

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: ENDOCRINOLOGIA**

**EFEITO ADITIVO DOS POLIMORFISMOS DO PROTO-ONCOGENE *RET* NA  
SUSCETIBILIDADE E AGRESSIVIDADE TUMORAL NO CARCINOMA  
MEDULAR DE TIREÓIDE ESPORÁDICO**

**LUCIELI CEOLIN**

**Porto Alegre, abril de 2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: ENDOCRINOLOGIA**

**EFEITO ADITIVO DOS POLIMORFISMOS DO PROTO-ONCOGENE *RET* NA  
SUSCETIBILIDADE PARA O CARCINOMA MEDULAR DE TIREÓIDE  
ESPORÁDICO E AGRESSIVIDADE TUMORAL**

**LUCIELI CEOLIN**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação  
em Ciências Médicas: Endocrinologia, UFRGS como  
requisito parcial para obtenção do grau de Mestre

**Orientadora: Profa. Dra. Ana Luiza Maia**

**Porto Alegre, abril de 2010**

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Luiza Maia, pelos ensinamentos e pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

A todos os amigos e colegas do Grupo de Tireóide. Principalmente as colegas: Clara Capp, Debora Siqueira, Simone Wajner e ao colega Leonardo Leiria, pelo apoio, amizade, compreensão e agradável convívio.

A minha grande amiga Mirian Romitti, pela amizade, colaboração e pelas palavras de conforto nos momentos de apuro.

As bolsistas e amigas Carla Vaz e Silvana Maia, pela dedicação e ajuda na rotina do laboratório.

A todos os amigos e amigas, cuja paciência apoio e compreensão contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu namorado Rodrigo Casaroli, por toda a compreensão, carinho e estímulo principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Nicanor e Marlene Ceolin, pela dedicação e constante incentivo ao desenvolvimento intelectual de seus filhos.

Aos meus irmãos Gustavo e Silvana, por toda a alegria e força, mesmo que muitas vezes à distância.

A todas as pessoas e instituições que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desta dissertação.

Esta Dissertação de Mestrado segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Metabolismo e Nutrição, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo apresentada na forma de dois manuscritos sobre o tema da Dissertação:

- Artigo de revisão geral do tema;
- Artigo original referente ao trabalho de pesquisa propriamente dito; encaminhado para publicação em jornal científico de circulação internacional.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CLA – Líquen amilóide cutâneo

CMT – Carcinoma Medular de Tireóide

CMTF – Carcinoma Medular e Tireóide Familiar

GFL – Ligante da Família GNDF

GFR $\alpha$  - Receptores da família GNDF

GNDF – Fator Neutrófico Derivado das células da Glía

NEM – Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo

NEM 2 A – Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 2A

NEM 2B – Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 2B

NIH-3T3 – Linhagem celular de fibroblastos murinos

*RET* (REarranged during Transfection) – Proto-oncogene *RET*

SNP – Polimorfismos de nucleotídeo único

TK1 – Domínio intracelular da proteína RET rico em resíduos tirosino-quinase

TK2 – Domínio intracelular da proteína RET rico em resíduos tirosino-quinase

# SUMÁRIO

## PARTE I - BASES MOLECULARES DO CARCINOMA MEDULAR DE TIREÓIDE

Resumo .....	9
Introdução .....	10
Carcinoma Medula de Tireóide.....	11
Patogênese do Carcinoma Medular de Tireóide.....	12
Papel dos Polimorfismos no CMT .....	16

## PARTE II - ADDITIVE EFFECT OF THE *RET* POLYMORPHISMS IN SPORADIC MEDULLARY THYROID CARCINOMA SUSCETIBILITY AND TUMOR AGGRESSIVENESS

Abstract.....	28
Introduction .....	29
Materials and Methods .....	30
Results .....	32
Discussion .....	33

## **PARTE I**

### **BASES MOLECULARES DO CARCINOMA MEDULAR DE TIREÓIDE**

## **BASES MOLECULARES DO CARCINOMA MEDULAR DE TIREÓIDE**

Lucieli Ceolin, Debora Rodrigues Siqueira, Mírian Romitti, Ana Luiza Maia

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

Título abreviado: Carcinoma Medular de Tireóide

Palavras-chave: Carcinoma Medular de Tireóide, polimorfismos, *RET*

Correspondência: Dra. Ana Luiza Maia  
Serviço de Endocrinologia  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Rua Ramiro Barcelos, 2350  
CEP 90035-003 – Porto Alegre, RS, Brasil  
Telefone: 55- 51- 33310207  
E-mail: almaia@ufrgs.br



## RESUMO

O Carcinoma Medular de Tireóide (CMT) é um tumor maligno raro com origem nas células C ou parafoliculares tireoidianas. Esse carcinoma representa 5 a 10% dos tumores dessa glândula e pode se apresentar de duas formas distintas: na maioria dos pacientes (75 a 80%) ocorre de forma esporádica, mas também pode ocorrer como uma doença autossômica dominante (20-25%), fazendo parte de três síndromes clínicas distintas - neoplasia endócrina múltipla (NEM) 2A, 2B ou CMT familiar. Estudos genético-moleculares realizados nos últimos anos têm demonstrado o envolvimento do proto-oncogene *RET* na maioria das formas hereditárias de CMT e, em menor frequência, na sua forma esporádica. Desde a identificação desse proto-oncogene, o conhecimento sobre a patogênese do CMT e neoplasias associadas tem avançado muito. Contudo, particularidades da doença, como a heterogeneidade clínica observada em indivíduos portadores da mesma mutação, ainda são pouco compreendidas. Nos últimos anos, diversos autores têm investigado se a presença de sequências variantes ou polimorfismos poderiam estar associados à suscetibilidade para o desenvolvimento do CMT ou modificações na sua evolução. Muitos desses estudos descreveram uma prevalência aumentada dos polimorfismos do proto-oncogene *RET* em indivíduos com CMT, porém, outros estudos não conseguiram confirmar esses resultados. Os resultados referentes à atuação desses polimorfismos no desenvolvimento ou evolução do CMT são ainda bastante conflitantes, visto que diferenças na etnia podem ser uma das causas para os diferentes resultados descritos e que diferentes atributos genéticos podem conferir proteção ou risco para o desenvolvimento do câncer em populações de ancestralidades diferentes.

## INTRODUÇÃO

O Carcinoma Medular de Tireóide (CMT) é um tumor maligno raro com origem nas células C ou parafoliculares tireoidianas. Esse carcinoma representa 5 a 10% de todos os tumores dessa glândula, tendo como principal produto secretório a calcitonina (Kebebew and Clark 2000; Pacini, et al. 2010). O CMT foi inicialmente identificado por Hazard e colaboradores (Hazard, et al. 1959) e pode se apresentar na forma esporádica ou na forma hereditária. A forma esporádica é a mais frequente, sendo responsável por aproximadamente 75 a 80% dos casos. O restante (20-25%) corresponde à forma hereditária (Eng 1999; Pacini et al. 2010; Pinales, et al. 2004).

A forma hereditária esta associada a mutações germinativas no proto-oncogene *RET* (*REarranged during Transfection*), apresentando-se como uma doença autossômica dominante com alto grau de penetrância e variabilidade de expressão, podendo fazer parte de três síndromes clínicas distintas dependendo dos órgãos envolvidos: Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 2A (NEM 2A), 2B (NEM 2B) e Carcinoma Medular de Tireóide Familiar (CMTF) (Mulligan, et al. 1995; Pinales et al. 2004).

Os processos moleculares envolvidos no desenvolvimento do CMT esporádico permanecem pouco compreendidos. Cerca de 50 – 80% dos casos apresentam a mutação somática M918T, no proto-oncogene *RET* (Eng, et al. 1996b; Eng, et al. 1998; Romei, et al. 1996; Siqueira, et al. 2010). Essa mutação não parece ser uniforme entre as várias subpopulações de células dentro do mesmo tumor ou das metástases, sugerindo que o CMT esporádico possa ter uma origem policlonal ou que as mutações no proto-oncogene *RET* não sejam eventos iniciais na tumorigênese desse carcinoma (Eng et al. 1996b; Romei et al. 1996).

No presente artigo revisamos os avanços no conhecimento da patogênese do Carcinoma Medular de Tireóide nas suas diferentes formas, hereditário e esporádico. Também analisamos criticamente resultados descritos na literatura sobre o papel dos polimorfismos do proto-oncogene *RET* na apresentação clínica e prognóstico do CMT.

## **CARCINOMA MEDULA DE TIREÓIDE**

### **Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 2A**

Constitui aproximadamente 70 a 80% dos casos de NEM tipo 2 (Eng, et al. 1996a; Kloos, et al. 2009). A síndrome genética NEM 2A caracteriza-se pela presença de CMT (95%), feocromocitoma (30–50%) e hiperparatireoidismo (10–20%) (Hansford and Mulligan 2000; Maia, et al. 2005). A doença adrenomedular é usualmente multicêntrica e bilateral, geralmente detectada após o aparecimento de CMT e com taxa de malignidade inferior a 10% (Eng et al. 1996a; Mulligan, et al. 1993b; Mulligan et al. 1995). Outras associações raras da NEM 2A incluem a associação com uma lesão pruriginosa da região escapular caracterizada pela deposição de amilóide, conhecida como líquen amilóide cutâneo (CLA) e a doença de Hirschsprung (Eng et al. 1996a; Gagel, et al. 1989).

### **Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 2B**

A síndrome NEM 2B representa cerca de 5% dos casos de NEM tipo 2 e possui um fenótipo bastante agressivo (Kloos et al. 2009). Caracteriza-se pela presença de CMT (90%), feocromocitoma (45%), ganglioneuromatose (100%) e hábitos marfanóides (65%) (Eng et al. 1996a; Mulligan et al. 1995). Essa síndrome caracteriza-se por um fenótipo único, que inclui ganglioneuromatose difusa da língua, lábios, olhos e do trato gastrointestinal. As características da face podem ser precocemente reconhecidas durante a infância (neuromas da mucosa). O envolvimento gastrointestinal pode causar diarreia e constipação intermitente, dor abdominal, megacólon e, ocasionalmente, obstrução intestinal. Outro aspecto fenotípico da NEM 2B é o hábito marfanóide com dedos e extremidades longas, hiperextensão de articulações e anormalidades epifisárias (Eng et al. 1996a; Eng, et al. 1994; Mulligan et al. 1995).

