

***POLIMORFISMOS GENÉTICOS: IMPLICAÇÕES NA GÊNESE DO
CARCINOMA MEDULAR DE TIREÓIDE***

Andreia Possatti da Rocha e Ana Luiza Maia

Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Título abreviado: Polimorfismos no Carcinoma Medular de Tireóide

Suporte Financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.

Correspondência: Profa. Dra. Ana Luiza Maia
Serviço de Endocrinologia
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos 2350
90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil
Fone / fax: 51-3332-5188; e-mail: almaia@ufrgs.br

R672p Rocha, Andreia Possatti da

Polimorfismos genéticos : implicações na gênese do carcinoma medular de tireóide / Andreia Possatti da Rocha ; orient. Ana Luiza Silva Maia. – 2005.

51 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia. Porto Alegre, BR-RS, 2005.

1. Neoplasias da glândula tireóide 2. Carcinoma medular 3. Polimorfismo genético I. Maia, Ana Luiza II. Título.

NLM: WK 270

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Resumo:

O carcinoma medular de tireóide (CMT) é uma neoplasia maligna rara, ocorrendo na forma esporádica ou hereditária. Mutações germinativas no proto-oncogene *RET* são responsáveis pelo CMT hereditário. No entanto, a maioria dos casos de CMT ocorre em indivíduos sem história familiar, na qual a patogênese da doença ainda é pouco compreendida. Os polimorfismos do gene *RET* são descritos na população geral assim como em pacientes com CMT. Embora, estas variações alélicas aparentemente não confirmem qualquer atividade transformadora no receptor RET, estudos sugerem que essas alterações genéticas podem modificar a suscetibilidade à doença e o fenótipo clínico em pacientes com CMT esporádico ou hereditário. Uma maior frequência dos polimorfismos localizados nos exons 11 (G691S), 13 (L769L), 14 (S836S) e 15 (S904) é descrita em pacientes com CMT provenientes de países Americanos e Europeus. Na presente revisão, analisamos criticamente os resultados obtidos nos diferentes estudos e descrevemos a frequência dos polimorfismos do *RET* em pacientes Brasileiros com CMT esporádico.

Abstract:

Medullary thyroid carcinoma (MTC) is a rare malignant neoplasia, which may occur on sporadic form or on a hereditary basis. Germ line mutations in the *RET* proto-oncogene is responsible for hereditary MTC. However, most MTC occur in individuals without family history where the pathogenesis is still unclear. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *RET* gene have been described in the general population as well as in patients with MTC. Even though these allelic variants do not seem to confer any transforming activity to the tyrosine kinase domain of the RET protein, cumulative studies suggest that they could modify disease susceptibility and clinical phenotype in patients with sporadic or hereditary MTC. Polymorphisms located in exon 11 (G691S) 13 (L769L), 14 (S836S) and 15 (S904S) seem to be over-represented in sporadic MTC patients from American and European countries. Here, we discuss the results obtained in different studies as well as describe the frequency of RET polymorphisms in Brazilian patients with sporadic MTC.

Introdução

Desde a identificação do proto-oncogene *RET* como gene causador do carcinoma medular de tireóide (CMT) hereditário em 1993, o conhecimento acumulado sobre a patogênese do CMT e neoplasias associadas tem sido significativo (1-5). Contudo, particularidades da doença ainda são pouco compreendidas. Como exemplos, a heterogeneidade clínica observada em indivíduos com a mesma mutação e questões quanto a possibilidade da mutação no *RET* não ser o evento inicial na gênese da doença (6-8). Em relação ao CMT esporádico o quadro é um pouco mais obscuro. Mutações somáticas no proto-oncogene *RET* são descritas em apenas 50% dos casos e parecem não ocorrer de modo uniforme entre as várias subpopulações de células dentro de um mesmo tumor ou de suas metástases (9-13).

Alguns estudos sugerem que o efeito determinado por genes de baixa penetrância possa fornecer uma explicação plausível para essas questões. Seqüências variantes ou polimorfismos genéticos estariam associados a um risco pequeno a moderado para o desenvolvimento da doença.

O que são polimorfismos?

Dentro de uma espécie, os cromossomos homólogos são bastante similares entre si, mas em determinadas localizações do cromossomo (loci) pode haver variabilidade na seqüência do DNA. Se a variação é encontrada em proporção superior a 1% da população, denomina-se polimorfismo (14). Polimorfismos podem atuar como marcadores genéticos, já que são transmitidos associados a outros genes localizados na região cromossômica próxima a eles (*linkage*). Desta forma, se um gene próximo a um marcador causa uma doença, todos os indivíduos afetados na família recebem tanto o marcador como o gene causador da doença (14). Os polimorfismos também são responsáveis pela diversidade humana. Diferentes fenótipos são decorrentes de diferentes polimorfismos, como por exemplo, o sistema ABO (15). De outro modo, os polimorfismos podem influenciar diretamente sobre fatores de risco associados a doenças comuns, como é descrito nos estudos envolvendo a estrutura genética das apolipoproteínas (16, 17).

Embora o determinante genético para uma determinada patologia seja identificada através de uma mutação com herança mendeliana simples, os determinantes para a idade de início da doença e a variabilidade clínica existente entre indivíduos com a mesma mutação ainda são ignorados (6-8). Uma explicação possível seria que fatores ambientais, risco ou proteção, uma segunda mutação ou polimorfismo estariam interferindo na evolução da doença (14, 18-20).

Quais as bases genéticas do carcinoma medular de tireóide?

O CMT é uma neoplasia maligna com origem nas células C ou parafoliculares da tireóide, correspondendo 5 a 8% dos tumores da glândula tireóide (21). O CMT pode ocorrer na forma esporádica, 75% dos casos, ou como parte de uma síndrome clínica de herança autossômica dominante (22). Nos pacientes com CMT familiar (CMTF) somente a tireóide é afetada. Os pacientes com neoplasia endócrina múltipla (NEM) 2A desenvolvem CMT, feocromocitoma e/ou hiperparatireoidismos (HPT). Os pacientes com NEM 2B apresentam CMT, feocromocitoma, ganglioneuromas no trato gastrointestinal, neuromas da mucosa com ou sem anormalidades esqueléticas (tabela 1) (23). O líquen amilóide cutâneo (CLA) e a Doença de Hirschprung (DH) podem ocorrer associados a MEN 2A (23-29).

O proto-oncogene *RET* (*REarrangement during Transfection*) é o gene que determina suscetibilidade ao CMT (2-4). O conceito de oncogene originou-se com a descoberta de que certos elementos genéticos virais apresentavam a habilidade de formar tumores (30). Diversas classes destes genes foram encontradas em diferentes espécies de vertebrados e invertebrados (30). As sucessivas descobertas levaram rapidamente a observação que esses genes, quando ativados de modo descontrolado, estariam associados a tumores de origem não-viral em humanos (2, 3). Ao contrário dos genes supressores tumorais, os efeitos da ativação de um oncogene nas células são dominantes, ou seja, existe um efeito positivo no crescimento celular mesmo na presença de um alelo normal ou inativado (30).

O proto-oncogene *RET* está localizado no braço longo do cromossomo 10 (10q11.2) sendo formado por 21 exons (31, 32). O *RET*, expresso nas células

derivadas da crista neural, codifica um receptor tirosino-kinase constituído por três domínios, um domínio extracelular com uma região caderina-*like* e uma região rica em cisteína, um domínio transmembrana e um domínio intracelular tirosino-kinase (5). O receptor RET realiza a transmissão de sinais extracelulares ao núcleo da célula, controlando a proliferação, crescimento e diferenciação celular sendo ativado pela ligação de um fator de crescimento, denominado *glial cell line derived neurotrophic factor* (GDNF) (33-35). O mecanismo molecular de ativação do RET tem início através da interação do fator de crescimento com um co-receptor glicosil-fosfadilinositol ($GFR\alpha$) ancorado na membrana celular, o qual, por sua vez, se associa ao receptor RET formando um receptor multimérico. A presença do ligante desencadeia a dimerização do RET, ativação do domínio tirosino-kinase, determinando assim a transmissão do sinal (figura 1). De outro modo, uma mutação do tipo ganho de função no proto-oncogene *RET* determina uma ativação constitutiva do receptor RET, ou seja, independente do ligante (5).

Mutações do tipo *missense* originárias da linhagem germinativa celular são responsáveis pelo CMT hereditário. Os exons mais comumente afetados são o 10, 11 e 16 (23, 27, 36-38). No entanto, mutações nos exons 5, 8, 13, 14 e 15 podem ser encontradas mais raramente (39-47). Na imensa maioria dos casos, os pacientes com NEM 2A e CMTF têm a mutação em um de cinco códons (*hot points*), codificadores dos resíduos de cisteína localizados no domínio extracelular do RET, sendo eles o 609, 611, 618 e 620 (exon 10) e o 634 (exon 11) (37, 38, 48-51). Nos pacientes com NEM 2B, a mutação mais freqüente afeta o códon 918 (exon 16), resultando na troca de uma metionina por uma treonina (M918T) no domínio intracelular tirosino-kinase (4, 52). No entanto, mutações no códon 883 (exon 15) parecem estar associadas a um pequeno número de casos com NEM 2B (53).

Mutações somáticas no proto-oncogene *RET* também são descritas em um número variável (23 a 86%) de casos de CMT esporádico (9-12). Uma mutação somática do tipo *missense* afetando o códon 918 (exon 16), apresentando a mesma substituição de aminoácidos da NEM 2B, ocorre na maioria dos casos (4). Um estudo realizado em 28 pacientes com CMT esporádico demonstrou que a mutação não ocorre de modo uniforme entre as

várias subpopulações de células dentro de um mesmo tumor ou de suas metástases, o que poderia explicar a grande variabilidade na frequência encontrada na literatura. O achado também sugere que a mutação no códon 918 pode ter ocorrido durante a evolução clonal de um tumor já estabelecido ou que o mesmo tenha uma origem policlonal (13). Outras mutações, sejam pontuais ou do tipo deleção/inserção, também foram identificadas em alguns pacientes com CMT esporádico, porém em uma frequência menor (54-58).

