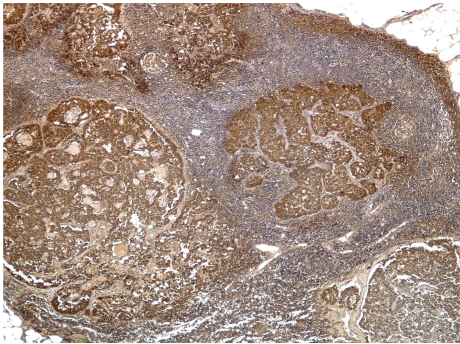
L769L

Exon 11

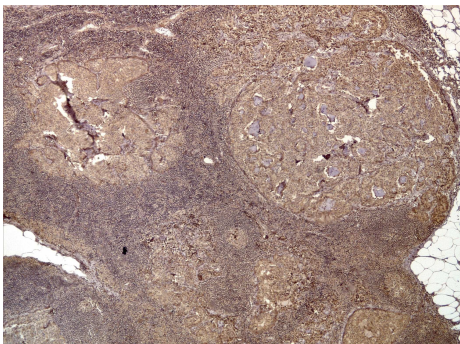


G691S

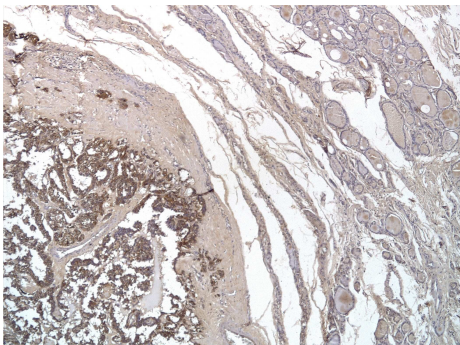
Apêndice G: Representação fotográfica da expressão da calcitonina e da isoforma RET 9, grau 4, no linfonodo e tireóide, proveniente do bloco de parafina dos pacientes com CMT operados (50x).



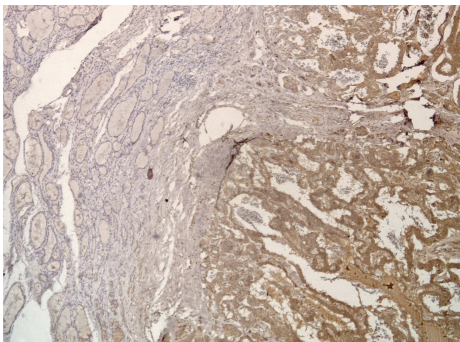
Calcitonina, paciente 5 (linfonodo)



RET 9, paciente 7 (linfonodo)

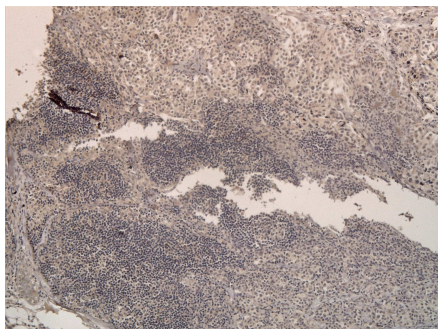


Calcitonina, paciente 5 (tireóide)

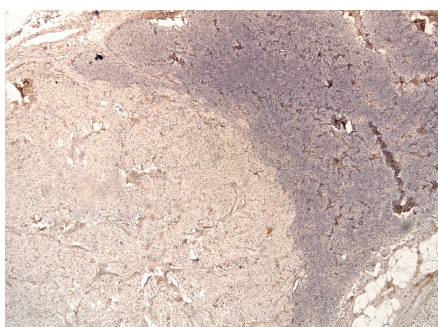


RET 9, paciente 7 (tireóide)

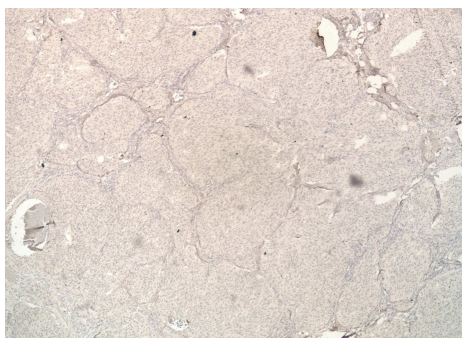
Apêndice G: Representação fotográfica da expressão da isoforma RET 51 no linfonodo (graus 1 e 3) e da tireóide (graus 1 e 3), proveniente dos blocos de parafina dos pacientes com carcinoma medular da tireóide operados



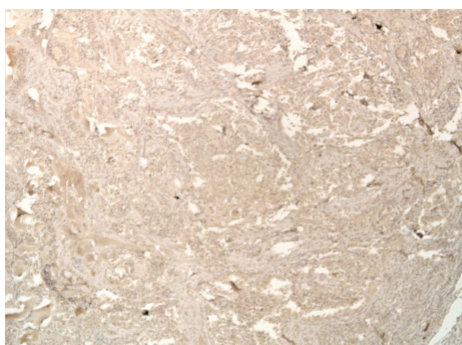
RET 51, paciente 1 (linfonodo, grau 1), 100x



RET 51, paciente 9 (linfonodo, grau 3)

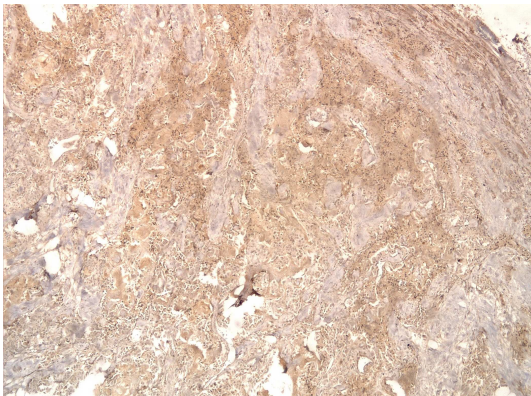


RET 51, paciente 10 (tireóide, grau 1)

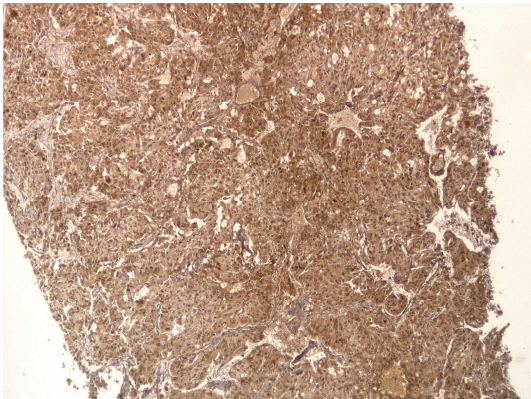


RET 51, paciente 9 (tireóide, grau 3)

Apêndice G: Representação fotográfica da expressão do resíduo Y1062 (TYR 1062), proveniente do bloco de parafina dos pacientes operados de carcinoma medular da tireóide (50x).



TYR Y1062, caso 9 (tireóide, grau 3)



TYR Y1062, caso 8 (suprarrenal, grau 4)