### **Carcinoma Medular de Tireóide Familiar**

O CMTF constitui aproximadamente 10 a 20% dos casos de NEM2. Consiste na manifestação de CMT isolado (ausência de feocromocitoma e hiperparatireoidismo) em duas ou mais gerações da mesma família ou identificação de mutações relacionadas ao CMTF (Kloos et al. 2009). Nesse caso, a apresentação clínica do CMT é mais tardia e o prognóstico mais favorável, quando comparado com as outras formas de apresentação do CMT (Pacini et al. 2010).

## **Carcinoma Medular de Tireóide Esporádico**

Na forma esporádica, o CMT geralmente se apresenta como um tumor unifocal, cujo diagnóstico ocorre tardiamente, na quinta ou sexta década de vida (Heshmati, et al. 1997). Pacientes com CMT esporádico usualmente apresentam nódulo tireoidiano palpável, indistinguível de qualquer outro nódulo tireoidiano. Metástases em linfonodos são detectadas em pelo menos 50% desses pacientes, podendo dessa forma revelar a doença. Metástases à distância ocorrem em torno de 10 a 20% dos casos (Pacini et al. 2010).

## **PATOGÊNESE DO CARCINOMA MEDULAR DE TIREÓIDE**

Estudos genético-moleculares realizados nos últimos anos têm demonstrado o envolvimento do proto-oncogene *RET* na maioria das formas hereditárias de CMT e, em menor frequência, em sua forma esporádica. O proto-oncogene *RET* foi identificado em 1985 por Takahashi e cols. durante um experimento clássico de transfecção de células NIH 3T3 com DNA de alto peso molecular de células T de linfoma humano (Takahashi, et al. 1985). Estudos posteriores determinaram a localização do *RET* no cromossomo 10 e o relacionaram à gênese da NEM 2A, NEM 2B e CMTF (Ishizaka, et al. 1989; Takahashi, et al. 1989). Em 1993, observou-se pela primeira vez mutações pontuais genômicas no proto-oncogene *RET* de pacientes com NEM 2A e CMTF (Donis-Keller, et al. 1993; Mulligan et al. 1993b), e em 1994, foram evidenciadas mutações no proto-oncogene *RET* associadas à NEM 2B e ao CMT na sua forma esporádica (Hofstra, et al. 1994).

O proto-oncogene *RET* codifica um receptor de membrana do tipo tirosino-quinase, expresso nas células derivadas da crista neural, incluindo tumores neuroendócrinos originados dessas células (de Groot, et al. 2006; Schlumberger, et al. 2008). Sendo um receptor de membrana, a proteína RET é constituída por três domínios: um domínio extracelular; um domínio transmembrana e uma porção intracelular contendo dois domínios tirosino-quinase (TK1 e TK2) (Eng 1999; Hansford and Mulligan 2000). O domínio extracelular inclui regiões homólogas à família caderina das moléculas de adesão celular e uma grande região rica em resíduos de cisteína, que realiza transdução de sinais extracelulares de proliferação, crescimento, diferenciação, migração, sobrevivência e apoptose celular. O domínio intracelular é dividido em 2 subdomínios tirosino-quinase (TK1 e TK2), separados por 28 aminoácidos. Nesses subdomínios estão localizados os resíduos de tirosina que são fosforilados durante a ativação do receptor, e que estão envolvidos na ativação das vias intracelulares sinalizadoras. O domínio extracelular e o transmembrana são codificados pelos éxons 1-11, enquanto os éxons 12-21 codificam o domínio intracelular (Eng 1999; Hansford and Mulligan 2000).

## Ativação da proteína RET

Em condições normais, a ativação de RET depende da interação de co-receptores GFR $\alpha$  (GDNF Family Receptor  $\alpha$ ) e seus respectivos ligantes, proteínas da família do fator de crescimento neurotrófico derivado de células da glia – GDNF (Glial cell line Derived Neurotrophic). O complexo GFR $\alpha$ -ligante, juntamente com a porção extracelular de RET, promove a autofosforilação dos resíduos de tirosina na porção intracelular da molécula (de Groot et al. 2006).

Embora os receptores GFR $\alpha$  encontrem-se usualmente ancorados à membrana plasmática, eles também se apresentam na forma solúvel, podendo então ativar RET de duas formas distintas: *cis* ou *trans* (figura 1). A ativação em *cis* se dá quando o co-receptor (GFL) se liga ao GFR $\alpha$  ancorado em uma plataforma lipídica e, posteriormente, esse complexo promove a aproximação de duas moléculas de RET através da plataforma lipídica, permitindo a fosforilação dos resíduos de tirosina intracelulares.

Já o modelo de ativação em *trans* sugere que o GFL possa se ligar a forma solúvel de GFR $\alpha$ , estimulando a dimerização de RET fora da plataforma lipídica, permitindo assim sua ativação (de Groot et al. 2006).

Uma vez ativado, RET participa de diferentes cascatas intracelulares, envolvendo a regulação de processos

como diferenciação, sobrevivência, proliferação, migração e quimiotaxia celular.

O mecanismo molecular pelo qual as mutações no proto-oncogene RET desencadeiam o processo neoplásico foi determinado através de elegantes estudos *in vitro* realizados pelo grupo de Santoro e cols (Santoro, et al. 1999; Santoro, et al. 1995). De modo simplificado, no indivíduo normal a proteína RET somente é ativada na presença do GDNF, que ao se ligar ao receptor GFR $\alpha$ , promove a sua dimerização e autofosforilação das cascatas de sinalização intracelulares (de Groot et al. 2006; Ponder 1999). A presença de mutação no domínio extracelular, por exemplo, no códon 634, induz a dimerização de RET mesmo na ausência do ligante, com conseqüente ativação constitutiva

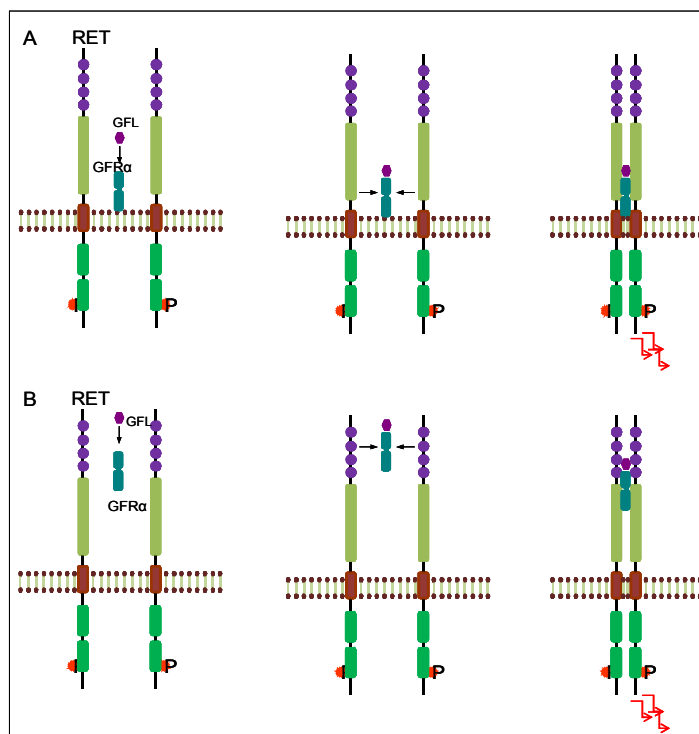


Figura 1. Modelos de ativação de RET. A) ativação de RET em *cis*: GFL liga-se ao GFR $\alpha$  que se encontra ancorado na membrana plasmática, permitindo a dimerização de RET e sinalização intracelular. B) Ativação de RET em *trans*: GFL liga-se a forma solúvel de GFR $\alpha$ , aproximando os monômeros de RET, favorecendo sua dimerização e fosforilação.

das vias de sinalização intracelulares (figura 2a). Mutações no domínio intracelular tirosino-quinase (códono 918), não interferem na dimerização do receptor, mas induzem a um aumento da fosforilação, mesmo na ausência da dimerização da proteína, resultando também na ativação constitutiva das vias de sinalização (figura 2b) (de Groot et al. 2006; Ponder 1999). A ativação de RET é responsável pelo processo de transformação neoplásica nos tecidos onde é expresso, células C da tireóide, cromafins e da paratireóide. Entretanto, parece representar apenas um passo inicial na via oncogênica (Ponder 1999). Evidências moleculares de outras anormalidades cromossômicas sugerem que eventos citogenéticos adicionais estão, provavelmente, envolvidos na progressão para a malignidade (Eng et al. 1996b).

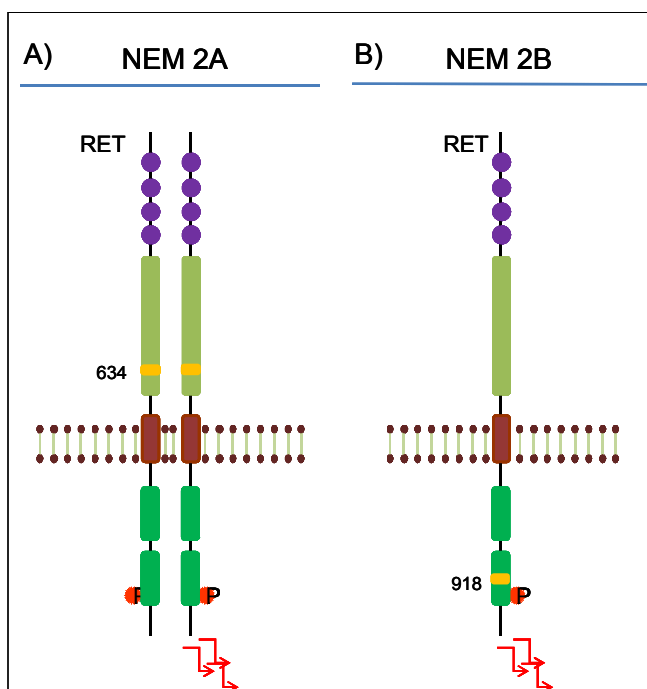


Figura 2. Mecanismo de ativação da proteína RET mutada. A) mutações no domínio extracelular: desencadeiam a ativação de RET independente da interação ligante-receptor. B) mutações no domínio intracelular: desencadeiam a ativação de RET independente da interação ligante –receptor e da dimerização do receptor.