Apesar dos avanços na compreensão da patogênese etiologia do CMT, algumas questões permanecem: (1) por que somente algumas células irão apresentar desenvolvimento clonal se todas são portadoras da mutação no caso do CMT hereditário? (2) por que indivíduos de uma mesma família apresentam diferença quanto à apresentação clínica, à idade ao diagnóstico e quanto à evolução da doença? (3) qual o mecanismo genético inicial do CMT esporádico se a mutação somática no códon 918 do proto-oncogene *RET* for um evento determinado durante a evolução clonal do tumor? (4) que mecanismo genético explicaria o CMT esporádico entre os pacientes nos quais uma mutação somática no *RET* não foi identificada?

Qual o papel dos polimorfismos no CMT?

Nos últimos anos, diversos autores têm investigado se a presença de seqüências variantes ou polimorfismos poderiam estar associados à susceptibilidade para o desenvolvimento ou modificando a evolução do CMT. A resposta às questões feitas no parágrafo anterior pode ser o efeito determinado por genes de baixa penetrância, ou seja, cuja seqüência variante ou polimorfismo possa estar associado a um risco pequeno a moderado para o desenvolvimento da doença. Desse modo, é razoável supor que polimorfismos, os quais estão presentes numa frequência relativamente elevada na população, possam conferir um risco atribuível maior do que as raras mutações que ocorrem em genes de susceptibilidade com alta penetrância. Os polimorfismos mais comumente estudados estão representados esquematicamente na figura 2.

Gimm *et al.*, analisando 50 casos de CMT esporádico (38 alemães e 12 norte americanos), observaram um aumento na frequência do polimorfismo sinônimo no exon 14, códon 836 (AGC→AGT) que codifica uma serina (S836S).

A frequência do alelo S836S foi de 9% (9/98) entre os casos e 3,7% (5/140) entre os controles, obtendo na análise uma diferença significativa ($P=0,03$). Um achado interessante nesse estudo foi que oito dos nove pacientes (89%) com o polimorfismo S836S também apresentavam a mutação somática no M918T. Nenhum outro polimorfismo analisado no *RET* apresentou maior expressão quando associado ao CMT (10).

Em um outro estudo realizado com indivíduos provenientes da região da Andaluzia na Espanha, Ruiz *et al.* analisaram 32 pacientes com CMT esporádico e 250 controles. O polimorfismo S836S apresentou uma frequência alélica de 9,3% (6/64) entre os casos comparados a 3,6% (18/500) dos controles, obtendo-se uma diferença significativa entre os grupos analisados (59).

Elisei *et al.* analisaram 106 casos de CMT esporádico, 46 tecidos de pacientes com CMT esporádico, 60 membros de oito famílias com CMT hereditário cujo caso índice apresentava no exon 11, códon 691, a troca (GGT→AGT) de uma glicina por uma serina (G691S) e 106 controles. A análise dos dados demonstrou uma associação positiva entre o polimorfismo G691S e a presença de CMT esporádico. No entanto, não houve diferença nos níveis do RNA mensageiro do *RET* nos tumores com ou sem o polimorfismo G691S ou com qualquer outro polimorfismo analisado. A presença do polimorfismo G691S foi independente dos achados clínico-patológicos de CMT (estágio TNM, nível de calcitonina e evolução). Outro achado interessante foi a co-segregação da seqüência variante G691S com um ou mais dos polimorfismos neutros. A co-segregação entre o G691S/S904S (GGT→AGT / TCC→TCG) foi significativa quando comparada a todas as outras combinações, tanto nos pacientes quanto nos controles. Nos pacientes com CMT hereditário, a transmissão do polimorfismo e da mutação do *RET* parece ocorrer de forma randômica (60).

Em um outro estudo desenhado para se estimar o risco de CMT hereditário entre pacientes poloneses com diagnóstico de doença aparentemente esporádica, Winch *et al.* em 2001 descreveram que o polimorfismo no exon 13, códon 769 (CTT→CTG) que codifica uma leucina (L769L) ocorria principalmente em pacientes com CMT esporádico diagnosticado em idades mais precoces (<30 anos). O polimorfismo apresentou uma

freqüência de 36% nos pacientes com CMT esporádicos com idade inferior a 30 anos comparados a 15% dos que apresentavam entre 31 a 45 anos. O alelo contendo o polimorfismo S836S estava presente em 4,5% dos pacientes com CMT esporádico. No entanto, a crítica a esse estudo refere-se a ausência de uma população controle (61).

Robledo *et al* (2003), analisando pacientes com CMT esporádico, observou que o haplótipo G691S/S904S na forma homozigótica foi mais prevalente entre os pacientes com CMT comparados ao grupo controle, sugerindo que a variante tenha um papel como gene de baixa penetrância (OR=2,36; $P=0,045$). Na análise dos pacientes com CMT hereditário, aqueles que eram homozigotos para o polimorfismo G691S/S904S apresentavam a doença mais precocemente que os pacientes heterozigotos e *wild-type*. No entanto, em estudo mais recente, 384 indivíduos com NEM 2A pertencentes a 178 famílias foram avaliados quanto ao efeito determinado pelo haplótipo G691S/S904S sobre a idade de aparecimento da doença, e os achados de Robledo *et al* não foram confirmados (62).

No estudo realizado por Cebrian *et al* (2005), os autores também relataram associação positiva entre polimorfismos do *RET* e o CMT. Um aumento de 1,5 a 2,5 vezes no risco relativo para o desenvolvimento de CMT foi observado entre aqueles que apresentavam os polimorfismos no exon 11 (G691S), exon 15 (S904S) e exon 19 (STOP+388bp). De outro modo, o polimorfismo sinônimo no exon 2 (GCG→GCA) que codifica uma alanina (A45A) ocorreu em uma menor freqüência entre os casos de CMT e, segundo Cebrian, poderia representar um alelo protetor contra o desenvolvimento do CMT (63).

Baumgartner-Parzer *et al* (2005) não identificaram diferença quanto à freqüência dos polimorfismos G691S, L769L, S836S e S904S entre pacientes com CMT esporádico, CMTF, indivíduos com calcitonina basal elevada e indivíduos com calcitonina basal normal. Entretanto, um polimorfismo do intron 14 (IVS14-24, seqüência variante distante 24 nucleotídeos do início do exon 15) apresentou uma maior freqüência nos indivíduos com calcitonina basal elevada e com CMT esporádico comparado aos controles (indivíduos com calcitonina basal normal). Entre os pacientes com CMTF foi observada uma associação significativa entre a presença do polimorfismo L769L e uma mutação no códon

791, mutação esta representada pela substituição de uma fenilalanina por uma tirosina (F769Y). Os autores sugerem que a presença do polimorfismo poderia levar a ocorrência da mutação F769Y *de novo* ou estar modulando o fenótipo da doença, no entanto, pelo número limitado de indivíduos analisados (9 casos-índice) as conclusões são, no momento, meramente especulativas (64).

Por outro lado, outros estudos não demonstraram diferenças quanto à presença dos polimorfismos entre pacientes com CMT esporádico e controles. Berard *et al* analisaram a presença dos polimorfismos L769L e S836S em 92 pacientes com CMT esporádico e 87 controles, todos franceses, não havendo diferença na distribuição dos polimorfismos entre os grupos analisados (65). Na América Latina, Wohllk *et al* estudaram 50 pacientes com tumores esporádicos e 50 controles com etnias semelhantes, predominantemente de origem espanhola, mas a frequência alélica para os polimorfismos G691S, L769L, S836S e S904S não foi diferente para casos e controles (66).

O nosso grupo estudou 27 pacientes com CMT esporádicos acompanhados no Hospital das Clínicas de Porto Alegre quanto à presença dos polimorfismos L769L, S836S e S904S, comparados a 62 controles, pareados para sexo e etnia (67). A análise dos resultados não revelou associação significativa entre os polimorfismos L769L, S836S e S904S e a presença de CMT, quando frequência alélica foi analisada. O polimorfismo L769L foi identificado em 37% dos pacientes CMT esporádico comparado a 24% dos controles, entretanto, a diferença entre os grupos encontrada não alcançou significância estatística ($P= 0,10$). O polimorfismo S836S estava presente em 9,0% dos casos, enquanto 3,0% dos controles apresentavam o alelo variante S836S ($P= 0,13$). A frequência encontrada para a variante S904S foi idêntica entre os grupos, ocorrendo em 19,0% dos casos e em 21,0% dos controles ($P= 0,84$). A tabela 2 resume os resultados dos estudos previamente descritos.

Uma possível influência de polimorfismos do *RET* na doença de Hirschsprung (DH) foi também investigada (68). A DH é uma desordem genética que cursa com obstrução intestinal funcional secundária a aganglionose entérica e que pode estar associada a uma mutação inativadora do *RET*. Os autores observaram uma maior frequência dos polimorfismos A45A e L769L comparado à população controle. De outro modo, os polimorfismos G691S e S904S

apresentaram uma frequência menor entre os pacientes com DH comparado aos controles (68).

Que mecanismos são sugeridos?

O mecanismo preciso que explique como os polimorfismos desempenham seus efeitos sobre o desenvolvimento ou sobre a evolução do CMT não é conhecido. Um dos mecanismos propostos é que o polimorfismo poderia influenciar a estabilidade da molécula do RNA mensageiro (RNAm). No entanto, estudos quantitativos do RNAm do RET no tecido tumoral de indivíduos com CMT, realizados por Elisei *et al.* em 2004, não demonstraram diferença na expressão desse gene em pacientes com e sem polimorfismos (60). Outra hipótese é que a troca de base na molécula do DNA cause a criação de um *splicing* alternativo levando a uma proteína alterada ou então que o nucleotídeo modificado esteja em desequilíbrio de ligação com uma variante funcional ainda não conhecida (10). Nos polimorfismos onde ocorre uma substituição de aminoácido, pode-se supor que a modificação tenha um efeito cooperativo na dimerização do RET ou forme um novo sítio de fosforilação no domínio tirosino-quinase (7).

Qual a explicação para os diferentes achados nos estudos?

Diferenças na etnia podem ser uma das causas para os diferentes resultados descritos. Diferentes atributos genéticos podem conferir proteção ou risco para o desenvolvimento do câncer em populações de ancestralidades diferentes. Porém, estratificar os grupos quanto à etnia não é tão simples, pois nem a cor da pele nem a região de origem podem adequadamente diferenciar uma população miscigenada.