### **Mutações em RET e Manifestações Clínicas**

Mutações germinativas no proto-oncogene *RET* estão associadas às síndromes clínicas de NEM tipos 2A e 2B, e ao CMTF. Foram descritas nesse gene, mutações localizadas principalmente nos éxons 10, 11 e 16. No entanto, mutações com menor frequência também ocorrem nos éxons 8, 13, 14 e 15 (Mulligan, et al. 1994; Punales, et al. 2003). Em humanos essas mutações afetam essencialmente quatro tipos de tecidos, todos derivados das células da crista neural: células C tireoidianas, células das paratireóides, células cromafins da medula adrenal e plexo autonômico entérico. Mutações do tipo *missense*, originárias da linhagem germinativa celular, são as responsáveis pela NEM 2 (Maia et al. 2005; Ponder 1999).

A maioria das famílias com NEM 2A (mais de 90%), apresentam mutações pontuais no proto-oncogene *RET* (tipo *missense*), envolvendo um dos 5 códons codificadores de resíduos de cisteína localizados no domínio extracelular do receptor. Os códons envolvidos são: 609, 611, 618 e

620 no éxon 10 e 634 no éxon 11 (Boikos and Stratakis 2008; Mulligan et al. 1994; Piolat, et al. 2006; Punaes, et al. 2002; Santos, et al. 2006), sendo que as presentes no códon 634 são as mais freqüentes, representando mais de 60% de todos os carcinomas medulares de tireóide identificados geneticamente e mais de 90% das mutações em NEM 2 (Piolat et al. 2006).

A NEM 2B é causada, em aproximadamente 95% dos casos, por uma mutação específica no códon 918 (éxon 16), resultando na troca de um resíduo de metionina por um de treonina no domínio intracelular tirosino-quinase de RET. Mutações nos códons 804, 806 e 904 (éxon 14) e no códon 883 (éxon 15) também têm sido descritas em um pequeno número de pacientes com essa síndrome (Magalhães, et al. 2003; Punaes et al. 2004).

No CMTF, substituições nos códons 609, 611, 618, 620 e 634 dos éxons 10 e 11 são encontradas em mais de 80% das famílias. A mutação mais freqüente na NEM 2A (C634R) não foi descrita em famílias de CMTF (Magalhães et al. 2003; Maia et al. 2005).

Alguns estudos sugerem uma correlação entre o genótipo e o fenótipo encontrados, podendo existir uma variabilidade grande de síndromes clínicas associadas às diferentes mutações, ou seja, indivíduos com um determinado tipo de mutação têm uma probabilidade maior ou menor de apresentar um determinado componente da síndrome (Punaes et al. 2002; Punaes et al. 2004). Alguns autores têm sugerido uma classificação de risco de acordo com a localização das mutações, sendo que os códons 634 e 918 seriam considerados de elevado risco de transformação neoplásica (Machens, et al. 2003). Cirurgia profilática é sugerida até os cinco anos de idade, para portadores de mutação no códon 634, e até o primeiro ano de vida para portadores de mutação no códon 918 (Kloos et al. 2009).

Uma associação estatisticamente significativa foi encontrada entre a presença de qualquer mutação no códon 634 e a presença de feocromocitoma e hiperparatireoidismo (Frank-Raue, et al. 1996). Dentre as mutações do códon 634, a mutação C634R foi significativamente associada com a presença de hiperparatireoidismo. Indivíduos com essa mesma mutação também apresentaram, além de todas as manifestações clínicas clássicas da NEM 2A, o raro líquen amilóide cutâneo (Punaes et al. 2003).

Outros estudos demonstram que mutações germinativas no códon 634, éxon11 do proto-oncogene *RET* é a causa mais comum de CMT em crianças (Piolat et al. 2006). Um estudo multicêntrico realizado em 1996 demonstrou que as mutações C634R e C634Y do éxon 11 ocorrem em, respectivamente, 52 e 26% das famílias com NEM 2A (Eng et al. 1996a).

Estudos moleculares recentes, realizados com indivíduos brasileiros, também encontraram uma íntima associação entre NEM 2A e mutações no éxon 11 do proto-oncogene *RET*, acometendo principalmente o códon 634 (Punales, et al. 2008; Punales et al. 2003). Em estudo realizado em nosso serviço, observamos que pacientes com mutações no códon 634, consideradas de alto risco, também apresentam uma grande heterogeneidade clínica da NEM 2A. Nesse estudo, 92% (47 indivíduos) da amostra apresentavam mutação no códon 634. Nesse grupo, foram identificados três tipos de trocas de aminoácidos: C634W, C634Y e C634R. A idade de acometimento do CMT foi similar entre os três genótipos. A presença de metástases em linfonodos regionais foi maior no genótipo C634R, embora não tenha alcançado significância estatística. No entanto, o genótipo C634R apresentou significativamente mais metástases à distância ao diagnóstico do que os grupos C634W e C634Y, sugerindo então que mutações específicas podem alterar a evolução natural da doença. (Punales et al. 2002, Punales et al.2003). Mutações somáticas nos éxons 11 e 16 do proto-oncogene *RET* são freqüentemente encontrados em CMT esporádico e correlacionados com um mau prognóstico (Romei et al. 1996).

## **PAPEL DOS POLIMORFISMOS NO CMT**

Desde a identificação do *RET* como gene causador do CMT hereditário, o conhecimento sobre a patogênese do CMT e neoplasias associadas tem avançado muito (Donis-Keller et al. 1993; Mulligan, et al. 1993a; Santoro et al. 1999). Contudo, particularidades da doença, como a heterogeneidade clínica observada em indivíduos portadores da mesma mutação, ainda são pouco compreendidas (Punales et al. 2003; Robledo, et al. 2003; Wiench, et al. 2001). Em relação ao CMT esporádico o quadro é um pouco mais obscuro, pois mutações somáticas no proto-oncogene *RET* são descritas em apenas 50 a 80% dos casos (Eng and Mulligan 1997; Siqueira et al. 2010; Wiench et al. 2001) e parecem não ocorrer de modo uniforme entre as várias subpopulações de células dentro de um mesmo tumor ou de suas metástases (Eng et al. 1996b; Gimm, et al. 1999; Marsh, et al. 1996).

Nos últimos anos, diversos autores têm investigado se a presença de sequências variantes ou polimorfismos poderiam estar associados à susceptibilidade para o desenvolvimento do CMT ou modificação da sua evolução. Esses estudos descreveram uma prevalência aumentada dos polimorfismos G691S (éxon 11, GlyGGT→SerAGT), L769L (éxon 13, LeuCTT→LeuCTG), S836S (éxon 14, SerAGC→SerAGT), e S904S (éxon 15, SerTCC→SerTCG) do proto-oncogene *RET* em indivíduos com CMT hereditário e esporádico (Elisei, et al. 2004; Gimm et al. 1999; Robledo et al.



2003; Rocha, et al. 2007; Siqueira et al. 2010). A seguir apresentaremos os principais aspectos relacionados com polimorfismos e susceptibilidade ao desenvolvimento do CMT.

### **Polimorfismo L769L**

Em 2001, o estudo de Wiench e colaboradores verificou que o polimorfismo L769L (éxon 13) estava significativamente associado à presença de CMT em indivíduos mais jovens. Pacientes com CMT esporádico e idade menor que 30 anos apresentaram uma frequência maior do alelo variante quando comparados àqueles com doença diagnosticada entre 31 – 45 anos (36% vs 15%). No entanto, a ausência de um grupo controle diminuiu a relevância dessa observação (Wiench et al. 2001).

Em nosso meio, Magalhães e cols., estudando uma pequena série de pacientes, observaram que uma paciente com o diagnóstico presumido de CMT esporádico apresentava a mutação V804M (éxon 14) associada ao polimorfismo L769L (éxon 13), o que modificou seu diagnóstico para CMT familiar. A mutação V804M é rara e está associada ao CMTF de aparecimento tardio e menor agressividade. Essa paciente, ao contrário do que usualmente ocorre, teve seu diagnóstico estabelecido aos 32 anos, quando extensas metástases ganglionares foram detectadas. Sua mãe, aos 60 anos, era assintomática e ao ser submetida ao rastreamento, teve apenas a mutação V804M detectada (sem a presença do polimorfismo L769L), e um tumor de 4 mm. Sugerindo que o polimorfismo L769L do protooncogene *RET* pode estar relacionado com uma idade mais adiantada de início da doença em pacientes com a mutação V804M (Magalhães, et al. 2004).

Em 2005, Baumgartner-Parzer e cols verificaram que um polimorfismo do íntron 14 (IVS14-24, seqüência variante distante 24 nucleotídeos do início do éxon 15 apresentou uma maior frequência 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 (F769Y). Os autores sugerem que a presença desse polimorfismo poderia levar à ocorrência da mutação F769Y *de novo* ou estar modulando o fenótipo da doença; no entanto, pelo número limitado de indivíduos analisados, as conclusões são, no momento, meramente especulativas (Baumgartner-Parzer, et al. 2005).

Sromek e colaboradores, em 2010, compararam a frequência dos polimorfismos L769L, S836S, e S904S entre pacientes com CMT esporádico e uma amostra da população. Uma diferença significativa foi encontrada na frequência do polimorfismo L769L nos pacientes com CMT, quando

comparados com a população não afetada. Esse estudo também demonstra que a presença do polimorfismo L769L predispõe ao desenvolvimento de CMT e a uma idade precoce de desenvolvimento do CMT, quando ocorre em homozigose (Sromek, et al. 2010).

### **Polimorfismo S836S**

Gimm e colaboradores, em 1999, avaliaram a frequência da variante genética S836S (éxon 14) em pacientes norte-americanos e germânicos. Esse foi o primeiro estudo a identificar uma correlação entre os polimorfismos do *RET* e o CMT. Nesse trabalho os autores observaram uma frequência significativamente maior do alelo variante no grupo com CMT (9,0% vs 3,6%) (Gimm et al. 1999). Mais tarde, Ruiz e colaboradores confirmaram esses achados em uma população de origem espanhola, encontrando um risco 2 a 3 vezes maior para o desenvolvimento da neoplasia quando a sequência variante S836S estava presente (Ruiz, et al. 2001).

Este ano, um trabalho do nosso grupo investigou a influência das variantes neutras do *RET* (G691S, L769L, S836S e S904S) na apresentação clínica da doença em pacientes com CMT hereditário ou esporádico. Nesse estudo, nossos dados indicaram que a variante S836S está associada com início precoce da doença e um risco aumentado para o desenvolvimento de doença metastática em pacientes com CMT hereditário ou esporádico (Siqueira et al. 2010).

### **Polimorfismo S904S**

Outro tema abordado em alguns estudos é a co-segregação de variantes genéticas no *RET*. Robledo e colaboradores, em 2003, encontraram uma forte co-segregação entre os polimorfismos G691S (éxon 11) e S904S (éxon 15), sugerindo que esses polimorfismos estão em forte desequilíbrio de ligação. Demonstraram também que o haplótipo G691S/S904S na forma homozigótica foi mais prevalente em pacientes com NEM 2A comparados ao grupo controle, sugerindo um papel como gene de baixa penetrância para essa variante. Esse estudo também observou que essa variante (G691S/S904S) pode modificar a idade de acometimento do CMT em pacientes com a doença (Robledo et al. 2003). No entanto, esses dados não foram replicados por um estudo posterior desenvolvido por Lesueur e colaboradores, que avaliaram o efeito desse haplótipo em uma população de origem européia (Lesueur, et al. 2006).

Elisei e colaboradores (2004) também observaram que os polimorfismos G691S e S904S apresentavam a tendência de segregar juntos. Nesse estudo, realizado em uma população italiana, os

autores constataram que a frequência do polimorfismo G691S era maior nos pacientes com CMT esporádico em relação aos controles (27,8% vs 18,9%). Entretanto, uma influência desse polimorfismo sobre a expressão do mRNA do *RET* foi descartada (Elisei et al. 2004).

Em outro estudo realizado por Cebrian e colaboradores (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 nos éxons 11 (G691S), 15 (S904S) e 19 (STOP+388bp). De outro modo, o polimorfismo sinônimo no éxon 2 (GCG→GCA), que codifica uma alanina (A45A), ocorreu em uma menor frequência entre os casos de CMT e, segundo os autores, poderia representar um alelo protetor contra o desenvolvimento do CMT (Cebrian, et al. 2005).

### **Outros Polimorfismos**

Recentemente, foram identificadas outras duas variantes do *RET* (IVS1–126G > T e IVS8 +82A > G; 85–86 insC), que foram associadas à variabilidade fenotípica em pacientes portadores da mutação G533C. Nesse estudo, os autores encontraram uma associação entre a variante IVS1–126G > T e idade ao diagnóstico do CMT. Já a variante [82 IVS8 A> G; InsC 85-86] foi associada com a presença de metástases linfonodais no momento do diagnóstico. Análises *in silico* sugerem que esta variante possa induzir *splicing* anormal. Postulando que a variante [82 IVS8 A> G; 85-86 InsC] poderia interromper e/ou criar um sítio exônico de *splicing*, levando assim a síntese de uma proteína alterada (Tamanaha, et al. 2009).

Por outro lado, outros estudos não demonstraram diferenças quanto à presença dos polimorfismos entre pacientes com CMT esporádico e controles. Berard e colaboradores 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 (Berard, et al. 2004). Na América Latina, Wohllk e colaboradores 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 (Wohllk, et al. 2005a). Nosso grupo, quando investigou a influência das variantes neutras do *RET* (G691S, L769L, S836S e S904S) na apresentação clínica de pacientes com CMT hereditário, também não encontrou associação significativa com esses polimorfismos e características como feocromocitoma, hiperparatireoidismo e metástase local (Siqueira et al. 2010).

As bases moleculares envolvidas no desenvolvimento do CMT hereditário já estão bem definidas, cerca de 98% dos pacientes apresentam mutações no proto-oncogene *RET* (Pacini et al. 2010). Porém, quanto ao desenvolvimento do CMT esporádico os dados são mais controversos. Mutações somáticas são encontradas em aproximadamente 50% dos indivíduos afetados, e se distribuem de forma não uniforme entre as varias subpopulações de células dentro de um mesmo tumor ou de suas metástases. Por isso, acredita-se que variantes polimórficas possam desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento dessa forma de neoplasia (Eng and Mulligan 1997; Siqueira et al. 2010).

Até o momento, não se conhece o mecanismo preciso que explique como os polimorfismos desempenham seus efeitos sobre o desenvolvimento ou a evolução do CMT. Um dos mecanismos propostos é que o polimorfismo poderia influenciar a estabilidade do RNA mensageiro (mRNA). Porém, estudos quantitativos no mRNA no tecido tumoral de indivíduos com CMT não demonstraram diferença na expressão desse gene em pacientes com e sem polimorfismo (Elisei et al. 2004). Outra hipótese é que a troca de bases na molécula de DNA poderia interromper e/ou criar um sítio de *splicing*, levando a síntese de uma proteína alterada, ou então, que o nucleotídeo modificado esteja em desequilíbrio de ligação com uma variante funcional ainda não conhecida (Gimm et al. 1999; Tamanaha et al. 2009). Além disso, nos polimorfismos que promovem a substituição de aminoácidos, pode se supor que a modificação tenha um efeito cooperativo na dimerização da proteína *RET* ou forme um novo sítio de fosforilação no domínio tirosino-kinase (Robledo et al. 2003).

## **CONCLUSÃO**

Em resumo, os resultados referentes à atuação de polimorfismos no desenvolvimento ou evolução do CMT são ainda bastante conflitantes. As hipóteses propostas incluem diversas possibilidades, como alterações na estabilidade do RNAm, alterações no sítio de *splicing* e efeitos sobre a dimerização da proteína *RET*. Além disso, diferenças populacionais 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.

**Tabela 1. Papel dos Polimorfismos no Desenvolvimento e Progressão CMT**

Autor	Tamanho Amostral	SNPs	Tipo de neoplasia	Conclusão
<b>Gimm (1999)</b>	50	L769L S836S S904S/G691S*	Esporádico	Polimorfismo S836S (c.2439C4T) mais frequentes em pacientes com CMT. Não foi encontrada associação com outros polimorfismos.
<b>Ruiz (2001)</b>	32	S836S	Esporádico	Risco 2 a 3 vezes maior para o desenvolvimento de CMT quando a sequência variante S836S está presente
<b>Wiensch (2001)</b>	116	L769L S836S	Esporádico	O polimorfismo L769L está associado à presença de CMT em indivíduos mais jovens.
<b>Robledo (2003)</b>	198	G691S S904S	Hereditário (NEM 2A)	A forma homozigótica foi mais prevalente em pacientes com NEM 2A. Pacientes homozigotos para esse polimorfismo tiveram idade ao diagnóstico menor (10 anos).
<b>Elisei (2004)</b>	106(CMTs) 106(contr)	L769L S836S S904S G691S	Esporádico	Alta frequência do polimorfismo G691S em pacientes com CMT esporádico. Foi excluída influência deste polimorfismo na expressão de mRNA do RET no desenvolvimento de mutações somáticas e germinativas, início precoce do MTC, e desfechos clínicos da doença.
<b>Magalhães (2004)</b>	11	L769L S904S	Hereditário (CMTF)	O polimorfismo L769L pode estar relacionado com uma idade mais adiantada de início do CMT em pacientes com a mutação V804M.
<b>Berard (2004)</b>	92(CMTs) 87(Contr)	L769L S836S	Esporádico	Não foi encontrada diferença na distribuição dos polimorfismos entre os grupos.
<b>Baumgart-Parzer (2005)</b>	22(Esp) 45(Herd)	L769L S836S S904S G691S IVS13_158 IVS14-24	Esporádico e Hereditário (CMTF)	Entre os pacientes com CMTF foi observada uma associação entre a presença do polimorfismo L769L e uma mutação no códon 791 (F791Y). SNPs exônicos não apresentaram diferença entre os grupos. IVS14-24 foi mais prevalente em pacientes com calcitonina elevada e pacientes com CMT esporádico.
<b>Cebrian (2005)</b>	135(CMTs) 533(contr)	L769L S836S S904S G691S A45A A432A IVS19_47 IVS1-126 STOP_95bp STOP_388bp	Esporádico	A presença dos polimorfismos nos éxons 11 (G691S), 15 (S904S) e 19 (STOP+388bp) foi associada com risco de 1,5 a 2,5 vezes para o desenvolvimento de CMT. O estudo também sugere efeito protetor do polimorfismo A45A (NS).
<b>Wohlk (2005)</b>	50(CMTs) 50(contr)	L769L S836S S904S G691S	Esporádico	Não foi encontrada diferença na distribuição dos polimorfismos entre os grupos.
<b>Tamanaha (2008)</b>	77(CMTh) 100(contr)	(IVS1-126G>T) (IVS8 +82A>G; 85-86 insC)	Hereditário	As duas variantes foram associadas à variabilidade fenotípica em pacientes portadores da mutação G533C.
<b>Sromek (2010)</b>	246(CMTs) 420(contr)	L769L S836S S904S	Esporádico	Maior frequência do polimorfismo L169L nos pacientes com CMTs. Presença do polimorfismo L769L predispõe ao desenvolvimento de CMT e a uma idade de desenvolvimento do CMT precoce em pacientes com essa variante em homozigose.
<b>Siqueira (2010)</b>	81(CMTs) 100(CMTh)	L769L S836S S904S G691S	Esporádico e Hereditário	A variante S836S está associada com início precoce da doença e um risco aumentado para o desenvolvimento de doença metastática em pacientes com CMT hereditário ou esporádico.