Questões metodológicas também precisam ser discutidas. O CMT é um tumor raro e frequentemente um número pequeno de pacientes costumam ser analisados. Desta forma, pode-se imaginar que tanto um erro do tipo α (concluir que existe uma associação entre o gene e a doença quando ela não existe) quanto do tipo β (concluir que não existe associação quando na verdade existe) podem ser esperados. O problema de interpretação pode ser minimizado se o cálculo do tamanho da amostra estivesse disponível para o leitor. Além disso,

um estudo de associação ideal deveria apresentar um número grande de pacientes, um pequeno valor P , um risco atribuível alto, uma explicação biológica plausível e pelo menos um outro estudo replicando os achados (69). De modo que somente seria possível analisar um número adequado de pacientes com CMT se houvesse a colaboração conjunta de diversos centros de pesquisa.

Referências:

1. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, *ret*, by DNA rearrangement. *Cell* 1985;42(2):581-8.
2. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993;363(6428):458-60.
3. 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(7):851-6.
4. Hofstra RM, Landsvater RM, Ceccherini I, et al. A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature* 1994;367(6461):375-6.
5. 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(10):811-9.
6. Wiench M, Wygoda Z, Gubala E, Wloch J, Oczko M, Jarzab B. The genetic background of medullary thyroid carcinoma in young patients. *Folia Histochem Cytobiol* 2001;39 Suppl 2:163-4.
7. Robledo M, Gil L, Pollan M, et al. Polymorphisms G691S/S904S of RET as genetic modifiers of MEN 2A. *Cancer Res* 2003;63(8):1814-7.
8. Pinales MK, Graf H, Gross JL, Maia AL. RET codon 634 mutations in multiple endocrine neoplasia type 2: variable clinical features and clinical outcome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(6):2644-9.
9. Eng C, Mulligan LM. Mutations of the RET proto-oncogene in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes, related sporadic tumours, and hirschsprung disease. *Hum Mutat* 1997;9(2):97-109.
10. Gimm O, Neuberg DS, Marsh DJ, et al. Over-representation of a germline RET sequence variant in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma and somatic RET codon 918 mutation. *Oncogene* 1999;18(6):1369-73.
11. Marsh DJ, Learoyd DL, Andrew SD, et al. Somatic mutations in the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996;44(3):249-57.

12. Eng C, Mulligan LM, Smith DP, et al. Mutation of the RET protooncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;12(3):209-12.
13. Eng C, Mulligan LM, Healey CS, et al. Heterogeneous mutation of the RET proto-oncogene in subpopulations of medullary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1996;56(9):2167-70.
14. Balasubramanian SP, Cox A, Brown NJ, Reed MW. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. *Eur J Surg Oncol* 2004;30(6):593-601.
15. Olsson ML, Irshaid NM, Hosseini-Maaf B, et al. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles. *Blood* 2001;98(5):1585-93.
16. Kaprio J, Ferrell RE, Kottke BA, Kamboh MI, Sing CF. Effects of polymorphisms in apolipoproteins E, A-IV, and H on quantitative traits related to risk for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb* 1991;11(5):1330-48.
17. Syvanen AC. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat Rev Genet* 2001;2(12):930-42.
18. Alberg AJ, Brock MV, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. *J Clin Oncol* 2005;23(14):3175-85.
19. McGarr SE, Ridlon JM, Hylemon PB. Diet, anaerobic bacterial metabolism, and colon cancer: a review of the literature. *J Clin Gastroenterol* 2005;39(2):98-109.
20. Huang SC, Torres-Cruz J, Pack SD, et al. Amplification and overexpression of mutant RET in multiple endocrine neoplasia type 2-associated medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(1):459-63.
21. Hazard JB. The C cells (parafollicular cells) of the thyroid gland and medullary thyroid carcinoma. A review. *Am J Pathol* 1977;88(1):213-50.
22. Saad MF, Ordonez NG, Guido JJ, Samaan NA. The prognostic value of calcitonin immunostaining in medullary carcinoma of the thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59(5):850-6.
23. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *Jama* 1996;276(19):1575-9.

24. Blank RD, Sklar CA, Dimich AB, LaQuaglia MP, Brennan MF. Clinical presentations and RET protooncogene mutations in seven multiple endocrine neoplasia type 2 kindreds. *Cancer* 1996;78(9):1996-2003.
25. Caron P, Attie T, David D, et al. C618R mutation in exon 10 of the RET proto-oncogene in a kindred with multiple endocrine neoplasia type 2A and Hirschsprung's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(7):2731-3.
26. Decker RA, Peacock ML, Watson P. Hirschsprung disease in MEN 2A: increased spectrum of RET exon 10 genotypes and strong genotype-phenotype correlation. *Hum Mol Genet* 1998;7(1):129-34.
27. Mulligan LM, Marsh DJ, Robinson BG, et al. Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2: report of the International RET Mutation Consortium. *J Intern Med* 1995;238(4):343-6.
28. Hofstra RM, Sijmons RH, Stelwagen T, et al. RET mutation screening in familial cutaneous lichen amyloidosis and in skin amyloidosis associated with multiple endocrine neoplasia. *J Invest Dermatol* 1996;107(2):215-8.
29. Punaes MK, Rocha AP, Gross JL, Maia AL. [Medullary thyroid carcinoma: clinical and oncological features and treatment]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2004;48(1):137-46.
30. Krontiris TG. *Oncogenes*. *N Engl J Med* 1995;333(5):303-6.
31. Ishizaka Y, Itoh F, Tahira T, et al. Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. *Oncogene* 1989;4(12):1519-21.
32. Pasini B, Hofstra RM, Yin L, et al. The physical map of the human RET proto-oncogene. *Oncogene* 1995;11(9):1737-43.
33. Ponder BA, Smith D. The MEN II syndromes and the role of the ret proto-oncogene. *Adv Cancer Res* 1996;70:179-222.
34. Eng C. RET proto-oncogene in the development of human cancer. *J Clin Oncol* 1999;17(1):380-93.
35. Saarma M. GDNF - a stranger in the TGF-beta superfamily? *Eur J Biochem* 2000;267(24):6968-71.
36. Maruyama S, Iwashita T, Imai T, et al. Germ line mutations of the ret proto-oncogene in Japanese patients with multiple endocrine neoplasia type 2A and type 2B. *Jpn J Cancer Res* 1994;85(9):879-82.

37. 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. *Nat Genet* 1994;6(1):70-4.
38. Heshmati HM, Gharib H, Khosla S, Abu-Lebdeh HS, Lindor NM, Thibodeau SN. Genetic testing in medullary thyroid carcinoma syndromes: mutation types and clinical significance. *Mayo Clin Proc* 1997;72(5):430-6.
39. Dvorakova S, Vaclavikova E, Duskova J, Vlcek P, Ryska A, Bendlova B. Exon 5 of the RET proto-oncogene: a newly detected risk exon for familial medullary thyroid carcinoma, a novel germ-line mutation Gly321Arg. *J Endocrinol Invest* 2005;28(10):905-9.
40. Hofstra RM, Fattoruso O, Quadro L, et al. A novel point mutation in the intracellular domain of the ret protooncogene in a family with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(12):4176-8.
41. Elisei R, Cosci B, Romei C, et al. Identification of a novel point mutation in the RET gene (Ala883Thr), which is associated with medullary thyroid carcinoma phenotype only in homozygous condition. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(11):5823-7.
42. Bolino A, Schuffenecker I, Luo Y, et al. RET mutations in exons 13 and 14 of FMTC patients. *Oncogene* 1995;10(12):2415-9.
43. Feldman GL, Edmonds MW, Ainsworth PJ, et al. Variable expressivity of familial medullary thyroid carcinoma (FMTC) due to a RET V804M (GTG-->ATG) mutation. *Surgery* 2000;128(1):93-8.
44. Wohlk N, Becker P, Youlton R, Cote GJ, Gagel RF. [Germline mutations of the ret proto-oncogene in Chilean patients with hereditary and sporadic medullary thyroid carcinoma]. *Rev Med Chil* 2001;129(7):713-8.
45. Gimm O, Niederle BE, Weber T, et al. RET proto-oncogene mutations affecting codon 790/791: A mild form of multiple endocrine neoplasia type 2A syndrome? *Surgery* 2002;132(6):952-9; discussion 9.
46. Berndt I, Reuter M, Saller B, et al. A new hot spot for mutations in the ret protooncogene causing familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2A. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(3):770-4.

47. Magalhaes PK, de Castro M, Elias LL, Soares EG, Maciel LM. Polymorphisms in the RET proto-oncogene and the phenotypic presentation of familial medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2004;14(10):848-52.
48. Mulligan LM, Eng C, Attie T, et al. Diverse phenotypes associated with exon 10 mutations of the RET proto-oncogene. *Hum Mol Genet* 1994;3(12):2163-7.
49. Oriola J, Paramo C, Halperin I, Garcia-Mayor RV, Rivera-Fillat F. Novel point mutation in exon 10 of the RET proto-oncogene in a family with medullary thyroid carcinoma. *Am J Med Genet* 1998;78(3):271-3.
50. Marsh DJ, Robinson BG, Andrew S, et al. A rapid screening method for the detection of mutations in the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A and familial medullary thyroid carcinoma families. *Genomics* 1994;23(2):477-9.
51. Komminoth P, Kunz EK, Matias-Guiu X, et al. Analysis of RET protooncogene point mutations distinguishes heritable from nonheritable medullary thyroid carcinomas. *Cancer* 1995;76(3):479-89.
52. Eng C, Smith DP, Mulligan LM, et al. Point mutation within the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B and related sporadic tumours. *Hum Mol Genet* 1994;3(2):237-41.
53. Gimm O, Marsh DJ, Andrew SD, et al. Germline dinucleotide mutation in codon 883 of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B without codon 918 mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(11):3902-4.
54. Hofstra RM, Stelwagen T, Stulp RP, et al. Extensive mutation scanning of RET in sporadic medullary thyroid carcinoma and of RET and VHL in sporadic pheochromocytoma reveals involvement of these genes in only a minority of cases. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(8):2881-4.
55. Uchino S, Noguchi S, Yamashita H, et al. Somatic mutations in RET exons 12 and 15 in sporadic medullary thyroid carcinomas: different spectrum of mutations in sporadic type from hereditary type. *Jpn J Cancer Res* 1999;90(11):1231-7.
56. Bugalho MJ, Coelho I, Sobrinho LG. Somatic trinucleotide change encompassing codons 882 and 883 of the RET proto-oncogene in a patient with sporadic medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2000;142(6):573-5.