\* polimorfismos em desequilíbrio de ligação

## REFERÊNCIAS

- Baumgartner-Parzer SM, Lang R, Wagner L, Heinze G, Niederle B, Kaserer K, Waldhausl W & Vierhapper H 2005 Polymorphisms in exon 13 and intron 14 of the RET protooncogene: genetic modifiers of medullary thyroid carcinoma? *J Clin Endocrinol Metab* **90** 6232-6236.
- Berard I, Kraimps JL, Savagner F, Murat A, Renaudin K, Nicolli-Sire P, Bertrand G, Moisan JP & Bezieau S 2004 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* **65** 150-152.
- Boikos SA & Stratakis CA 2008 Molecular mechanisms of medullary thyroid carcinoma: current approaches in diagnosis and treatment. *Histol Histopathol* **23** 109-116.
- Cebrian A, Lesueur F, Martin S, Leyland J, Ahmed S, Luccarini C, Smith PL, Luben R, Whittaker J, Pharoah PD, et al. 2005 Polymorphisms in the initiators of RET (rearranged during transfection) signaling pathway and susceptibility to sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **90** 6268-6274.
- de Groot JW, Links TP, Plukker JT, Lips CJ & Hofstra RM 2006 RET as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocr Rev* **27** 535-560.
- Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, Howe JR, Moley JF, Goodfellow P & Wells SA, Jr. 1993 Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet* **2** 851-856.
- Elisei R, Cosci B, Romei C, Bottici V, Sculli M, Lari R, Barale R, Pacini F & Pinchera A 2004 RET exon 11 (G691S) polymorphism is significantly more frequent in sporadic medullary thyroid carcinoma than in the general population. *J Clin Endocrinol Metab* **89** 3579-3584.
- Eng C 1999 RET proto-oncogene in the development of human cancer. *J Clin Oncol* **17** 380-393.
- Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, van Amstel HK, Lips CJ, Nishisho I, Takai SI, et al. 1996a The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *JAMA* **276** 1575-1579.
- Eng C & Mulligan LM 1997 Mutations of the RET proto-oncogene in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes, related sporadic tumours, and hirschsprung disease. *Hum Mutat* **9** 97-109.
- Eng C, Mulligan LM, Healey CS, Houghton C, Frilling A, Raue F, Thomas GA & Ponder BA 1996b Heterogeneous mutation of the RET proto-oncogene in subpopulations of medullary thyroid carcinoma. *Cancer Res* **56** 2167-2170.
- Eng C, Smith DP, Mulligan LM, Nagai MA, Healey CS, Ponder MA, Gardner E, Scheumann GF, Jackson CE, Tunnacliffe A, et al. 1994 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* **3** 237-241.
- Eng C, Thomas GA, Neuberger DS, Mulligan LM, Healey CS, Houghton C, Frilling A, Raue F, Williams ED & Ponder BA 1998 Mutation of the RET proto-oncogene is correlated with RET immunostaining in subpopulations of cells in sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **83** 4310-4313.

- Frank-Raue K, Hoppner W, Frilling A, Kotzerke J, Dralle H, Haase R, Mann K, Seif F, Kirchner R, Rendl J, et al. 1996 Mutations of the ret protooncogene in German multiple endocrine neoplasia families: relation between genotype and phenotype. German Medullary Thyroid Carcinoma Study Group. *J Clin Endocrinol Metab* **81** 1780-1783.
- Gagel RF, Levy ML, Donovan DT, Alford BR, Wheeler T & Tschen JA 1989 Multiple endocrine neoplasia type 2a associated with cutaneous lichen amyloidosis. *Ann Intern Med* **111** 802-806.
- Gimm O, Neuberg DS, Marsh DJ, Dahia PL, Hoang-Vu C, Raue F, Hinze R, Dralle H & Eng C 1999 Over-representation of a germline RET sequence variant in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma and somatic RET codon 918 mutation. *Oncogene* **18** 1369-1373.
- Hansford JR & Mulligan LM 2000 Multiple endocrine neoplasia type 2 and RET: from neoplasia to neurogenesis. *J Med Genet* **37** 817-827.
- Hazard JB, Hawk WA & Crile G, Jr. 1959 Medullary (solid) carcinoma of the thyroid; a clinicopathologic entity. *J Clin Endocrinol Metab* **19** 152-161.
- Heshmati HM, Gharib H, van Heerden JA & Sizemore GW 1997 Advances and controversies in the diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma. *Am J Med* **103** 60-69.
- Hofstra RM, Landsvater RM, Ceccherini I, Stulp RP, Stelwagen T, Luo Y, Pasini B, Hoppener JW, van Amstel HK, Romeo G, et al. 1994 A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature* **367** 375-376.
- Ishizaka Y, Ochiai M, Tahira T, Sugimura T & Nagao M 1989 Activation of the ret-II oncogene without a sequence encoding a transmembrane domain and transforming activity of two ret-II oncogene products differing in carboxy-termini due to alternative splicing. *Oncogene* **4** 789-794.
- Kebebew E & Clark OH 2000 Medullary thyroid cancer. *Curr Treat Options Oncol* **1** 359-367.
- Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, Moley JF, Pacini F, Ringel MD, Schlumberger M, et al. 2009 Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid* **19** 565-612.
- Lesueur F, Cebrian A, Robledo M, Niccoli-Sire P, Svensson KA, Pinson S, Leyland J, Whittaker J, Pharoah PD & Ponder BA 2006 Polymorphisms in RET and its coreceptors and ligands as genetic modifiers of multiple endocrine neoplasia type 2A. *Cancer Res* **66** 1177-1180.
- Machens A, Niccoli-Sire P, Hoegel J, Frank-Raue K, van Vroonhoven TJ, Roehrer HD, Wahl RA, Lamesch P, Raue F, Conte-Devolx B, et al. 2003 Early malignant progression of hereditary medullary thyroid cancer. *N Engl J Med* **349** 1517-1525.
- Magalhães PK, de Castro M, Elias LL, Soares EG & Maciel LM 2004 Polymorphisms in the RET proto-oncogene and the phenotypic presentation of familial medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* **14** 848-852.
- Magalhães PKR, Castro Md, Elias LLK & Maciel LMZ 2003 Carcinoma Medular de Tireóide: da Definição às Bases Moleculares. *Arq Bras Endocrinol Metab* **47** 515-528.
- Maia AL, Gross JL & Punaes MK 2005 [Multiple endocrine neoplasia type 2]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **49** 725-734.
- Marsh DJ, Learoyd DL, Andrew SD, Krishnan L, Pojer R, Richardson AL, Delbridge L, Eng C & Robinson BG 1996 Somatic mutations in the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* **44** 249-257.

- Mulligan LM, Eng C, Healey CS, Clayton D, Kwok JB, Gardner E, Ponder MA, Frilling A, Jackson CE, Lehnert H, et al. 1994 Specific mutations of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC. *Nat Genet* **6** 70-74.
- Mulligan LM, Gardner E, Smith BA, Mathew CG & Ponder BA 1993a Genetic events in tumour initiation and progression in multiple endocrine neoplasia type 2. *Genes Chromosomes Cancer* **6** 166-177.
- Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, Love DR, Mole SE, Moore JK, Papi L, et al. 1993b Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* **363** 458-460.
- Mulligan LM, Marsh DJ, Robinson BG, Schuffenecker I, Zedenius J, Lips CJ, Gagel RF, Takai SI, Noll WW, Fink M, et al. 1995 Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2: report of the International RET Mutation Consortium. *J Intern Med* **238** 343-346.
- Pacini F, Castagna MG, Cipri C & Schlumberger M 2010 Medullary thyroid carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **22** 475-485.
- Piolat C, Dyon JF, Sturm N, Pinson S, Bost M, Jouk PS, Plantaz D & Chabre O 2006 Very early prophylactic thyroid surgery for infants with a mutation of the RET proto-oncogene at codon 634: evaluation of the implementation of international guidelines for MEN type 2 in a single centre. *Clin Endocrinol (Oxf)* **65** 118-124.
- Ponder BA 1999 The phenotypes associated with ret mutations in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndrome. *Cancer Res* **59** 1736s-1741s; discussion 1742s.
- Punales MK, da Rocha AP, Meotti C, Gross JL & Maia AL 2008 Clinical and oncological features of children and young adults with multiple endocrine neoplasia type 2A. *Thyroid* **18** 1261-1268.
- Punales MK, Graf H, Gross JL & Maia AL 2002 Rastreamento Genético do Carcinoma Medular de Tireóide: Identificação de Mutações no Proto-Oncogene Ret. *Arq Bras Endocrinol Metab* **6** 632-639.
- Punales MK, Graf H, Gross JL & Maia AL 2003 RET codon 634 mutations in multiple endocrine neoplasia type 2: variable clinical features and clinical outcome. *J Clin Endocrinol Metab* **88** 2644-2649.
- Punales MK, Rocha AP, Gross JL & Maia AL 2004 [Medullary thyroid carcinoma: clinical and oncological features and treatment]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **48** 137-146.
- Robledo M, Gil L, Pollan M, Cebrian A, Ruiz S, Azanedo M, Benitez J, Menarguez J & Rojas JM 2003 Polymorphisms G691S/S904S of RET as genetic modifiers of MEN 2A. *Cancer Res* **63** 1814-1817.
- Rocha AP, Magalhães PR, Maia AL & Maciel LZ 2007 Polimorfismos Genéticos: Implicações na Patogênese do Carcinoma Medular de Tireóide. *Arq Bras Endocrinol Metab* **5** 723-730.
- Romei C, Elisei R, Pinchera A, Ceccherini I, Molinaro E, Mancusi F, Martino E, Romeo G & Pacini F 1996 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* **81** 1619-1622.
- Ruiz A, Antinolo G, Fernandez RM, Eng C, Marcos I & Borrego S 2001 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)* **55** 399-402.
- Santoro M, Carlomagno F, Melillo RM, Billaud M, Vecchio G & Fusco A 1999 Molecular mechanisms of RET activation in human neoplasia. *J Endocrinol Invest* **22** 811-819.



- Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro DP, Dathan NA, Grieco M, Fusco A, Vecchio G, Matoskova B, Kraus MH, et al. 1995 Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science* **267** 381-383.
- Santos MA, Nunes AB, Abelin N, Ezabella MC, Toledo Rde A, Lourenco DM, Jr., Hayashida CY, Fonseca, II & Toledo SP 2006 [Genetic screening of multiple endocrine neoplasia type 2: experience of the USP Endocrine Genetics Unit]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **50** 7-16.
- Schlumberger M, Carlomagno F, Baudin E, Bidart JM & Santoro M 2008 New therapeutic approaches to treat medullary thyroid carcinoma. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **4** 22-32.
- Siqueira DR, Romitti M, da Rocha AP, Ceolin L, Meotti C, Estivalet A, Punaes MK & Maia AL 2010 The RET polymorphic allele S836S is associated with early metastatic disease in patients with hereditary or sporadic medullary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* **17** 953-963.
- Sromek M, Czetwertynska M, Skasko E, Zielinska J, Czupczak D & Steffen J 2010 The frequency of selected polymorphic variants of the RET gene in patients with medullary thyroid carcinoma and in the general population of central Poland. *Endocr Pathol* **21** 178-185.
- Takahashi M, Buma Y & Hiai H 1989 Isolation of ret proto-oncogene cDNA with an amino-terminal signal sequence. *Oncogene* **4** 805-806.
- Takahashi M, Ritz J & Cooper GM 1985 Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell* **42** 581-588.
- Tamanaha R, Camacho CP, Pereira AC, da Silva AM, Maciel RM & Cerutti JM 2009 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 (Oxf)* **71** 56-64.
- Wiench M, Wygoda Z, Gubala E, Wloch J, Lisowska K, Krassowski J, Scieglinska D, Fiszler-Kierzkowska A, Lange D, Kula D, et al. 2001 Estimation of risk of inherited medullary thyroid carcinoma in apparent sporadic patients. *J Clin Oncol* **19** 1374-1380.
- Wohlk N, Soto E, Bravo M & Becker P 2005 Polimorfismos G691S, L769L y S836S del proto-oncogen RET no se asocian a mayor riesgo de cáncer medular tiroideo esporádico en pacientes chilenos. *Rev Méd Chile* **133**.