57. Gimm O, Greco A, Hoang-Vu C, Dralle H, Pierotti MA, Eng C. Mutation analysis reveals novel sequence variants in NTRK1 in sporadic human medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(8):2784-7.
58. Romei C, Elisei R, Pinchera A, et al. Somatic mutations of the ret protooncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma are not restricted to exon 16 and are associated with tumor recurrence. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(4):1619-22.
59. Ruiz A, Antinolo G, Fernandez RM, Eng C, Marcos I, Borrego S. Germline sequence variant S836S in the RET proto-oncogene is associated with low level predisposition to sporadic medullary thyroid carcinoma in the Spanish population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001;55(3):399-402.
60. Elisei R, Cosci B, Romei C, et al. RET exon 11 (G691S) polymorphism is significantly more frequent in sporadic medullary thyroid carcinoma than in the general population. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(7):3579-84.
61. Wiench M, Wygoda Z, Gubala E, et al. Estimation of risk of inherited medullary thyroid carcinoma in apparent sporadic patients. *J Clin Oncol* 2001;19(5):1374-80.
62. Lesueur F, Cebrian A, Robledo M, et al. Polymorphisms in RET and its coreceptors and ligands as genetic modifiers of multiple endocrine neoplasia type 2A. *Cancer Res* 2006;66(2):1177-80.
63. Cebrian A, Lesueur F, Martin S, et al. Polymorphisms in the initiators of RET (rearranged during transfection) signaling pathway and susceptibility to sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(11):6268-74.
64. Baumgartner-Parzer SM, Lang R, Wagner L, et al. Polymorphisms in exon 13 and intron 14 of the RET protooncogene: genetic modifiers of medullary thyroid carcinoma? *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(11):6232-6.
65. Berard I, Kraimps JL, Savagner F, et al. Germline-sequence variants S836S and L769L in the RE arranged during Transfection (RET) proto-oncogene are not associated with predisposition to sporadic medullary carcinoma in the French population. *Clin Genet* 2004;65(2):150-2.
66. Wohllk GN, Soto CE, Bravo AM, Becker CP. [G691S, L769L and S836S ret proto-oncogene polymorphisms are not associated with higher risk to sporadic

medullary thyroid carcinoma in Chilean patients]. Rev Med Chil 2005;133(4):397-402.

67. Rocha AP, Puñales MK, Meotti C, Gross JL, Maia AL. Role of RET genetic variants in sporadic and hereditary forms of medullary thyroid carcinoma (*submitted*).

68. Borrego S, Saez ME, Ruiz A, et al. Specific polymorphisms in the RET proto-oncogene are over-represented in patients with Hirschsprung disease and may represent loci modifying phenotypic expression. J Med Genet 1999;36(10):771-4.

69. Freely associating. Nat Genet 1999;22(1):1-2.

Tabela 1. Classificação da NEM 2 de acordo à apresentação clínica

NEM 2A	<p>NEM 2A (1): Famílias com CMT, feocromocitoma e hiperparatireoidismo.</p> <p>NEM 2A (2): Famílias com CMT, feocromocitoma e sem hiperparatireoidismo.</p> <p>NEM 2A (3): Famílias com CMT, hiperparatireoidismo e sem feocromocitoma.</p>
NEM 2B	<p>Famílias com CMT (com ou sem feocromocitoma), anormalidades clínicas características e, usualmente, sem hiperparatireoidismo.</p>
CMTF	<p>Famílias com no mínimo quatro membros com CMT e sem evidência de feocromocitoma ou hiperparatireoidismo.</p>
Outros	<p>Famílias com menos de quatro indivíduos com CMT e sem evidência de feocromocitoma ou hiperparatireoidismo.</p>

Adaptado : *International RET Mutation Consortium Analysis*; Eng et al, 1996.

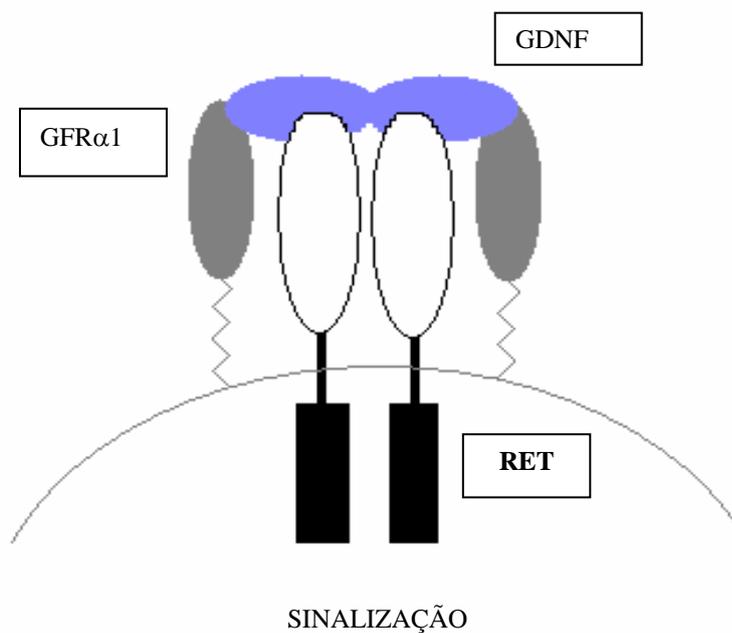


Figura 1: Complexo Multimérico de Ativação do RET

Esquema representando mecanismo de interação do GDNF com as moléculas acessórias $GFR\alpha 1$ promovendo a dimerização e ativação do RET (GDNF: *glial cell line derived neurotrophic factor*; $GFR\alpha 1$: *GPI-anchored GDNF family receptor α*).

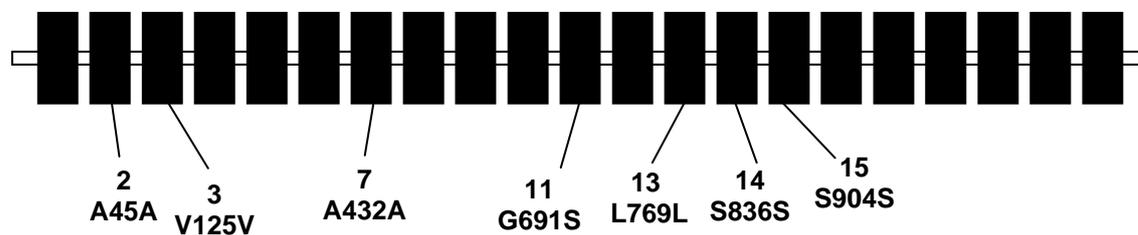
Proto-oncogene *RET*

Figura 2: Polimorfismos do proto-oncogene *RET*.

Representação esquemática do proto-oncogene *RET*, formado por 21 exons e polimorfismos descritos na literatura.

Tabela 2: Frequência dos alelos variantes do *RET* em diferentes populações analisadas

POLIMOR FISMOS (CMTE)	Gimm et al (n=50)		Ruiz et al (n=32)		Berard et al (n=92)		Wohlk et al (n=50)		Elisei et al (n=106)		Cebrian et al (n=135)		Baungartner -Parze et al (n=45)		Rocha et al (n=27)	
	Caso (%)	Controle (%)	Caso (%)	Controle (%)	Caso (%)	Controle (%)	Caso (%)	Controle (%)	Caso (%)	Controle (%)	Caso (%)	Controle (%)	Caso (%)	Controle (%)	Caso (%)	Controle (%)
L769L	26,0	26,0	NI	NI	22,3	25,9	23,0	24,0	21,6	24,0	25,0	23,4	24,4	17,7	33	24
	NS				NS		NS		NS		NS		NS		NS	
S836S	9,0	3,7	9,3	3,6	6,5	5,2	1,0	6,0	6,1	8,4	4,4	4,6	4,4	5,7	9,0	3,0
	P= 0,03		P= 0,04		NS		NS		NS		NS		NS		NS	
S904S	20,0	21,0	NI	NI	NI	NI	27,0	28,0	23,5	18,8	26,8	17,7	11,1	17,7	19,0	21,0
	NS						NS		NS		P= 0,002		NS		NS	
G691S	23,0	21,0	NI	NI	NI	NI	25,0	25,0	27,8	18,8	23,3	17,7	11,1	19,6	NI	NI
	NS						NS		P= 0,029		P= 0,003		NS			

**O PAPEL DOS POLIMORFISMOS DO PROTO-ONCOGENE RET
NA EVOLUÇÃO DO CARCINOMA MEDULAR DE TIREÓIDE
ESPORÁDICO E HEREDITÁRIO**

Andreia Possatti da Rocha, Márcia K. Puñales,

Camila D. Meotti, Ana Luiza Maia

Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Título abreviado: Polimorfismos no Carcinoma Medular de Tireóide

Suporte Financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.

Correspondência: Profa. Dra. Ana Luiza Maia

Serviço de Endocrinologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil

Fone / fax: 51-3332-5188; e-mail: almaia@ufrgs.br

Resumo

O carcinoma medular de tireóide (CMT) se origina das células C ou parafoliculares e ocorre como uma doença esporádica ou na forma hereditária. O proto-oncogene *RET* é ativado constitutivamente por mutação de ponto nos pacientes com CMT hereditário. Diferentes polimorfismos do *RET* foram descritos na população geral e alguns parecem ocorrer em uma frequência maior nos pacientes com CMT. O presente estudo teve como objetivo verificar se existe uma associação entre os polimorfismos L769L (exon 13), S836S (exon 14) e S904S (exon 15) com CMT esporádico e se estes polimorfismos do *RET* interferem na evolução ou na apresentação clínica do CMT entre indivíduos geneticamente correlatos. Cento e um pacientes com CMT (27 esporádicos e 74 hereditários) e 62 indivíduos controles foram submetidos à análise genética do *RET* por PCR e restrição enzimática. Nas análises dos haplótipos, observamos uma associação significativa entre o polimorfismo L769L e o CMT esporádico (61,3 vs. 38,7% no grupo controle, $P= 0,04$). A frequência da variante S836S também foi maior nos pacientes com CMT esporádico, comparados aos controles, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa (18,5% vs. 6,5%, $P= 0,12$). Não houve diferença quanto à presença do polimorfismo S904S entre os pacientes com CMT e o grupo controle (34,6 vs. 38,7%, $P= 0,81$). A idade ao diagnóstico não foi influenciada pelas variantes genéticas (L769L, $P= 0,25$; S836S, $P= 0,18$; S904S, $P= 0,82$) nos pacientes com CMT esporádico. Associação entre os polimorfismos e o curso natural do CMT hereditário foi analisada em 48 indivíduos com NEM 2A nos quais a doença evoluiu naturalmente sem intervenção médica, isto é sem tireoidectomia profilática. Neste grupo, os indivíduos com polimorfismo S904S foram significativamente mais jovens ao diagnóstico (26.1 ± 10.2 vs. 34.7 ± 13.9 , $P= 0.02$). O polimorfismo L769L foi mais frequentemente observado nos pacientes com CMT hereditário e feocromocitoma (60.0 vs. 25.0%, $P= 0.02$). Hiperparatireoidismo não foi associado a nenhuma das variantes genéticas analisadas. Os resultados sugerem que os polimorfismos do *RET* podem estar envolvidos na patogênese do CMT esporádico, bem como, interferindo na apresentação do CMT hereditário.

Abstract

Medullary thyroid carcinoma (MTC) originates from the parafollicular C cells and may occur as sporadic or as familial disorder. The *RET* proto-oncogene (*RET*) is constitutively activated by point mutations in hereditary MTC. Several polymorphisms of *RET* gene have been described in the general population and some might be over-represented in MTC patients. This study was undertaken to verify whether the *RET* variants L769L (exon 13), S836S (exon 14), and S904S (exon 15) are associated with sporadic MTC or whether these interfere with the natural course of MTC. A hundred-one MTC patients (27 sporadic and 74 hereditary) and 62 control individuals were subjected to *RET* analysis. Haplotype analyses showed significant association between the L769L polymorphism and sporadic MTC (61.3 vs. 38.7% in control group, $P= 0.04$). The frequency of *RET* variant S836S was also higher in sporadic MTC than in control patients, but did not reach statistical significance (18.5 vs. 6.5%, $P= 0.12$). No difference was observed between sporadic MTC group and control individuals for the S904S polymorphism (34.6 vs. 38.7%, $P= 0.81$). The age at diagnosis was not influenced by any of these genetic variants in sporadic MTC patients (L769L, $P= 0.25$; S836S, $P= 0.18$; S904S, $P= 0.82$). We determined whether these genetic variants could interfere in the natural course of MTC in 48 individuals with MEN 2A in whom the disease has evolved naturally without medical intervention, namely prophylactic thyroidectomy. Interestingly, we observed that individuals harboring the S904S polymorphism were significantly younger at the diagnosis than those without this polymorphism (26.1 ± 10.2 vs. 34.7 ± 13.9 , $P= 0.02$). Furthermore, the L769L polymorphism was over-represented in patients with pheochromocytoma (60.0 vs. 25.0%, $P= 0.02$). Hyperparathyroidism was not associated with any of the genetic variants. These results suggest that *RET* polymorphisms might be involved in sporadic MTC pathogenesis and that these variants could interfere on the disease presentation in hereditary MTC.

Introdução:

O carcinoma da glândula tireóide é a neoplasia maligna endócrina mais comum, com incidência de 0,5 a 10 por 100.000 indivíduos ao ano (1). O carcinoma medular de tireóide (CMT) compreende cerca de 5% das neoplasias malignas da tireóide e pode se manifestar na forma esporádica em 75% dos casos ou na forma hereditária nos 25% restantes (2,3). Pode ocorrer isoladamente, carcinoma medular de tireóide familiar (CMTF), ou como parte da síndrome clínica de neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (NEM 2). A NEM 2A se caracteriza pela presença de CMT associado a feocromocitoma e/ou hiperparatireoidismo. A NEM 2B se manifesta com CMT, ganglioneuromas do trato gastrointestinal, feocromocitoma e *habitus* marfanóides (4-6).

O CMT hereditário é uma doença autossômica dominante determinada por uma mutação no proto-oncogene *RET*, expresso nas células derivadas da crista neural e que codifica um receptor tirosino-kinase (7-9). Os exons mais comumente afetados são o exon 10, 11 e 16 (5,6,10,11). No entanto, mutações nos exons 8, 13, 14 e 15 podem ser encontradas mais raramente (12-19). Uma correlação entre o genótipo e fenótipo tem sido estabelecida na NEM 2, com um agrupamento das mutações nos exons 10 e 11 ocorrendo na NEM 2A, no exon 16 códon 918 na síndrome NEM 2B e nos exons 13 a 15 no CMTF (5). No entanto, variações clínicas, principalmente em relação à apresentação da doença e à idade ao diagnóstico indicam que outras alterações genéticas ou fatores ambientais possam interferir no início ou no desenvolvimento da doença.

O conhecimento em relação à patogênese do CMT esporádico é mais limitado. Mutações somáticas no proto-oncogene *RET* são descritas em apenas 50% dos casos, afetando principalmente o exon 16 códon 918 (20). Adicionalmente, observa-se a distribuição irregular das mutações somáticas dentro de um mesmo tumor ou entre as metástases em um mesmo indivíduo (21).

Polimorfismos são variações genéticas com frequência maior do que 1% na população. Diferentes polimorfismos localizados nos exons 11, 13, 14 e 15 do *RET* têm sido relatados em uma frequência maior que a esperada em pacientes com CMT esporádicos provenientes de países Europeus e Americanos. Os

polimorfismos mais freqüentemente relatados têm sido a troca de uma glicina por uma serina no códon 691 (G691S) no exon 11 e as trocas nucleotídicas silenciosas de leucina no códon 769 (L769L) e serina no códon 836 (S836S) nos exons 13 e 14, respectivamente (22-25). No CMT hereditário, a substituição silenciosa de um nucleotídeo no códon 904 codificando uma serina (S904S) quando em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo G961S e na forma homozigótica parece alterar a idade de início da doença.(26).

No presente estudo, analisamos o DNA de 27 pacientes com CMT esporádico e 62 controles, para determinar a freqüência dos polimorfismos L769L, S836S e S904S. Adicionalmente, avaliamos o impacto da presença dessas variantes na apresentação e na evolução clínica em 48 indivíduos com CMT hereditário.

Pacientes e Métodos

Pacientes

Pacientes com CMT atendidos no Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre foram convidados a participar do estudo. Pacientes de outros centros e encaminhados ao nosso serviço para investigação molecular também foram convidados a participar, sendo incluídos na análise. Devido às características peculiares, em especial a agressividade tumoral, os pacientes com NEM 2B foram excluídos.

Um total de 101 pacientes com diagnóstico histopatológico e imunohistoquímico de CMT foram incluído, sendo 27 com MTC esporádico e 74 com a forma hereditária. Os critérios para a classificação de “esporádicos” foram: história familiar negativa de CMT ou feocromocitoma (FEO) ou hiperparatireoidismo (HPT), ausência de multicentricidade tumoral, acrescidos da análise negativa para mutações no *RET*. O diagnóstico de CMT hereditário foi estabelecido através da análise molecular do *RET*, sendo todos avaliados quanto à presença de mutação nos exons 10, 11, 13, 14, 15 e 16 através de restrição enzimática e, quando necessário, por seqüenciamento direto dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) (27). Os pacientes ou seus responsáveis legais assinaram um termo de consentimento informado, conforme as exigências do Comitê de Ética da Instituição. O grupo controle foi constituído por um total de 62 amostras de DNA provenientes de um banco de doadores de sangue anônimos.

Os casos de CMT hereditário foram classificados segundo o *International Consortium of MEN Syndromes* (10). Os dados coletados de cada paciente incluíam achados clínicos (associação com outras neoplasias endócrinas), a presença e tipo de mutação do *RET*, e informações de achados atípicos, como a doença de Hirschprung (DH) ou líquen-amilóide cutâneo (CLA).

Os pacientes foram submetidos a um exame clínico completo, testes laboratoriais [níveis basais de calcitonina (Calcitonin IRMA-DSL7700, Diagnostic Systems Laboratories Inc, Webster, TX, valor de referência < 10 pg/ml; e Nichols Advantage[®] Calcitonin Immunoassay, San Clemente, CA, valor de referência < 8

pg/ml para homens e < 5 pg/ml para mulheres), PTH sérico (Imunoensaio Elecsys® PTH, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), metanefrinas e catecolaminas urinárias (HPLC)] e investigação extensiva por imagem que incluía ultra-sonografia cervical e tomografia computadorizada (TC) de tórax e abdome. De acordo com indicação clínica, alguns pacientes foram também submetidos a rastreamento corporal com metaiodobenzilguanidina (MIBG), para avaliar a presença de metástases à distância ou presença de FEO.

O procedimento terapêutico indicado consistiu em tireoidectomia total com esvaziamento cervical bilateral. Os pacientes com diagnóstico de FEO ou HPT foram encaminhados à cirurgia específica. O estadiamento clínico foi baseado na classificação da *International Union Against Cancer / American Joint Committee on Cancer* (TNM).

Análise Molecular

A extração do DNA genômico foi feita a partir de leucócitos coletados de sangue periférico por técnica padrão (28). Os *primers* para amplificação dos diferentes exons do *RET* foram desenhados nas seqüências intrônicas que se localizam nos flancos dos exons 13, 14 e 15 como indica a tabela 1. A técnica de PCR foi realizada com um volume final de 50µl usando 50 a 200ng de DNA genômico. A solução final da reação continha 20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl, 0,75mM MgCl₂, 0,1mM nucleotídeo trifosfato, 2,5U *Taq* polimerase e 10µM do *primer* específico. O DNA genômico foi denaturado por 5 min a 94°C antes de 35 ciclos a 94°, 62° e 72°C de 1 min cada temperatura, seguido por um ciclo final a 72°C com duração de 5 min no controlador térmico programável PTC-100™ (MJ Research, Inc, Waltham, MA). Os produtos do PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5% no ImageMaster® VDS (Pharmacia Biotech Inc, San Francisco, CA) através de coloração pelo brometo de etídio. Para verificar a presença dos polimorfismos, os amplicons dos exons 13, 14 e 15 foram analisados através de restrição enzimática com *TaqI*, *AluI* e *RsaI*, respectivamente, e as bandas examinadas em gel de agarose 3,0% corado com brometo de etídio.

A identificação das mutações nos pacientes com CMT hereditário foi obtida através de PCR dos exons 10, 11, 13, 14, 15 e 16. Os produtos de PCR

eram a seguir analisados por *Single Strend Conformation Polymorphism* (SSCP) e/ou restrição enzimática e/ou seqüenciamento direto. Os experimentos realizados para identificação das mutações têm sua descrição detalhada em publicação prévia (27).

Análise Estatística

Na análise descritiva dos dados, os resultados foram expressos através de mediana, média e desvio-padrão. Os grupos foram comparados usando teste χ^2 ou exato de Fisher para variáveis qualitativas e teste t de Student ou U de Mann-Whitney para variáveis quantitativas. A análise da razão de chances (odds ratio; OR) foi utilizada na comparação dos grupos controle e afetado com CMT esporádico. Os dados foram arquivados e analisados no programa SPSS para Windows 13.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$. Na interpretação do OR foi utilizado o intervalo de confiança (IC) de 95%.

Resultados

Carcinoma Medular de Tireóide Esporádico

Aspectos Gerais

A distribuição quanto ao sexo, idade e etnia no grupo controle e pacientes com CMT são descritas na tabela 2. Vinte e sete pacientes com CMT esporádico foram analisados, sendo 26 indivíduos caucasóides e um afro-brasileiro. A amostra foi constituída predominantemente pelo sexo feminino (17/27; 63,0%). A média de idade ao diagnóstico foi de $53,4 \pm 11,1$ anos, variando entre 33 a 78 anos. Apenas 2 (7,4%) pacientes apresentavam idade inferior a 40 anos ao diagnóstico do CMT. Todos indivíduos do grupo controle eram caucasóides com média de idade de $45,5 \pm 8,4$ anos. A proporção de indivíduos do sexo feminino foi de 48,4% (30/62), similar à encontrada no grupo de pacientes com CMT ($P = 0,21$).

Análise Molecular

Inicialmente, avaliamos a freqüência alélica dos polimorfismos L769L, S836S e S904S do *RET*. A freqüência alélica dos polimorfismos L769L, S836S e S904S do *RET* nos pacientes com CMT esporádico foi de 37%, 9% e 19% respectivamente. Observamos no grupo controle uma freqüência de 24%, 3% e 21% para os polimorfismos L769L, S836S e S904S, respectivamente, não havendo diferença significativa entre os grupos analisados (tabela 3).

Assumindo um possível efeito dominante do alelo variante, analisamos também a associação do polimorfismo de acordo com os haplótipos, exon 13 (TT vs. TG/GG), exon 14 (CC vs. CT/TT) e no exon 15 (CC vs. CG/GG). Observamos que o polimorfismo L769L (TG/GG) estava presente em uma freqüência maior nos pacientes com CMT esporádico (17/27; 61,3%) comparado aos controles (24/62; 38,7%; $P = 0,04$). A razão de chances (OR) associada à presença da seqüência variante L769L foi de 2,69 com IC entre 1,06 a 6,84. No entanto, não encontramos diferença para os polimorfismos S836S (CT/TT) e S904S (CG/GG), embora se observe uma tendência para uma maior expressão do polimorfismo S836S entre os pacientes com CMT esporádico, como indicado na tabela 4.

Os genótipos analisados encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para todas variantes analisadas.

Papel dos Polimorfismos na História Natural do CMT Esporádico

Para investigar um possível efeito das variantes genéticas sobre a evolução do CMT analisamos a idade e o TNM dos pacientes ao diagnóstico da doença (tabela 5). Em relação ao polimorfismo L769L, a média de idade ao diagnóstico foi similar entre pacientes com ou sem o alelo variante (TG/GG vs. TT, $51,5 \pm 10,3$ vs. $57,0 \pm 11,6$ anos; $P= 0,25$). Também não observamos diferenças na idade dos pacientes com ou sem o polimorfismo S836S (CT vs. CC; $47,0 \pm 10,6$ vs. $54,9 \pm 10,6$ anos; $P= 0,18$). Em função da raridade do alelo T na população geral, o haplótipo TT não foi identificado em nenhum dos casos ou controles. Os pacientes com polimorfismo S904S (CG/GG) tiveram uma média de idade semelhante aos pacientes que apresentavam o haplótipo CC, cujas médias foram $53,2 \pm 9,6$ e $54,2 \pm 11,8$ anos, respectivamente ($P= 0,82$).

Nenhum dos pacientes com CMT esporádico na nossa amostra se encontrava no estágio I da doença, de acordo com a classificação TNM. Apenas 25% destes pacientes apresentavam a doença restrita à glândula (estádio II), enquanto 75% apresentavam doença avançada, sendo que 41,7% foram classificados no estágio III e 33,3% no estágio IV. As médias das idades dos pacientes no estágio II, III e IV foram $51,2 \pm 7,0$ e $51,0 \pm 12,0$ e $56,1 \pm 12,6$ anos, respectivamente ($P= 0,59$). Não foi observada associação entre nenhum dos polimorfismos analisados e estágio da doença. A frequência observada no estágio II nos pacientes com polimorfismo L769L foi 12,5% enquanto que no estágio III e IV foram 50% e 37,5%; enquanto os pacientes que não apresentavam o alelo polimórfico foram 50% e 25% e 25%, respectivamente ($P= 0,21$). CMT nos estágios II, III e IV foi estava presente em 20%, 20% e 60% nos casos com polimorfismo S836S e em 26,3%, 47,4% e 26,3% nos casos que apresentavam o genótipo CC ($P= 0,46$). Do mesmo modo, observamos proporções semelhantes do estágio III e IV para os pacientes com polimorfismo S904S comparados aos que não apresentam o alelo variante (37,5 vs. 40% e 40 vs. 25%; $P= 0,75$).

Carcinoma Medular de Tireóide Hereditário

Aspectos Gerais

Os 74 pacientes analisados com CMT hereditário eram provenientes de 14 famílias, todos caucasóides e, predominantemente, do sexo feminino (47/74; 63,5%). A idade média ao diagnóstico do CMT hereditário foi de $26,5 \pm 16,0$ anos, variando entre 1 a 73 anos. A amplitude de variação na idade se deve ao estabelecimento do diagnóstico molecular a partir de 1997 pelo nosso Serviço.

As 14 famílias analisadas apresentavam o fenótipo de NEM 2A, com CMT associado a feocromocitoma e/ou hiperparatireoidismo em pelo menos um indivíduo da família. Entre as famílias com NEM 2A, três apresentavam CLA associado. Um paciente afetado com NEM 2A, de uma família com 5 indivíduos analisados, também teve diagnóstico de Doença de Hirschsprung.

Sessenta e sete pacientes (90,5%) apresentavam uma mutação no códon 634 e em 7 pacientes (9,5%) a mutação estava presente no códon 618. A troca mais freqüente foi de uma cisteína por uma tirosina no códon 634 (C634Y), observada em 66,2% dos casos, seguida pela mutação da cisteína por uma arginina no códon 634 (C634R; 16,2%) e no códon 618 (C618R; 9,5%). Em uma freqüentemente menor, encontramos a troca da cisteína por triptofano no códon 634 (C634W; 8,1%).

FEO e HPT foram diagnosticados em 20 (27%) e 12 (16,2%) pacientes, respectivamente, nos exames iniciais. Quanto ao TNM, 61,5% se encontravam no estágio I e II e 27,7% no estágio III e 10,8% no estágio IV, de acordo com o estadiamento e resultado anatopatológico. Quarenta e oito indivíduos (64,9%) referiam nódulo cervical ou apresentavam esse achado ao exame clínico ao diagnóstico de CMT hereditário.

Papel dos Polimorfismos na História Natural do CMT Hereditário

Dos 74 pacientes com CMT hereditário, 48 foram diagnosticados pelo achado de nódulo à palpação. Os pacientes que tiveram diagnóstico com base na clínica não foram submetidos a tireoidectomia profilática, apresentando assim a evolução natural da sua doença. Portanto, nesses pacientes foi possível avaliar a correlação dos polimorfismos L769L, S836S e S904S com relação ao

estágio do tumor, evitando o viés gerado pela intervenção precoce. Do mesmo modo, esses pacientes foram analisados quanto à existência de uma associação entre os polimorfismos e o diagnóstico de FEO e HPT (tabela 6).

A idade ao diagnóstico foi similar entre indivíduos com ou sem os haplótipos para as variantes genéticas L769L ($30,7 \pm 11,7$ vs. $33,2 \pm 14,7$; $P= 0,51$) e S836S ($26,4 \pm 11,7$ vs. $33,0 \pm 13,6$; $P= 0,24$). No entanto, os pacientes com polimorfismo S904S (CG/GG) apresentaram uma média de idade significativamente menor ao diagnóstico do que os pacientes sem o alelo variante ($26,1 \pm 10,2$ vs. $34,7 \pm 13,9$; $P= 0,02$). Essa diferença foi independente do tipo da mutação causadora do CMT. Nos pacientes com a mutação no códon 618 e 634, a idade ao diagnóstico foi de $42,7 \pm 14,8$ e $31,2 \pm 13,1$ anos, respectivamente ($P= 0,22$). Também não houve diferença na idade ao diagnóstico entre indivíduos com diferentes mutações no códon 634 (C634W vs. C634Y vs. C634R; $24,0 \pm 13,3$ vs. $33,2 \pm 13,5$ vs. $29,0 \pm 9,2$ anos, respectivamente; $P= 0,26$).

Não observamos diferenças quanto à presença dos polimorfismos e ao TNM ao diagnóstico do CMT. Os estágios I, II, III e IV foram observados em 5%, 40%, 35% e 25%, respectivamente, nos pacientes com o polimorfismo L769L (TG/GG) e, os resultados foram comparados aos pacientes sem o alelo variante L769L (TT), os quais apresentavam os estágios I, II, III e IV na frequência de 10,7%, 42,9%, 35,7% e 20% ($P= 0,82$). A análise do TNM entre os pacientes com e sem o polimorfismo S836S (CT/TT vs. CC) encontramos os seguintes resultados, 16,7%, 33,3%, 33,3% e 16,7% vs. 7,1%, 42,9%, 35,7%, 14,3%, relativos aos estágios I, II, III e IV, respectivamente ($P= 0,77$). Nos pacientes com o polimorfismo S904S (CG/GG), os estágios I, II, III e IV foram identificados em 21,4%, 42,9%, 21,4% e 14,3%, enquanto que nos pacientes sem o alelo variante (CC) estes estágios ocorreram em 2,9%, 41,2%, 41,2% e 14,7%, respectivamente ($P= 0,17$).

Em relação à associação de outras neoplasias, a presença do FEO foi mais freqüente em pacientes com o polimorfismo L769L (12/20) do que nos pacientes sem o alelo variante (7/28, $P= 0,02$). Não houve associação entre feocromocitoma e os polimorfismos S836S e S904S (3/6, $P= 0,67$ e 5/14, $P=$

1,00; respectivamente). De modo semelhante, nenhum dos polimorfismos estudados mostrou-se associado à presença de HPT.

Discussão:

No presente estudo avaliamos o papel das variantes genéticas na patogênese do CMT esporádico, bem como, a interferência dessas alterações sobre a apresentação clínica do CMT hereditário. A presença do polimorfismo L769L foi mais freqüente em indivíduos com CMT esporádico do que na população controle. Os polimorfismos L769L e S904S do proto-oncogene *RET* também parecem influenciar a apresentação clínica da doença hereditária. Pacientes com o polimorfismo S904S apresentaram idade inferior ao diagnóstico enquanto que a variante L769L foi associada à presença de feocromocitoma.

Os resultados dos estudos epidemiológicos, a partir do *Human Genome Project*, demonstram que algumas variantes genéticas comuns na população podem conferir risco a certas enfermidades (24, 29-31). Essa observação parece ser especialmente verdadeira para susceptibilidade ao desenvolvimento de neoplasias. Segundo a hipótese de Knudson, conhecida como o modelo de carcinogênese de dois eventos (*two-hit*), na forma dominante herdada de um tumor, uma mutação é herdada a partir de uma das células germinativas recebidas e a outra ocorre na célula somática, e na forma não herdada ambas as mutações ocorrem nas células somáticas (32). Deste modo, uma segunda mutação ou evento genético pode predispor o desenvolvimento do CMT ou modificar a evolução da doença. Desse modo, polimorfismos, que são variantes genéticas relativamente comuns, podem conferir um risco atribuível na população geral maior do que as raras mutações que ocorrem em genes de susceptibilidade com alta penetrância.

O primeiro estudo a identificar uma correlação entre os polimorfismos do *RET* e o CMT foi realizado por Gimm e colaboradores em 1999 (24). Os autores avaliaram a freqüência da variante genética S836S, uma troca silenciosa de aminoácido no exon 14 do *RET*, em pacientes norte-americanos e germânicos comparados a controles geograficamente relacionados e observaram uma freqüência significativamente maior do alelo variante no grupo com CMT (9,0% vs. 3,6%) (24). No mesmo estudo, foi observado que 8 dos 9 pacientes que apresentavam o polimorfismo S836S também apresentavam a mutação *missense* no exon 16 do *RET*, uma troca de uma metionina por uma treonina

(M918T), mutação associada a síndrome NEM 2B, sugerindo que a variante poderia de algum modo estar relacionada à mutação e, assim, responsável pela patogênese de um subgrupo de pacientes com CMT esporádico (24). Subseqüentemente, a freqüência desse polimorfismo (S836S) foi analisada na população espanhola com CMT. Observou-se uma freqüência alélica elevada nos pacientes com CMT esporádico, indicando que o achado não era restrito ao grupo de pacientes norte-americanos e germânicos (33). Em outro estudo realizado com pacientes poloneses, o polimorfismo L769L foi significativamente associado à presença de CMT em indivíduos mais jovens (23). Os pacientes com CMT esporádico e idade < 30 anos apresentaram uma freqüência maior do alelo variante quando comparados àqueles com doença diagnosticada entre 31 a 45 anos (36% vs. 15%) (23). No entanto, a ausência de grupo controle diminuiu o impacto dessa observação. Por outro lado, 2 estudos, um francês e um chileno, não observaram diferença na a freqüência dos polimorfismos L769L e S836S entre pacientes com CMT esporádico e controles (34, 35). Os polimorfismos G691S e S904S também foram avaliados nos pacientes chilenos, sendo que nenhuma das variantes apresentou uma freqüência maior nos pacientes com CMT esporádico (35).

No presente estudo, as freqüências alélicas dos polimorfismos L769L e S836S foram maiores nos pacientes com CMT do que na população controle. No entanto, o resultado não alcançou diferença estatisticamente significativa, provavelmente devido ao número pequeno casos. De fato, assumindo um efeito dominante do alelo variante, observamos que os genótipos TG/GG relacionados ao polimorfismo L769L foram mais freqüentes em pacientes com CMT esporádico do que no grupo controle (tabela 4). O risco calculado para a presença do polimorfismo L769L foi de 2,69. Nenhuma das variantes genéticas foi associada ao aparecimento do CMT em pacientes jovens ou com doença mais avançada ao diagnóstico.

Como essas variantes podem interferir na patogênese do CMT? As variantes analisadas não modificam o aminoácido sintetizado e, por isso, é difícil imaginar como os polimorfismos poderiam afetar a proteína RET. No entanto, algumas hipóteses podem ser levantadas. Primeiro, a variante genética poderia determinar uma maior expressão do RNA mensageiro através da facilitação da

transcrição do DNA ou poderia estabilizar o RNA, assim aumentando a expressão da proteína (36). Outra possibilidade seria que a presença da variante determine a formação de um sítio críptico doador ou um sítio críptico acceptor levando a formação de uma proteína alterada (24). Por último, o polimorfismo poderia estar em co-segregando em associação ou em desequilíbrio de ligação com uma outra variante genética que determine a mudança do aminoácido no RET, atuando nesse caso como um marcador.

A co-segregação de variantes genéticas no *RET* também tem sido abordada em alguns estudos. Dois grupos independentes observaram que os polimorfismos G691S e S904S apresentavam a tendência se segregar associados (22, 26). No estudo realizado na população italiana, um grupo de 106 pacientes com CMT esporádico foi comparado a um grupo controle, sendo observado que a frequência do polimorfismo G691S era maior nos pacientes com CMT esporádico (27,8% vs. 18,9%) (22). Enquanto que a frequência das variantes L769L, S836S e S904S foram similares entre pacientes e controles. Uma influência do polimorfismo G691S sobre a expressão do RNA mensageiro do *RET* foi excluída por este trabalho. Nos pacientes estudados com CMT hereditário, foi observada uma transmissão randômica entre as alterações genéticas (mutações *versus* polimorfismos) (22). De modo interessante, uma associação positiva entre os polimorfismos L769L / S836S ($P < 0,001$) e L769L / S904S ($P = 0,008$) foi encontrada quando analisamos a população de casos (esporádicos e hereditários) e controles. Por sua vez, não foi observada associação para as variantes S836S e S904S ($P = 0,75$) (resultados não apresentados).

Um achado importante em nosso estudo foi à associação entre o polimorfismo S904S e a idade mais precoce ao diagnóstico do CMT hereditário. Quando analisamos a coorte de pacientes com NEM 2A cuja evolução da doença seguiu seu curso natural, observamos que o grupo de pacientes com os genótipos CG/GG para o polimorfismo S904S apresentava uma média de idade ao diagnóstico significativamente menor do que os pacientes que não apresentavam o alelo variante (tabela 6). Uma possível interferência de outras alterações genéticas no CMT hereditário também foi abordada no estudo realizado por Robledo e colaboradores. Os autores observaram, de modo similar

ao relatado aqui, que as variantes G691S/S904S, quando presente em homozigose, apresentavam um efeito modificador na idade de início da NEM 2A. (26). De outro modo, no estudo realizado por Tamanaha e colaboradores, os polimorfismos G691S/S904S não foram associados à heterogeneidade clínica observada em uma família com CMTF e mutação no exon 8 (Gly533Cys). Uma observação dos autores foi que nenhum dos indivíduos analisados apresentava os polimorfismos G691S/S904S em homozigose (37). Magalhães e colaboradores, analisando uma família com a mutação V804M, normalmente associada à baixa agressividade do CMT, sugerem que o polimorfismo L769L estava associado ao aparecimento mais precoce da doença (25).

Um outro achado relevante no nosso trabalho refere-se à interferência do polimorfismo L769L na apresentação clínica da síndrome NEM 2A. Pacientes com o alelo variante desenvolveram feocromocitoma em uma frequência significativamente maior do que aqueles sem a alteração (tabela 6). Polimorfismos podem explicar a variabilidade genética que modifica a susceptibilidade a doenças comuns ou mesmo interfere na progressão da doença, assim como, na resposta individual a uma droga (38). Deste modo, a variabilidade na apresentação clínica da NEM 2A existente entre indivíduos de uma mesma família pode ser mais facilmente entendida se considerarmos um possível efeito dos polimorfismos do *RET* sobre a evolução da doença. A correlação entre a mutação do proto-oncogene *RET* e o fenótipo da doença na NEM 2A é bem conhecida, o feocromocitoma está especialmente associado à mutação no códon 634 (5, 39, 40). A associação entre o polimorfismo do exon 13 (L769L) e a presença de feocromocitoma foi um achado independente da mutação no códon 634. No entanto, nenhum dos polimorfismos avaliados foi associado à maior agressividade do CMT.

Concluindo, nossos resultados mostram que a frequência da variante genética L769L foi maior nos pacientes com CMT esporádico comparado aos indivíduos do grupo controle, com sexo e etnia semelhantes. Nos pacientes com CMT hereditário, a idade ao diagnóstico da doença clínica foi inferior nos que apresentavam o polimorfismo S904S, sugerindo que o polimorfismo pode estar relacionado ao aparecimento mais precoce da NEM 2A. Aparentemente, variantes genéticas também podem influenciar na apresentação clínica do CMT

hereditário, já que o polimorfismo L769L foi significativamente associado à presença de feocromocitoma nestes pacientes.

Referências:

1. AACE/AAES medical/surgical guidelines for clinical practice: management of thyroid carcinoma. American Association of Clinical Endocrinologists. American College of Endocrinology. *Endocr Pract* 2001;7(3):202-20.
2. Hazard JB. The C cells (parafollicular cells) of the thyroid gland and medullary thyroid carcinoma. A review. *Am J Pathol* 1977;88(1):213-50.
3. Bergholm U, Adami HO, Telenius-Berg M, Johansson H, Wilander E. Incidence of sporadic and familial medullary thyroid carcinoma in Sweden 1959 through 1981. A nationwide study in 126 patients. Swedish MCT Study Group. *Acta Oncol* 1990;29(1):9-15.
4. Raue F, Frank-Raue K, Grauer A. Multiple endocrine neoplasia type 2. Clinical features and screening. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1994;23(1):137-56.
5. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *Jama* 1996;276(19):1575-9.
6. Heshmati HM, Hofbauer LC. Multiple endocrine neoplasia type 2: recent progress in diagnosis and management. *Eur J Endocrinol* 1997;137(6):572-8.
7. 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(7):851-6.
8. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993;363(6428):458-60.
9. Eng C, Smith DP, Mulligan LM, et al. Point mutation within the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B and related sporadic tumours. *Hum Mol Genet* 1994;3(2):237-41.
10. Mulligan LM, Marsh DJ, Robinson BG, et al. Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2: report of the International RET Mutation Consortium. *J Intern Med* 1995;238(4):343-6.

11. 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. *Nat Genet* 1994;6(1):70-4.
12. 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.
13. Bolino A, Schuffenecker I, Luo Y, et al. RET mutations in exons 13 and 14 of FMTC patients. *Oncogene* 1995;10(12):2415-9.
14. Hofstra RM, Fattoruso O, Quadro L, et al. A novel point mutation in the intracellular domain of the ret protooncogene in a family with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(12):4176-8.
15. Berndt I, Reuter M, Saller B, et al. A new hot spot for mutations in the ret protooncogene causing familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2A. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(3):770-4.
16. Feldman GL, Edmonds MW, Ainsworth PJ, et al. Variable expressivity of familial medullary thyroid carcinoma (FMTC) due to a RET V804M (GTG-->ATG) mutation. *Surgery* 2000;128(1):93-8.
17. Wohllk N, Becker P, Youlton R, Cote GJ, Gagel RF. [Germline mutations of the ret proto-oncogene in Chilean patients with hereditary and sporadic medullary thyroid carcinoma]. *Rev Med Chil* 2001;129(7):713-8.
18. Gimm O, Niederle BE, Weber T, et al. RET proto-oncogene mutations affecting codon 790/791: A mild form of multiple endocrine neoplasia type 2A syndrome? *Surgery* 2002;132(6):952-9; discussion 9.
19. Elisei R, Cosci B, Romei C, et al. Identification of a novel point mutation in the RET gene (Ala883Thr), which is associated with medullary thyroid carcinoma phenotype only in homozygous condition. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(11):5823-7.
20. Eng C, Mulligan LM, Smith DP, et al. Mutation of the RET protooncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;12(3):209-12.
21. Eng C, Thomas GA, Neuberg DS, et al. Mutation of the RET proto-oncogene is correlated with RET immunostaining in subpopulations of cells in

sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(12):4310-3.

22. Elisei R, Cosci B, Romei C, et al. RET exon 11 (G691S) polymorphism is significantly more frequent in sporadic medullary thyroid carcinoma than in the general population. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(7):3579-84.

23. Wiench M, Wygoda Z, Gubala E, et al. Estimation of risk of inherited medullary thyroid carcinoma in apparent sporadic patients. *J Clin Oncol* 2001;19(5):1374-80.

24. Gimm O, Neuberg DS, Marsh DJ, et al. Over-representation of a germline RET sequence variant in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma and somatic RET codon 918 mutation. *Oncogene* 1999;18(6):1369-73.

25. Magalhaes PK, de Castro M, Elias LL, Soares EG, Maciel LM. Polymorphisms in the RET proto-oncogene and the phenotypic presentation of familial medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2004;14(10):848-52.

26. Robledo M, Gil L, Pollan M, et al. Polymorphisms G691S/S904S of RET as genetic modifiers of MEN 2A. *Cancer Res* 2003;63(8):1814-7.

27. Punaes MK, Graf H, Gross JL, Maia AL. RET codon 634 mutations in multiple endocrine neoplasia type 2: variable clinical features and clinical outcome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(6):2644-9.

28. Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.

29. Borrego S, Saez ME, Ruiz A, et al. Specific polymorphisms in the RET proto-oncogene are over-represented in patients with Hirschsprung disease and may represent loci modifying phenotypic expression. *J Med Genet* 1999;36(10):771-4.

30. Canani LH, Capp C, Dora JM, et al. The type 2 deiodinase A/G (Thr92Ala) polymorphism is associated with decreased enzyme velocity and increased insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(6):3472-8.

31. James RW, Leviev I, Ruiz J, Passa P, Froguel P, Garin MC. Promoter polymorphism T(-107)C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000;49(8):1390-3.

32. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68(4):820-3.
33. Ruiz A, Antinolo G, Fernandez RM, Eng C, Marcos I, Borrego S. Germline sequence variant S836S in the RET proto-oncogene is associated with low level predisposition to sporadic medullary thyroid carcinoma in the Spanish population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001;55(3):399-402.
34. Berard I, Kraimps JL, Savagner F, et al. Germline-sequence variants S836S and L769L in the RE arranged during Transfection (RET) proto-oncogene are not associated with predisposition to sporadic medullary carcinoma in the French population. *Clin Genet* 2004;65(2):150-2.
35. Wohllk GN, Soto CE, Bravo AM, Becker CP. [G691S, L769L and S836S ret proto-oncogene polymorphisms are not associated with higher risk to sporadic medullary thyroid carcinoma in Chilean patients]. *Rev Med Chil* 2005;133(4):397-402.
36. Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, et al. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet* 2003;12(3):205-16.
37. Tamanaha RSAM, RMB; Cerutti, JM. Análise de uma família com carcinoma medular de tireóide e mutação no Gly533Cys do oncogene *RET*: análise dos polimorfismos G691S/S904S e correlação com idade de início. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2004;48(3):S244.
38. Suh Y, Cantor C. Single nucleotide polymorphisms (SNPs): detection, interpretation, and application. *Mutat Res* 2005;573(1-2):1-2.
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):1104-9.
40. Yip L, Cote GJ, Shapiro SE, et al. Multiple endocrine neoplasia type 2: evaluation of the genotype-phenotype relationship. *Arch Surg* 2003;138(4):409-16; discussion 16.

Tabela1. Seqüência dos *primers* de amplificação do PCR para o *RET*.

	Nome¹ / Seqüência²	Enzima
Exon 13	13F: AACTTGGGCAAGGCGATGCA 13R: AGAACAGGGCTGTATGGAGC	<i>Taq I</i>
Exon 14	14F: AAGACCCAAGCTGCCTGAC 14R: GCTGGGTGCAGAGCCATAT	<i>Alu I</i>
Exon 15	15F: CTCTGCTGGTCACACCAGGC 15R:GGTATCTTTCCTAGGCTTCCC	<i>Rsa I</i>

¹ F e R significam *forward* e *reverse*, respectivamente.

² Seqüência do *primer* representado da extremidade 5' para 3'.

Tabela 2. Características gerais das populações analisadas.

	CMT esporádico (n= 27)	Controles (n=62)	<i>P</i>
Idade (anos)	53,4 ± 11,1	45,5 ± 8,4	
Sexo (% mulheres)	17 (63,0%)	30 (48,4%)	0,21
Etnia (% caucasóides)	26 (96,3%)	62 (100%)	0,30

Tabela 3. Frequência alélica dos polimorfismos do *RET*.

Exon	Substituição de nucleotídeo	Alelos testados CMT	Frequência alélica¹ CMT esporádico (%)	Frequência alélica¹ controles (%)	P
13	CTT→CTG L769L	54	37	24	0,10
14	AGC→AGT S836S	54	9	3	0,13
15	TCC→TCG S904S	52	19	21	0,84

¹ Frequência do alelo variante.

Tabela 4. Frequência genotípica dos polimorfismos do *RET*.

	CMT esporádico (%)	Controles (%)	<i>P</i>
Exon 13 (TG/GG)	61,3	38,7	0,04
Exon 14 (CT/TT)	18,5	6,5	0,12
Exon 15 (CG/GG)	34,6	38,7	0,81

Tabela 5. Idade e TNM dos pacientes com CMT esporádico de acordo ao polimorfismo analisado.

	L769L¹		S836S²		S904S³	
	TG/GG (n= 17)	TT (n= 09)	CT/TT (n= 05)	CC (n= 21)	CG/GG (n= 09)	CC (n= 16)
Idade (anos)	51,5 ± 10,3	57,0 ± 11,6	47,0 ± 10,6	54,9 ± 10,6	53,2 ± 9,6	54,2 ± 11,8
	P= 0,25		P= 0,18		P= 0,82	
TNM (%)						
II	12,5	50,0	20,0	26,3	37,5	20,0
III	50,0	25,0	20,0	47,4	37,5	40,0
IV	37,5	25,0	60,0	26,3	25,0	40,0
	P= 0,21		P= 0,46		P= 0,75	

¹ Troca nucleotídica silenciosa de leucina no códon 769 (CTT→CTG).

² Troca nucleotídica silenciosa de serina no códon 836 (AGC→AGT).

³ Troca nucleotídica silenciosa de serina no códon 904 (TCC→TCG).

Tabela 6. Características dos pacientes com CMT hereditário segundo os polimorfismos analisados.

	L769L¹		S836S²		S904S³	
	TG/GG (n= 20)	TT (n= 28)	CT/TT (n= 6)	CC (n= 42)	CG/GG (n= 14)	CC (n= 34)
Idade (anos)	30,7 ± 11,7	33,2 ± 14,7	26,4 ± 11,7	33,0 ± 11,7	26,1 ± 10,2	34,7 ± 13,9
	<i>P</i> = 0,51		<i>P</i> = 0,24		<i>P</i> = 0,02	
Sexo (% mulheres)	55,0	67,9	50,0	64,3	71,4	58,8
	<i>P</i> = 0,38		<i>P</i> = 0,66		<i>P</i> = 0,52	
FEO (%)	60,0	25,0	50,0	38,1	35,7	41,2
	<i>P</i> = 0,02		<i>P</i> = 0,67		<i>P</i> = 0,73	
HPT (%)	30,0	17,9	16,7	23,8	14,3	26,5
	<i>P</i> = 0,49		<i>P</i> = 1,00		<i>P</i> = 0,47	
N1 (%)	55,0	42,9	50,0	47,6	35,7	52,9
	<i>P</i> = 0,56		<i>P</i> = 1,00		<i>P</i> = 0,35	
M1 (%)	25,0	14,3	16,7	19,0	28,6	14,7
	<i>P</i> = 0,46		<i>P</i> = 1,00		<i>P</i> = 0,42	

¹ Troca nucleotídica silenciosa de leucina no códon 769 (CTT→CTG).

² Troca nucleotídica silenciosa de serina no códon 836 (AGC→AGT).

³ Troca nucleotídica silenciosa de serina no códon 904 (TCC→TCG).