## **Parte II**

### **ADDITIVE EFFECT OF THE *RET* POLYMORPHISMS IN SPORADIC MEDULLARY THYROID CARCINOMA SUSCETIBILITY AND TUMOR AGGRESSIVENESS**

**ADDITIVE EFFECT OF *RET* POLYMORPHISMS ON SPORADIC MEDULLARY  
THYROID CARCINOMA SUSCEPTIBILITY AND TUMOR AGGRESSIVENESS**

Lucieli Ceolin, Débora R. Siqueira, Carla Vaz Ferreira, Mírian Romitti, Silvana Cavalcante Maia,  
Patrícia Ashton Prolla, Ana Luiza Maia.

Thyroid Section, Endocrine Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Grant support: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação  
de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Fundo de Incentivo a Pesquisa do  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE) and Programa de Apoio a Núcleos de Excelência  
(PRONEX), Brazil.

Running title: Additive effect of polymorphisms, *RET* polymorphisms and Sporadic MTC

Correspondence: Ana Luiza Maia, M.D., Ph.D.

Serviço de Endocrinologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035 –003 Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: 55-51-21018127; Fax: 55-51-2101-8777; E-mail: [almaia@ufrgs.br](mailto:almaia@ufrgs.br)

## ABSTRACT

**Background:** The molecular mechanisms underlying sporadic medullary thyroid carcinoma (sMTC) are unknown. *RET* polymorphisms have been implicated in sMTC pathogenesis as well in the natural course of the disease but the results are controversy. Here we investigated the influence of multiple *RET* variants, either alone or in combination, in the risk of sMTC susceptibility and tumor behavior.

**Methods:** One hundred and three sMTC patients were included. The control group comprised 105 unaffected individuals. The *RET* polymorphisms G691S/S904S, L769L and S836S were genotyping by restriction fragment length polymorphism or direct sequencing.

**Results:** The frequency of the L769L allele was higher in sMTC patients as compared to controls (32 vs. 21.2%,  $P=0.03$ ). No differences were found in allele frequencies of the G691S/S904S variant. To examine the additive effect of *RET* variants, sMTC patients were grouped according to the presence of none, one, two or three polymorphisms. Compared with the control group, sMTC individuals with one (OR=2.23,  $P=0.02$ ), two (OR=2.57,  $P=0.04$ ) or three polymorphisms (OR=16,  $P=0.01$ ) had increasingly elevated risk of sMTC, demonstrating an additive effect of these variants. In sMTC patients, no significant differences were observed in the isolated or combined analysis of polymorphisms and age of diagnosis, CEA levels or tumor size ( $P>0.05$ ). Basal calcitonin levels increased according the number of polymorphisms, but it did not reach statistical significance ( $P=0.05$ ). However, patients with two or three polymorphisms presented increased risk for lymph node (OR=4.50,  $P=0.03$ ) or distant metastases (OR=8.25,  $P=0.04$ ).

**Conclusion:** Our data demonstrated an additive effect of *RET* polymorphisms in sMTC susceptibility and tumor aggressiveness.

## INTRODUCTION

Medullary thyroid carcinoma (MTC), a malignant tumor originating in parafollicular C cells of the thyroid, represents 5-10% of all thyroid cancers [1, 2]. About 75% of all MTC are sporadic (sMTC), whereas the remaining 25% correspond to inherited cancer syndrome known as Multiple Endocrine Neoplasia Type 2 (MEN 2). Features of MEN 2A include MTC, pheochromocytoma (PHEO) and hyperparathyroidism (HPT). MEN 2B presents a specific phenotype that encompasses MTC, PHEO, ganglioneuromas of the digestive tract, mucosal neuromas, and/or skeletal abnormalities [1, 3]. In familial medullary thyroid carcinoma (FMTC) MTC is the only clinical feature [3]. The *RET* proto-oncogene is the susceptibility gene for hereditary MTC. The *RET* gene encodes a tyrosine kinase receptor implicated in the neural crest tissue development and differentiation. Several germline mutations of this gene have been associated with hereditary MTC. Genotype-phenotype correlation has been reported and mutations in exons 10 (codons 609, 611, 618, and 620) or exon 11 (codon 634) occur in more than 98% of MEN 2A families. MEN 2B is associated primarily with a single missense mutation in exon 16 (M918T) which is found in more than 90% of all reported cases [4, 5].

Although much is known on hereditary MTC, the molecular mechanisms underlying the sMTC tumors remain to be clarified. Somatic *RET* point mutations in exon 16 (M918T) and gene deletions are described in 40–80% of sporadic MTCs [6, 7, 8, 9, 10]. However, the mutation does not appear to be uniform among the various cell subpopulations in the same tumor or in the metastases, suggesting that sporadic MTC may be of polyclonal origin, or that the mutations in the *RET* proto-oncogene are not initial events in MTC tumorigenesis [11, 12].

Based on the over-representation of certain *RET* single nucleotide polymorphisms (SNPs) in sMTC patients, it has been suggested a role of these genetics variants in the pathogenesis of this disease. Nevertheless, the results on the effect of the *RET* polymorphic variants in the predisposition to develop sMTC are still conflicting. Some studies have demonstrated that the *RET* G691S (exon 11) SNP is more frequent in sMTC than in the general population [13]. The G691S/S904S variant was also associated with a 1.5 to 2.5 fold risk for the development of sMTC [14]. Patients with sMTC under the age of 30 years presented a higher frequency of the *RET* L769L variant (exon 13) than those diagnosed between 31 – 45 years [15]. This polymorphism was also associated with increased risk for sMTC whereas patients homozygous for this polymorphic variant were younger at the MTC diagnosis [16]. Ruiz et al. (2001) have demonstrated that the *RET* S836S variant (exon 14)

was associated with a 2 to 3 fold increase in the risk of sMTC in the Spanish population [17]. More recently, the S836S variant was associated with early onset of the MTC and increased risk for metastatic disease [10]. Nonetheless, some studies failed to demonstrate any effect of *RET* variants in the risk for development or in the natural course of sMTC [18, 19, 20]. The reasons for these conflicting results are still unknown and illustrate the need for additional studies to explore the molecular mechanisms underlying sMTC.

Carcinogenesis is a multistep process that occurs through a multifactorial interplay between many genetic and environmental factors. In this way, the effect of a single SNP is unlikely to be substantial in studies of complex diseases. Thus, the approach based on combining multiple polymorphisms that interact in the same pathway may amplify the effect of individual polymorphisms and enhance the predictive power of SNPs analysis for multifactorial disease [21, 22, 23]. Here, we have investigated the influence of the multiple *RET* neutral variants (G691S, L769L, S836S, and S904S), either individual or in combination, in the risk for sMTC as well as in its clinical presentation.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patients**

Patients with a diagnosis of sMTC attending the Endocrine Division at Hospital de Clínicas de Porto Alegre were invited to participate in the study. Since 1997, our division is a reference center for *RET* mutation testing in Brazil, and therefore patients referred to us by other Brazilian centers were also invited to participate. All patients and/or their legal representatives provide written informed consent of the study in accordance with the Institutional Ethics Committee.

Our study included 103 consecutive patients with sMTC. The diagnosis of sMTC was based on the histopathological/ immunohistochemistry findings and the absence of known germline *RET* point mutations in exons 8, 10, 11, or 13–16. The clinical and laboratory data were collected for each individual. Patients underwent a complete clinical examination and laboratory tests were performed as previously described [10].

The control group was composed by 105 unrelated cancer-unaffected individuals who were gender and age-matched to the MTC patients.

### **Single Nucleotide Polymorphism Analysis**

*RET* SNPs G691S (codon 691 of exon 11, G>A), L769L (codon 769 of exon 13, T>G), S836S (codon 836 of exon 14, C>T), and S904S (codon 904 of exon 15, C>T) were analyzed. Genomic DNA was obtained from peripheral blood leukocytes by standard procedures, and the fragments covering the *RET* variants were amplified using PCR primers and conditions previously described [24]. Genotyping was performed using either restriction fragment length polymorphism (RFLP) or direct gene sequencing. For RFLP analysis, an aliquot of PCR product was digested with the appropriate restriction enzyme and analyzed as previously described [24]. For sequencing, PCR products were purified using the GFX PCR DNA purification kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and submitted to direct sequencing using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### **Somatic M918T Mutation Analysis**

MTC tumor samples were analyzed for the presence of the somatic *RET* M918T mutation. DNA was extracted from material paraffin-embedded formalin-fixed tissue blocks, using the Magnesil Genomic Fixed Tissue System (Promega, Madison, USA), according to the manufacturer's instructions. *RET* exon 16 was amplified by PCR using conditions previously described [10].

### **Statistical Analysis**

Results are expressed as mean±S.D. or median (IQ 25-75) unless otherwise specified. Baseline characteristics were compared using the  $\chi^2$ -test or Fisher's exact test for qualitative variables. To compare quantitative variables we used the Student's t-test, Mann-Whitney's U test, ANOVA or Kruskal-Wallis test. The additive effect of polymorphisms was controlled for somatic *RET* M918T mutation using Fisher's exact test. Hardy-Weinberg equilibrium for each polymorphism was assessed by the Chi-square tests of association or Fisher's exact test. The Statistical Package for the Social Sciences 18.0 (PASW Inc., Chicago, USA) software was used for all analyses, and  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

Clinical and oncological features of the subjects included in the study are summarized in table 1. The control group comprises 105 cancer-unaffected individuals. The mean in sMTC patients was similar to that observed in the control group. There were no differences in age ( $46 \pm 15.8$  vs.  $49.4 \pm 9.86$ ,  $P=0.09$ ) or percentage of females between sMTC and control group ( $54.8$  vs.  $54.3\%$ ,  $P=1.0$ ). The ethnic background of both cases and controls was similar ( $99.0$  vs.  $95.2\%$   $P=0.20$ ).

The G691S and S904S variants were in linkage disequilibrium and, therefore, to avoid redundant information, we analyzed only the variant GS904S and the results were grouped together and referred to as G691S/S904S [13, 25, 26]. The S836S polymorphism was excluded from the individual SNP analysis since it was previously evaluated in this sample population (Siqueira et al 2010). All genotypes analyzed were in Hardy-Weinberg equilibrium ( $P>0.14$ ).

### ***RET* Polymorphisms in Sporadic MTC Patients and Controls**

The allele frequencies in sMTC patients were similar to those reported in the literature [17, 18, 27, 28, 29]. There were no differences in the frequency of G691S/S904S polymorphism between patients and controls (Table 2). However, the frequency of the L769L allele was higher in sMTC patients as compared with controls ( $32$  vs.  $21.2\%$   $P=0.03$ ).

To examine the synergistic effect of these polymorphisms in the risk to sMTC development, we investigated the frequency of none, one, two or three polymorphisms between sMTC patients and control group. The number of individuals with *RET* polymorphisms was significantly higher in sMTC patients than in the control group ( $P=0.006$ ). Compared with the control group, individuals with one (OR=2.23,  $P=0.02$ ), two (OR=2.57,  $P=0.04$ ) or three polymorphisms (OR=16,  $P=0.01$ ) had increasingly elevated risk of sMTC (Figure 1A).

### **Additive Effect of *RET* Polymorphisms in Sporadic MTC Clinical Presentation**

First, we assessed the effect of the individual polymorphisms L769L and G691S/S904S in clinical features at diagnosis. No associations were observed between the L769L or G691S/S904S polymorphisms in the age at onset of disease, serum calcitonin or CEA levels, tumor size or presence of metastasis (Table 3).



Next, we examined the additive effect of *RET* G691S/S904S, L769L and S836S variants. No significant differences were observed in the age of diagnosis, CEA levels or tumor size ( $P>0.05$ ). The serum calcitonin levels increased according the number of polymorphisms, although it did not reach statistical significance (Figure 2,  $P=0.05$ ). In addition, we observed an association between additional presence of *RET* polymorphisms and metastatic disease (Table 4). Patients with two or three polymorphisms presented increased risk for the development of lymph node (OR=4.50,  $P=0.03$ ) and distant metastases (OR=8.25,  $P=0.04$ ) (Figure 1B and 1C).

### **Somatic *RET* M918T Mutation**

The presence of the somatic *RET* M918T mutation has been associated with the presence of lymph node metastases at diagnosis [30, 31]. Thus, to exclude a possible confounding effect, we also evaluated this mutation in sMTC samples. Of the 34 samples analyzed, 28 (82.4%) presented somatic M918T mutation. The M918T mutation was similarly distributed among the groups (100%, vs 75% vs 80% vs 100%;  $P=0.44$ ).

## **DISCUSSION**

The present study demonstrated that the presence of multiple *RET* polymorphisms is associated with increased risk for sMTC development and aggressiveness, indicating an additive effect of neutral *RET* variants in the pathogenesis of this rare malignant thyroid neoplasia.

Polymorphisms are involved in gene-environment interaction and are commonly associated with a large number of sporadic cancers [32]. The role of *RET* polymorphisms in the development or progression of sMTC is still controversial. Several studies have demonstrated that *RET* polymorphisms may be associated with the presence of sMTC and aggressive disease [10, 17, 29]. However, other studies failed to demonstrate such associations [18, 19, 20]. Differences in the genetic background of distinct population have been suggested as one of the reasons for the conflicting results described in the literature.

Based on the fact that combined analysis of genetic variants that interact in the same pathway may amplify the effects of individual polymorphisms and enhance the predictive power for a multifactorial disease, it is possible that that *RET* polymorphic variants may act synergistically in the development or progression of sMTC. Indeed, our results demonstrated that this might be the case

since the presence of additional *RET* polymorphisms was associated with a 2.5 to 16 fold increased risk for sMTC development.

The *RET* SNPs L769L, S836S, and G691S/S904S, either alone or in combination did not have any effect on age at onset of disease, CEA levels and tumor size. We observed an increase in serum calcitonin levels according to the number of polymorphisms, but this association was not statistically significant (figure 2). Notably, patients with two or three polymorphisms presented increased risk for the development of lymph node and distant metastases, demonstrating an additive effect of these variants on phenotype of disease.

The synergistic effect of polymorphisms has been described in several diseases. Philips et al (2010) showed that the additive effect of polymorphisms in the *IL-6*, *LTA*, and *TNF $\alpha$*  genes and plasma fatty acid level may modulate risk for the metabolic syndrome and its components [22]. The presence polymorphisms in the brain-derived neurotrophic factor) (*BDNF*) and RE1-silencing transcription factor (*REST*) genes were associated with improved general cognitive ability [21]. Moreover, Sfar et al (2009) have demonstrated that gene–gene interaction of angiogenic gene polymorphisms increased the risk of prostate cancer onset and aggressiveness. Interestingly, the authors observed a significant gene–dosage effect for increasing numbers of potential high-risk genotypes Compared to the reference group (low-risk genotypes), individuals with one, two and three high-risk genotypes had increasingly elevated risks of prostate cancer. Another interesting finding of the study was that interactions between *VEGF* and *TSP1* polymorphisms increase the risk of developing an aggressive phenotype disease. Patients carrying three high-risk genotypes showed a 20-fold increased risk of high-grade tumor [23].

The molecular mechanism by which *RET* polymorphisms affect the development and evolution of MTC are still not properly understood. One of the mechanisms proposed is that the polymorphism could influence the stability of the messenger RNA (mRNA). However, quantitative studies of mRNA in MTC tumor tissues did not show a difference in the *RET* expression in patients with or without polymorphism [13]. Another hypothesis is that bases exchange in the DNA molecule could create a new alternative splicing site, leading to the synthesis of truncated protein, erroneous ligand binding, microRNA binding, change of structure and mRNA stability as well as a number of copies and also the change in the structure of proteins caused by interference of translation [33]. It is also possible that the neutral polymorphism is in linkage disequilibrium with an as yet unknown functional variant [26, 29]. Besides, in the polymorphisms that promote the substitution of aminoacids, it can be assumed that the modification has a cooperative effect on the dimerization of

the *RET* protein or forms a new phosphorylation site in the tyrosine-kinase domain [25]. The S836S polymorphism failed to affect DNA–protein binding, transcript stability, or RNA splicing and editing [34], but it is possible that this genetic variant may create an unstable sequence upstream or downstream at germline or somatic *RET* mutations instead of directly participating in the tumorigenic process [29].

In conclusion, our data indicate that the presence of multiples polymorphisms in the *RET* gene may increase the risk for development and progression of sMTC and suggest that the combined analysis of *RET* polymorphic variants provide higher predictive value for sMTC when compared with each single SNPs. The result of these biological interactions may influence the occurrence of somatic mutation, or, alternatively, may indirectly reflect other polymorphisms that are in linkage disequilibrium with these genotyped polymorphisms and thus contribute to the tumorigenesis of sMTC. To the best of our knowledge, no previous studies has investigated the potential synergistic effects of *RET* polymorphisms on sMTC.

### **Competing interests**

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

### **Funding**

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

(FAPERGS), Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE) and Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), Brazil.

## REFERENCES

- 1 Maia AL, Gross JL, Punaes MK. [Multiple endocrine neoplasia type 2]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2005;**49**(5):725-34.
- 2 Marsh DJ, Learoyd DL, Robinson BG. Medullary thyroid carcinoma: recent advances and management update. *Thyroid* 1995;**5**(5):407-24.
- 3 Pacini F, Castagna MG, Cipri C, *et al.* Medullary thyroid carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2010;**22**(6):475-85.
- 4 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.
- 5 Hansford JR, Mulligan LM. Multiple endocrine neoplasia type 2 and RET: from neoplasia to neurogenesis. *J Med Genet* 2000;**37**(11):817-27.
- 6 Donis-Keller H. The RET proto-oncogene and cancer. *J Intern Med* 1995;**238**(4):319-25.
- 7 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.
- 8 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.
- 9 Schuffenecker I, Billaud M, Calender A, *et al.* RET proto-oncogene mutations in French MEN 2A and FMTC families. *Hum Mol Genet* 1994;**3**(11):1939-43.
- 10 Siqueira DR, Romitti M, da Rocha AP, *et al.* The RET polymorphic allele S836S is associated with early metastatic disease in patients with hereditary or sporadic medullary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 2010;**17**(4):953-63.
- 11 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.
- 12 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.
- 13 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.
- 14 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.

- 15 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.
- 16 Sromek M, Czetwertynska M, Skasko E, *et al.* The frequency of selected polymorphic variants of the RET gene in patients with medullary thyroid carcinoma and in the general population of central Poland. *Endocr Pathol* 2010;**21**(3):178-85.
- 17 Ruiz A, Antinolo G, Fernandez RM, *et al.* 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.
- 18 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.
- 19 Gursoy A, Erdogan MF, Erdogan G. Significance of the RET proto-oncogene polymorphisms in Turkish sporadic medullary thyroid carcinoma patients. *J Endocrinol Invest* 2006;**29**(10):858-62.
- 20 Wohllk N, Soto E, Bravo M, *et al.* Polimorfismos G691S, L769L y S836S del proto-oncogen RET no se asocian a mayor riesgo de cáncer medular tiroideo esporádico en pacientes chilenos. *Rev Méd Chile* 2005;**133**:397-402.
- 21 Miyajima F, Quinn JP, Horan M, *et al.* Additive effect of BDNF and REST polymorphisms is associated with improved general cognitive ability. *Genes Brain Behav* 2008;**7**(7):714-9.
- 22 Phillips CM, Goumidi L, Bertrais S, *et al.* Additive effect of polymorphisms in the IL-6, LTA, and TNF- $\alpha$  genes and plasma fatty acid level modulate risk for the metabolic syndrome and its components. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;**95**(3):1386-94.
- 23 Sfar S, Saad H, Mosbah F, *et al.* Combined effects of the angiogenic genes polymorphisms on prostate cancer susceptibility and aggressiveness. *Mol Biol Rep* 2009;**36**(1):37-45.
- 24 Punales MK, Graf H, Gross JL, *et 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.
- 25 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.
- 26 Tamanaha R, Camacho CP, Pereira AC, *et al.* 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 (Oxf)* 2009;**71**(1):56-64.
- 27 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.

- 28 Fernandez RM, Pecina A, Antinolo G, *et al.* Analysis of RET polymorphisms and haplotypes in the context of sporadic medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2006;**16**(4):411-7.
- 29 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.
- 30 Elisei R, Cosci B, Romei C, *et al.* Prognostic significance of somatic RET oncogene mutations in sporadic medullary thyroid cancer: a 10-year follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;**93**(3):682-7.
- 31 Zedenius J, Larsson C, Bergholm U, *et al.* Mutations of codon 918 in the RET proto-oncogene correlate to poor prognosis in sporadic medullary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;**80**(10):3088-90.
- 32 Song M, Lee KM, Kang D. Breast cancer prevention based on gene-environment interaction. *Mol Carcinog* 2011;**50**(4):280-90.
- 33 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.
- 34 Griseri P, Sancandi M, Patrone G, *et al.* A single-nucleotide polymorphic variant of the RET proto-oncogene is underrepresented in sporadic Hirschsprung disease. *Eur J Hum Genet* 2000;**8**(9):721-4.

## TABLES

**Table 1** Clinical and oncological features of sporadic MTC patients according to the presence of the polymorphic allele

---

Total patients	103
Sex female (%)	57 (54.8)
Age at Diagnosis	46±15.83
Calcitonin (pg/ml)	870.0 (154.75-2900)
CEA (ng/ml)	69.20 (11.65-166.8)
Size Tumor (cm)	2.8 (1.58-3.58)
Distant Metastases (%)	
M0	78
M1	22
Lymph Node Metastasis (%)	
N0	45.6
N1	54.4

---

**Table 2** Frequency of RET polymorphisms in Sporadic Medullary Thyroid Cancer

Sequence Variant	Genotype Distribution			Allele Frequency sCMT (%)	Allele Frequency Controls (%)	P	Prevalence in literature <sup>a</sup> (%)
	Wild-type	Heterozygous	Homozygous				
Exon 13 L769L	47	46	10	32.0	21.2	0.03	15-26
Exon 15 G691S/S904S	61	36	5	22.5	19.5	0.75	11.1-24

<sup>a</sup>References: Gimm et al. 1999, Ruiz et al. 2001, Berard et al. 2004, Baumgartner-Parzer et al. 2005, Fernandez et al. 2006.

**Table 3** Effect of individual polymorphisms L769L, S836S, and G691S/S904S in clinical features of sMTC

Patients (n)	Total	L769L			G691S/S904S		
		WT	P	WT	P	WT	P
<b>Age at Diagnosis</b>	46±15.9	47.3±14.9	44.4±17.1	0.40	43.9±16.2	47.5±15.8	0.30
<b>Calcitonin</b>	870(154.7-2900)	990(255-4360)	848 (53.25-1771)	0.27	1304 (194.5-6579)	848(154.7-2855)	0.65
<b>Lymph Node Metastasis (%)</b>	54.4	62.7	44.7	0.09	59.4	51	0.43
<b>Distant Metastases (%)</b>	21.9	26.9	15.7	0.21	27	19.2	0.39
<b>Tumor Size</b>	2.8(1.55-3.5)	3.0(1.7-3.85)	2.0(1.45-3.0)	0.11	2.0 (1.4-3.1)	3.0(1.8-3.8)	0.14

WT, wild-type



**Table 4** Additive effect of *RET* polymorphisms in clinical features of sMTC

	<b>None</b>	<b>One</b>	<b>Two</b>	<b>Three</b>	<b>P</b>
<b>Age at Diagnosis</b>	45.7±21.3	47±14.2	44±13.8	38.1±18.3	0.44
<b>Calcitonin</b>	645 (10-1952)	870 (216-2710)	1600 (255-6374)	13737 (4193- )	0.05
<b>CEA</b>	10.13 ± 4.07*	63 (7.9-149.8)	108.0 (28.25-2877.5)	161.60	0.26
<b>Lymph Node Metastasis (%)</b>	40	50	63	100	0.03
<b>Distant Metastases (%)</b>	26	11	25	75	0.002
<b>Tumor Size</b>	2.5 (1.82-3.57)	2.45 (1.5-3.45)	3.0 (1.9-4.1)	3.3 (1.25-3.75)	0.76
<b>Presence M918T mutation (%)</b>	100	75	80	100	0.44

**FIGURES**

1)

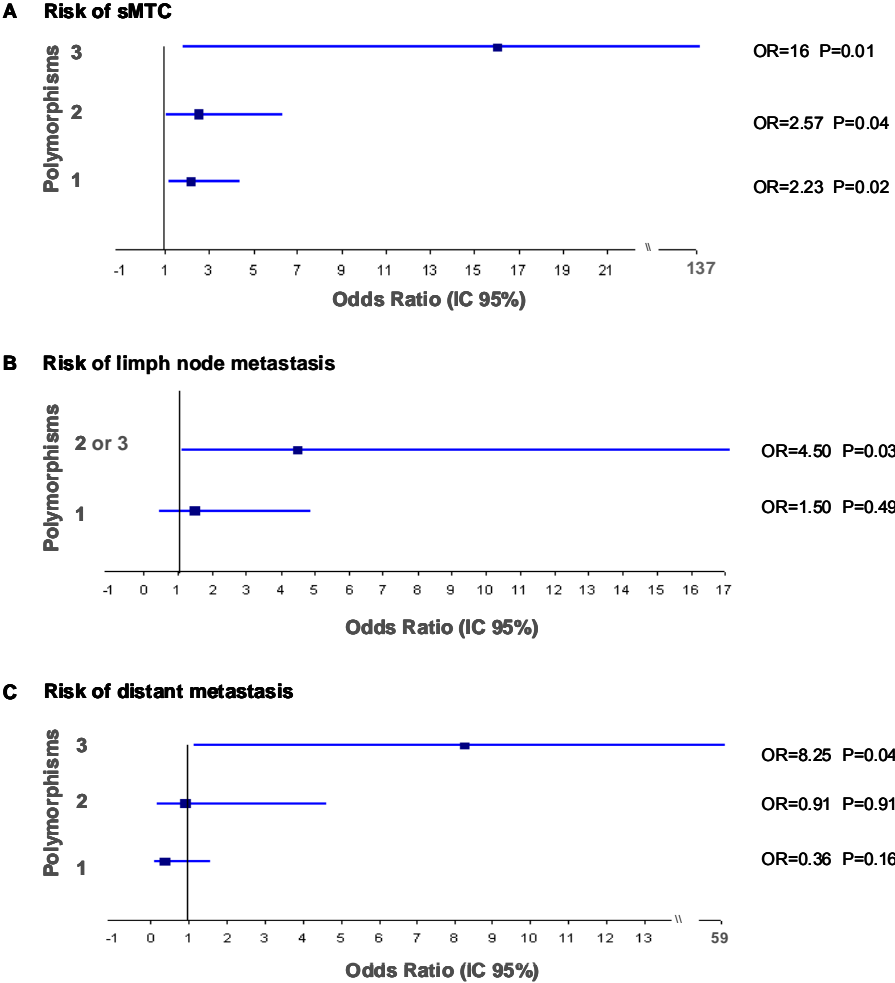


Figure 1. Risk for sMTC development in patients with one (OR=2.23, P= 0.02), two (OR=2.57, P= 0.04) or three (OR=16, P= 0.01) polymorphisms (A). Risk for lymph node (OR=4.50, P= 0.03) (B) and distant metastasis (OR=8.25, P= 0.04) (C) in sMTC patients.

2)

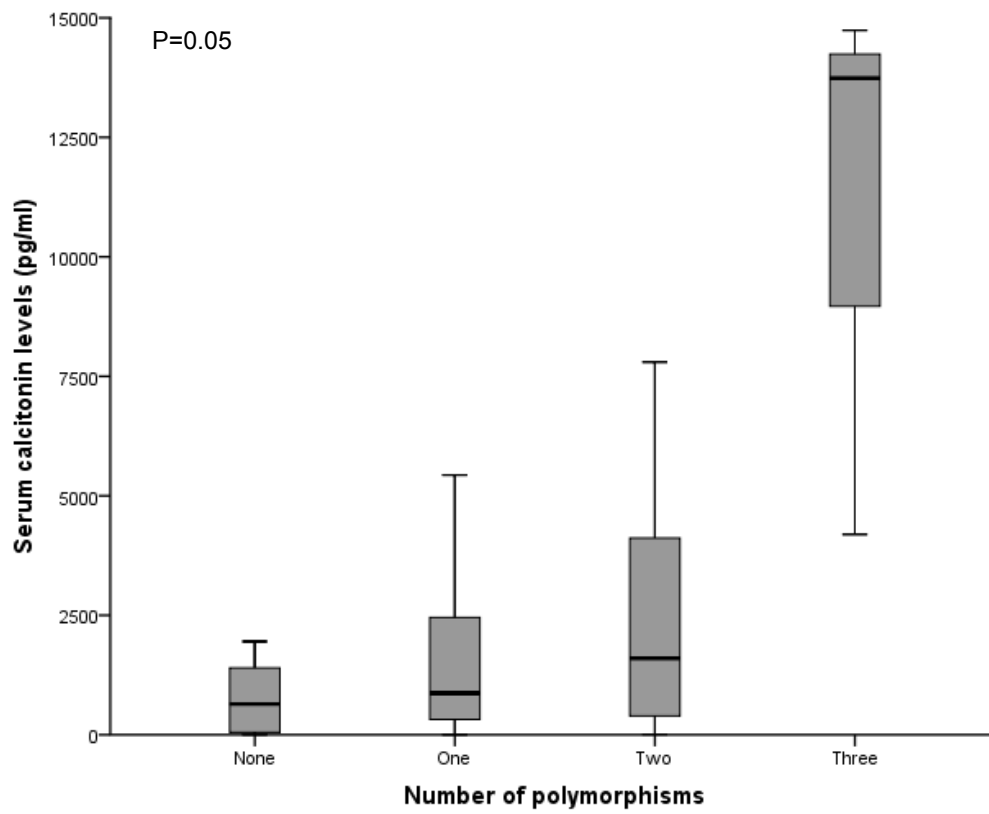


Figure 2. Increased in serum calcitonin levels according number of polymorphisms

C398e Ceolin, Lucieli

Efeito aditivo dos polimorfismos do proto-oncogene ret na suscetibilidade e agressividade tumoral no carcinoma medular de tireóide esporádico / Lucieli Ceolin ; orient. Ana Luiza Maia. – 2011.

41 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, 2011.

1. Neoplasias da glândula tireóide 2. Carcinoma medular 3. Polimorfismo genético 4. Proteínas proto-oncogênicas c-ret 5. Neoplasia endócrina múltipla Tipo 2b I. Maia, Ana Luiza II. Título.

NLM: WK 270

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA