ROXANNE HATANAKA

**Rastreamento de variantes de significado desconhecido (VUS)
no gene *RET* em indivíduos-controle e em pacientes com
carcinoma medular de tireoide**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Sergio Pereira de Almeida Toledo

São Paulo
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Hatanaka, Roxanne

Rastreamento de variantes de significado desconhecido (VUS) no gene *RET* em indivíduos-controle e em pacientes com carcinoma medular de tireoide / Roxanne Hatanaka. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientador: Sergio Pereira de Almeida Toledo .

Descritores: 1.Neoplasias endócrina múltipla 2.Proteínas proto-oncogênicas c-ret
3.Mutação 4.Polimorfismo de nucleotídeo único 5.Carcinoma medular
6.Feocromocitoma 7.Tireoidectomia 8.Assintomático 9.Estudos de casos e controle
10.Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala 11.Predisposição genética para
doença

USP/FM/DBD-413/15

Este projeto foi realizado na Unidade de Endocrinologia Genética (LIM25) e na Fundação Pró-Sangue do Hemocentro do Hospital das Clínicas de São Paulo/SP, Brasil. Contou com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (auxílio pesquisa – regular 2013/01476-9; e bolsa de Mestrado 2013/00902-2).

Dedicatória

Aos meus pais, pelo exemplo de dedicação e esforço para conseguir alcançar o que amamos.

A todos meus familiares e amigos que acreditaram que conseguiria realizar mais uma etapa acadêmica.

Aos doadores, pacientes e instituições pela participação e confiança depositada em mim.

Aos meus orientadores: professor Dr. Sérgio Pereira de Almeida Toledo, Dra. Tomoko Sekiya e Dr. Rodrigo de Almeida Toledo por acreditarem no meu trabalho.

Agradecimientos

Em primeiro lugar agradeço:

À Deus, por me capacitar e colocar pessoas no meu caminho que me ajudaram e me incentivaram, demonstrando seu cuidado por mim em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, as minhas irmãs e meu sobrinho, as minhas tias de coração (Terezinha e Nice), a todos os meus amigos (especialmente Tomoko) e familiares, por todo o amor, apoio, carinho e principalmente paciência durante o desenvolvimento desse projeto.

Ao meu orientador Professor Dr. Sérgio Pereira de Almeida Toledo pelos ensinamentos, conhecimentos e sabedoria compartilhada ajudando no meu desenvolvimento profissional e pessoal. Por me permitir participar e opinar neste estudo, depositando sua confiança em mim.

Aos meus co-orientadores Dra. Tomoko Sekiya e Dr. Rodrigo de Almeida Toledo pela participação e auxílio na elaboração do projeto junto a meu orientador. A dedicação da Dra. Tomoko e do Dr. Rodrigo contribuiu de forma enriquecedora ao estudo.

Aos médicos Dr. Delmar Lourenço Junior, Dra. Joya Correia-Deur, Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge e pesquisadora Dra. Ericka B. Trarbach pelos dados clínicos, apoio e amizade que facilitaram o desenvolvimento desse projeto.

Aos meus colegas e funcionários da Unidade de Endocrinologia Genética – LIM 25, Eliete Santiago, Geni Rodrigues, Maria das Graças Cavalcanti e Elisangela Quedas pela companhia e alegria que permitiram meu convívio diário agradável.

Aos Professores Doutores Dra. Cintia Fridman, Dra. Helena Brentani e Dr. Bruno Ferraz de Souza por contribuírem com sugestões e observações na minha qualificação, acrescentados no projeto.

Aos Doutores Dr. Alfredo Mendrone Junior , Dr. José Eduardo Levi, Dra. Sandra Montebello pela estrutura, colaboração, apoio e suporte durante o início do projeto.

A todos os funcionários e enfermeiros do Hemocentro de São Paulo pelo suporte e auxílio na coleta das amostras biológicas, e por demonstrarem todo o cuidado e carinho com os doadores. Aos pacientes e doadores pela participação e confiança.

Aos funcionários da empresa Life Technologies pelo apoio e suporte na elaboração do projeto.

As secretarias (Cida, Rosana e Senaria) de pós-graduação da endocrinologia pelo apoio e suporte.

À FAPESP por acreditar e apoiar o projeto financeira e cientificamente. À Unidade de Endocrinologia, ao Hospital das Clínicas de São Paulo e a FMUSP pelo espaço e estrutura para realização deste projeto.

Epígrafe

“Porque assim como os céus são mais altos do que a terra, assim são os meus
caminhos mais altos do que os vossos caminhos, e os meus pensamentos
mais altos do que os vossos pensamentos”

Isaías 55:9

“Porque a sabedoria serve de defesa, como de defesa serve o dinheiro; mas a
excelência do conhecimento é que a sabedoria dá vida ao seu possuidor”

Eclesiastes 7:12

(Bíblia Sagrada)

Esta dissertação está de acordo as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas e símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1- Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2	2
1.1.1- Classificação da NEM-2	3
1.2- Proto-oncogene <i>RET</i>	4
1.3- Correlação genótipo-fenótipo na NEM2	7
1.4- Polimorfismos no gene <i>RET</i>	9
1.5- Caracterização de variantes (mutação ou polimorfismo)	9
1.5.1- Estudo de frequência alélica	9
1.5.2- Estudo de predição (<i>in silico</i>)	10
1.6- Variantes de significado desconhecido (<i>VUS</i>)	12
1.6.1- Levantamento de variantes desconhecidas (<i>VUS</i>)	14
1.7- Justificativa	20
2. OBJETIVO	22
3. CASUÍSTICA	24
3.1- Considerações éticas	25
3.2- Indivíduos controles (sem histórico familiar de NEM-2)	25
3.3- Pacientes com CMT	26
4. MÉTODOS	27
4.1- Estudo molecular	28
4.1.1- Extração de DNA (sangue total)	28
4.1.2- Grupo 1: Sequenciamento de Sanger	29
4.1.3- Grupo 2: Sequenciamento de nova geração	31
4.2- Estudo <i>in silico</i>	43
4.3- Estudo de frequência alélica	44
5. RESULTADOS	45
5.1- Análise no éxon 13 do gene <i>RET</i> no grupo 1	46
5.2- Análise nos exons <i>hotspots</i> do gene <i>RET</i> no grupo 2 – avaliação por NGS	49
5.2.1- Rastreamento das amostras por sequenciamento de nova geração (<i>NGS</i>)	51

5.3- Análise <i>in silico</i> das variantes de significado desconhecidos (VUS)	54
5.4- Descrição de pacientes com CMT portando VUS	59
5.4.1- Investigação das famílias de pacientes portando a variante <i>RET</i> Y791F com CMT	59
5.4.1.1- Novo caso com FEO portador da variante <i>RET</i> Y791F	60
5.4.2- Família portadora da variante V648I	60
5.4.3- Família portadora da variante K666N	62
5.5- Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> das VUS	63
5.6- Frequência alélica nos bancos de dados	65
5.7- Descrição das VUS na literatura	70
6. DISCUSSÃO	74
6.1- Medicina Genética	75
6.2- Variantes genéticas de significado clínico desconhecido	76
6.2.1- A variante <i>RET</i> Y791F	77
6.2.2- Variante <i>RET</i> Y791N	78
6.2.3- Variante <i>RET</i> E511K	79
6.2.4- Variante <i>RET</i> V648I	79
6.2.5- Variante <i>RET</i> K666N	80
7. CONCLUSÃO	81
8. ANEXOS	84
9. REFERÊNCIAS	91
APÊNDICE	

*Lista de abreviaturas
e símbolos*

+/-	Com / sem
aa	Aminoácido
ATA	American Thyroid Association
Ca	Cálcio
CEA	Antígeno carcinoembrionário
CEA	Antígeno carcinoembrionário
CMT	Carcinoma Medular de Tireóide
CMTF	Carcinoma Medular de Tireóide Familiar
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutation in Cancer
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERK	Extracellular-signal-regulated kinases
ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
FEO	Feocromocitoma
GNDF	<i>Glial derived Nerve Growth Factor</i>
GRF α -1/2/3	GDNF family receptor
H	high risk
H	Hidrogênio
HCC	Hiperplasia de Célula C
HPT	Hiperparatireoidismo primárias
HRM	High resolution melt (Fusão de alta resolução)
HST	highest risk
IB	Instituto de Biociências
LIM24	Laboratorio de investigação médica -24
MOD	moderate risk

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEM-2	Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2
NEM2A	Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2 - subtipo A
NEM2B	Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2 - subtipo B
NGS	New generation sequencing (Sequenciamento de nova geração)
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
pB	Pares de bases
PGM	Personal Genome Machine
pH	Potencial de hidrogênio
pM	Picomol
PTH	Hormônio de paratireoide
<i>RET</i>	<i>REarranjo durante Transfecção</i>
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Real time- polymerase Chain Reaction
SNP	Single nucleotide polymorfism
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCV	Torrent variant caller
TK1/2	Tirosina-quinase 1/2
TTx	Tireoidectomia Total
UV	Ultra-violeta
VUS	Variant unknown significance

Lista de figuras

Figura 1 -	Domínios e sinalização da proteína RET: 1) sinalização normal da proteína com seu complexo; 2) Dimerização independente do complexo devido à mutação no domínio extracelular; 3) Ativação da proteína sem dimerização ou com hiperatividade	6
Figura 2 -	Principais etapas do rastreamento de variantes do gene <i>RET</i> nos indivíduos-controle	28
Figura 3 -	Método de fusão dos <i>primers</i> . A- Sequenciamento bidirecional da região alvo com os 2 pares de <i>primers</i> ; B – Estrutura dos iniciadores	33
Figura 4 -	Eletroferogramas das variantes encontradas no éxon 13 do gene <i>RET</i> no grupo 1: a) p.Y791F (TAT>TTT); b) p.Y791N (TAT>AAT); c) p.L769L (CTG>CTT); d) p.P766P (CCG>CCA); e) p.N777N (AAC>AAT)	46
Figura 5 -	Heredograma da família do indivíduo portando a variante <i>RET</i> Y791F	48
Figura 6 -	a. Heredograma da família portando a variante <i>RET</i> E511K; b. Eletroferograma da variante encontrada	53
Figura 7 -	Genealogia da família portadora da variante <i>RET</i> Y791F com CMT	59
Figura 8 -	Heredograma de membros portadores da variante <i>RET</i> Y791F	59
Figura 9 -	a. Heredograma da família portando a variante <i>RET</i> V648I; b. Eletroferograma com perfil em heterozigose	61
Figura 10 -	a. Heredograma da família portadora da variante <i>RET</i> K666N; b. Eletroferograma da alteração no códon 666	63

Lista de tabelas

Tabela 1 -	Expressão fenotípica em famílias portadoras de NEM-2	3
Tabela 2 -	Classificação de riscos correlacionando genótipo-fenótipo com a idade recomendada para cirurgia tireoidiana preventiva	8
Tabela 3 -	Variantes genéticas identificadas no gene <i>RET</i> com significado desconhecido (<i>VUS</i>)	17
Tabela 4 -	Definições das classes para variantes genéticas	20
Tabela 5 -	Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para estratégia de “ <i>Primers Fusion</i> ”	35
Tabela 6 -	Programas preditivos utilizadas na análise das <i>VUS</i>	44
Tabela 7 -	Frequências das variantes encontradas no éxon 13	47
Tabela 8 -	Resultados da detecção das amostras-controle nos <i>pools</i> inseridos no chip	50
Tabela 9 -	Frequência das variantes em exons <i>hotspots</i>	51
Tabela 10 -	Avaliação dos programas preditivos em mutações conhecidas no gene <i>RET</i>	54
Tabela 11 -	Resultado da predição das <i>VUS</i> do gene <i>RET</i>	56
Tabela 12 -	Levantamento dos estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> das <i>VUS</i> na literatura	64
Tabela 13 -	Análise do levantamento de frequência alélica nos bancos de dados	67
Tabela 14 -	Descrição da ocorrência das <i>VUS</i> na literatura	71

Resumo

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

Introdução: A Neoplasia endócrina múltipla do tipo 2 (NEM-2) é uma síndrome tumoral de herança autossômica dominante, na qual os tumores associados são carcinoma medular de tireoide (CMT), feocromocitoma (FEO) e hiperparatireoidismo primário (HPT). Esta síndrome ocorre devido a mutações ativadoras no proto-oncogene *RET* que alteram a via do receptor tirosina quinase RET. Essas mutações levam à ativação constitutiva de vias de sinalização desregulando o ciclo celular. Segundo os Consensos Internacionais de 2001 e 2009 sobre CMT/NEM-2, portadores de mutações no gene *RET*, inclusive indivíduos assintomáticos, devem ser submetidos a tireoidectomia total (TT) preventiva, aumentando a chance de cura da doença. Não é recomendado rastreamento clínico em portadores que apresentem somente polimorfismos isolados (variante não patogênica). No entanto, existem indivíduos que carregam variantes genéticas de significado clínico desconhecido (*VUS*), gerando dúvida quanto à conduta clínica. Atualmente, não se tem conhecimento se essas variantes podem ou não estar envolvidas no aumento do risco ao desenvolvimento de CMT. Dessa forma, o presente projeto analisou diversos aspectos como frequência alélica, estudo *in silico*, dados na literatura e nos bancos genéticos com o intuito de abranger o entendimento dessas variantes e auxiliar na indicação de conduta clínica adequada aos portadores de *RET VUS*. **Objetivo:** Expandir o conhecimento do potencial patogênico das *VUS* do gene *RET*, focando na classificação controversa da variante p.Y791F. **Métodos:** Foi realizado o rastreamento dos exons *hotspots* do gene *RET* em indivíduos adultos/idosos-controle e em pacientes com CMT através da técnica de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) e Sequenciamento de Sanger. Foi também analisada a predição computacional da patogenicidade dessas variantes em seis diferentes programas preditivos. Foi feito o levantamento de dados em diversos bancos genéticos. **Resultados:** As variantes p.Y791N, p.Y791F e p.E511K foram encontradas no rastreamento genético das amostras-controle sequenciadas. Além dessas variantes, foram identificadas e estudadas famílias de pacientes com CMT portadoras das variantes p.V648I e p.K666N. A variante p.Y791F foi identificada em um novo caso somente com FEO. A análise *in silico* demonstrou que 4/6 programas foram mais informativos, e que 25/48 *VUS* demonstram alterar a estrutura físico-química da proteína RET. A frequência alélica encontrada nos bancos de dados de indivíduos-controle e indivíduos com tumores foram bastante baixas. Apenas 15/48 *VUS* possuem dados sobre estudos *in vitro*. **Conclusão:** Nossos dados sugerem que a variante *RET* p.Y791F, quando isolada e sem coocorrência com mutações conhecidas *RET*, se comporta como um polimorfismo benigno raro, sem associação do aumento do risco ao CMT. Já a associação de p.Y791F com mutações conhecidas *RET*, como a C634Y, pode levar ao desenvolvimento de fenótipos atípicos, como maior risco ao feocromocitoma. A variante p.V648I é provavelmente um polimorfismo benigno raro, evidenciado pelo seguimento clínico de aproximadamente 15 anos de uma família portadora dessa variante, sem

evidências de CMT, FEO ou HPT. Há necessidade de mais dados para classificar apropriadamente as demais *VUS*; no entanto, devido a possibilidade das variantes p.E511K, K666N e Y791N poderem ser patogênicas, portadores devem ser monitorados clinicamente.

Descritores: 1. Neoplasia endócrina múltipla; 2. Proteínas proto-oncogênicas c-ret; 3. Mutação; 4. Polimorfismo de nucleotídeo único; 5. Carcinoma medular de tireoide; 6. Feocromocitoma; 7. Tireoidectomia; 8. Assintomático; 9. Estudos de casos e controles; 10. Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala; 11. Predisposição genética para doença

Summary

Hatanaka R. *Screening of variants unknown significance (VUS) in the RET gene in control individuals and patients with medullary thyroid carcinoma*. [Dissertação]. São Paulo. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Introduction: Multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN-2) is a tumor syndrome with autosomal dominant inheritance, in which tumors are associated with medullary thyroid carcinoma (MTC), pheochromocytoma (FEO) and primary hyperparathyroidism (HPT). This syndrome occurs due to activating mutations in the *RET* proto-oncogene, which lead to constitutive activation of tyrosine kinase signaling pathways that deregulate the cell cycle. According to the International Consensus on MTC/MEN-2 of 2001 and 2009 one should recommend that *RET* mutation carriers, including asymptomatic individuals, should undergo prophylactic total thyroidectomy (TT), increasing the chance of cure of the disease. It is not recommended clinical screening in patients that show only isolated polymorphisms (non-pathogenic variant). However, there are individuals who carry genetic variants of unknown clinical significance (VUS), generating doubt about the best clinical management. Currently, there is no consistent knowledge whether these variants may or may not be involved with the increased risk to MTC. The present project has approached the several aspects of these VUS, such as the allele frequency, in silico pathogenic prediction, published data and public databases, in order to increase our knowledge about VUS, in an attempt to contribute by offering appropriate clinical management to VUS carriers. **Objective:** To expand the knowledge of the pathogenic potential of some of the VUS of the *RET* gene, focusing especially on the controversial genetic variant p.Y791F. **Methods:** We performed the mutation screening of hotspots exons of the *RET* gene of DNA samples of 2061 adult/elderly healthy individuals and of patients with CMT by Sanger sequencing and Next Generation Sequencing (NGS) techniques. Pathogenic predictions of the studied variants were generated using six genetic softwares. Allelic frequency of *RET* VUS was assessed in different public databanks. **Results:** Genetic screening of control samples identified the presence of p.Y791N, p.Y791F and p.E511K germline variants. Patients with MTC carrying p.V648I and p.K666N germline variants were localized and family members were screened and clinically investigated. In addition, a new case with pheochromocytoma was found to carry the p.Y791F germline variant. The in silico analyses showed that 4 out of 6 packages were more informative, suggesting physico-chemical structure alteration caused by 25 out of 48 *RET* VUS. Very low allele frequencies were found in the public databases including healthy individuals and tumor samples. In vitro studies have been performed only for 15 out of 48 *RET* VUS. **Conclusion:** Our data strongly suggest that the p.Y791F variant, when occurring in an isolated form, is a benign polymorphism not associated with increased risk of MTC. Conversely, its co-occurrence with bona fide *RET* mutations as C634Y may lead to modulation of the phenotype, as increasing the frequencies of large and bilateral pheochromocytomas in MEN2A families. Family members carrying the p.V648I variant isolate have been followed clinically for approximately 15 years. As no indication of MCT, pheochromocytoma or hyperparathyroidism development has been documented, we conclude that this variant is a rare *RET* benign polymorphism.

More information is needed to a better characterization of other *VUS* as E511K, K666N and Y791N. Thus, carriers with these variants should be necessarily examined through a periodic clinical follow up.

Descriptors: 1. Multiple endocrine neoplasia; 2. Proto-oncogene proteins c-ret; 3. Mutation; 4. Polymorphism, single nucleotide; 5. Carcinoma, medullary; 6. Pheochromocytoma; 7. Thyroidectomy; 8. Carrier state; 9. Case-control studies; 10. High-throughput nucleotide sequencing; 11. Genetic predisposition to disease.

1 Introdução

1.1 Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2

A Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2 (NEM-2) é uma síndrome tumoral rara transmitida por herança autossômica dominante, em que familiares de primeiro grau possuem 50% de chance de herdar a doença. As principais manifestações clínicas da síndrome são o carcinoma medular de tireóide (CMT), feocromocitoma (FEO) e hiperparatiroidismo primário (HPT); que ocorrem nas glândulas da tireóide, adrenais e paratireóides, respectivamente (Eng, 2010). A prevalência da NEM-2 (OMIM 171400) é de 2,5 para cada 100.000 indivíduos da população (Raue; Frank-Raue, 2010).

Os tumores relacionados à essa síndrome se manifestam com diferentes frequências, sendo que o carcinoma medular de tireóide é o tumor mais comum, presente em aproximadamente 99% dos casos de NEM2A. O FEO ocorre entre 40-50% dos casos, enquanto que o hiperparatiroidismo primário acomete cerca de 10-20% (Toledo *et al.*, 2006; Frank-Raue *et al.*, 2010b).

O CMT hereditário representa aproximadamente 25% dos casos, e é associado a uma fase pré-maligna do CMT, a hiperplasia das células C (HCC). Nesses casos familiares, a doença é precoce e multicêntrica. O restante dos casos, que representa aproximadamente 75% dos CMTs, é esporádico e apresenta desenvolvimento mais tardio e tumores unifocais. O CMT pode ser agressivo e desenvolver metástases, que ocorrem inicialmente nos linfonodos cervicais das cadeias laterais ou nos linfonodos mediastinais, e mais raramente em pulmões, fígado e ossos (Eng, 2000; Brandi *et al.*, 2001; Elisei *et al.*, 2014).

Outro aspecto clínico importante do CMT é em relação sua apresentação. O CMT por ser isolado (sem associação com outros tipos de

tumores) ou associado com o FEO e/ou HPT. A classificação da NEM2 é relacionada à existência e tipo de associação de tumores, conforme descrito adiante (Hoff *et al.*, 2000).

1.1.1 Classificação da NEM-2

A NEM-2 é subdividida de acordo com sua expressividade fenotípica e agressividade, em três formas clínicas distintas: 1) NEM-2 tipo A (NEM2A) é a forma na qual o CMT é associado a outros tumores e ocorre em 55% dos casos; 2) NEM-2 tipo B (NEM2B) é a forma mais agressiva e também mais rara, com frequências entre 5-10% dos casos; 3) CMT familiar (CMTF) é a forma em que pelo menos quatro membros de uma mesma família apresentam somente o CMT. O CMTF acomete entre 35-40% dos casos (Tabela 1) (Brandi *et al.*, 2001; Raue; Frank-Raue, 2010).

Tabela 1 - Expressão fenotípica em famílias portadoras de NEM-2 (adaptado de Eng *et al.*, 1996 e Raue e Frank-Raue, 2010)

Tipo	Características Clínicas	% dos casos	Agressividade
NEM2A	1. CMT associado à FEO e HPT; 2. CMT e FEO em pelo menos 1 indivíduo; 3. CMT e HPT, excluído o diagnóstico de FEO.	55%	Moderada-Alta
NEM2B	CMT +/- FEO + anormalidades fenotípicas (<i>habitus</i> marfanóides), geralmente sem HPT + ganglioneuromatose	5-10%	Alta
CMTF	CMT em quatro ou mais membros da família, excluídos os diagnósticos de FEO e HPT no afetado ou em membros sob risco.	35-40%	Baixa-Moderada
Outros	Famílias com menos de quatro membros com CMT; nenhuma evidência objetiva de FEO ou HPT ou famílias com diagnóstico histopatológico não confirmado.	--	--

1.2 Proto-oncogene *RET*

O gene *RET* (REarranjo durante Transfecção) foi identificado em 1985, durante um processo de transfecção de células NIH 3T3 com DNA de linfoma humano, na qual houve um rearranjo de DNA que resultou em uma transformação oncogênica (Takahashi *et al.*, 1985). Entretanto, a primeira descrição de mutações no gene *RET* em pacientes com NEM2 ocorreu apenas em 1993. Mulligan e colaboradores observaram em estudos por mapeamento físico e combinação genética a associação do gene *RET* em pacientes com NEM-2, e identificou a mutação no códon 634* como responsável pelo fenótipo de NEM2A em 19/20 dos casos (Mulligan *et al.*, 1993).

A partir dessa correlação, diversos estudos demonstram a ocorrência de mutações germinativas em aproximadamente 100% dos casos (Brandi *et al.*, 2001; Jimenez *et al.*, 2004; Wells *et al.*, 2015)

O proto-oncogene *RET* está localizado na banda 10q11.2, sendo constituído por 20 exons, todos codificantes, e expresso principalmente nas células precursoras da crista neural e do trato urogenital. Esse gene codifica o receptor de tirosina-quinase RET que está envolvido na regulação do crescimento, sobrevivência, proliferação, diferenciação e migração celular (Groot *et al.*, 2006).

A proteína RET possui três isoformas geradas por “*splicing* alternativo” do RNA mensageiro sendo determinadas de RET51, RET43 e RET9, sendo as principais RET51 que possui 1.114 aa (aminoácidos) e RET9 com 1.072 aa (Mise *et al.*, 2006; Elisei *et al.*, 2014).

* No artigo está descrito no códon 380

A proteína RET é composta por três domínios: o domínio extracelular, um domínio transmembrana e um domínio intracelular tirosina-quinase. O domínio extracelular localiza-se nos 11 primeiros exons do gene *RET* e possui duas regiões, sendo uma região caderina-*like* que contém moléculas de adesão dependentes de Ca^{2+} com função de induzir e estabilizar trocas necessárias para interação de ligantes e co-receptores. Há também uma região rica em cisteína que é responsável pela estrutura terciária, através de ligações dissulfeto intramoleculares, e formação de dímeros. O domínio intracelular é responsável pela fosforilação de resíduos de tirosina que envolve a interação com moléculas alvo e a ativação de inúmeras vias de sinalização de transdução intracelulares, a qual ocorre nos subdomínios de tirosina quinase - TK1 e TK2 (Hoff *et al.*, 2000; Groot *et al.*, 2006).

A ativação de RET ocorre através de um complexo de ligantes e co-receptores que provocam a dimerização dos monômeros do receptor RET e promovem a fosforilação dos resíduos intracelulares, iniciando e ativando as diversas vias de sinalização celular. O ligante GDNF (*Glial derived Nerve Growth Factor*) está envolvido na migração e diferenciação de células derivadas da neuroectoderme e acoplado com seu co-receptor $\text{GRF}\alpha$ -1 ativa a sinalização da cascata, assim como, $\text{GRF}\alpha$ -2/ nerturina, $\text{GRF}\alpha$ -3/ artemina e $\text{GRF}\alpha$ -4/ persepina (Hoff *et al.*, 2000; Marx, 2005; Arighi *et al.*, 2005).

Estudos *in vitro* demonstram que a sinalização de RET ocorre pela dimerização do complexo ligante-receptor, no entanto a presença de mutações em determinados domínios da proteína pode desencadear uma ativação

constitutiva da via de RET na ausência de seus ligantes, promovendo processos neoplásicos (Nunes *et al.*, 2006; Vaclavikova *et al.*, 2009).

No domínio extracelular as mutações interferem nas ligações intramoleculares e favorecem ligações bissulfeto intermoleculares que viabilizam a dimerização e fosforilação ativando a proteína. No domínio intracelular as mutações alteram o sítio de reconhecimento do substrato no interior do domínio tirosina-quinase, aumentando sua afinidade com o ligante ou alterando sua especificidade e levando a um CMT precoce (Figura 1) (Hoff *et al.*, 2000; Toledo *et al.*, 2006).

Figura 1 - Domínios e sinalização da proteína RET: 1) sinalização normal da proteína com seu complexo; 2) Dimerização independente do complexo devido à mutação no domínio extracelular; 3) Ativação da proteína sem dimerização ou com hiperatividade (Adapt. Hoff *et al.*, 2000; Marx, 2005)

1.3 Correlação genótipo-fenótipo na NEM2

As mutações no gene *RET* ocorrem principalmente nos exons 5, 8, 10, 11, 13, 14, 15 e 16, denominados regiões quentes (*mutacional hotspots*). Essas regiões são, portanto as preferencialmente sequenciadas durante o rastreamento genético nos casos-índice e familiares sob-risco (Berndt *et al.*, 1998; Frank-Raue *et al.*, 2010b).

O indivíduo portador de mutação germinativa (herdada) apresenta um risco muito alto para desenvolver CMT. Dessa forma, os parâmetros internacionais de manuseio clínico desses casos sugerem que esses pacientes sejam submetidos à tireoidectomia total (TTx), que consiste na retirada da glândula tireoide e na reposição de hormônios, por toda a vida, afim de evitar o desenvolvimento do câncer. A indicação da idade para a TTx preventiva depende da mutação encontrada e a agressividade associada (Brandi *et al.*, 2001)

Segundo o consenso Internacional (ATA), a classificação de risco para desenvolver tumor varia entre nível 1 (alto), nível 2 (mais alto) e nível 3 (altíssimo) (Brandi *et al.*, 2001). As mutações que ocorrem nos códons 883, 918 e 922 são classificadas como risco 3 responsáveis pela forma clínica de NEM2B. Pacientes identificados com essas mutações são indicados à cirurgia nos primeiros 6 meses de vida. As mutações de nível 2 são encontradas nos códons 611, 618, 620 e 634, sendo causadoras da NEM2A. Pacientes identificados com essas mutações são indicados à cirurgia antes dos 5 anos de idade. As mutações 609, 768, 790, 791 804, e 891 são associadas como nível

1 de agressividade e a indicação para cirurgia é entre 5 a 10 anos de idade (Tabela 2) (Brandi *et al.*, 2001).

Em 2009, a classificação de risco das mutações foi representada por códigos A, B, C e D (Kloos *et al.*, 2009). No entanto, recentemente, numa revisão da ATA classificou o risco das mutações como altíssimo risco (*HST*), alto risco (*H*) e risco moderado (*MOD*). Essa classificação buscou simplificar a interpretação de patogenicidade das variantes *RET*. Assim, a mutação M918T, associada à NEM2B é classificada como *HST*; as mutações C634 são classificadas como ATA-H e as demais mutações descritas foram todas agrupadas na classe *MOD* (Wells *et al.*, 2015). A principal diferença apresentada foi que as indicações para cirurgia dos casos com todas as demais mutações (denominadas moderadas) são baseadas, também, em análises bioquímicas. Recomenda-se que seja realizado o monitoramento com dosagens de calcitonina (marcador bioquímico para CMT) e se elevados esses valores o indivíduo seja submetido à cirurgia (Wells *et al.*, 2015).

Tabela 2 - Classificação de riscos correlacionando genótipo-fenótipo com a idade recomendada para cirurgia tireoidiana preventiva (adaptado de Brandi *et al.*, 2001; Toledo *et al.*, 2006)

Níveis de risco	Códon com mutação	Fenótipo associado	Idade profilática
1 (baixo risco)	609; 768; 790; 791; 804; 891	NEM2A CMTF	< 5-10 anos de idade
2 (alto risco)	611; 618; 620; 634*	NEM2A CMTF	< 5 anos de idade
3 (altíssimo risco)	883; 918; 922	NEM2B	< 6 meses

* atualmente, nestes casos a cirurgia deve ser recomendada ao redor dos 3 anos (Kloos *et al.*, 2009).

1.4 Polimorfismos no gene *RET*

O gene *RET* apresenta diversos polimorfismos: a) intrônicos que são localizados em regiões não codificadoras; b) exônicos sinônimos que se localizam na região codificadora do gene, mas sem causar troca de aminoácidos. Essas variantes não causam uma mudança direta na proteína RET e geralmente apresentam frequências alélicas relativamente altas na população geral (sem tumores). Assim, essas variantes não são clinicamente relevantes, pois não aumentam de maneira importante o risco ao CMT (Balasubramanian *et al.*, 2004).

Além dessas variantes, o gene *RET* possui pelo menos dois polimorfismos frequentes na população que causam troca de aminoácidos (rs1799939, G691S e rs17158558, R982C). Apesar de alguns estudos caso-controle terem sugerido uma possível influência no risco ao CMT (Robledo *et al.*, 2003; Elisei *et al.*, 2004), essas variantes são amplamente interpretadas como polimorfismos benignos sem implicação clínica. (Machens *et al.*, 2012).

1.5 Caracterização de variantes (mutação ou polimorfismo)

1.5.1 Estudo de frequência alélica

Em linhas gerais e de forma bastante simplificada, uma variante genética encontrada em um paciente e não encontrada em indivíduos saudáveis da população seria classificada como mutação. No entanto, o número de controles que devem ser analisados varia bastante (Berndt *et al.*, 1998; Saez *et al.*, 2000). Por isso, em 2005, foi recomendada a análise de um

mínimo de 1000 indivíduos controles (Weber; Eng, 2005), pois foi observado que 86% das variantes raras possuem frequência menor que 0.5%, sendo necessário estudar um maior número de indivíduos para aumentar significativamente a probabilidade de encontrar uma variante rara ou ainda muito rara (Balasubramanian *et al.*, 2004; Li; Leal, 2009).

O rastreamento genético de variantes pode ser realizado por diversas técnicas, como enzima de restrição (*RFLP*), reação de cadeia de polimerase em tempo real (*RT-PCR*), Fusão de alta resolução (*HRM*), sequenciamento de Sanger, sequenciamento de nova geração (*NGS*), entre outras.

O processo do *NGS* é composto por três etapas: preparação de biblioteca, amplificação e sequenciamento (Mardis, 2008; Liu *et al.*, 2012). O uso dessa técnica possibilita a análise genética de um grande número de indivíduos de forma relativamente rápida e com baixo custo. Dessa forma, o *NGS* se tornou uma das técnicas mais utilizadas em rastreamento de variantes genéticas em grandes coortes. É importante validar os resultados de *NGS* pela técnica de sequenciamento de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) para confirmação e garantir que os resultados obtidos das leituras não são artefatos (Liu *et al.*, 2012; McCourt *et al.*, 2013).

1.5.2 Estudo de predição (*in silico*)

Além do estudo de frequência alélica, programas preditivos foram desenvolvidos para auxiliar na caracterização da possível patogenicidade de variantes genéticas. Existem diversos programas preditivos voltados a análise

de variantes missenses, porém os descritos na literatura com maior frequência são o *SIFT*, *PMUT*, *Align-GVGD*, *SNAP*, *POLYPHEN 2* e *PantherPSEC*.

Essas ferramentas usam diferentes algoritmos para analisar a possível interferência da troca de aminoácidos na estrutura físico-químicas da proteína, além de associar a conservação evolutiva dos resíduos mutados e dados da literatura, como citado a seguir.

A avaliação por meio do *SIFT* baseia-se na conservação evolutiva da posição de determinado aminoácido em relação à proteína. É realizado um alinhamento da proteína em questão de diversas espécies e se o aminoácido for conservado sugere que aquela posição é importante para a função protéica (Kumar *et al.*, 2009).

O programa *PMUT* analisa se as variantes são associadas à doença através das informações contidas nos bancos de dados OMIM e *SwissProt*, e a interação com a estrutura da proteína do programa *Protein Mutant Database (PMD)* (Ferrer-Costa *et al.*, 2004).

A análise realizada pelo programa *SNAP* prediz se a troca de aminoácidos é neutra em relação à estrutura secundária da proteína. A estrutura utilizada é do programa *PROF*, sendo associada a diversas informações contidas em programas de análise de proteínas como *PSI-BLAST*, *PSIC*, *SwissProt*, *Protein Mutant Database (PMD)* e *Pfam*. Além disso, também se avalia o efeito funcional oferecido pelo programa *SIFT* (Bromberg *et al.*, 2008).

O *Align-GVGD* classifica as variantes pelos graus de agressividade baseando-se em alinhamento de proteínas de diversas espécies e

características bio-físicas de aminoácidos. O banco de dados utilizado por esse programa é o *BRACAnalysis* e *GenBank*, e o alinhamento feito pelo programa 3DCoffee (Tavtigian *et al.*, 2006).

O programa *PantherPSEC* integra informações como conservação de proteínas, função molecular, processo biológicos e vias de sinalização à troca de aminoácidos (Thomas *et al.*, 2003).

O *POLYPHEN 2* avalia a troca de aminoácido como patogênica pelas características da sequência de conservação, estrutura e posição da substituição de aminoácido com as anotações do programa *Swiss-Prot* (Adzhubei *et al.*, 2010).

1.6 Variantes de significado desconhecido (*VUS*)

Nos últimos anos, uma nova classe de variantes genéticas do gene *RET* surgiu e vem se expandindo bastante. Trata-se das variantes com significado clínico indeterminado, em inglês chamadas de *variant of unknown (clinical) significance* (*VUS*). As *VUS* não se classificam como mutações clássicas (C634 e M918) ou mutações menos agressivas (ATA-A/B ou MOD), mas também não são polimorfismos comuns.

Ao contrário, das mutações e polimorfismos, as variantes consideradas *VUS* não apresentam evidências suficientes que determinem seu grau patogênico. Os poucos estudos de correlação genótipo-fenótipo, frequência populacional, *in vitro*, *in silico* ou *in vivo*, bem esclarecidos, dificulta o diagnóstico dos indivíduos portadores e compromete o tratamento dos casos portadores de *VUS* no gene *RET*. No caso do gene *RET*, a caracterização da

patogenicidade de suas variantes genéticas é de extrema importância, pois indivíduos, mesmo assintomáticos, portadores de mutações *RET* devem ser indicados à tireoidectomia total profilática (Domchek; Weber, 2008; Radice *et al.*, 2011; Wells *et al.*, 2015). Em casos já identificados e operados, o rastreamento de familiares deve ser realizado, e é essencial saber se a variante encontrada é realmente patogênica, e irá levar ao desenvolvimento do CMT nesses casos.

No entanto, pouco se sabe sobre as *VUS* encontradas no gene *RET*, o que limita de forma importante o manuseio clínico desses pacientes. Se a variante for um polimorfismo, isso significa que não é causadora de CMT e que os portadores não devem ser submetidos à tireoidectomia total (TT). Se a variante for uma mutação os portadores devem ser submetidos à cirurgia para evitar o desenvolvimento ou agravamento do CMT. Se a variante for um polimorfismo e os portadores forem submetidos à TT, os resultados anátomo patológico serão negativos, o procedimento retirou um órgão de forma completamente desnecessária, e esse indivíduo deverá repor os hormônios tireoideanos por toda sua vida. Se a variante for uma mutação e o indivíduo não for indicado para TT, ele/a poderá desenvolver CMT que pode ocasionar metástase aumentando o risco de morte mesmo após cirurgia posterior.

Um exemplo claro de uma *VUS* que sua patogenicidade foi mal interpretada e resultou num manuseio clínico inadequado em portadores foi o caso da variante Y791F do éxon 13 (Pezczkowska *et al.*, 2013). Em 1998, essa variante foi descrita inicialmente como mutação (Berndt *et al.*, 1998) e desde então, tem sido incluída nos guias clínicos como associada a um elevado risco

ao CMT e portanto com recomendação de TT preventiva em portadores (Brandi *et al.*, 2001; Kloos *et al.*, 2009). Em consequência da descrição dessa variante como patogênica, mesmo sem dados conclusivos, diversos familiares assintomáticos portadores de Y791F foram submetidos à cirurgia (Fitze *et al.*, 2002; Gimm *et al.*, 2002). Posteriormente, foram descritas as primeiras evidências sugerindo que Y791F não estaria associada a um elevado risco de CMT. Vestergaard e colaboradores relataram um caso-índice com bócio portador da variante Y791F. Em seguida, análises genéticas dos familiares identificaram 11 portadores, que foram rastreados clínica e bioquimicamente. De forma clara, mas surpreendente nenhum dos 11 familiares rastreados apresentou alteração bioquímica ou evidências do desenvolvimento de CMT, FEO e HPT. Sendo assim, os autores questionam se haveria necessidade de intervenção cirúrgica nos portadores de *RET* Y791F (Vestergaard *et al.*, 2007).

Erlic e colaboradores concluíram através de estudo populacional e análise *in silico* pelo programa *SIFT* que a variante Y791F é um polimorfismo raro e não patogênico. Foi encontrada a variante Y791F em 13/1475 amostras-controle (sem tumor endócrino) e a análise preditiva demonstrou uma troca de aminoácidos tolerável sem probabilidade de dano na proteína (Erlic *et al.*, 2010). Em 2013, o grupo de Neumann (Friburg, Alemanha) conclui que a Y791F é ou um *SNP* ou uma *VUS*.

1.6.1- Levantamento de variantes desconhecidas (VUS)

Os avanços do conhecimento genético e genômico ocorridos nos últimos anos foram imensos. Em 2001 foi publicado o primeiro rascunho do genoma

humano. Hoje, menos de 15 anos depois, milhares de genomas, exomas, transcriptomas foram sequenciados e estão gratuitamente disponíveis para pesquisadores, empresas e leigos. Há poucos anos, se tinha conhecimento sobre os projetos do *NCBI* (Consórcio Americano do NIH) e *ENSEMBL* (Consórcio Europeu), agora o número bancos de dados públicos existentes é enorme e continua crescendo com o início de novos projetos na área.

No levantamento no banco de dados da *ARUP Online Scientific Resource* verificamos a existência de 48 *VUS*, nos exons *hotspots*, do gene *RET* (Tabela 3). Ao contrário da Y791F, as demais *VUS* possuem escassez de informação para classificá-las como mutações ou polimorfismos.

As descrições abaixo são, apenas, alguns relatos das *VUS* do gene *RET*:

Um levantamento feito em abril (1993) a março (2004) em 6.700 casos com diagnóstico ou suspeita de NEM2A ou CMTF, foi realizado a análise dos exons 10 e 11 para o gene *RET*, foram encontradas nove novas variantes em 12 casos não-relacionados, na qual seis variantes eram de significado desconhecido (D631V, H665Q, D631E, IVS9, Y606C e C630R). Nesses casos, as variantes foram consideradas *VUS* devido ao fato de familiares assintomáticos apresentarem a mesma variante, ou não haver histórico e/ou dados suficientes para um diagnóstico adequado (Ahmed *et al.*, 2005).

Em levantamento realizado entre 1993 a 2008 em 360 casos índices com CMT do Instituto Gustave Roussy Villejuif (França) foram encontrados quatro pacientes portando as variantes A510V, E511K, C531R e K666N. Análises *in vitro* do potencial oncogênico dessas variantes mostraram um nível

alterado de fosforilação (RET e ERK), transformação celular, e estrutura em relação à célula selvagem. Dentre as novas variantes, a K666N apresentou maior potencial oncogênico, entretanto os tumores mais agressivos foram encontrados nos portadores das variantes A510V e E511K (Muzza *et al.*, 2010).

Tabela 3 - Variantes genéticas identificadas no gene *RET* com significado desconhecido (*VUS*) (adaptado da fonte: ARUP Database fevereiro 2014)

Éxon	Genótipo (cDNA)	Proteína	Troca de nucleotídeo	Identificação <i>SNP</i> ¹	Achado clínico	Indivíduos saudáveis ³	Referências
5	c.961G>A	G321R	GGG-AGG	rs377767388	CMT/HCC	--	Dvorakova (2005)
	c.1013C>T	T338I	ACC-ATC	rs377767433	HSCR	200/50	Cosci 2011 / Fitze (2002)
8	c.1529C>T	A510V	GCC-GTC	rs201745826	CMT/LNM	400	Muzza (2010)
	c.1531G>A	E511K	GAG-AAG	rs201553718	CMT/LNM	100/400	Prazeres 2011 / Muzza (2010)
	c.1591T>C	C531R	TGT-CGT	rs377767390	CMT	400	Muzza (2010)
	c.1597G>A	G533S	GGC-AGC	rs75873440	HSCR	--	Sangkhathat (2006)
	c.1799G>A	R600Q	CGG-CAG	rs377767393	CMT	300	Saez (2000)
10	c.1807A>C	K603Q	AAA-CAA	rs377767394	CMT	80	Rey (2001)
	c.1817A>G	Y606C	TAT-TGT	rs377767395	CMT	--	Ahmed (2005)
	c.1825T>A	C609S	TGC-AGC	rs77558292	HSCR	50	Fitze (2002)
	c.1832G>C	C611S	TGC-TCC	rs377767398	S/Fenótipo	--	Kruckeburg (2004)
					CMT/HSCR	--	Nishikawa (2003)
11	c.1889G>C	C630S	TGC-TCC	rs377767405	CMT	--	Kitamura (1997)
	c.1891G>A	D631N	GAC-AAC	rs377767406	#	--	Asai (1999)
	c.1892A>C	D631A	GAC-GCC	rs121913308	#	--	Asai (1999)
	c.1892A>G	D631G	GAC-GGC	rs121913308	#	--	Shirahama (1998)
	c.1892A>T	D631V	GAC-GTC	rs121913308	FEO	--	Ahmed (2005)
	c.1893C>A	D631E	GAC-GAA	rs55846256	NEM2	--	Kruckeburg (2004)
	c.1894G>A	E632K	GAG-AAG	rs377767407	CMT multi	--	Frank-Raue (2007)
	c.1903C>G	R635G	CGC-GGC	rs377767410	NEM2A/CMT	--	Lips (1994)
	c.1919C>G	A640G	GCC-GGC	rs78935588	NEM2A	--	Tessitore (1999)

continua

Tabela 3 - Variantes genéticas identificadas no gene *RET* com significado desconhecido (*VUS*) (adaptado da fonte: ARUP Database fevereiro 2014) (continuação)

Éxon	Genótipo (cDNA)	Proteína	Troca de nucleotídeos	Identificação <i>SNP</i> ¹	Achado Clínico	Indivíduos saudáveis ³	Referências
11	c.1921G>T	A641S	GCT-TCT	rs377767411	NEM2A	--	Poturnajova (2005)
	c.1942G>A	V648I	GTC-ATC	rs777111105	CMT	200	Nunes (2002)
	c.1946C>T	S649L	TCG-TTG	rs148935214	CMT/#	100	Wiench (2001)
	c.1995C>G	H665Q	CAC-CAG	rs377767413	FEO	--	Ahmed (2005)
	c.1997A>T	K666M	AAG-ATG	rs377767439	CMT/HCC	--	Mastroianno (2011)
	c.1998G>T	K666N	AAG-AAT	rs146646971	CMT	400	Muzza (2010)
	c.2098A>T	M700L	ATG-TTG	rs377767441	CMT/FEO	100	Conzo (2012)
13	c.2309G>A	R770Q	CGA-CAA	rs377767414	CMT	--	Frank-Raue (2010)
	c.2330A>G	N777S	AAC-AGC	rs377767415	CMT/#	150	D'Aloiso (2006)
	c.2332G>A	V778I	GTC-ATC	rs75686697	CMT	--	Miyauchi (2002)
	c.2371T>A	Y791N	TAT-AAT	rs377767417	--	--	Frank-Raue (2010)
	c.2372A>T	Y791F	TAT-TTT	rs77724903	*D	*D	Diversos artigos
14	c.2413G>A	E805K	GAG-AAG	rs377767418	CMT	--	Cranston (2006) #1
	c.2452G>A	E818K	GAG-AAG	rs377767420	CMT	--	Paszko (2007)
	c.2456G>T	S819I	AGC-ATC	rs377767421	CMT	--	Koch (2000)
	c.2497C>T	R833C	CGC-TGC	rs377767422	#	--	Cranston (2006) #2
	c.2522C>T	P841L	CCG-CTG	rs149891333	HSCR	--	Decker (1997)
	c.2529G>T	E843D	GAG-GAT	rs377767423	CMT	--	Koch (2000)
	c.2530C>T	R844W	CGG-TGG	rs377767424	HSCR	--	Kim (2006)
	c.2531G>A	R844Q	CGG-CAG	rs55947360	CMT	--	Paszko (2007)
	c.2531G>T	R844L	CGG-CTG	rs55947360	MELANOMA	--	Greenman (2007)
	c.2543T>C	M848T	ATG-ACG	rs201101792	CMT	200	Elisei (2007)

continua

Tabela 3 - Variantes genéticas identificadas no gene *RET* com significado desconhecido (*VUS*) (adaptado da fonte: ARUP Database fevereiro 2014) (conclusão)

Éxon	Genótipo (cDNA)	Proteína	Troca de nucleotídeos	Identificação <i>SNP</i> ¹	Achado Clínico	Indivíduos saudáveis ³	Referências
15	c.2641C>G	L881V	CTG-GTG	rs377767427	CMT/HCC	--	Frank-Raue (2010)
	c.2656C>T	R886W	CGG-TGG	rs146838520	CMT	100/ 70	Prazeres (2011/ 2006)
	c.2711C>G	S904C	TCC-TGC	rs267607011	MEN2B	--	Menko (2002)
	c.2719A>G	K907E	AAG-GAG	rs377767430	HSCR	--	Attie (1995)
	c.2720A>T	K907M	AAG-ATG	rs377767431	CMT	--	Kaserer (2001)
16	c.2735G>A	R912Q	CGG-CAG	rs78347871	HSCR	50	Fitze (2002)
	c.2752A>G	M918V	ATG-GTG	rs377767442	CMT	200	Cosci (2011)

¹ Fonte de identificação das variantes: Human Genome Mutation Database (CM); NCBI (rs);

² Fontes das frequências alélicas e genotípica: *GF (projeto NHLBI); MAF (projeto 1000 genomes); ENSEMBLE; HapMap; ^a encontradas em heterozigose (projeto exoma NHLBI ESP);

³ Levantado dado da referência;

*D= Diversas informações

- Estudo *in vitro*

Outras doenças genéticas também apresentam dificuldade no diagnóstico pela presença de *VUS* e devido ao grande número dessas variantes foi elaborado um guia prático para auxiliar o clínico no diagnóstico genético. De acordo com o Guia recomenda-se que variantes gênicas sejam divididas em cinco classes: 1- Claramente não patogênico; 2- não deve ser patogênico; 3- significado desconhecido; 4- susceptível de ser patogênica; 5- claramente patogênica (Tabela 4) (Wallis *et al.*, 2013).

Tabela 4 - Definições das classes para variantes genéticas (Wallis *et al.*, 2013)

CLASSE	TIPO	DEFINIÇÃO
1	Claramente não patogênico	Polimorfismo "comum" (não descrito)
2	Não deve ser patogênico	Diagnóstico não confirmado molecularmente
3	Significado desconhecido	Não confirmar ou excluir diagnóstico
4	Susceptível de ser patogênica	Compatível com diagnóstico
5	Claramente patogênica	Confirmado com o diagnóstico

1.7 Justificativa

Diante da falta/controvérsia de dados sobre as *VUS* descritas no gene *RET* e as implicações clínicas que interpretações errôneas podem causar, esse presente estudo buscou realizar uma ampla análise das frequências de variantes alélicas em 2.061 indivíduos-controle da população brasileira com o objetivo de tentar entender melhor o risco (ou ausência de risco) ao CMT causado por algumas *VUS*. Os dados obtidos foram analisados junto com levantamentos dos bancos de dados e literatura para abranger o máximo de informações possibilitando a caracterização de variantes genéticas.

A metodologia de rastreamento foi o sequenciamento de nova geração utilizando a aplicação *primers fusion* na plataforma Ion Torrent Personal Genome Machine™ System e a técnica de Sanger. O estudo *in silico* foi realizado, inicialmente, em seis programas preditivos. O levantamento dos dados foi realizado pelos bancos de dados dos projetos *NCBI*, *Exome Aggregation Consortium (ExAC)* e *Catalogue of Somatic Mutation in Cancer (Cosmic)*.

Espera-se que os resultados gerados neste estudo possam contribuir para um melhor entendimento das *VUS* do gene *RET* e assim possibilitar um melhor manuseio clínico e cirúrgico dos portadores dessas variantes e seus familiares.

2 Objetivo

Expandir o conhecimento atual em relação ao possível papel patogênico ou benigno das variantes de significado desconhecido (*VUS*) do gene *RET*, com especial atenção a variante Y791F.

3 Casuística

3.1 Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP (CAPPesq) sob o protocolo de pesquisa N° 10097/13 e de outros projetos do grupo (0425/08, 0549/09 e 0050/10). Este projeto também está associado ao projeto FAPESP de auxílio à pesquisa N° 2013/01476-9.

3.2 Indivíduos controles (sem histórico familiar de NEM-2)

A pesquisa foi realizada em 2061 amostras provenientes das seguintes fontes que foram divididas nos dois grupos abaixo.

- *Grupo 1: Amostras cedidas por grupos de pesquisa*

Em um total de 1261 amostras de DNA extraídos de sangue total foram gentilmente cedidas de dois bancos de DNA provenientes de dois grupos de pesquisa: Laboratório de Oncologia Experimental (LIM24) e Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências (IB).

Os dados como sexo, idade e ascendência foram cedidos de 1217 amostras, sendo 494 do sexo masculino (40,6 %) e 723 do sexo feminino (59,4 %); a idade média foi de $66,6 \pm 17,5$ anos, sendo 76% de idade superior a 52 anos de idade.

- *Grupo 2: Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo*

Entre agosto de 2013 a fevereiro de 2014 foram coletadas 800 amostras de sangue total. As coletas foram realizadas no banco de sangue da Fundação

Pró-sangue Hemocentro de São Paulo (Diretor Prof. Vicente Odone Filho). Os indivíduos foram triados através de entrevista e preenchimento de questionário específico (vide anexo A).

Foram incluídos no estudo indivíduos adultos (maiores de 18 anos), sem histórico familiar de tumores hereditários de tireoide. Todos os participantes do projeto leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes de realizar o procedimento da coleta de sangue (vide anexo B).

Dentre as 800 amostras, 419 (52,4%) eram homens e 381 mulheres (47,6%) com média de idade de 35 ± 12 anos de idade. Os dados populacionais, como ascendência, cidade de origem, histórico clínico também foram coletados no questionário específico.

Os dados contidos no questionário como sexo, idade, ascendência, histórico de doença hereditária foram utilizados para gerar um banco de dados para caracterizar a população de estudo.

3.3 Pacientes com CMT

Na pesquisa, também, foram incluídas e investigadas as famílias de indivíduos portadores de *VUS* com tumores associados à NEM-2.

4 Métodos

4.1 Estudo molecular

O rastreamento de variantes dos grupos 1 e 2 foram utilizadas duas estratégias: a) Sequenciamento de Sanger – grupo 1 (somente éxon 13); b) Sequenciamento de nova geração – grupo 2 (8 exons *hotspot*) (Figura 2).

Figura 2 - Principais etapas do rastreamento de variantes do gene *RET* nos indivíduos-controle

4.1.1 Extração de DNA (sangue total)

A extração de DNA 800 amostras coletas na Fundação Pró-sangue foi realizada com o kit *PureLink® Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen, USA), conforme instruções descritas pelo protocolo do fabricante. Este método baseia

se na extração e purificação de gDNA por coluna de sílica. O volume inicial de amostra utilizado foi 200 µl e a eluição foi realizada em 120 µl.

A qualidade da amostra foi avaliada por espectrofotometria através das análises das relações de absorbância A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} . As leituras foram realizadas no instrumento *NanoVue Plus* (GE Healthcare®, Buckinghamshire, UK). Foram aceitas amostras que apresentaram os seguintes valores: a) 1,8 – 2,0 para A_{260}/A_{280} ; b) 2,0 – 2,2 para A_{260}/A_{230} . Amostras com valores abaixo foram novamente purificadas para retirada de inibidores de reação de PCR, tais como sais de proteínas.

A determinação da concentração da amostra foi realizada por fluorimetria utilizando o reagente *Qubit® dsDNA BR Assay Kit* e o fluorímetro *Qubit® 2.0* (Invitrogen, USA). Este método utiliza uma molécula fluorescente que se intercala especificamente com moléculas de dupla fita de DNA, possibilitando uma quantificação mais acurada da amostra.

4.1.2 Grupo 1: Sequenciamento de Sanger

O rastreamento de variantes no éxon 13 do gene *RET* foi realizado por Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR*) seguido por sequenciamento de Sanger.

A reação de PCR foi realizada com o seguinte par de oligonucleotídeos iniciais: senso 5'- AACTTGGGCAAGGCGATGCA-3' e reverso 5'- AGAACAGGGCTGTATGGAGC -3'. O tamanho esperado do fragmento de PCR com este par de oligonucleotídeos é 277 pb (pares de bases). Estes iniciadores foram desenhados com auxílio do programa Primer3

(frodo.wi.mit.edu/). A reação de *PCR* foi realizada com o kit *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, USA) e apresentou as seguintes condições em um volume final de 25 µl: 1X *PCR Buffer* (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl), 2 mM *MgCl₂*, 0,2 mM mix dNTP's e 20 ng de gDNA. A reação de amplificação foi realizada no instrumento *Veritti Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) e o protocolo de termociclagem apresentou os seguintes parâmetros: 95 °C 5 min; 35X: 95 °C 20 seg, 60 °C 20 seg, 72 °C 20 seg; 72 °C 10 min.

A detecção do produto de *PCR* foi realizada por eletroforese em gel de agarose 2% corado com o reagente intercalante fluorescente de dupla fita de *DNA SYBR® Safe DNA Gel Stain*, como padrão de quantificação foi utilizado o reagente *Low DNA Mass™ Ladder* (Invitrogen, USA). Os parâmetros de eletroforese foram 110 Volts por 30 min. A análise do gel foi realizada em transluminador sobre luz UV.

Os produtos com amplificação específica foram submetidos a uma purificação enzimática para retirada de iniciadores de dNTP remanescentes na reação de *PCR*. Para esse procedimento foi utilizado o reagente *ExoSAP-IT® PCR Cleanup reagent* (USB, USA) seguindo instruções descritas pelo protocolo do fabricante.

A reação de sequenciamento de Sanger foi realizada com o reagente *BigDye® Terminator v.3.1 cycle sequencing kit* (Applied Biosystems, USA) utilizando os mesmos iniciadores da *PCR*. O protocolo padronizado apresentou as seguintes concentrações finais em 10 µl de volume final de reação: 1X *Sequencing Buffer*, 1:16 mix *BigDye terminator*, 5 pmol de *primer* e 5-10 ng

DNA. Essa reação foi feita com programa de termociclagem nas condições: 25 ciclos - 95 °C por 10 seg, 50 °C por 10 seg e 60 °C por 1 min.

Para retirada de resíduos (sal e proteínas) e principalmente produtos não incorporados durante a reação (ddNTP's) foi realizada uma purificação através do processo de precipitação alcoólica utilizando o protocolo Etanol Absoluto (PA) / Acetato de sódio (3M) / EDTA (125 mM) conforme protocolo padronizado pelo nosso laboratório.

Após precipitação, o *pellet* seco, foi ressuspendido em 10 µl do reagente *Hi-Di Formamide* (Applied Biosystems), desnaturados a 95°C e submetidos à eletroforese capilar.

O sequenciamento direto foi realizado pelo processo de eletroforese capilar no equipamento *ABI3130xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) seguindo processos recomendados pelo fabricante.

As análises foram realizadas no *software Sequencher v.4.1.4* (Gene Codes, USA). O consenso formado entre as fitas senso e reverso foi comparado com a sequência referência NM_020975.4. As amostras que apresentaram variantes genéticas em relação à referência foram repetidas em duplicata com uma nova reação de *PCR*.

4.1.3 Grupo 2: Sequenciamento de nova geração

O rastreamento de variantes nos 8 exons *hotspot* do *RET* nas 800 amostras do grupo foi realizado por sequenciamento de nova geração (NGS). Foi escolhido essa estratégia de triagem devido a rapidez e custo do método.

O NGS utiliza a estratégia de sequenciamento massivo paralelo de DNA que possibilita a identificação de até bilhões de leituras de uma mesma sequência ao mesmo tempo. Essa metodologia apresenta como vantagens sequenciar em uma única corrida múltiplos fragmentos com grande cobertura com o uso mínimo de amostra. As principais etapas do fluxo de execução da técnica estão descritas abaixo:

1. Construção da biblioteca
2. Preparo do molde (*Template*)
3. Sequenciamento
4. Análise dos dados

1. Construção da biblioteca

Nesta etapa as regiões alvo do DNA são fragmentas em tamanhos específicos por processos químicos, mecânico ou enzimáticos. Outra estratégia de gerar uma biblioteca de fragmentos é utilizar *primers* específicos para regiões alvos de interesse e construir a biblioteca através da técnica de *PCR* (biblioteca de *amplicons*).

Cada fragmento gerado corresponde a um molde (*template*). Após fragmentação, adaptadores, que são sequencias conhecidas, são incorporados ao molde. Nesta etapa também podem ser inseridos sequencia específicas de 5-10 bases para identificação de amostra (*barcodes*), que permite a mistura de diferentes amostras em uma única reação.

Neste projeto, a biblioteca foi construída a partir de *amplicons* dos oito exons *hotspot* do gene *RET* utilizando a estratégia de “Fusão dos *primers*” (*Primers Fusion*). Na sequencias dos oligonucleotídeos iniciadores, além da

sequência específica para o alvo, estão incorporados sequências dos adaptadores TrP1 (adaptador truncado) e A e do código identificador da amostra (*barcodes*).

O método de fusão dos *primers* utiliza quatro sequências de iniciadores: dois pares senso e dois reversos para cada região alvo, que permite o sequenciamento bidirecional. Um dos pares apresenta na sequência do iniciador senso o adaptador A localizado próximo ao início da região alvo, e o reverso apresenta o adaptador trP1 na região distal final da região alvo. O outro par apresenta as regiões trocadas entre o senso e o reverso (Figura 3).

Figura 3 - Método de fusão dos *primers*. A- Sequenciamento bidirecional da região alvo com os 2 pares de *primers*; B – Estrutura dos iniciadores

1.1. Oligonucleotídeo iniciadores - Fusão dos primers

Os oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificação dos oito exons *hotspot* foram desenhados com auxílio do programa NCBI/*Primer BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) utilizando a sequência NM_020975.4 como referência.

Após obtenção da sequência específica dos iniciadores foram adicionados sequencias dos adaptadores trP1 e A, e sequencias identificadoras de amostra (*barcodes*). Para cada sequência contendo *barcode* específico foram desenhados 16 iniciadores (8 exons com sequenciamento direcional), totalizando 48 sequencias de oligonucleotídeos (Tabela 5).

Tabela 5 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para estratégia de “*Primers Fusion*”

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência 5'→ 3'	Tamanho produto PCR (pb)
RET-E5F_P1_F	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCATCTCGCCTGCACTGACCA	360
RET-E5R_A_R_BC01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATAAGAGCGAGCACCTCATTTTC	
RET-E5R_A_R_BC02	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATAAGAGCGAGCACCTCATTTTC	
RET-E5R_A_R_BC03	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATAAGAGCGAGCACCTCATTTTC	
RET-E5R_P1_R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAAGAGCGAGCACCTCATTTTC	
RET-E5F_A_F_BC01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATCATCTCGCCTGCACTGACCA	
RET-E5F_A_F_BC02	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATCATCTCGCCTGCACTGACCA	
RET-E5F_A_F_BC03	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATCATCTCGCCTGCACTGACCA	
RET-E8F_P1_F	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCTGTGACCCTGCTTGTCTG	287
RET-E8R_A_R_BC01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATCAGGACCCCGTTTCCACC	
RET-E8R_A_R_BC02	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATCAGGACCCCGTTTCCACC	
RET-E8R_A_R_BC03	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATCAGGACCCCGTTTCCACC	
RET-E8R_P1_R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCAGGACCCCGTTTCCACC	
RET-E8F_A_F_BC01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATCCTGTGACCCTGCTTGTCTG	
RET-E8F_A_F_BC02	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATCCTGTGACCCTGCTTGTCTG	
RET-E8F_A_F_BC03	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATCCTGTGACCCTGCTTGTCTG	
RET-E10F_P1_F	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAGGCTGAGTGGGCTACGTCTG	270
RET-E10R_A_R_BC01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATGTTGAGACCTCTGTGGGGCT	
RET-E10R_A_R_BC02	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATGTTGAGACCTCTGTGGGGCT	
RET-E10R_A_R_BC03	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATGTTGAGACCTCTGTGGGGCT	
RET-E10R_P1_R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGTTGAGACCTCTGTGGGGCT	
RET-E10F_A_F_BC01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATAGGCTGAGTGGGCTACGTCTG	
RET-E10F_A_F_BC02	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATAGGCTGAGTGGGCTACGTCTG	

continua

Tabela 5 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para estratégia de “*Primers Fusion*” (continuação)

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência 5'→ 3'	Tamanho produto PCR (pb)
RET-E10F_A_F_BC03	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATAGGCTGAGTGGGCTACGTCTG	399
RET-E11F_P1_F	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATATGAGGCAGAGCATACGCAGCC	
RET-E11R_A_R_BC01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATCTTGAAGGCATCCACGGAGACC	
RET-E11R_A_R_BC02	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATCTTGAAGGCATCCACGGAGACC	
RET-E11R_A_R_BC03	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATCTTGAAGGCATCCACGGAGACC	
RET-E11R_P1_R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCTTGAAGGCATCCACGGAGACC	
RET-E11F_A_F_BC01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATATGAGGCAGAGCATACGCAGCC	
RET-E11F_A_F_BC02	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATATGAGGCAGAGCATACGCAGCC	
RET-E11F_A_F_BC03	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATATGAGGCAGAGCATACGCAGCC	343
RET-E13F_P1_F	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAACTTGGGCAAGGCGATGCA	
RET-E13F_A_F_BC01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATAACTTGGGCAAGGCGATGCA	
RET-E13F_A_F_BC02	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATAACTTGGGCAAGGCGATGCA	
RET-E13F_A_F_BC03	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATAACTTGGGCAAGGCGATGCA	
RET-E13R_P1_R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAGAACAGGGCTGTATGGAGC	
RET-E13F_A_F_BC01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATAACTTGGGCAAGGCGATGCA	
RET-E13F_A_F_BC02	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATAACTTGGGCAAGGCGATGCA	
RET-E13F_A_F_BC03	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATAACTTGGGCAAGGCGATGCA	359
RET-E14F_P1_F	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCTGGCTCCTGGAAGACC	
RET-E14R_A_R_BC01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATCATATGCACGCACCTTCATC	
RET-E14R_A_R_BC02	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATCATATGCACGCACCTTCATC	
RET-E14R_A_R_BC03	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATCATATGCACGCACCTTCATC	
RET-E14R_P1_R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCATATGCACGCACCTTCATC	
RET-E14F_A_F_BC01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATCCTGGCTCCTGGAAGACC	
RET-E14F_A_F_BC02	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATCCTGGCTCCTGGAAGACC	
RET-E14F_A_F_BC03	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATCCTGGCTCCTGGAAGACC	

continua

Tabela 5 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para estratégia de “*Primers Fusion*” (conclusão)

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência 5'→ 3'	Tamanho produto PCR (pb)
RET-E15F_P1_F	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCATGGCCTGACGACTCGTGC	260
RET-E15R_A_R_BC01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATCCTGGGAGCCCCGCCTCATC	
RET-E15R_A_R_BC02	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATCCTGGGAGCCCCGCCTCATC	
RET-E15R_A_R_BC03	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATCCTGGGAGCCCCGCCTCATC	
RET-E15R_P1_R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCTGGGAGCCCCGCCTCATC	
RET-E15F_A_F_BC01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATCATGGCCTGACGACTCGTGC	
RET-E15F_A_F_BC02	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATCATGGCCTGACGACTCGTGC	
RET-E15F_A_F_BC03	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATCATGGCCTGACGACTCGTGC	
RET-E16F_P1_F	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTCTGTGCCAGGAGTGTCT	295
RET-E16R_A_R_BC01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATCCAAGAGAGCAACACCCACA	
RET-E16R_A_R_BC02	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATCCAAGAGAGCAACACCCACA	
RET-E16R_A_R_BC03	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATCCAAGAGAGCAACACCCACA	
RET-E16R_P1_R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCAAGAGAGCAACACCCACA	
ET-E16F_A_F_BC01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATTCTGTGCCAGGAGTGTCT	
RET-E16F_A_F_BC02	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATTCTGTGCCAGGAGTGTCT	
RET-E16F_A_F_BC03	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATTCTGTGCCAGGAGTGTCT	

1.2. *Preparo pools de DNA*

A biblioteca para NGS foi preparada com amostras de DNA em forma de *pools* contendo 34 amostras. Duas amostras do pool foram controles de sensibilidade do processo, pois eram provenientes de pacientes com mutação no gene *RET*. Foram utilizadas como controles quatro amostras de DNA de indivíduos contendo as seguintes mutações germinativas: C611W, C620R, C634R e M918T.

O *pool* foi preparado adicionado 200 ng de DNA de cada amostra, seguida de quantificação por fluorimetria.

1.3. *PCR para amplificação das regiões alvo com os iniciadores fundidos (Primers Fusion)*

A amplificação dos oito exons foi realizada com o reagente *Platinum® PCR SuperMix High Fidelity* (Invitrogen, USA). Este reagente apresenta todos os componentes para reação de PCR, exceto iniciadores e amostra; e contém uma enzima de alta fidelidade com taxa de correção de 25X. O protocolo de reação apresentou as seguintes condições em um volume final de 50 µl: 1X master mix *high fidelity*; 10 µM de cada iniciador; 20 ng de DNA (*pool*). As condições da PCR no instrumento *Veritti Thermal Cycler* (Applied Biosystems, USA) foram: *hold* de 94 °C por 3 min; ciclo 40X: 94°C por 30 seg; 58 °C por 30 seg; 68 °C por 40 seg.

Devido ao sequenciamento bidirecional dos oito éxons de *RET*, para cada amostra (*pool*) foram realizadas 16 reações de PCR.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% para avaliar se houve amplificação específica. Em seguida, foi realizada a purificação da reação de PCR utilizando o método de coluna de sílica proveniente no kit *PureLink® PCR Purification* (Invitrogen, USA). Esta etapa é importante para retirada de produtos não incorporados na reação (iniciadores, ddNTPs) e também retirada de resíduos de sais. Seguiram-se todas as instruções descritas no manual do fabricante.

Após purificação da PCR todas as amostras foram submetidas a quantificação por fluorimetria utilizando o reagente *Qubit® dsDNA BR Assay Kit* e o fluorímetro *Qubit® 2.0* (Invitrogen, USA).

1.4. Preparo de pool de produtos de PCR

Os 16 *amplicons* de cada *pool* de DNA foram previamente quantificados por fluorimetria e misturados em um único tubo. Como foram desenhados iniciadores contendo três códigos identificadores de amostra (*barcode*) diferentes foi possível montar um *pool* de *amplicons* contendo 48 produtos de PCR. Foi adicionado 30 ng de cada amostra na mistura.

Antes de realizar a etapa de preparo do DNA molde (*template*) foi necessário determinar o fator de diluição do pool de *amplicons* para que a amostra apresentasse uma concentração de aproximadamente 26 pM (~15,5 X 10⁶ moléculas/μl). Essa concentração é a indicada para preparação do molde usando o kit *Ion PGM™ Template OT2 400* e a plataforma *Ion OneTouch™ 2 System* (Ion Torrent, USA). O fator de diluição foi determinado através da fórmula abaixo:

Fator de diluição = concentração da biblioteca/ 26 pM

Antes do preparo do *template* foi realizada uma nova quantificação da biblioteca utilizando o reagente *Ion Library Quantitation* Kit. Foram avaliadas concentrações (1:2, 2X e com o fator de diluição obtido pelo cálculo acima) da biblioteca para certificar a correta quantificação da biblioteca.

O *pool* foi amplificado com *primers* contendo marcadores denominados *barcodes*, através de *PCR* convencional utilizando a *Platinum® Taq DNA Polymerase, High Fidelity* (Invitrogen, Life Technologies, USA). Em um volume final de 50 µl foram adicionadas as seguintes concentrações finais: 10 µM dos iniciadores senso e reverso, 30 ng de DNA (*pool*). O programa de amplificação apresentou as seguintes termociclagens: 1° etapa: 94°C por 3 min; 2° etapa: composta por 40 ciclos de 94°C por 30 seg; 3° etapa: fase de anelamento por 58°C por 30 seg e extensão de 68°C por 1 min.

A etapa de normalização a 26 pM é importante para evitar formação de policlonalidade e esferas vazias da etapa de *PCR* em emulsão.

2. Preparo do molde (*template*)

Esta etapa consiste em amplificar a biblioteca e gerar em um espaço físico pequeno milhares de cópias de cada fragmento de DNA produzido na etapa de preparo da amostra, com o propósito de aumentar a fonte de sinal de detecção.

Na técnica de *NGS Ion Torrent* a amplificação é realizada por emulsão, onde são gerados micro reatores em uma emulsão de óleo. Essa reação é

realizada em pequenas esferas chamada *beads* ou *IonSpheres* recobertas com a sequência complementar ao adaptador. Essas sequências servem para fixar os clones do molde na esfera e também como iniciador da reação de *PCR*.

A etapa de *PCR* em emulsão foi realizada com o kit *Ion PGM™ Template OT2 400* (Ion Torrent, USA). Este kit contém reagentes para amplificação por emulsão de bibliotecas de 400 pares de bases utilizando o instrumento *Ion OneTouch™ 2 System* (Ion Torrent, USA) e enriquecimento das *beads* após a amplificação utilizando o instrumento *Ion OneTouch™ ES* (Ion Torrent, USA). Esta última etapa tem como propósito selecionar somente esferas contendo produto amplificado.

Após o enriquecimento do produto amplificado foi realizada uma verificação do desempenho utilizando o kit *Ion Sphere™ Quality Control*.

3. Sequenciamento

Esta etapa foi realizada com o kit *Ion PGM™ Sequencing 400* (Ion Torrent, USA). Este kit contém todos os reagentes necessários para reação de sequenciamento dentro do sistema semicondutor do kit *Ion 318™ Chip v2* utilizando a plataforma *Ion Personal Genome Machine® (PGM™) System* (Ion Torrent, USA).

A tecnologia *Ion Torrent* do instrumento *PGM* detecta alterações de pH no meio através da reação de polimerização que gera um próton H⁺. Essa alteração é detectada por um transistor e convertido em um sinal elétrico.

Foram analisadas oito corridas/Chips, cada corrida contendo três *pools* (N=34) totalizando 102 amostras por corrida.

4. Análise dos dados

As análises dos resultados foram realizadas no software *Torrent Suite Software 4.0.2* (Ion Torrent, USA) utilizando a ferramenta de análise *Torrent Variant Caller 3.6 (TCV)*.

O *TCV* é uma ferramenta de chamada de variantes de sequencias geradas nas plataformas de sequenciamento *Ion Torrent*. Antes da análise é necessário criar um *template* de análise contendo as regiões de interesse (*hotspots*) e outros critérios de qualidade de chamada de bases (alta ou baixa estringência).

O *template* de análise apresentou os seguintes parâmetros: 48 posições no genoma correspondentes as 48 *VUS* ao longo dos oito exons do gene *RET*, *cutoff* de mutação somática rara e baixa estringência. Para confirmação dos resultados foi utilizado outro *template* com alta estringência.

O algoritmo de mutação somática rara permite detectar uma variante com até 1% de sensibilidade. Os DNA controles adicionados em cada *pool* permitiu avaliar o desempenho de cada pool dentro da corrida. Foram aceitos *pools* com controles $\leq 1\%$.

Todas as variantes detectadas pela triagem por NGS foram analisadas por sequenciamento de Sanger. Para essa nova análise o *pool* identificado com variante missense foi aberto e as amostras executadas individualmente para o éxon correspondente.

4.2 Estudo *in silico*

A análise *in silico* foi realizada utilizando seis diferentes programas de computador que predizem a possível patogenicidade das variantes de significância desconhecida (*VUS*) do gene *RET*. Os programas utilizados foram o *SIFT*, *PMUT*, *Align-GVGD*, *SNAP*, *POLYPHEN 2* e *PantherPSEC* (Tabela 6).

A avaliação por meio do *SIFT* baseia-se na conservação evolutiva ou nas propriedades bioquímicas dos aminoácidos, sendo a variável classificada como “tolerado” ou “não tolerado” para troca de aminoácidos. O resultado com valor abaixo de 0.5 foi excluído da análise, pois apresenta pobre predição.

A análise feita pelo programa *PMUT* gera a resposta “neutra”, quando a troca de aminoácidos não provoca doença; ou “patogênica” quando leva à doença. Este tipo de análise é semelhante à feita pelo *software SNAP* que classifica a variante como “neutra” ou “não-neutra”.

O programa *Align-GVGD* classifica as variantes pelos graus de agressividade representadas na forma de C0 (menos agressiva), C15, C25, C35, C45, C55 e C65 (crescentemente mais agressivas).

O programa *PantherPSEC* classifica a variante de acordo com o valor de *subPSEC* e *Pdeleterious*, sendo que os valores de *subPSEC* ≤ 3.0 e *Pdeleterious* ≥ 0.5 são indicativos de variantes patológicas; além disto, se a variante não apresentar alinhamento pelo programa esta será excluída da análise.

O programa *POLYPHEN 2* avalia a troca de aminoácidos (aa) nos códons como “benigno”, “possivelmente danificada” ou “provavelmente

danificada”, sendo que nesse estudo foram consideradas patológicas as duas últimas classificações.

Tabela 6 - Programas preditivos utilizados na análise das *VUS*

Programa	Referência*
<i>SIFT</i>	http://sift.jcvi.org/www/SIFT_seq_submit2.html
<i>PMUT</i>	http://mmb.pcb.ub.es/PMut/
<i>Align-GVGD</i>	http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php
<i>SNAP</i>	https://roslab.org/services/snap/submit
<i>POLYPHEN 2</i>	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml
<i>PantherPSEC</i>	http://www.pantherdb.org/tools/csnpscoreForm.jsp

*versão dos sites em março de 2015.

4.3 Estudo de frequência alélica

A frequência alélica, também, foi obtida pelo levantamento nos bancos de dados dos projetos: *NCBI*, *Exome Aggregation Consortium (ExAC)* e *Catalogue of Somatic Mutation in Cancer (Cosmic)*.

5 Resultados

5.1 Análise no éxon 13 do gene *RET* no grupo 1

Foram encontradas cinco variantes genéticas, sendo quatro delas descritas no banco de dados de *SNP* do *NCBI* (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/): p.Y791N (rs377767417), p.Y791F (rs77724903), p.L769L (rs1800861) e p.P766P (rs140658743); e uma nova variante sinônima p.N777N (C>T) (Figura 4).

Figura 4 - Eletroferogramas das variantes encontradas no éxon 13 do gene *RET* no grupo 1: a) p.Y791F (TAT>TTT); b) p.Y791N (TAT>AAT); c) p.L769L (CTG>CTT); d) p.P766P (CCG>CCA); e) p.N777N (AAC>AAT)

A presença da variante p.Y791F (c.2372A>T) foi encontrada em dois indivíduos, ambos do sexo feminino com a idade de 77 e 89 anos.

Foram identificados dois portadores com p.Y791N (c.2371T>A), sendo um homem e uma mulher com idades de 76 e 55 anos, respectivamente. Ambas as variantes apresentaram perfil em heterozigose (Tabela 7).

Tabela 7 - Frequências das variantes encontradas no éxon 13

VARIANTE	FREQUÊNCIA	PORCENTAGEM (%)	GENOTIPO	SEXO	IDADE
p.Y791F	2 / 1261	0.0016	AT	F	77
				F	89
p.Y791N	2 / 1261	0.0016	TA	M	76
				F	55
p.N777N	1 / 1261	0.0008	CT	M	42
p.P766P	1 / 1261	0.0008	GA	F	73
p.L769L	717 / 1261	0.57	GT / TT	M / F	>40

O TCLE do HC-FMUSP incluía a possibilidade de contato futuro, caso fosse identificada alguma variante suspeita de aumentar risco ao CMT ou outros tumores endócrinos. Assim, o indivíduo que apresentou a variante p.Y791F com a idade de 76 anos foi convidado a comparecer no hospital para uma avaliação complementar. Exames bioquímicos realizados (calcitonina, CEA, catecolaminas, PTH, cálcio) confirmam a ausência de tumores associados à NEM-2 na família. Foi informado que seu pai era alemão e faleceu aos 75 anos de ataque cardíaco (I.2), e tinha uma filha com 45 anos de idade (III.5). Realizou-se o rastreamento genético e avaliação bioquímica em sua filha, porém não foi encontrada a variante e os exames bioquímicos não demonstraram alteração (Figura 5).

A outra portadora da variante p.Y791F tinha seguimento no hospital, e seus resultados clínicos não indicavam qualquer sinal ou sintoma para tumores associados à NEM-2. O indivíduo foi a óbito em 2008, aos 94 anos de idade.

A variante p.Y791N foi encontrada em dois indivíduos da casuística do IB-USP que apesar de ser composta por indivíduos idosos e sem tumores; houve interesse em contatar os portadores dessa variante para sugerir testes específicos, entretanto devido ao TCLE desta instituição ser mais restritivo, não foi possível.

Figura 5 - Heredograma da família do indivíduo portando a variante *RET* Y791F

5.2 Análise nos exons *hotspots* do gene *RET* no grupo 2- avaliação por NGS

O protocolo de NGS apresentou uma cobertura acima da média recomendada para rastreamento de mutação somática rara (500). A cobertura obtida para cada alvo foi na média de 1995. Em todas as corridas os dois controles positivos adicionados a cada pool de DNA apresentou uma de detecção $\leq 1\%$.

O uso de algoritmos de análises de alta e baixa estridência permitiu excluir resultados falso-positivo e falso-negativo.

A detecção dos alelos alterados das amostras e controles foi identificada com no mínimo de 20 leituras na técnica de NGS, sendo confirmados por sequenciamento de Sanger (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultados da detecção das amostras-controle nos *pools* inseridos no chip

CHIP	COBERTURA**	AMOSTRAS MUTADAS*			
		Controle positivo (CTRL)	FAM***(%)	ALELO TOTAL	ALELO ALTERADO
1	1996	CTL1	6,0	1999	120
		CTL2	1,9	2000	39
2	1996	CTL1	8,1	1999	161
		CTL2	2,0	1997	39
3	1996	CTL1	2,4	1998	47
		CTL2	1,7	1997	34
4	1996	CTL1	2,4	1996	47
		CTL2	1,2	1999	24
5	1996	CTL1	1,8	1997	35
		CTL2	1,0	1999	20
6	1996	CTL1	1,9	1997	37
		CTL2	1,1	2000	21
7	1995	CTL1	2,1	1995	41
		CTL2	1,3	1999	26
8	1996	CTL1	1,9	1999	37
		CTL2	1,2	1998	24

*Mutações utilizadas como controles-positivo para padrão de detecção de variantes;

**Valor da média da cobertura de todas as variantes;

***frequência alélica mínima encontrada no chip dos 3 pools inseridos.

5.2.1 Rastreamento das amostras por sequenciamento de nova geração (NGS)

Foram encontradas duas variantes no éxon 8 (c.1531G>A; E511K) e a outra no éxon 13 (c.2372A>T; Y791F), assim como polimorfismos conhecidos (Tabela 9). Após a identificação, houve a confirmação por sequenciamento de Sanger.

Tabela 9 - Frequência das variantes em exons *hotspots*

ÉXON	FREQUÊNCIA (%)	VARIANTE	SNPID*	GENÓTIPO
8	1,4	E511K	rs201553718	GA**
11	16,5	G691S	rs1799939	GA
13	1,4	Y791F	rs77724903	AT**
	77	L769L	rs1800861	GT/TT
14	6,4	S836S	rs1800862	CT
15	17	S904S	rs1800863	CG

*SNPID- código de identificação do SNP.

** Confirmação por sequenciamento de Sanger.

A variante E511K foi identificada em um indivíduo de origem Italiana, do sexo masculino, 35 anos, sendo a frequência alélica dessa variante 0,12% com perfil em heterozigose.

Após a confirmação genética o indivíduo portador da variante E511K foi convidado a realizar análise genética em exons (não *hotspots*), outros exames bioquímicos e investigação do histórico familiar.

O caso-índice apresentou, além da p.E511K, apenas uma variante sinônima p.A432A (c.1296A>G) no éxon 7 em heterozigose. Além disso, o exame de imagem identificou três nódulos de tireóide: a) no terço superior do lobo direito, medindo 0,4x0,3x0,4cm; b) no terço superior do lobo esquerdo, medindo 1,1x0,9x0,7cm com áreas de microcalcificação em seu interior e fino halo hipoecoico; c) no terço médio do lobo esquerdo, medindo 0,8x0,7x0,4 cm. Apesar de níveis de calcitonina normais, o teste de secreção de calcitonina após estímulo com cálcio demonstrou resultados elevados: calcitonina 393,0pg/mL, sugerindo possível CMT. Entretanto, o exame de punção realizado no nódulo considerado mais suspeito não indicou malignidade.

Foram convidados para o rastreamento genético os membros da família, compareceram o pai (65 anos de idade), a mãe (64 anos) e a irmã do caso-índice (34 anos). Ambas mulheres apresentaram a mesma variante em heterozigose e os resultados dos exames bioquímicos foram normais, assim como o ultrassom (Figura 6). O pai (I.2) não era portador da variante, e até o momento, não foi possível o contato com o irmão (II.5).

Apesar do histórico familiar para NEM-2 ser negativo, o caso-índice foi indicado à cirurgia por apresentar nível de calcitonina por estímulo elevado.

Figura 6 - a. Heredograma da família portando a variante *RET* E511K; b. Eletroferograma da variante encontrada

Até o momento, não foi possível o contato com o indivíduo portador da variante *RETY791F* encontrada nesse grupo de amostras.

Na técnica de *NGS* o éxon 11 a partir da posição 711 houve uma diminuição das leituras que provocou baixa qualidade da frequência nos cinco últimos nucleotídeos, porém não há nenhuma descrição de variante nessa região.

Todas as variantes encontradas no gene *RET* em 2061 indivíduos estão de acordo com o cálculo de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

5.3 Análise *in silico* das variantes de significado desconhecido (VUS)

A análise *in silico* das 48 VUS descritas no banco de dados ARUP Online Scientific Resource através de seis programas preditivos demonstrou divergência de resultados, por isso foi realizado uma avaliação dos programas para verificar os mais adequados para variantes do gene *RET*.

A primeira avaliação dos programas analisou cinco mutações com associação fenotípica bem definida na literatura. Na análise das cinco mutações (C611W, rs80069458; C620R, rs77316810; C634R, rs75076352; A883F, rs377767429; M918T, rs74799832) nos programas preditivos, o *SIFT* foi o único que avaliou a troca do aminoácido na mutação C620R como Tolerável (Tabela 10).

Tabela 10 - Avaliação dos programas preditivos em mutações conhecidas no gene *RET*

VARIANTE*	PROGRAMAS PREDITIVOS**					
	<i>SIFT</i> ¹	<i>PolyPhen-2</i> ²	<i>PMUT</i> ³	<i>SNAP</i> ⁴	<i>Align-GVGD</i> ⁵	<i>PantherPSEC</i> ⁶
C611W	NT	D	P	NN	C65	M
C620R	T	D	P	NN	C65	M
C634R	NT	D	P	NN	C65	M
A883F	NT	D	P	NN	C65	M
M918T	NT	D	P	NN	C65	M

* Mutações descritas (Kloos *et al.*, 2009); **Resultados analisados em março de 2015;

¹ Programa atualizado de 2011; ² Programa versão 2.2.2; ³ Programa versão 5.8.8; ⁴ Programa atualizado de 2012; ⁵ Programa atualizado de 2014; ⁶ Programa versão 6.1.

Além do *SIFT*, o programa *PantherPSEC* foi excluído devido a falta de alinhamento, segundo o programa, que não permitiu avaliar a troca de aminoácidos para três variantes (G321R, T338I e R833C). Portanto, foi realizada a avaliação das 48 *VUS* por quatro programas preditivos.

De forma geral, poderiam ser consideradas com potencial patogênico àquelas em que três ou quatro programas preditivos demonstraram que a troca de aminoácidos poderia danificar a proteína em algum aspecto. Onze variantes tiveram resultados inconclusivos (Tabela 11).

Os programas preditivos não avaliam as variantes sinônimas, aquelas nas quais não ocorre troca de aminoácidos como a variante L769L, entre outras.

Tabela 11 - Resultado da predição das VUS do gene *RET*

ÉXON	VARIANTE	SNPID	RESULTADO*	Programas Preditivos			
				<i>PolyPhen-2</i> ¹	<i>PMUT</i> ²	<i>SNAP</i> ³	<i>Align-GVGD</i> ⁴
5	G321R	rs377767388	2/4	B	P	N	C65
	T338I	rs377767433	2/4	B	P	N	C65
8	A510V	rs201745826	1/4	B	N	N	C65
	E511K	rs201553718	2/4	B	P	N	C55
	C531R	rs377767390	4/4	D	P	NN	C65
	G533S	rs75873440	2/4	D	N	N	C55
	R600Q	rs377767393	2/4	B	N	NN	C35
10	K603Q	rs377767394	1/4	B	N	N	C45
	Y606C	rs377767395	3/4	D	P	N	C65
	C609S	rs77558292	4/4	D	P	NN	C65
	C611S	rs377767398	2/4	D	N	N	C65
	C630S	rs377767405	3/4	D	N	NN	C65
11	D631N	rs377767406	1/4	PD	N	NN	C15
	D631A	rs121913308	4/4	D	P	NN	C65
	D631G	rs121913308	4/4	D	P	NN	C65
	D631V	rs121913308	4/4	D	P	NN	C65
	D631E	rs55846256	2/4	D	N	N	C35
	E632K	rs377767407	2/4	B	N	NN	C55
	R635G	rs377767410	4/4	D	P	NN	C65
	A640G	rs78935588	1/4	B	N	N	C55
	A641S	rs377767411	2/4	D	N	N	C65
	V648I	rs77711105	0/4	B	N	N	C25
	S649L	rs148935214	2/4	D	N	N	C65
	H665Q	rs377767413	1/4	PD	P	N	C15
	K666N	rs146646971	3/4	D	N	NN	C65
	K666M	rs377767439	3/4	D	N	NN	C65
	M700L	rs377767441	0/4	B	N	N	C0

continua

Tabela 11 - Resultado da predição das VUS do gene *RET* (conclusão)

ÉXON	VARIANTE	SNPID	RESULTADO*	Programas Preditivos			
				<i>PolyPhen-2</i> ¹	<i>PMUT</i> ²	<i>SNAP</i> ³	<i>Align-GVGD</i> ⁴
13	R770Q	rs377767414	3/4	D	N	NN	C35
	N777S	rs377767415	1/4	B	N	N	C45
	V778I	rs75686697	0/4	B	N	N	C25
	Y791N	rs377767417	3/4	PD	P	NN	C65
	Y791F	rs77724903	1/4	PD	N	NN	C15
14	E805K	rs377767418	4/4	D	P	NN	C55
	E818K	rs377767420	1/4	PD	N	N	C55
	S819I	rs377767421	2/4	D	N	N	C65
	R833C	rs377767422	3/4	D	P	N	C65
	P841L	rs149891333	4/4	D	P	NN	C65
	E843D	rs377767423	1/4	B	N	N	C35
	R844W	rs377767424	4/4	D	P	NN	C65
	R844Q	rs55947360	4/4	D	P	NN	C35
	R844L	rs55947360	4/4	D	P	NN	C65
15	M848T	rs201101792	3/4	D	P	N	C65
	L881V	rs377767427	2/4	D	N	NN	C25
	R886W	rs146838520	4/4	D	P	NN	C65
	S904C	rs267607011	4/4	D	P	NN	C65
	K907E	rs377767430	3/4	D	N	NN	C55
16	K907M	rs377767431	3/4	D	N	NN	C65
	R912Q	rs78347871	4/4	D	P	NN	C35
	M918V	rs377767442	3/4	D	P	NN	C15

*Resultados referentes: patogenicidade apresentada / programas;

Nt= nucleotídeo; SNPID=identificação do SNP; NR= não reconhecido;

¹ B- benigno, PD- possível dano, D- causa dano; ² P-patogênico, N-neutro; ³ N-neutro, NN- não neutro; ⁴ C (escala) - C65= mais provável de interferir na função da proteína, C55, C45, C35, C25, C15 e C0= menor interferência;

Programas feito o levantamento em março de 2015.

5.4 Descrição de pacientes com CMT portando *VUS*

5.4.1 Investigação das famílias de pacientes portando a variante *RET Y791F* com CMT

A investigação de uma família portando Y791F foi realizada em colaboração com a universidade federal de São Paulo (UNIFESP), na qual foi identificado uma mulher com 37 anos de idade (II.4) que apresentou, inicialmente, nódulos de tireóide e devido ao resultado no teste de calcitonina ser elevado, o indivíduo foi submetido à TTx. A análise anátomo patológico confirmou um CMT de 2,5cm. Após três anos de seguimento não houve alteração nos exames bioquímicos e físicos, assim como não apresentou FEO ou HPT (Figura 7).

Sua irmã com 32 anos de idade (II.5) também havia herdado a variante Y791F e seus exames bioquímicos não apresentaram nenhum sinal ou alteração que indicassem o desenvolvimento de CMT ou HPT. Ela estava sendo seguida em hospital do interior de São Paulo, com o cirurgião que havia operado sua irmã, e foi inadvertidamente submetida à TTx.. As análises anátomo patológicas não encontraram nenhuma evidência para CMT ou HCC.

A análise genética da mãe com 59 anos (I.1) e seus filhos de 18 e 11 anos de idade (III.6 e III.7) do caso-índice não identificou a variante e seus exames bioquímicos foram normais. O pai de origem alemã faleceu aos 46 anos em um acidente de carro, sem evidências da doença.

Figura 7 - Genealogia da família portadora da variante *RET* Y791F com CMT

Outro indivíduo com CMT (I.1) foi encontrado com a alteração no códon 791 na cidade de Curitiba, Brasil. A análise genética nos exons (1-12 e 14-21) não apresentou nenhuma outra variante. A filha do caso-índice com 9 anos de idade (II.3) apresentou a variante, porém o resultado do ultrassom para tireóide foi normal. Esta família tem descendência alemã (Figura 8).

Figura 8 - Heredograma de membros portadores da variante *RET* Y791F

5.4.1.1 Novo caso com FEO portador da variante *RET* Y791F

Um indivíduo, do sexo masculino, foi identificado portando a variante *RET* Y791F no Hospital Santa Casa (São Paulo). Foi diagnosticado aos 74 anos de idade e apresentou incidentaloma de adrenal esquerda (9x8, 3x6,5cm). Também tinha hipertensão, fibrilação atrial crônica e subclínica autoimune hipertireoidismo. Após a cirurgia foi confirmado um FEO (8.5 cm e 220 g) e o ultrassom da tireoide resultou em tireoidite sem nódulos. Dosagens de calcitonina, HPT e cálcio não apresentaram nenhuma alteração. O indivíduo não possuía histórico familiar de tumores e seu sequenciamento para o gene *TMEM127* e exons *hotspots* do gene *RET* não foram identificados nenhuma outra variante ou mutação.

5.4.2 Família portadora da variante *RET* V648I

Em 1988, foi descrito pela primeira vez, o caso-índice (I.2) com 34 anos e portador das variantes p.C634R e p.V648I (Figura 9) (Mendonça *et al.*, 1988). A família foi analisada para a mutação C634R e os portadores submetidos à tireoidectomia (II.5 e II.6) (Nunes *et al.*, 2002).

Esta família foi encaminhada ao nosso grupo para seguimento, a qual foi realizada uma análise mais detalhada para a V648I (rs77711105), em que ocorre a troca de nucleotídeos G>A, no rastreamento foi identificado dois membros.

Aos 46 anos de idade, o indivíduo (II.4) que portava esta variante foi convidado a realizar outros exames, assim como análise genética e bioquímica para suas duas filhas (III.9 e III.10). Este indivíduo apresenta resultados

normais nos testes de calcitonina e cálcio normais, tem seguimento desde seus 14 anos de idade. A análise genética de todos os exons indicou que o indivíduo carregava apenas a alteração no códon 648, assim como sua filha mais nova de 9 anos de idade (III.10).

O resultado do teste de calcitonina basal na sua filha foi normal, devido à idade da criança não foi submetida ao teste de cálcio.

A outra filha portadora da variante (II.7), possui duas crianças cujos exames genéticos e bioquímicos foram analisados. Apenas um dos filhos apresentou a variante *RET* V648I (III.11). Os resultados bioquímicos foram normais para os três membros.

Figura 9 - a. Heredograma da família portando a variante *RET* V648I;
b. Eletroferograma com perfil em heterozigose

5.4.3 Família portadora da variante *RET* K666N

Em 2012, identificamos uma família com a variante p.K666N (rs146646971) em que ocorre a troca dos nucleotídeos G>C (Figura 10).

O caso-índice (II.4), sexo masculino, apresentou aos 62 anos de idade apresentou CMT metastático. O tumor media 2,8x2,5x1,3cm no lobo direito; e no lobo esquerdo 0,9x0,8x0,8cm e 0,8x0,6x0,6cm. Ele foi submetido a tireoidectomia total, mas acabou indo à obtido devido ao CMT.

O outro familiar portador da variante K666N (III.10), era o filho de 32 anos do caso-índice que apresentou a mesma variante do pai. O exame de ultrassom não apresentou malignidade, porém o teste de bioquímico apresentou nível exacerbado para calcitonina, portanto o indivíduo foi submetido a TTx. No entanto, a análise anato-patologia demonstrou que as células eram normais.

A filha do caso-índice (III.9) foi negativa para a presença da variante, e excluída do seguimento.

Os pais (I.1 e I.2) morreram com idades acima de 80 anos, sendo a mãe falecida por infarto (IAM) e o pai não se tem conhecida da causa da morte. A irmã (II.7) faleceu aos 52 anos de idade, da mesma doença que a mãe.

O irmão (II.5) teve caso de IAM aos 57 anos, e mora em Recife; outro irmão apresentou quadro clínico de AVC (II.6); e outro aparentemente hígido (II.8). Os contatos desses membros, até o momento, não foram possíveis devido ao seguimento ter sido encaminhado para outra instituição.

Figura 10 - a. Heredograma da família portadora da variante *RET* K666N; b. Eletroferograma da alteração no códon 666

5.5 Estudos *in vitro* e *in vivo* das VUS

No levantamento da literatura que foi realizada, constatou-se que apenas 15/48 destas variantes foram analisadas por ensaios *in vitro*.

Esses estudos *in vitro* descritos avaliaram atividade de transformação celular, fosforilação e proliferação. Entre as quinze VUS foram observadas que sete variantes (A510V, E511K, C531R, K666N, N777S, Y791F, M918V) apresentaram potencial baixo, ao contrário das variantes M848T e R886W que demonstraram patogenicidade alta. Os parâmetros de classificação do potencial patogênico das variantes foram avaliados em comparação com os alelos selvagens (WT) e C634 mutado. As variantes T338I, D631N, D631A,

D631G, V648I e S649L não apresentaram nenhuma atividade patogênica (Tabela 12).

Nenhuma das VUS possuem estudos *in vivo* para analisar o grau patogênico.

Tabela 12 - Levantamento dos estudos *in vitro* e *in vivo* das VUS na literatura

ÉXON	VARIANTE	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	REFERÊNCIA
5	T338I	SP	--	Cosci, 2011
8	A510V	PB	--	Muzza (2010)
	E511K	PM / PB	--	Prazeres 2011 / Muzza (2010)
	C531R	PB	--	Muzza (2010)
11	D631N	SP	--	Asai, 1999
	D631A	SP	--	Asai, 1999
	D631G	SP	--	Asai, 1999
	V648I	SP	--	Cosci, 2011
	S649L	SP	--	Prazeres, 2011
	K666N	PM	--	Muzza, 2010
13	N777S	PB	--	D'Aloiso, 2006
	Y791F	PB	--	Cosci, 2011
14	M848T	PA	--	Cosci, 2011
15	R886W	PA	--	Prazeres, 2011
16	M918V	PB	--	Cosci, 2011

Potencial patogênico alto (PA); Potencial patogênico Moderado (PM); Potencial patogênico baixo (PB); sem potencial patogênico (SP).

5.6 Frequência alélica nos bancos de dados

As frequências alélicas das 48 *VUS* no gene *RET* foram analisados em três bancos de dados diferentes: *COSMIC*, *dbSNP* e *ExAC* (Tabela 13).

Quatro variantes dentre as 48 *VUS* potencialmente associadas com tumores de NEM-2 (D631N, D631G, V648I e Y791F) foram encontradas no *COSMIC*, porém com frequências extremamente baixas, 1/29162.

O *NCBI* (*dbSNP*) disponibiliza a menor frequência alélica (MAF) encontrada em indivíduos-controle. As variantes associadas à NEM-2 apresentavam MAF=0.0002/1 para alelos alterados.

O consórcio *ExAC*, que agrupa diversos grupos de pesquisa em diferentes regiões do mundo, encontrou frequências alélicas variadas para 26/48 *VUS*, sendo a maior frequência alélica da variante Y791F em indivíduos-controle.

O *ExAC* especifica a frequência encontrada de cada variante na população mundial. A variante Y791F foi encontrada em indivíduos da população Finlandesa (N=174), Europa-Finlandesa (N=38), Africana (N=1), Latina (N=1) e outras sem origem (N=2). A variante Y791N foi encontrada em indivíduos da população Finlandesa (N=2) e Latina (N=1); já a variante E511K em Finlandeses (N=11); A variante V648I foi identificada em Finlandeses (N=7), Asiáticos (N=1) e Latinos (N=3); e a variante K666N foi observada somente na população Finlandesa (N=1).

Segundo o levantamento feito na literatura para as *VUS*, o estudo realizado por Erlic e colaboradores foi o único que obteve um grupo-controle maior que 1000. Os autores encontraram duas variantes, a Y791F e S649L,

sendo a frequência alélica descrita de 0,88% e 0,07%, respectivamente (Erlic *et al.*, 2010).

Tabela 13 - Análise do levantamento de frequência alélica nos bancos de dados

EXON	VARIANTE	IDSNP	RESULTADO	NCBI (MAF)	ERLIC	COSMIC	ExAC
5	G321R	rs377767388	0/800	--	--	--	12/114738
	T338I	rs377767433	0/800	--	--	--	5/115732
8	A510V	rs201745826	0/800	T=0.0002/1	--	--	16/50348
	E511K	rs201553718	1/800	A=0.0002/1	--	--	11/50792
	C531R	rs377767390	0/800	--	--	--	--
	G533S	rs75873440	0/800	A=0.0002/1	--	--	3/31866
10	R600Q	rs377767393	0/800	--	--	--	3/92090
	K603Q	rs377767394	0/800	--	--	--	--
	Y606C	rs377767395	0/800	--	--	--	--
	C609S	rs77558292	0/800	--	--	--	--
	C611S	rs377767398	0/800	--	--	--	--
11	C630S	rs377767405	0/800	--	--	--	--
	D631N	rs377767406	0/800	--	--	1/29162	7/120738
	D631A	rs121913308	0/800	--	--	--	--
	D631G	rs121913308	0/800	--	--	1/29162	--
	D631V	rs121913308	0/800	--	--	--	--
	D631E	rs55846256	0/800	T=0.0002/1	--	--	1/120762
	E632K	rs377767407	0/800	A=0.0002/1	--	--	11/120798
	R635G	rs377767410	0/800	--	--	--	2/120906
	A640G	rs78935588	0/800	--	--	--	--
	A641S	rs377767411	0/800	--	--	--	--
	V648I	rs77711105	0/800	--	--	1/29162	11/121196

continua

Tabela 13 - Análise do levantamento de frequência alélica nos bancos de dados (Continuação)

EXON	VARIANTE	IDSNP	RESULTADO	NCBI (MAF)	ERLIC	COSMIC	ExAC
11	S649L	rs148935214	0/800	T=0.0004/2	1/1475	--	39/121214
	H665Q	rs377767413	0/800	--	--	--	1/121262
	K666N	rs146646971	0/800	--	--	--	3/121326
	M700L	rs377767441	0/800	--	--	--	--
13	R770Q	rs377767414	0/2061	--	--	--	--
	N777S	rs377767415	0/2061	--	--	--	1/120764
	V778I	rs75686697	0/2061	--	--	--	4/120750
	Y791F	rs77724903	2/2061	T=0.0002/1	13/1475	1/29162	216/119802
	Y791N	rs377767417	2/2061	--	--	--	3/119878
14	E805K	rs377767418	0/800	--	--	--	--
	E818K	rs377767420	0/800	--	--	--	3/105522
	S819I	rs377767421	0/800	--	--	--	--
	R833C	rs377767422	0/800	--	--	--	2/117482
	P841L	rs149891333	0/800	--	--	--	10/119072
	E843D	rs377767423	0/800	--	--	--	--
	R844W	rs377767424	0/800	--	--	--	--
	R844Q	rs55947360	0/800	--	--	--	7/119466
	R844L	rs55947360	0/800	--	--	--	1/119466
	M848T	rs201101792	0/800	--	--	--	3/119732

continua

Tabela 13 - Análise do levantamento de frequência alélica nos bancos de dados (Conclusão)

EXON	VARIANTE	IDSNP	RESULTADO	NCBI (MAF)	ERLIC	COSMIC	ExAC
15	L881V	rs377767427	0/800	--	--	--	1/117994
	R886W	rs146838520	0/800	--	--	--	1/118380
	S904C	rs267607011	0/800	--	--	--	--
	K907E	rs377767430	0/800	--	--	--	--
	K907M	rs377767431	0/800	--	--	--	--
16	R912Q	rs78347871	0/800	--	--	--	--
	M918V	rs377767442	0/800	--	--	--	--

5.7 Descrição das *VUS* na literatura

O levantamento na literatura sobre a frequência das *VUS* em tumores e estudo população-controle são escassos, com exceção da variante Y791F.

Ao analisar a população controle verificamos que os estudos individuais não ultrapassam de 400 indivíduos-controle (Tabela 14). Segundo nossas revisões da literatura foram estudadas um total de 1280 indivíduos-controle.

Tabela 14 - Descrição da ocorrência das *VUS* na literatura

Éxon	Variante	Identificação	Família / membro /portador	Afetado (fenótipo/ portador)	Achado Clínico	Amostras- controle	Referências
5	G321R	rs377767388	1 / -- / 4	1 CMT / 1HCC	--	--	Dvorakova (2005)
	T338I	rs377767433	1 / -- / 2	1 CMT	1 HSCR	200 / 50	Cosci 2011 / Fitze (2002)
8	A510V	rs201745826	--	--	1 CMT	400	Muzza (2010)
	E511K	rs201553718	1 / 6 / 4	1 CMT	1 CMT	100 / 400	Prazeres 2011 / Muzza (2010)
	C531R	rs377767390	--	--	1 CMT	400	Muzza (2010)
	G533S	rs75873440	--	--	1 HSCR	--	Sangkhatat (2006)
10	R600Q	rs377767393	1 / 8 / 6	1 CMT	--	300	Saez (2000)
	K603Q	rs377767394	1 / 12 / 3	1 CMT	--	80	Rey (2001)
	Y606C	rs377767395	1 / -- / 2	1 CMT	--	--	Ahmed (2005)
	C609S	rs77558292	--	--	1 HSCR	50	Fitze (2002)
	C611S	rs377767398	--	--	NEM-2	--	Kruckeburg (2004)
11	C630S	rs377767405	--	--	CMT		Kitamura(1997)
	D631N	rs377767406	--	--	#	--	Asai (1999)
	D631A	rs121913308	--	--	#	--	Asai (1999)
	D631G	rs121913308	--	--	#	--	Shirahama (1998)
	D631V+ H665Q	rs121913308	1 / -- / 3	1 FEO	--	--	Ahmed (2005)
	D631E+ C634Y	dupla	-- 2 / -- / 2	-- 2 CMT	NEM-2 --	-- --	Kruckeburg (2004) Ahmed (2005)
	E632K	rs377767407	--	--	CMT multifocal	--	Frank-Raue (2007)

continua

Tabela 14 - Descrição da ocorrência das *VUS* na literatura (continuação)

Éxon	Variante	Identificação	Família / membro /portador	Afetado (fenótipo portador)	Achado Clínico	Amostras- controle	Referências
11	R635G	rs377767410	--		NEM2A/CMT	--	Lips (1994)
	A640G	rs78935588	--	--	NEM2A	--	Tessitore (1999)
	A641S	rs377767411	--	--	NEM2A	--	Poturnajova (2005)
	V648I	rs77711105	1 / -- / 2	1 HCC	CMT	200	Cosci 2011/ Nunes (2002)
	S649L	rs148935214	--	--	CMT/#	100	Wiench (2001)
	H665Q+ D631V	rs377767413	1 / -- / 3	1 FEO	--	--	Ahmed (2005)
	K666M	rs377767439	--	--	CMT/HCC		Mastroianno (2011)
	K666N	rs146646971	--	--	1 CMT	400	Muzza (2010)
	M700L	rs377767441	--	--	CMT/FEO	100	Conzo (12)
13	R770Q	rs377767414	1 / 5 / 3	1 CMT	--	--	Frank-Raue (2010)
	N777S	rs377767415	---	--	CMT/#	150	D'Aloiso (2006)
	V778I	rs75686697	--	--	CMT		Miyauchi (2002)
	Y791N	rs377767417	1 / -- / 2	--	HSCR/CMT		Frank-Raue (2010) Ruiz-Ferrer (2006)
	Y791F	rs77724903	*D	*D	*D	*D	Diversos artigos
14	E805K	rs377767418	--	--	CMT	--	Cranston (2006) #1
	E818K	rs377767420	--	--	CMT	--	Paszko (2007)
	S819I	rs377767421	--	--	CMT	--	Koch (2000)
	R833C	rs377767422	--	--	#	--	Cranston (2006) #2
	P841L	rs149891333	--	--	HSCR	--	Decker (1997)
	E843D	rs377767423	--	--	CMT	--	Koch (2000)

continua

Tabela 14 - Descrição da ocorrência das *VUS* na literatura (conclusão)

Éxon	Variante	Identificação	Família/membro /portador	Afetado (fenótipo portador)	Achado Clínico	Amostras- controle	Referências
14	R844W	rs377767424		--	HSCR	--	Kim (2006)
	R844Q	rs55947360		--	CMT	--	Paszko (2007)
	R844L	rs55947360		--	MELANOMA		Greenman (2007)
	M848T	rs201101792	1 / -- / 2	1 CMT	--	200	Cosci 2011/ Elisei (2007)
15	L881V	rs377767427	1 / -- / 5	1 CMT / 1HCC	--	--	Frank-Raue (2010)
	R886W	rs146838520	1 / 6 / 2	1 CMT	--	100 / 70	Prazeres 2011 / Prazeres 2006
	S904C	rs267607011		--	MEN2B		Menko (2002)
	K907E	rs377767430		--	HSCR		Attie (1995)
	K907M	rs377767431		--	CMT		Kaserer (2001)
16	R912Q	rs78347871	--	--	1 HSCR	50	Fitze (2002)
	M918V	rs377767442	1 / -- / 2	1 CMT	--	200	Cosci (2011)

*D= Diversas informações;

- Estudo *in vitro*.

6 Discussão

6.1 Medicina Genética

Os avanços do conhecimento genético e genômico ocorridos nos últimos anos foram imensos. Em 2001 foi publicado o primeiro rascunho do genoma humano. Hoje, menos de 15 anos depois, milhares de genomas, exomas, transcriptomas foram sequenciados e estão gratuitamente disponíveis para pesquisadores, empresas e leigos. Há poucos anos, os bancos de dados do *NCBI* (Consórcio Americano do NIH) e *ENSEMBL* (Consórcio Europeu) eram as principais fontes de dados de variantes. Entretanto, atualmente o número de fontes é enorme e continua crescendo com o início de novos projetos na área.

No presente estudo analisamos uma questão central da genética médica e medicina personalizada, que é a interpretação do significado clínico de variantes genéticas. Ao se receber um relatório genético, não importa se de uma única troca de nucleotídeo (exames realizados por enzima de restrição), da sequência de um único éxon de um gene, de todos os exons de um gene, de um exoma, ou de um genoma completo, é essencial que a interpretação dos resultados seja realizada, explicada e entendida de forma correta. A consequência da interpretação equivocada de uma variante genética pode ser pequena nos casos em que o gene não tem implicação clínica, ou podem ser graves em casos nas quais a desregulação do gene seja associada à doença. Por exemplo, há diversos tratamentos na área da oncologia que são indicados somente para pacientes com (ou sem) uma mutação patogênica e funcional em determinados genes. Pacientes com câncer de cólon com mutação no gene *KRAS* apresentam benefícios terapêuticos quando tratados com anti-*EGFRs*.

Entretanto, pacientes sem uma mutação *KRAS* progridem e morrem mais rapidamente se tratados com anti-*EGFR* (Karapetis *et al.*, 2008).

O caso de doenças cuja causa principal é uma predisposição genética, também chamada de predisposição familiar, é essencial que seja feita uma interpretação correta das variantes encontradas no exame genético. Diversas perguntas básicas, mas nem sempre fáceis de serem respondidas devem ser feitas, como:

- A variante genética encontrada confirma a suspeita de diagnóstico da doença?
- A variante genética encontrada aumenta o risco de doença? Se sim, esse risco é aumentado em quanto? Qual é a penetrância da doença em casos com essa variante?
- A variante genética encontrada tem associação com prognóstico?
- O tratamento clínico, medicamentoso ou cirúrgico deve ser alterado?
- Os familiares de primeiro grau desse indivíduo devem ser rastreados?

6.2 Variantes genéticas de significado clínico desconhecido

Nos últimos anos, uma nova classe de variantes genéticas do gene *RET* surgiu e vem se expandindo bastante. Trata-se das variantes com significado clínico indeterminado, em inglês chamadas de *variant of unknown significance* (*VUS*). Essas variantes genéticas são diferentes e formam uma nova classe de variantes. As *VUS* não são consideradas mutações clássicas como as que ocorrem nos códons C634 e M918 ou mutações menos agressivas (ATA-A/B

ou MOD), mas também não são polimorfismos comuns e conhecidos. Elas, se localizam em um limbo ou entre as mutações raras e polimorfismos. A tabela 4 apresenta uma lista de VUS no gene *RET*. A principal fonte de identificação dessas variantes são os casos com CMT esporádicos. Com a expansão da realização das análises diagnósticas do gene *RET* em todo o mundo, várias VUS foram identificadas e publicadas. O problema é que os estudos que descrevem VUS em casos com CMT são imparciais, pois eles já partem de uma seleção prévia de casos com CMT. Assim, a descrição de uma possível “associação clínica” entre a variante genética e clínica é favorecida. Quando se identificam uma nova variante *RET* em uma casuística com CMT, é necessário cuidado na descrição da mesma, pois a associação da nova mutação *RET* com o desenvolvimento do CMT do paciente é (no mínimo) tentador, como descrito abaixo.

6.2.1 A variante *RET* Y791F

Uma forma de se evitar a descrição equivocada de VUS como novas mutações patogênicas é a análise mais global da frequência dessa variante em outras fontes, que não contenham pacientes com CMT.

O presente projeto abordou essa questão, de forma indireta. Aprofundamos o conhecimento das variantes alélicas do gene *RET* mais raras e menos estudadas.

A variante Y791F encontrada em nossa casuística (indivíduos-controle) apresentou uma baixa frequência (polimorfismo raro). Os dados foram semelhantes aos obtido no estudo Erlic e colaboradores (2010), sendo que no

presente trabalho pode-se analisar um número muito maior de indivíduos-controlado do que aqueles investigados por Erlic (Erlic *et al.*, 2010).

Dados de estudo *in vitro* da literatura evidenciam que a variante Y791F promove uma baixa atividade de fosforilação (Cosci *et al.*, 2011; Hyndman *et al.*, 2012), apesar da ativação constitutiva (Plaza-Menacho *et al.*, 2007). Análises *in silico* mostraram concordância com os resultados *in vitro*.

Apesar de estudos relacionarem a variante Y791F como sendo uma mutação (Berndt *et al.*, 1998; Fitze *et al.*, 2002b; Gimm *et al.*, 2002; Vestergaard *et al.*, 2007; Tamanaha *et al.*, 2007), os dados desse projeto demonstraram que a variante é um polimorfismo e não mutação. Atualmente, indicamos que tais casos não sejam submetidos à tireoidectomia total preventiva, mas sim a seguimento anual principalmente por meio de dosagens de calcitonina basal e após estímulo com cálcio, além de ultrassonografia da tireoide.

6.2.2 Variante RET Y791N

Nos nossos resultados a variante RET Y791N apresentou uma frequência alélica muito menor quando comparada a outra variante no mesmo códon. Há apenas uma descrição na literatura de caso não apresentando (sem aparentemente) nenhuma associação clínica (Frank-Raue *et al.*, 2010b). Porém a análise *in silico* demonstrou ser patogênica em todos os programas preditivos. Portanto essa variante continua sendo uma incógnita, e recomendamos seguimento médico anual principalmente por meio de dosagens de calcitonina e ultrassonografia de tireoide.

6.2.3 Variante *RET* E511K

A variante *RET* E511K foi encontrada somente em um indivíduo de origem européia. A investigação da nossa casuística é semelhante a outro estudo (Prazeres *et al.*, 2011), na qual relata uma família com membros portando a variante E511K, porém apenas o caso-índice apresentou CMT ou suspeita do tumor. A avaliação *in silico* foi inconclusiva, assim como o estudo *in vitro* que demonstrou atividade celular entre moderada (Prazeres *et al.*, 2011) e baixa (Muzza *et al.*, 2010). Esse dado indica que o médico deverá ter uma maior cautela no monitoramento dos portadores da variante, podendo preferencialmente realizar o seguimento anual com dosagens de calcitonina e ultrasonografia de tireoide.

6.2.4 Variante *RET* V648I

A investigação da família portando a variante V648I demonstrou que nenhum dos membros portadores apresentou qualquer evidência de associação para o desenvolvimento de CMT. Outra família reportada, também não apresentou associação fenótipo-genótipo (Cosci *et al.*, 2011). A análise *in silico* demonstrou que essa variante é “neutra” em todos os programas preditivos utilizados. Dados *in vitro* da literatura indicam baixa atividade de transformação celular (Cosci *et al.*, 2011). Assim, recomendamos que casos com esta variante do proto-oncogene *RET* sejam dispensados de seguimento médico.

6.2.5 Variante *RET* K666N

Uma família investigada em nosso laboratório portando a K666N apresentou um membro com CMT e outro com suspeita para o desenvolvimento de CMT, pois seu exame bioquímico apresentou alteração. Quando comparados a outras análises o estudo *in silico*, em que os programas preditivos apontaram como patogênica a variante K666N; e o estudo *in vitro* apresentou um potencial oncogênico moderado (Muzza *et al.*, 2010). Os resultados acima indicam tratar-se de uma mutação, porém deve agir-se com cautela ao afirmar a caracterização dessa variante. Assim, seria adequado seguir estes casos com dosagens periódicas anuais de calcitonina e ultrassonografia de tireoide.

7 Conclusão

No presente estudo abrangemos o máximo de informações possíveis para o aumento do conhecimento de variantes de significado desconhecido (*VUS*) no proto-oncogene *RET*. A patogenicidade de uma variante é importante para um diagnóstico correto ao portador viabilizando minimizar erros de conduta clínica.

Conclui-se, até o momento, que:

- A análise para a variante Y791F (isolada) não apresenta risco de desenvolvimento de CMT ou fenótipo de NEM-2, no entanto o fenótipo pode demonstrar maior agressividade quando associado à mutação C634Y. Em tumores FEO, quando encontrada a Y791F (isolada), o fenótipo pode estar ocorrendo devido a mutações causadoras de tumor em outros genes. Se o indivíduo portador dessa variante não apresentar CMT ou exames bioquímicos e imagens alterados, não deve ser submetido à TTx;
- Devido a pouca informação na literatura e a impossibilidade de analisar a variante Y791N mais detalhadamente, não conseguimos concluir se essa alteração pode ou não estar envolvida no desenvolvimento de CMT. Então sugerimos que periodicamente esses portadores sejam cuidadosamente monitorados, e submetidos à cirurgia apenas quando apresentarem alteração nos exames;
- A análise realizada para a p.V648I em todos os aspectos estudados demonstrou que essa variante não está associada a risco aumentado de desenvolver CMT, sugerindo que indivíduos

portadores podem ser dispensados de seguimento médico, quando não apresentem alteração em exames bioquímicos e de imagens;

- Ainda há dúvidas se a variante E511K poderia estar envolvida no fenótipo de NEM-2. Por esse motivo, sugere-se que portadores dessa variante sejam monitorados, sendo assintomáticos ou não, e submetidos à cirurgia se houver alteração em outros exames. Este procedimento é sugerido como forma de prevenção, já que esta variante apresenta um risco mínimo de desenvolver a doença;
- Apesar da pequena família relatada portando a K666N, os estudos *in vitro* e *in silico* reforçam a hipótese de se tratar de uma mutação, com potencial moderado para desenvolver o fenótipo de NEM-2. Entretanto, mais dados são necessários para a caracterização adequada dessa variante;
- As variantes *VUS* em geral necessitam de mais estudos para comprovar seu potencial patogênico ou benigno. Uma possibilidade é que portadores de variantes que apresentem potencial patogênico sejam monitorados periodicamente;
- O presente estudo realizou rastreamento genético em indivíduos-controle da população brasileira e estudos *in silico*, e levantamentos em banco de dados e literatura. No entanto, algumas variantes missenses ainda permanecem questionáveis quanto ao seu potencial patogênico; as informações aqui obtidas e descritas podem auxiliar no diagnóstico mais adequado aos portadores e incentivar outros estudos.

8 Anexos

Anexo A – Questionário**Questionário para doenças hereditárias**

Nome: _____ Cidade de origem: _____

Telefone: _____ e-mail: _____ Raça (cor da pele): _____

Ascendência:

() Africano () Espanhol () Indígena () Português

() Asiático _____ () Alemã () Outros _____

1. Já foi submetido a algum tipo de cirurgia?

() Sim () Não

Se sim, qual foi o tipo da cirurgia e onde operou? _____

2. Pai, mãe ou outro familiar já foi operado?

() Sim () Não

Se sim, qual o grau de parentesco? _____

Indique o tipo de cirurgia? Onde operou? _____

3. Algum familiar apresenta ou apresentou algum tipo de doença como câncer, em uma das glândulas descritas abaixo?

() Tireoide () Paratireóides () Hipófise

() Tumores carcinoides (pulmão, brônquio, timo). () Pâncreas

() Adrenais () Outros. Indique: _____ () Não

4. Utiliza algum tipo de medicamento?

() Sim () Não

Se sim, qual? _____

5. Outras observações: Tem alguma doença hereditária na sua família?

() Sim, Qual _____ () Não

6. Dá seu consentimento para se analisar o DNA de seu sangue? (Será assinada a parte)

() Sim

() Não

Data: / /

Assinatura

Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
- DATA NASCIMENTO.:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA
- PESQUISADOR: CARGO/FUNÇÃO:
- INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº
- UNIDADE DO HCFMUSP:
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO	☐	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐
4. DURAÇÃO DA PESQUISA:

1. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa acrescentar dados moleculares sobre a etiopatogênese dos tumores relacionados à Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2;
2. Será coletada uma amostra de sangue total de cada indivíduo para extração de DNA genômico e análise mutacional;
3. A coleta de sangue será realizada por punção periférica da veia do antebraço;
4. O risco do protocolo de pesquisa é mínimo, pois em alguns casos podem ocorrer complicações no processo de coleta, tais como dificuldade de encontrar a veia do antebraço e sensibilidade individual;
5. A pesquisa pode contribuir para o estabelecimento de um diagnóstico mais preciso da NEM-2 e, assim, permitir a introdução de uma melhor conduta terapêutica a esses pacientes;
6. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores são Roxanne Hatanaka e Dr. Sérgio Pereira de Almeida Toledo que podem ser contatados pelo e-mail: rhatanaka@usp.br e toledo@usp.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br;
7. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seus direitos às informações sobre o projeto;
8. As informações obtidas serão analisadas em conjunto, não sendo divulgada a identificação de nenhum indivíduo;
9. Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
10. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e eventuais consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.
11. Todos os dados obtidos e o material coletado serão utilizados somente para esse protocolo de pesquisa.

12. O exame do DNA que será realizado, por meio desta amostra de sangue agora coletada, será de grande utilidade na comparação com exames já realizados em um grupo de 50 pacientes portadores de câncer de tireóide, que está sendo investigado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), Hospital das Clínicas de São Paulo e na Fundação Pró-Sangue. O exame que será realizado por meio desta amostra de sangue não gerará em resultado com aplicação clínica no curto prazo, para o Doador. Caso o Doador deseje saber o resultado do seu exame genético, este estará acessível mediante contato conosco pelos emails: rhatanaka@usp.br e toldo@usp.br. O prazo para obtenção destes resultados será a partir de 120 dias após a coleta, devido ao alto grau de complexidade envolvido na realização destes exames.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Rastreamento de variantes de significado desconhecido (VUS) no proto-oncogene *RET*, em indivíduos saudáveis da população brasileira e em pacientes com Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2”.

Eu discuti com o Dr. Sérgio Pereira de Almeida Toledo e com seus colegas colaboradores sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso às informações sobre o andamento do projeto e seus resultados parciais ou totais obtidos; e a eventual tratamento hospitalar, quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou em eventual atendimento neste serviço que possa ser necessário.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data

____/____/____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Desejo ser informado caso alguma variante seja encontrada, desse projeto.

() NÃO

() SIM

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Data / /

Assinatura do responsável pelo estudo

9 Referências

- 1- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248-9.
- 2- Ahmed SA, Snow-Bailey K, Highsmith WE, Sun W, Fenwick RG, Mao R. Nine novel germline gene variants in the RET proto-oncogene identified in twelve unrelated cases. *J Mol Diagn*. 2005;7(2):283-8.
- 3- Arighi E, Borrello MG, Sariola H. RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16(4-5):441-67.
- 4- Asai N, Iwashita T, Murakami H, Takanari H, Ohmori K, Ichihara M, Takahashi M. Mechanism of Ret activation by a mutation at aspartic acid 631 identified in sporadic pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;255(3):587-90.
- 5- Attié T, Pelet A, Edery P, Eng C, Mulligan L, Amiel J, Beldjord S, Nihoul-Fékété C, Munnich A, Ponder B, Lyonnet S. Diversity of RET proto-oncogene mutations in Hirschsprung's disease. *Hum Mol Genet*. 1995;4: 2407-2409.
- 6- Balasubramanian SP, Cox A, Brown NJ, Reed MW. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. *Eur J Surg Oncol*. 2004;30(6):593-601.
- 7- Baumgartner-Parzer SM, Lang R, Wagner L, Heinze G, Niederle B, Kaserer K, Waldhäusl W, Vierhapper H. Polymorphisms in exon 13 and intron 14 of the RET protooncogene: genetic modifiers of medullary thyroid carcinoma?. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(11):6232-6236.
- 8- Berndt I, Reuter M, Saller B, Frank-Raue K, Groth P, Grußendorf M, Raue F, Ritter MM, Höppner W. 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;83:770-774.

-
- 9- Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, Conte-Devolx B, Falchetti A, Gheri RG, Libroia A, Lips CJ, Lombardi G, Mannelli M, Pacini F, Ponder BA, Raue F, Skogseid B, Tamburrano G, Thakker RV, Thompson NW, Tomassetti P, Tonelli F, Wells SA Jr, Marx SJ. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:5658-71.
 - 10- Bromberg Y, Yachdav G, Rost B. SNAP predicts effect of mutations on protein function. *Bioinformatics.* 2008;24(20):2397-2398.
 - 11- Cebrian A, Lesueur F, Martin S, Leyland J, Ahmed S, Luccarini C, Smith PL, Luben R, Whittaker J, Pharoah PD, Dunning AM, Ponder BAJ. Polymorphisms in the initiators of RET (Rearranged during Transfection) signaling pathway and susceptibility to sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(11):6268–6274.
 - 12- Conzo G, Circelli L, Pasquali D, Sinisi A, Sabatino L, Accardo G, Renzullo A, Santini L, Salvatore F, Colantuoni V. Lessons to be learned from the clinical management of a MEN 2A patient bearing a novel 634/640/700 triple mutation of the RET proto-oncogene. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012; 77(6):934-6.
 - 13- Cosci B, Vivaldi A, Romei C, Gemignani F, Landi S, Ciampi R, Tacito A, Molinaro E, Agate L, Bottici V, Cappagli V, Viola D, Piaggi P, Vitti P, Pinchera A, Elisei R. In silico and in vitro analysis of rare germline allelic variants of RET oncogene associated with medullary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2011;18(5):603-12.
 - 14- Cranston AN, Carniti C, Oakhill K, Radzio-Andzelm E, Stone EA, McCallion AS, Hodgson S, Clarke S, Mondellini P, Leyland J, Pierotti MA, Whittaker J, Taylor SS, Bongarzone I, Ponder BA. RET is constitutively activated by novel tandem mutations that alter the active site resulting in multiple endocrine neoplasia type 2B. *Cancer Res.* 2006;66(20):10179-87.

- 15- D'Aloiso L, Carlomagno F, Bisceglia M, Anaganti S, Ferretti E, Verrienti A, Arturi F, Scarpelli D, Russo D, Santoro M, Filetti S. Clinical case seminar: in vivo and in vitro characterization of a novel germline RET mutation associated with low-penetrant nonaggressive familial medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(3):754-9.
- 16- Decker RA, Peacock ML. Update on the profile of multiple endocrine neoplasia type 2a RET mutations practical issues and implications for genetic testing. *Cancer (Suppl.)*. 1997;80(3):557-568.
- 17- Domchek S, Weber BL. Genetic variants of uncertain significance: flies in the ointment. *J Clin Oncol.* 2008;26(1):16-7.
- 18- 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.
- 19- Elisei R, Molinaro E, Agate L, Bottici V, Viola D, Biagini A, Matrone A, Tacito A, Ciampi R, Vivaldi A, Romei C. Ret oncogene and thyroid carcinoma. *J Genet Syndr Gene Ther.* 2014;5:214-224.
- 20- Elisei R, Romei C, Cosci B, Agate L, Bottici V, Molinaro E, Sculli M, Miccoli P, Basolo F, Grasso L, Pacini F, Pinchera A. RET genetic screening in patients with medullary thyroid cancer and their relatives: experience with 807 individuals at one center. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(12):4725-9.
- 21- Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gabel RF, Amstel HKPV, Lips CJM, Nishisho I, Takai SI, Marsh DJ, Robinson BG, Frank-Raue K, Raue F, Xue F, Noll WW, Romei C, Pacini F, Fink M, Niederle B, Zedenius J, Nordenskjold M, Komminoth P, Hendy GN, Gharib H, Thibodeau SN, Lacroix A, Frilling A, Ponder BAJ, Mulligan LM. The relationship between specific *RET* proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. *JAMA.* 1996;276(19):1575-1579.

-
- 22- Eng C. Mendelian genetics of rare--and not so rare--cancers. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1214:70-82.
- 23- Eng C. Multiple endocrine neoplasia type 2 and the practice of molecular medicine. *Rev Endocr Metab Disord.* 2000;1(4):283-290.
- 24- Erlic Z, Hoffmann MM, Sullivan M, Franke G, Peczkowska M, Harsch I, Schott M, Gabbert HE, Valimaki M, Preuss SF, Hasse-Lazar K, Waligorski D, Robledo M, Januszewics A, Eng C, Neumann HPH. Pathogenicity of DNA variants and double mutations in Multiple Endocrine Neoplasia type 2 and von Hippel-Lindau syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(1):308-313.
- 25- Ferrer-Costa C, Orozco M, de la Cruz X. Sequence-based prediction of pathological mutations. *Proteins.* 2004;57(4):811-9.
- 26- Fitze G, Cramer J, Ziegler A, Schierz M, Schreiber M, Kuhlisch E, Roesner D, Schackert HK. Association between c135G/A genotype and RET proto-oncogene germline mutations and phenotype of Hirschsprung's disease. *Lancet.* 2002;359(9313):1200-5.
- 27- Fitze G, Schierz M, Bredow J, Saeger HD, Roesner D, Schackert HK. Various penetrance of familial medullary thyroid carcinoma in patients with RET protooncogene codon 790/791 germline mutations. *Ann Surg.* 2002b;236(5):570-5.
- 28- Frank-Raue K, Döhring J, Scheumann G, Rondot S, Lorenz A, Schulze E, Dralle H, Raue F, Leidig-Bruckner G. New Mutations in the RET Protooncogene-L881V – Associated with Medullary Thyroid Carcinoma and -R770Q - in a Patient with Mixed Medullar/Follicular Thyroid Tumour. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2010;118(8):550-553.
- 29- Frank-Raue K, Rondot S, Raue F. Molecular genetics and phenomics of RET mutations: Impact on prognosis of MTC. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;322(2010):2-7.

-
- 30- Frank-Raue K, Rondot S, Schulze E, Raue F. Change in the spectrum of RET mutations diagnosed between 1994 and 2006. *Clin Lab*. 2007;53(5-6):273-82.
- 31- Gimm O, Niederle BE, Weber T, Bockhorn M, Ukkat J, Brauckhoff M, Thanh PN, Frilling A, Klar E, Niederle B, Dralle H. RET proto-oncogene mutations affecting codon 790/791: A mild form of multiple endocrine neoplasia type 2A syndrome? *Surgery*. 2002;132(6):952-9.
- 32- Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C, Edkins S, O'Meara S, Vastrik I, Schmidt EE, Avis T, Barthorpe S, Bhamra G, Buck G, Choudhury B, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Tofts C, Varian J, Webb T, West S, Widaa S, Yates A, Cahill DP, Louis DN, Goldstraw P, Nicholson AG, Brasseur F, Looijenga L, Weber BL, Chiew YE, DeFazio A, Greaves MF, Green AR, Campbell P, Birney E, Easton DF, Chenevix-Trench G, Tan MH, Khoo SK, Teh BT, Yuen ST, Leung SY, Wooster R, Futreal PA, Stratton MR. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*. 2007;446(7132):153-8.
- 33- Groot JWB, Links TP, Plukker JTM, Lips CJM, Hofstra RMW. RET as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocr Rev*. 2006;27(5):535-560.
- 34- Hoff AO, Cote GJ, Gagel RF. Multiple Endocrine Neoplasias. *Annu Rev. Physiol*. 2000;62:377-411.
- 35- Hyndman BD, Gujral TS, Krieger JR, Cockburn JG, Mulligan LM. Multiple functional effects of RET kinase domain sequence variants in Hirschsprung disease. *Hum Mutat*. 2013 Jan;34(1):132-42.

-
- 36- Jimenez C, Dang GT, Schultz PN, El-Naggar A, Shapiro S, Barnes EA, Evans DB, Vassilopoulou-Sellin R, Gagel RF, Cote GJ, Hoff AO. A novel point mutation of the RET protooncogene involving the second intracellular tyrosine kinase domain in a family with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(7):3521-6.
- 37- Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zalcberg JR. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2008;359(17):1757-65.
- 38- Kaserer K, Scheuba C, Neuhold N, Weinhäusel A, Haas OA, Vierhapper H, Niederle B. Sporadic versus familial medullary thyroid microcarcinoma: a histopathologic study of 50 consecutive patients. *Am J Surg Pathol.* 2001;25(10):1245-51.
- 39- Kim JH, Yoon KO, Kim JK, Kim JW, Lee SK, Kong SY, Seo JM. Novel mutations of RET gene in Korean patients with sporadic Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 2006;41(7):1250-1254.
- 40- Kitamura Y, Goodfellow PJ, Shimizu K, Nagahama M, Ito K, Kitagawa W, Akasu H, Takami H, Tanaka S, Wells SA Jr. Novel germline RET proto-oncogene mutations associated with medullary thyroid carcinoma (MTC): mutation analysis in Japanese patients with MTC. *Oncogene.* 1997 Jun 26;14(25):3103-6.
- 41- Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, Moley JF, Pacini F, Ringel MD, Schlumberger M, Wells Jr SA. Medullary Thyroid Cancer: Management Guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid.* 2009;19(6):565-612.
- 42- Koch CA, Huang SC, Vortmeyer AO, Zhuang Z, Chrousos GP, Pacak K. A patient with MEN 2 and multiple mutations of RET in the germline. *Exp Clin Endocrinol. Diabetes.* 2000;108(8):493.

-
- 43- Kruckeberg KE, Thibodeau SN. Pyrosequencing technology as a method for the diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 2. *Clin Chem*. 2004; 50(3):522-9.
 - 44- Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4(7):1073-81.
 - 45- Li B, Leal SM. Discovery of rare variants via sequencing: implications for the design of complex trait association studies. *Plos Genetics*. 2009;5(5):1-9.
 - 46- Lips CJ, Landsvater RM, Höppener JW, Geerdink RA, Blijham G, van Veen JM, van Gils AP, de Wit MJ, Zewald RA, Berends MJ, et al. Clinical screening as compared with DNA analysis in families with multiple endocrine neoplasia type 2A. *N Engl J Med*. 1994;331(13):828-35.
 - 47- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*. 2012, 2012:251364.
 - 48- Machens A, Dralle H. Familial prevalence and age of RET germline mutations: implications for screening. *Clin Endocrinol*. 2008;69:81-87.
 - 49- Machens A, Frank-Raue K, Lorenz K, Rondot S, Raue F, Dralle H. Clinical relevance of RET variants G691S, L769L, S836S and S904S to sporadic medullary thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;76(5):691-7.
 - 50- Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008;9:387-402.
 - 51- Marx SJ. Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 e 2. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(5):367-375.

-
- 52- Mastroianno S, Torlontano M, Scillitani A, D'Aloiso L, Verrienti A, Bonfitto N, De Bonis A, D'Agruma L, Muscarella LA, Guarnieri V, Dicembrino F, Maranghi M, Durante C, Filetti S. Coexistence of multiple endocrine neoplasia type 1 and type 2 in a large Italian family. *Endocrine*. 2011; 40(3):481-5.
- 53- McCourt CM, McArt DG, Mills K, Catherwood MA, Maxwell P, Waugh DJ, Hamilton P, O'Sullivan JM, Salto-Tellez M. Validation of next generation sequencing technologies in comparison to current diagnostic gold standards for BRAF, EGFR and KRAS mutational analysis. *PLoS One*. 2013;8(7):e69604.
- 54- Menko FH, van der Luijt RB, de Valk IA, Toorians AW, Sepers JM, van Diest PJ, Lips CJ. Atypical MEN type 2B associated with two germline RET mutations on the same allele not involving codon 918. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(1):393-7.
- 55- Mise N, Drosten M, Racek T, Tannapfel A, Putzer BM. Evaluation of potencial mechanisms underlying genotype-phenotype correlations in multiple endocrine neoplasia type 2. *Oncogene*. 2006;25:6637-6647.
- 56- Miyauchi A, Matsuzuka F, Hirai K, Yokozawa T, Kobayashi K, Ito Y, Nakano K, Kuma K, Futami H, Yamaguchi K. Prospective trial of unilateral surgery for nonhereditary medullary thyroid carcinoma in patients without germline RET mutations. *World J Surg*. 2002;26(8):1023-8.
- 57- Mulligan LM, Kwok JBJ, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, Love DR, Mole SE, Moore JK, Papi L, Ponder MA, Telenius H, Tunnacliffe A, Ponder BAJ. Germ-line mutations of the *RET* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2. *Nature*. 1993;363:458-460.
- 58- Muzza M, Cordella D, Bombled J, Bressac-de Paillerets B, Guizzardi F, Francis Z, Beck-Peccoz P, Schlumberger M, Persani L, Fugazzola L. Four novel RET germline variants in exons 8 and 11 display an oncogenic potential in vitro. *Eur J Endocrinol*. 2010;162(4):771-7.

-
- 59- Nishikawa M, Murakumo Y, Imai T, Kawai K, Nagaya M, Funahashi H, Nakao A, Takahashi M. Cys611Ser mutation in RET proto-oncogene in a kindred with medullary thyroid carcinoma and Hirschsprung's disease. *Eur J Hum Genet.* 2003;11(5):364-8.
- 60- Nunes AB, Ezabella MC, Pereira AC, Krieger JE, Toledo SP. A novel Val648Ile substitution in RET protooncogene observed in a Cys634Arg multiple endocrine neoplasia type 2A kindred presenting with an adrenocorticotropin-producing pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(12):5658-61.
- 61- Nunes AB, Ezabella MCL, Hayashida CY. Neoplasia endócrina múltipla tipo 2. In: Lopes AC *et al.* Editors. Tratado de Clínica Médica. São Paulo: Ed. Roca; 2006. vol.2. p.3539-3547.
- 62- Paszko Z, Sromek M, Czetwertynska M, Skasko E, Czapczak D, Wisniewska A, Prokurat A, Chrupek M, Jagielska A, Kozłowicz-Gudzinska I. The occurrence and the type of germline mutations in the RET gene in patients with medullary thyroid carcinoma and their unaffected kindred's from Central Poland. *Cancer Invest.* 2007;25(8):742-9.
- 63- Pęczkowska M, Kowalska A, Sygut J, Waligórski D, Malinoc A, Janaszek-Sitkowska H, Prejbisz A, Januszewicz A, Neumann HP. Testing new susceptibility genes in the cohort of apparently sporadic phaeochromocytoma/paraganglioma patients with clinical characteristics of hereditary syndromes. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013;79(6):817-23.
- 64- Plaza-Menacho I, van der Sluis T, Hollema H, Gimm O, Buys CH, Magee AI, Isacke CM, Hofstra RM, Eggen BJ. Ras/ERK1/2-mediated STAT3 Ser727 phosphorylation by familial medullary thyroid carcinoma-associated RET mutants induces full activation of STAT3 and is required for c-fos promoter activation, cell mitogenicity, and transformation. *J Biol Chem.* 2007;282(9):6415-24.

-
- 65- Poturnajova M, Altanerova V, Kostalova L, Breza J, Altaner C. Novel germline mutation in the transmembrane region of RET gene close to Cys634Ser mutation associated with MEN 2A syndrome. *J Mol Med (Berl)*. 2005;83(4):287-95.
- 66- Prazeres H, Couto JP, Rodrigues F, Vinagre J, Torres J, Trovisco V, Martins TC, Sobrinho-Simões M, Soares P. In vitro transforming potential, intracellular signaling properties, and sensitivity to a kinase inhibitor (sorafenib) of RET proto-oncogene variants Glu511Lys, Ser649Leu, and Arg886Trp. *Endocr Relat Cancer*. 2011;18(4):401-12.
- 67- Prazeres HJ, Rodrigues F, Figueiredo P, Naidenov P, Soares P, Bugalho MJ, Lacerda M, Campos B, Martins TC. Occurrence of the Cys611Tyr mutation and a novel Arg886Trp substitution in the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 families and sporadic medullary thyroid carcinoma cases originating from the central region of Portugal. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;64(6):659-66.
- 68- Radice P, De Summa S, Caleca L, Tommasi S. Unclassified variants in BRCA genes: guidelines for interpretation. *Ann Oncol*. 2011;22 Suppl 1:i18-23.
- 69- Raue F, Frank-Raue K. Update multiple endocrine neoplasia type 2. *Fam Cancer*. 2010;9(3):449-457.
- 70- Rey JM, Brouillet JP, Fonteneau-Allaire J, Boneu A, Bastié D, Maudelonde T, Pujol P. Novel germline RET mutation segregating with papillary thyroid carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2001;32(4):390-1.
- 71- Robledo M, Gil L, Pollan M, Cebrian A, Ruiz S, Azanedo M, Benitez J, Menárguez J, Rojas JM. Polymorphisms G691S/S904S of RET as genetic modifiers of MEN 2A. *Cancer Res*. 2003;63(8):1814-1817.

-
- 72- Sáez ME, Ruiz A, Cebrián A, Morales F, Robledo M, Antiñolo G, Borrego S. A new germline mutation, R600Q, within the coding region of RET proto-oncogene: a rare polymorphism or a MEN 2 causing mutation? *Hum Mutat.* 2000;15(1):122.
- 73- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biochemistry.* 1977;74(12):5463-5467.
- 74- Sangkhathat S, Kusafuka T, Chengkriwate P, Patrapinyokul S, Sangthong B, Fukuzawa M. Mutations and polymorphisms of Hirschsprung disease candidate genes in Thai patients. *J Hum Genet.* 2006;51:1126-1132.
- 75- Shirahama S, Ogura K, Takami H, Ito K, Tohsen T, Miyauchi A, Nakamura Y. Mutational analysis of the RET proto-oncogene in 71 Japanese patients with medullary thyroid carcinoma. *J Hum Genet.* 1998;43:101-106.
- 76- Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell.* 1985;42:581-588.
- 77- Tamanaha R, Camacho CP, Ikejiri ES, Maciel RMB, Cerutti JM. Y791F RET mutation and early onset of medullary thyroid carcinoma in Brazilian Kindred: evaluation of phenotype-modifying effect of germline variants. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;67(5):806-808.
- 78- Tavtigian SV, Deffenbaugh AM, Yin L, Judkins T, Scholl T, Samollow PB, de Silva D, Zharkikh A, Thomas A. Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *J Med Genet.* 2006;43(4):295-305.
- 79- Tessitore A, Sinisi AA, Pasquali D, Cardone M, Vitale D, Bellastella A, Colantuoni V. A novel case of multiple endocrine neoplasia type 2A associated with two de novo mutations of the RET protooncogene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(10):3522-7.

-
- 80- Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, Diemer K, Muruganujan A, Narechania A. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res.* 2003; 13(9):2129-41.
- 81- Toledo SPA, Santos MACG, Toledo RA, Lourenço Jr DM. Impacto f RET proto-oncogene analysis on the clinical management of multiple endocrine neoplasia type 2. *Clinics (Sao Paulo).* 2006;61(1):59-70.
- 82- Vaclavikova E, Dvorakova S, Sykorova V, Bilek R, Dvorakova K, Vlcek P, Skaba R, Zelinka T, Bendlova B. RET mutation Tyr791Phe: the genetic cause of different diseases derived from neural crest. *Endocrinology.* 2009;36:419-424.
- 83- Vestergaard P, Vestergaard EM, Brockstedt H, Christiansen P. Codon Y791F Mutations in a Large Kindred: Is Prophylactic Thyroidectomy Always Indicated?. *World J Surg.* 2007;31:996-1001.
- 84- Wallis Y, Payne S, McAnulty C, Bodmer D, Sistermans E, Robertson K, Moore D, Abbs S, Deans Z, Devereau A. *Practice Guidelines for the evaluation of pathogenicity and the reporting of sequence variants in clinical molecular genetics.* Birmingham: Association for Clinical Genetic Science; 2013. p. 1-16.
- 85- Weber F, Eng C. Editorial: Germline variants within RET: clinical utility or scientific playtoy?. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(11):6334-6336.
- 86- Wells SA Jr, Asa SL, Dralle H, Elisei R, Evans DB, Gagel RF, Lee N, Machens A, Moley JF, Pacini F, Raue F, Frank-Raue K, Robinson B, Rosenthal MS, Santoro M, Schlumberger M, Shah M, Waguespack SG. Revised American Thyroid Association Guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2015;25(6):567-610.
- 87- Wiench M, Włoch J, Wygoda Z, Gubała E, Oczko M, Pawlaczek A, Kula D, Lange D, Jarzab B. RET polymorphisms in codons 769 and 836 are not associated with predisposition to medullary thyroid carcinoma. *Cancer Detect Prev.* 2004;28(4):231-6.

- 88- Wiench M, Wygoda Z, Gubala E, Wloch J, Lisowska K, Krassowski J, Scieglinska D, Fiszer-Kierzkowska A, Lange D, Kula D, Zeman M, Roskosz J, Kukulska A, Krawczyk Z, Jarzab B. Estimation of risk of inherited medullary thyroid carcinoma in apparent sporadic patients. *J Clin Oncol*. 2001;19(5):1374-80.

Apêndice

Comprehensive assessment of the disputed *RET* Y791F variant shows no association with medullary thyroid carcinoma susceptibility

Rodrigo A Toledo¹, Roxanne Hatakana¹, Delmar M Lourenço Jr¹, Susan C Lindsey⁶, Cleber P Camacho⁶, Marcio Almeida⁹, José V Lima Jr¹⁰, Tomoko Sekiya¹, Elena Garralda⁸, Michel S Naslavsky⁴, Guilherme L Yamamoto⁴, Monize Lazar⁴, Osorio Meirelles¹¹, Tiago J P Sobreira⁷, Maria Lucia Lebrão³, Yeda A O Duarte², John Blangero⁹, Mayana Zatz⁴, Janete M Cerutti⁵, Rui M B Maciel⁶ and Sergio P A Toledo^{1,6}

¹Endocrine Genetics Unit (Laboratório de Investigação Médica/LIM-25) of Hospital das Clínicas, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, São Paulo 05403-010, Brazil

²Nursing School, ³School of Public Health, and ⁴Human Genome Research Center, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

⁵Division of Genetics, Genetic Bases of Thyroid Tumors Laboratory, Department of Morphology and Genetics, and

⁶Division of Endocrinology, Laboratory of Molecular and Translational Endocrinology, Department of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

⁷Brazilian National Laboratory of Biosciences, Campinas, São Paulo, Brazil

⁸Centro Integral Oncológico Clara Campal, Hospital Universitario Sanchinarro, Madrid, Spain

⁹Department of Genetics, Texas Biomedical Research Institute, AT&T Genomic Computing Center, San Antonio, Texas, USA

¹⁰Endocrinology Division, Santa Casa Hospital, São Paulo, São Paulo, Brazil

¹¹Laboratory of Epidemiology and Population Sciences, National Institute on Aging, Bethesda, Maryland, USA

Correspondence should be addressed to R A Toledo
Emails
toledorodrigo@usp.br or toledorodrigo79@gmail.com

Abstract

Accurate interpretation of germline mutations of the rearranged during transfection (*RET*) proto-oncogene is vital for the proper recommendation of preventive thyroidectomy in medullary thyroid carcinoma (MTC)-prone carriers. To gain information regarding the most disputed variant of *RET*, ATA-A Y791F, we sequenced blood DNA samples from a cohort of 2904 cancer-free elderly individuals (1261 via Sanger sequencing and 1643 via whole-exome/genome sequencing). We also accessed the exome sequences of an additional 8069 individuals from non-cancer-related laboratories and public databanks as well as genetic results from the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) project. The mean allelic frequency observed in the controls was 0.0031, with higher occurrences in Central European populations (0.006/0.008). The prevalence of *RET* Y791F in the control databases was extremely high compared with the 40 known *RET* pathogenic mutations ($P=0.00003$), while no somatic occurrence has been reported in tumours. In this study, we report new, unrelated Brazilian individuals with germline *RET* Y791F-only: two tumour-free elderly controls; two individuals with sporadic MTC whose Y791F-carrying relatives did not show any evidence of tumours; and a 74-year-old pheochromocytoma patient without MTC. Furthermore, we showed that the co-occurrence of Y791F with the strong *RET* C634Y mutation explains the aggressive MTC phenotypes observed in a large affected family that was initially reported as Y791F-only. Our literature review revealed that limited analyses

Key Words

- multiple endocrine neoplasias
- *RET* oncogene
- MEN2
- medullary thyroid carcinoma
- genetics

have led to the misclassification of *RET* Y791F as a probable pathogenic variant and, consequently, to the occurrence of unnecessary thyroidectomies. The current study will have a substantial clinical influence, as it reveals, in a comprehensive manner, that *RET* Y791F only shows no association with MTC susceptibility.

Endocrine-Related Cancer
(2015) 22, 65–76

Introduction

MEN2 (MIM #164761) is a dominantly inherited multi-glandular tumour syndrome that presents with a high penetrance of medullary thyroid carcinoma (MTC; observed in virtually 100% of cases), pheochromocytoma (50%) and parathyroid adenoma and/or hyperplasia (20%) (Eng *et al.* 1996). Germline gain-of-function mutations of the rearranged during transfection (*RET*) proto-oncogene, mostly occurring in exons 8, 10, 11, 13, 14, 15 and 16, activate RET via autophosphorylation of the trans-membrane receptor tyrosine kinase; these mutant receptors are highly expressed in MEN2-related tissues, leading to tumour growth. The International Consortium on MTC of 1996 (Eng *et al.* 1996), the 2001 Consensus on MENs (Brandi *et al.* 2001) and the updated American Thyroid Association (ATA) Consensus on MTC (Kloos *et al.* 2009) recommend that individuals carrying a germline disease-causing *RET* mutation should be subjected to early prophylactic total thyroidectomy, which is currently the only effective approach for preventing the progression of MTC. For the purpose of molecular diagnosis and for adequate surgical management of patients and their relatives, it is crucial to know whether a *RET* gene variant identified via genetic testing is a benign polymorphism, a variant of unknown clinical significance or a pathological disease-causing mutation (Toledo *et al.* 2006).

Biased genetic analyses of highly selected patients, in addition to relatively small numbers of controls, may result in a misunderstanding and misclassification of the pathogenicity of rare variants of medically actionable genes (Weber & Eng 2005). In this context, there is currently a great debate in the literature regarding the potential pathogenicity of the c.2372A>T Y791F variant in exon 13 of *RET* (Berndt *et al.* 1998, Fitze *et al.* 2002, 2004, Gimm *et al.* 2002, Brauer *et al.* 2004, Plaza-Menacho *et al.* 2007, Tamanaha *et al.* 2007, Vestergaard *et al.* 2007, Eng 2010, Erlic *et al.* 2010, Cerutti & Maciel 2013, Pęczkowska *et al.* 2013, Rich *et al.* 2014).

Recently, we described nine MEN2A families carrying both the classical *RET* C634Y mutation and the *RET* Y791F variant, which revealed a previously unrecognised role for

Y791F in the MEN2 syndrome. Although further analysis is still needed, our results indicate that Y791F may modify the effects of other concurrent *RET* mutations and may therefore act as a modifier variant (Toledo *et al.* 2010). However, the role of RET Y791F-only in MTC/MEN2-related pathogenesis and susceptibility is currently a matter of dispute (Vestergaard *et al.* 2007, Kloos *et al.* 2009, Eng 2010, Erlic *et al.* 2010, Rich *et al.* 2014 and Supplementary References, see section on supplementary data given at the end of this article).

The current study represents the largest analysis focusing on the *RET* (ATA-A) Y791F variant performed to date, including new data from Sanger and next-generation sequencing analyses of 2904 healthy adult/elderly individuals. We also accessed genetic and genomic findings from multiple public databases, resulting in the analysis of a total of 11 544 healthy individuals and 18 163 cancer samples.

Subjects

Written informed consent was obtained from the subjects, in accordance with the protocols approved by the Institutional Review Board of each participating centre.

Cohorts of new investigated controls

In this study, we report data from 2904 previously uninvestigated individuals from three tumour-free adult/elderly cohorts. The first cohort comprised 1261 healthy adult/elderly Brazilians (54% females and 46% males), with a mean age of 65.2 years. Blood DNA samples from these individuals were subjected to Sanger sequencing of *RET* exon 13 in our laboratory at the University of Sao Paulo School of Medicine. This cohort included samples from the School of Public Health of the University of Sao Paulo and control samples from the Experimental Oncology Laboratory (LIM-24) of the University of Sao Paulo School of Medicine. The ethnicity of the tumour-free adult/elderly subjects was 79% White/White Latino and 10% African and mixed Black/Caucasian.

The second cohort has been designated the SAbE60+ cohort and is a control group that was assembled and subjected to whole-exome sequencing by the Human Genome and Stem Cell Research Center (HUG-CELL) of the University of Sao Paulo. SAbE60+ consists of 604 Brazilian individuals from Sao Paulo City (214 males and 390 females), with minimum and maximum ages of 63.3 and 92.2 respectively, and an average age of 74.2 ± 6.9 years. The majority of the individuals in this cohort were White (57.62%), followed by mixed Black/Caucasian (18.38%), Black (7.45%), Asian (1.99%) and Amerindian (0.33%). Approximately 7% (6.62%) of the individuals answered positively to belonging to another ethnicity, and 7.62% did not answer this question.

The third cohort investigated in this study is the T2D-GENES cohort, which comes from a large collaborative study composed of 1039 completely sequenced individuals. The primary focus of this study group is the discovery of new genes associated with the development of type 2 diabetes using the information provided by large human pedigrees. Each sequenced pedigree contains between 22 and 86 individuals distributed across three to five generations. The sample population is composed of Mexican-American (48.9% males) individuals living in San Antonio, Texas (SATX), who are part of the large San Antonio Family Study (SAFS) project, which has been ongoing for more than 25 years, with a primary focus on cardiovascular diseases.

Public databases

Genetic and genomic data from the following non-tumour-enriched public databases were accessed: i) the NHLBI GO Exome Sequencing Project; ii) the database of single nucleotide polymorphisms (dbSNP) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine and iii) Ensembl (European Bioinformatics Institute, EBI, and European Molecular Biology Laboratory, EMBL), from the Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI). The genotyping results for the 1000 European-American controls reported by Erlic *et al.* (2010) were also included.

In addition, genetic and genomic findings from the cancer-specific Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) database were also accessed, while variant classifications were obtained from the databases of the ARUP MEN2/RET program of the Department of Pathology, University of Utah (Margraf *et al.* 2009).

All of the data from the databases were obtained between 20 July and 23 July 2014, and the websites for each database are listed at the end of the article.

Literature review

The PubMed and Google Scholar databases were used for the literature review. Space limitations prevented us from providing more thorough coverage of the topic, and we apologise to those whose work could not be cited. An extended list of the studies on RET Y791F is included as online supplementary data.

Methods

DNA extraction, PCR and Sanger sequencing

Blood DNA was extracted using the salting out method and a Qiagen kit (Qiagen). PCR amplification of RET exon 13 was carried out using 10 ng of gDNA and the following primers: F: 5'-AACTTGGGCAAGGCGATGCA-3' and R: 5'-AGAACAGGGCTGTATGGAGC-3'. The PCR products were run on a 1% agarose gel, and specific 277 bp amplicons (Supplementary Fig. 3, see section on supplementary data given at the end of this article) were then purified using the ExoSap-IT enzyme (USB Co., Cleveland, OH, USA). BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing (Applied Biosystems) was employed to sequence the reaction products, and the samples were run on an ABI Prism 3130xl – Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Whole-exome and whole-genome sequencing

Whole-exome sequence data were generated using Agilent SureSelect v2 technology for targeted exon capture, and the obtained reads were aligned using the Burrows-Wheeler Aligner (BWA) tool. Piccard was employed to convert, sort and index the aligned data files; the sequence quality scores were recalibrated using Genome Analysis Toolkit (GATK); and annotation of the variants was performed using Annovar.

Whole-genome sequencing (WGS) of 586 individuals was performed externally by Complete Genomics, Inc. (CGI, Mountain View, CA, USA) via a sequence-by-ligation method. The paired-end sequencing reads (70 bp) were mapped using the human reference genome (V 37.2), with a mean coverage of $60\times$. Variant calling was performed by CGI using version 2.0.3.1 of their proprietary pipeline. The false discovery rate estimates for SNP calls on the CGI platform ranged from 0.2 to 0.6%. The variant calls within the WGS were processed using CGA Tools software (version 1.5.0, build 31), made available by CGI. The WGS information was employed together with the pedigree information and a previously generated genome-wide association chip for effective imputation of

offspring using the MACH Bayesian imputation algorithm (Li 2010). The final sample comprised 1039 individuals genotyped using nearly 23 million SNPs.

Protein structure analysis

The structure of the RET receptor was generated based on the crystal structure of the RET tyrosine kinase domain bound to adenosine that has been recently deposited in the RCSB-PDB protein databank (ID: 4CKJ, Plaza-Menacho *et al.* 2014) and using the software program YASARA (Krieger *et al.* 2009). The RET domains were determined using the Conserved Domain Database (CDD), and a figure was generated with DOG 2.0 (Ren *et al.* 2009).

In silico pathogenic prediction

Four packages with different algorithms were used to investigate the pathogenicity of RET Y791F *in silico*: SIFT; PMUT; Align-GVGD; and POLYPHEN2 (the websites are listed at the end of the article).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by O Meirelles using IBM SPSS (www-01.ibm.com/software/analytics/spss/).

Results

RET Y791F in the tumour-free cohorts

The analyses of 22 138 alleles from the control subjects revealed that Y791F is a very rare SNP, with a frequency that varies greatly among the analysed populations (Fig. 1 and Supplementary Table 1, see section on supplementary data given at the end of this article). In accordance with an initial

report from Europe (Berndt *et al.* 1998), the three European-American cohorts of control individuals presented the highest frequencies, which ranged from 0.0017 to 0.008. The three Latin cohorts together with the African-American population presented the lowest frequencies of RET Y791F, ranging from 0 to 0.0007 (Supplementary Table 1). Notably, both the original Y791F MTC cases reported by Berndt *et al.* (1998) and the screen of 1000 controls conducted by Erlic *et al.* (2010), which identified the highest allelic frequency among the controls, are from Germany. In addition, as discussed later in this study, the largest cohort of patients carrying the Y791F variant also comes from Germany, indicating a probably higher prevalence of the Y791F variant in this country. Interestingly, one of the healthy Y791F-only Brazilian individuals reported in this study and the two unrelated Brazilian cases with sporadic MTC who also carried the variant (descriptions of these individuals are provided later in this report) were direct descendants of Germans. In addition, at least two out of the nine Brazilian MEN2A families with C634Y/Y791F that we had previously reported were of German descent (Toledo *et al.* 2010, Valente *et al.* 2013). However, no cases harbouring C634Y/Y791F have been reported outside of Brazil thus far.

Owing to possible incomplete assessment of the phenotypic features of affected individuals or late disease onset, the control databases may conceivably include patients with rare diseases such as (familial) MTC and MEN2 syndrome who carry pathogenic RET variants. To explore the chance of this situation occurring, we assessed whether the Exome Sequencing Project (ESP) exome variation database (which is not a tumour-enriched database) included any classical disease-associated RET mutations. No alleles corresponding to strong RET mutations, classified as an MTC level-3 risk by the consensus on MENs or as levels C-D by the ATA MTC guidelines, were found in the ESP control databases (Fig. 2 and Supplementary Fig. 1, see section on supplementary data given at the end of this article). Notably, one allele of the low-risk V804M mutation, which is classified as MTC risk 1/ATA-A, was found among the 13 000 RET alleles from the ESP database. Valine 804 is a gatekeeper residue that is critical for ATP binding and activation of the RET kinase receptor. Protein conformation analyses have revealed that the V804M and V804L mutations modify the ATP-binding pockets of RET, facilitating ATP binding and conferring resistance to the multikinase inhibitor vandetanib, which is approved for the treatment of advanced MTC (Carlomagno *et al.* 2004, Wells *et al.* 2010). The identification of heterozygous RET V804M in the controls may be due to the relatively mild phenotype or late onset of MTC that is frequently associated with this

Figure 1

RET Y791F frequencies in different control populations/cohorts. The highest frequencies are observed in the populations from central Europe, especially Germany. Details of the populations are provided in Supplementary Table 1.

Figure 2

No *RET* ATA-B, C or D alleles were found in the ESP control databases. Only one instance of the V804M allele (ATA-A) was found among the 13 000 sequenced alleles, indicating a very low frequency of *bona fide* MTC-related *RET* mutations in healthy individuals. In contrast, 15 alleles of Y791F were found within the ESP control databases, indicating that the frequencies of this specific variant behave differently, possibly as an accompanying genetic modifier or as a benign polymorphism.

variant (Feldman *et al.* 2000). The ESP dataset also included one allele of each of the three *RET* variants G321K, K666E, and R866W. These three last variants are very rare and are noted on the ATA guidelines as 'mutations based on limited families/case reports and may represent variants of unknown significance' (Kloos *et al.* 2009).

In contrast to the absence/very low frequency of *bona fide* *RET*-activating mutations in the ESP dataset, the Y791F variant was present in 14 individuals, one of whom was homozygous (N alleles=15). This allelic frequency is significantly higher than that observed among the remaining *RET* mutations ($P=0.00003$).

Previously unreported tumour-free elderly individuals harbouring *RET* Y791F

In this study, we report two Brazilian *RET* Y791F carriers who were identified during the genetic screening of the healthy elderly controls by Sanger sequencing performed in our laboratory. The first subject is a 76-year-old woman who has never developed tumours and presents no health complications. She has been followed by the Hospital das Clínicas in Sao Paulo (HC-FMUSP) for routine check-ups. Her calcitonin level was undetectable (<2 pg/ml) in September 2014, and she reports no history of tumours in her family. Her father was German and died at the age of 75 due to a heart attack. Her 45-year-old daughter (an only child) was invited to come to the hospital to provide blood for

biochemical examinations and genetic testing; her calcitonin level was <2 pg/ml, and sequencing analysis revealed that she harboured the WT allele.

Less information is available regarding the second subject with *RET* Y791F. She was also followed by HC-FMUSP for routine check-ups, and her medical report shows no tumour development or presence of other serious clinical features. She died in 2008 at the age of 94.

In accordance with our data on elderly individuals carrying *RET* Y791F without any history of tumours, a recent study that analysed the exome data of 44 centenarian Ashkenazi Jews has found two individuals ($2/44=0.045$) harbouring the *RET* Y791F variant (Freudenberg-Hua *et al.* 2014).

Evaluation of *RET* Y791F in MTC, MEN2, hyperparathyroidism (HPT) and pheochromocytoma shows no association with susceptibility to endocrine neoplasia

Berndt *et al.* (1998) first reported the presence of the Y791F variant in MTC patients in 1998. In addition to the mutational hotspots in exons 10 and 11, the authors reported exon 13 as a new potential hotspot following the identification of the L790F and Y791F variants in patients with familial MTC. In the original paper, the two *RET* Y791F families were small and included a combined total of only three clinically affected individuals (Berndt *et al.* 1998). The association linking Y791F to familial MTC/MEN2 is based on limited and selected cohorts. More importantly, there is no convincing data in the literature showing co-segregation of Y791F with MTC (Supplementary References).

Additionally, Gimm *et al.* (2002) analysed German patients with mutations in codons 790 and 791 and suggested a mild form of the disease.

Through a review of the literature, we found two large families reported to carry *RET* Y791F; one family is from Denmark with Central Europe descendants, and the other is from Brazil. Vestergaard *et al.* (2007) initially identified a Danish young case with goitre carrying *RET* Y791F and subsequently performed genetic screening of a total of 27 family members. It is noteworthy that 15 of the family members were Y791F carriers, and none exhibited abnormal clinical or biochemical results. The calcitonin levels of the carriers and non-carriers in this family did not differ significantly, and total thyroidectomy was postponed (Vestergaard *et al.* 2007). The second kindred were a large Brazilian *RET* Y791F family with 17 carriers, ten of whom were diagnosed with MTC, including cases with the early and aggressive phenotype (Tamanaha *et al.* 2007).

Although this family was initially described as an Y791F-only family, a subsequent analysis indicated that these patients also harboured the *bona fide* activating germline RET C634Y mutation (Cerutti & Maciel 2013, Valente *et al.* 2013). These results are in accordance with the previous report of C634Y-Y791F *cis* being found in four Brazilian MEN2A families (Toledo *et al.* 2010).

The largest reported cohort of patients carrying RET Y791F was described by Frank-Raue and colleagues and comprised 22 German MTC/MEN2 cases and 34 screened relatives. The authors concluded that Y791F carriers develop milder clinical features and achieve higher cure rates compared with carriers of the codon 790 and 804 mutations (Frank-Raue *et al.* 2008). No control samples from the German population were analysed in this study. Patients with Y791F who display hyperparathyroidism and no MTC have been reported as well (Vierhapper *et al.* 2005). Another study identified RET Y791F in German patients with glioblastoma multiforme and gastric and pancreatic cancers who showed no clinical features of MTC or MEN2 (Rückert *et al.* 2011).

In accordance with the results of studies by Erlic *et al.* (2010) and Pęczkowska *et al.* (2013) showing occasional pheochromocytoma cases with co-occurrence of the RET Y791F variant and pathogenic variants in other pheochromocytoma-related genes, we identified a 68-year-old male with pheochromocytoma carrying the RET Y791F variant and the new germline variant D236N in the SDHB gene. Nevertheless, the pathogenicity of the latter variant is still uncertain.

Two new MTC patients harbouring RET Y791F without a family history of endocrine neoplasias

In this study, we report a 37-year-old female followed by the MEN clinic of the Federal University of Sao Paulo (UNIFESP) who presented a thyroid nodule with cytological results indicative of Hürthle cell neoplasm and an extremely high calcitonin level (2079 pg/ml, normal=8.5/5.0 pg/ml). During physical examination, the patient showed no cutaneous lichen amyloidosis, marfanoid habitus or mucosal neuromas. She underwent total thyroidectomy with prophylactic central neck dissection. A pathological analysis revealed a 2.5 cm MTC on the left thyroid lobe and lymphocytic thyroiditis with clusters of hyperplastic Hürthle cells. The tumour was confined to the thyroid, and the 20 lymph nodes that were analysed showed no evidence of metastasis. A genetic analysis of all of the RET hotspot exons revealed the Y791F variant. Three years after surgery, the calcitonin levels of this patient remain

undetectable (<2 pg/ml); her carcinoembryonic antigen (CEA) level was 1.6 ng/ml, and cervical ultrasonography showed no sign of relapse. Additionally, her clinical and biochemical screening results were negative for pheochromocytoma and hyperparathyroidism.

Screening of this patient's family revealed no history of endocrine tumours. Her 32-year-old sister also carries the RET Y791F variant and presented a thyroid ultrasound exhibiting thyroiditis and no nodules and biochemical examinations showing no evidence of MTC (calcitonin levels <1 pg/ml) or primary hyperparathyroidism. She was followed by another service and inadvertently underwent thyroidectomy. Pathological analysis found no evidence of MTC or C-cell hyperplasia. Her mother (59 years old) and her two sons (18 and 11 years old) did not harbour the RET Y791F variant and presented low calcitonin levels. Her father, who was probably the obligatory carrier, died in a car accident at the age of 46 years with no signs of the disease. He was from Germany. The lack of a family history of MTC in this family with three carriers argues that the RET Y791F variant is not an endocrine-neoplasia-susceptibility variant. Unfortunately, similar to this family, other asymptomatic relatives with the Y791F variant have also undergone unnecessary thyroidectomies (Supplementary References).

Recently, we have identified another patient with MTC harbouring the RET Y791F variant from the city of Curitiba, Brazil. The patient, a 35-year-old woman, was diagnosed with a thyroid nodule. The patient underwent a thyroidectomy, and the final histological analysis revealed MTC. An extended RET analysis (exons 1–12 and 14–21) was performed, and no other mutations were identified. The patient has a 9-year-old daughter exhibiting normal thyroid ultrasound results. The patient also has a German background.

A new elderly pheochromocytoma patient harbouring RET Y791F without MTC

A RET Y791F germline variant was observed in a patient being followed at Santa Casa Hospital in Sao Paulo, who was referred to our laboratory for genetic testing at the University of Sao Paulo. The remaining RET hotspot exons were sequenced, and no variant was identified. The patient was a 74-year-old man diagnosed with a left adrenal incidentaloma (9×8.3×6.5 cm). He had shown hypertension for the past 14 years, in addition to exhibiting chronic atrial fibrillation and subclinical autoimmune hyperthyroidism. His surgical pathology was diagnostic of pheochromocytoma (8.5 cm and 220 g), and the results

of his thyroid ultrasound examination were compatible with thyroiditis without nodules. His calcitonin and calcium/parathyroid hormone levels were normal. No family history of tumours was reported, and the sequencing results for the *TMEM127* gene showed no mutations. This case is another example of an elderly individual harbouring the *RET* Y791F variant without any increased risk for MTC.

RET Y791F in human tumours

The number of *RET* ATA mutations observed in the COSMIC genetic and genomic dataset increased substantially according to the mutation's aggressiveness: 94.1% of the ATA *RET* mutations occurring in cancers belong to the ATA C–D classification (strong mutations), while only 1.4% are weak ATA-A *RET* mutations (Fig. 3 and Supplementary Tables 2 and 3, see section on supplementary data given at the end of this article). Among the ATA-A risk mutations, the most common variant is V804M, while the remaining variants are very rare and with an uncertain functional effect according to the ATA classification.

Among the entire COSMIC dataset of 18 163 tumour samples with available *RET* genotypes, only one (a lymphoid neoplasm, ID: COSM1159820) presented the *RET* Y791F variant (0.002% – no information available

ATA classification	<i>RET</i> mutations on COSMIC
ATA-A	8 (1.4%)
ATA-B	26 (4.5%)
ATA-C	64 (11.2%)
ATA-D	474 (82.9%)
Total	572

Figure 3

The number of *RET* mutations observed in the COSMIC cancer genetic and genomic dataset increases substantially according to the ATA mutation aggressiveness classification: 94.1% of the *RET* mutations found in cancers belong to the ATA C–D classification (strong mutations), while only 1.4% consist of weak ATA-A *RET* mutations. One of the 8 (12.5%) ATA-A variants is Y791F, corresponding to 0.17% of the mutations.

regarding somatic or germline status). Of the 1549 MTCs in the COSMIC dataset, 625 (40.3%) exhibited a *RET* mutation, none of which were Y791F, indicating that there is not a frequent association between this variant and MTC tumourigenesis (Supplementary Table 4, see section on supplementary data given at the end of this article).

In addition to the lack of evidence regarding a 'driver' property of *RET* Y791F in human tumours, two reports describing results indicative of a 'passenger' role for Y791F. The first case is an Y791F MTC patient in whom the most aggressive *RET* mutation, M918T, was identified somatically, which is most probably the cause of MTC (Fitze et al. 2002). The second case has been recently reported by Carlini et al. (2014) who described a patient with pancreatic carcinoma presenting the typical *KRAS* G12D mutation and the *RET* Y791F variant. There is no information as to whether the Y791F mutation was germline or somatic in this patient, but as *KRAS* G12D is a very well-described pancreatic cancer-driver mutation, the results strongly indicate a minor/non-pathological role for *RET* Y791F. Interestingly, the patient is Caucasian, was born in Australia and has a German surname (Carlini, electronic communication).

RET Y791F in HSCR

RET Y791F was first described in a case of Hirschsprung's disease (HSCR) (Seri et al. 1997). HSCR is a genetically heterogeneous disorder, and inactivation (nonsense and frameshift) mutations in *RET* are its primary cause (Ederly et al. 1994). In families harbouring activating *RET* mutations occurring primarily in extracellular domains (i.e. exon 10), such as C620R, it has been classically reported that HSCR develops in up to 7% of carriers. Since the initial report, other Y791F-carrier HSCR cases with no evidence of MTC have been reported, raising the question as to whether this variant is actually involved in tumourigenesis (Virtanen et al. 2013).

In silico RET Y791F analyses

All four of the software programs used in this study predicted low or very low pathogenicity for the *RET* Y791F variant (data not shown). Although the software programs employ different algorithms to calculate potential pathogenicity, they all use evolutionary conservation, which indicated that an amino acid change at Tyrosine 791 is more likely to be tolerated, rather than being lethal or pathogenic. Our assessment of the *RET* protein structure indicate that Y791F localises to the N-lobe, in β 4, and is close to the ATP-binding site (Supplementary Fig. 3),

which is a region that does not commonly contain strong *RET* mutations.

In vitro RET Y791F assays

Plaza-Menacho *et al.* (2007) investigated the *RET* Y791F variant *in vitro* and reported ligand-independent activation. According to the results of this previous study, Y791F is an autophosphorylated monomeric activated receptor that leads to the constitutive activation of STAT3. However, the mechanism of STAT3 activation occurs via Src, JAK1 and JAK2, which differs from the classical *RET* C634R activation mechanism (Plaza-Menacho *et al.* 2007). In a later study, Hyndman *et al.* (2013) analysed *in vitro* *RET* variants that had been previously reported in HSCR cases and showed that Y791F behaved similarly to the WT protein in many respects, with similar RET/pERK/pSTAT3 phosphorylation, surface localisation, and RNA and protein stability being observed. Nevertheless, unlike to the *RET* WT protein and similarly to other HSCR variants, Y791F was associated with reduced levels of cell migration and no ability to promote colony formation (Hyndman *et al.* 2013). Although this last study did not include *bona fide* *RET*-activating mutations for comparison, the results indicate WT-like functional and molecular effects of Y791F, rather than Y791F acting as a gain-of-function mutation.

A third study by Cosci *et al.* (2011) combined *in silico* and *in vitro* assays to analyse known pathogenic mutations of *RET*, such as C634R and M918T and 'rare medium/low-risk' variants, including Y791F. Correlations between the results obtained using different approaches were observed primarily for the stronger variants, while the overall results and classification of the weaker variants remained unclear. The *in silico* classification of *RET* Y791F was deleterious, although focus and soft agar assays indicated Y791F to be a weak and probably non-pathogenic variant (Cosci *et al.* 2011). In contrast, the high proliferation rates associated with Y791F, C634R and M918T achieved statistical significance, but these results were inconclusive, as several probably non-pathogenic variants, such as V648I, also achieved statistical significance.

The three studies of *RET* cited above, together with many others in the literature, show how difficult and sometimes capricious it can be to characterise a weak variant using *in vitro* or *in silico* approaches, especially in genes related to genotypes with major medical implications, such as the recommendation for total thyroidectomy in the case of *RET*. To the best of our knowledge, there is no animal model of the *RET* Y791F variant.

RET Y791F as a potential phenotypic modifying variant in cases with pathogenic *RET* mutations

The data that we were able to generate and review in the current study indicate a clear lack of pathogenicity of *RET* Y791F-only. However, the possible role of Y791F as a phenotype-modifying variant cannot be discarded. In fact, we have recently reported four MEN2A families carrying the classical *RET* C634Y mutation and Y791F *in cis* (Toledo 2010). The patients presented aggressive MTC (codon C634-like pattern) associated with an increased susceptibility to unusually large bilateral pheochromocytomas. This finding is indicative of a modifier effect of Y791F when associated with classical disease-causing *RET* mutations (Toledo 2010). In the same study, we described *in vitro* analyses performed in Dr Lois Mulligan's laboratory (ON, Canada), demonstrating that the double C634Y/Y791F *RET* receptor is significantly more highly phosphorylated than either the WT receptor or the single C634Y and Y791F *RET* mutants (Toledo *et al.* 2010). Interestingly, an association between *RET* C634Y and Y791F has been recently observed in five additional Brazilian families (Cerutti & Maciel 2013, Valente *et al.* 2013). In addition to C634Y/Y791F, the presence of Y791F has been reported in patients harbouring other disease-associated *RET* mutations, such as C620F, V804L and M918T (Jindrichova *et al.* 2004). Although current knowledge shows no relevant clinical effect, the possible mechanism of such co-occurrence seems worth exploring in the future.

Known *RET* missense variants identified through whole-exome/genome sequencing

Four variants classified as ATA-A mutations (S649L, V804M, R844Q and S891A) (Kloos *et al.* 2009) were rarely found in the whole-exome/genome sequences of the tumour-free individuals assessed in the current study. The V804M and S891A variants are also included in the *RET* list as MTC level 1 mutations (Brandi *et al.* 2001). As mentioned earlier, V804M is a well-described gatekeeper mutation associated with a mild, late-onset phenotype, which could explain its rare occurrence in the presumably healthy cohort (1/13 000 alleles in the ESP dataset, 0.00007). The frequencies of V804M and Y791F in the controls were very different and were compatible with a true, low-risk mutation and a rare non-pathogenic variant respectively (Fig. 2 and Supplementary Fig. 2, see section on supplementary data given at the end of this article). In addition, a novel change involving Valine 804 (c.2411C>T; p.V804A) was, to the best of our knowledge, identified

Table 1 The nine new variants of the *RET* proto-oncogene identified via whole-exome and whole-genome sequencing in the current study

Casuistic	Nucleotide	Codon	RET protein	dbSNP or ESP	SIFT	PolyPhen2	n	Genotype frequency
SABE60+	C1352T	451	T451M*	Not reported	D	B	1	0.0008
SATX	T1418A	473	L473Q	Not reported	D	D	3	0.0014
SATX	A1462T	488	T488S	Not reported	T	B	1	0.0004
SABE60+	C1573T	525	R525W	Not reported	D	D	1	0.0008
SABE60+	C1678T	560	P560S	Not reported	D	D	1	0.0008
SABE60+	G1799T	600	R600L	Not reported	D	B	1	0.0008
SATX	C2077T	693	R693C	Not reported	D	D	2	0.0001
SABE60+	C2225T	742	T742M	Not reported	D	D	1	0.0008
SABE60+	A2255G	752	Y752C	Not reported	T	D	1	0.0008
SATX	T2411C	804	V804A	Not reported	D	D	1	0.0005

Please see the discussion and interpretation of these findings in the main text. The T451M variant is not present in the control databases (dbSNP and ESP), but it was identified in two endometrium carcinomas (COSMIC project IDs: 1584958 and 918112). The other variants have not been reported in COSMIC. D, damaging; B, benign; T, tolerated; SABE60+, University of Sao Paulo; SATX, San Antonio, Texas.

for the first time in this study (Table 1, allelic frequency of 0.00001 in the SATX control cohorts). An *in silico* analysis using both SIFT and Polyphen2 indicated the V804M and V804A changes to be pathogenic.

In accordance with our results for S649L, seven individuals from the ESP dataset were also identified as harbouring this variant, which has been presumably associated with late-onset, non-aggressive MTC (Colombo-Benkman et al. 2008).

RET V292M was also found in the SABE60+ cohort (1 out of 1218 of the sequenced alleles, 0.0008). This variant is classified as pathogenic in the ARUP MEN2 and dbSNP/NCBI databases, but it has not been included in the MTC guidelines (Eng et al. 1996, Kloos et al. 2009). Currently, limited evidence is available regarding the pathogenicity of this variant.

The previously reported RET Y791N variant was identified in two control individuals analysed via Sanger sequencing (2/2522, 0.008): a 76-year-old male and a 55-year-old female. There is no evidence of pathogenicity of this variant in the literature; it was initially reported in a case of HSCR and later in the sister of an MTC case harbouring RET R770Q (Ruiz-Ferrer et al. 2006, Frank-Raue et al. 2010).

Novel RET missense variants identified via whole-exome/genome sequencing

Nine of the RET missense variants identified herein via massive parallel DNA sequencing have not been reported in the dbSNP/NCBI or ESP databanks and, to the best of our knowledge, are novel (Table 1). Eight of the variants were classified as damaging by Polyphen2 or SIFT; six were

classified as damaging by both software programs; and one variant was classified as benign/tolerated by both software programs (Table 1). Despite the rarity of these variants and the *in silico* predictions, the fact that our population was composed of healthy adult/elderly individuals with no familial history of tumours indicates that these variants are probably benign polymorphisms or low-penetrance genetic changes. If new evidence appears in the future indicating pathogenicity in these variants, especially V804A, which occurs at a known RET hotspot, we will contact the carriers and offer genetic counselling, molecular testing and specific clinical screening.

Conclusions of the current comprehensive assessment of RET Y791F

1. There is no robust evidence from either our data or the literature indicating that RET Y791F-only may cause familial MTC or MEN2 syndrome (reports addressing very small families should not be considered to be informative). RET Y791F, like other non-pathogenic variants of RET, can be found in sporadic MTC patients, but its presence alone does not indicate an increased MTC risk.
2. The frequencies of the RET Y791F variant detected in large cohorts of healthy individuals are characteristic of the behaviour of a rare benign polymorphism, rather than a medically actionable pathogenic mutation of the RET proto-oncogene.

Lessons from findings 1 and 2:

- Asymptomatic germline RET Y791F-only carriers (with no other disease-causing mutations of RET) should not undergo preventive total thyroidectomy

based on the genetics. Familial risk, clinical outcomes, and biochemical and imaging data are the most valuable resources for managing these cases.

- There is no indication that genetic and clinical screening of family members of typical sporadic MTC cases harbouring *RET* Y791F-only is beneficial.
3. The patients with familial MTC/MEN2 who were initially reported to be *RET* Y791F-only carriers were also found to harbour other associated disease-causing *RET* variants (C634Y *in cis*), leading to the disease.

Lessons from finding 3:

- Genetic testing for *RET* is only complete when sequencing of all of the hotspot mutations in exons 8 and 10–16 is successfully performed. That is, sequencing of the remaining exons should not cease when the first suspect variant is identified.
 - Sequencing or re-sequencing of the hotspot exons of the *RET* gene (and possibly the full gene depending on the phenotype) of familial MTC/MEN2 patients initially described as *RET* Y791F-only carriers can reveal medically actionable pathogenic mutations in the *RET* proto-oncogene.
 - Limitations of PCR, such as allelic drop-out (PCR failure of one allele) and/or preferential amplification (hypo-amplification of one allele), may be responsible for false-negative *RET* genetic results. Therefore, the use of a second set of primers (with different sequences than those used for the initial PCR and sequencing run) is recommended for the re-sequencing of questionable cases.
4. Pheochromocytoma patients initially reported to be *RET* Y791F-only carriers can harbour variants of other genes, e.g. *VHL* or *SDHx*, that are most probably the cause of the disease.

Lesson from finding 4:

- Established clinical predictors and algorithms should be used to sequence pheochromocytoma-susceptibility genes in pheochromocytoma cases that are initially reported as *RET* Y791F-only.
5. Biased genetic analysis of highly selected patients and a relatively small number of controls can result in misunderstanding and misclassification of the pathogenicity of rare variants in medically actionable genes.

Lesson from finding 5:

- The analysis of large and informative datasets from tumour-free individuals constitutes an accessible and useful tool for improving the interpretation of a molecular diagnosis and aiding in genetic counselling and the clinical management and treatment of carriers.

Final comments about the era of NGS

The scientific and medical community working on *RET*-related diseases needs to be aware of the implications related to the dramatic increase in the number of new variants of this gene being identified in the current next-generation sequencing era. In fact, nine new *RET* variants were identified in the present study. Moreover, it is imperative to use caution when interpreting genetic variants with limited information. At the same time, access to genetic data from large cohorts presents an opportunity to re-evaluate the clinical behaviour of disputed *RET* variants, such as Y791F.

Websites

1. NHLBI ESP Exome Sequencing Project: <http://evs.gs.washington.edu>.
2. dbSNP/NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>.
3. Ensembl EBI/EMBL/WTSL: <http://www.ensembl.org>.
4. COSMIC: <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic>.
5. ARUP *RET* database, Univ. Utah: http://arup.utah.edu/database/MEN2/MEN2_display.php.
6. SIFT: sift.jcvi.org.
7. PMUT: <http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>.
8. POLYPHEN2: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>.
9. Align-GVGD: <http://agvgd.iarc.fr/>.

Supplementary data

This is linked to the online version of the paper at <http://dx.doi.org/10.1530/ERC-14-0491>.

Declaration of interest

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

Funding

This study was supported by funds from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant number 401.990/2010-9 and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grants number 2013/01476-9 (to S P A Toledo) and 2006/60402-1 and 2010/51547-1 (to R M B Maciel). S P A Toledo, J M Cerutti and R M B Maciel are investigators with the CNPq. R A Toledo has received a Ciências Sem Fronteiras CNPq postdoctoral fellowship and is currently working at the Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) in Madrid. R Hatakana, T Sekiya, S C Lindsey, D M Lourenço Jr, and R A Toledo received research fellowships from FAPESP. S P A Toledo is a Senior Professor in the Division of Endocrinology, Department of Medicine, Federal University of São Paulo, SP, Brazil, with a grant from the Programa

de Visitante Nacional Senior – Edital 028/2013 – from the Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge all of the subjects and volunteers who participated in this study. They would also like to thank Dr Roger Chammas (Experimental Oncology Laboratory/LIM-24, University of Sao Paulo School of Medicine) and Dr Patricia L Dahia (University of Texas Health Science Center at San Antonio) for their support.

References

- Berndt I, Reuter M, Saller B, Frank-Raue K, Groth P, Grussendorf M, Raue F, Ritter MM & Höppner W 1998 A new hot spot for mutations in the *ret* protooncogene causing familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2A. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83** 770–774. (doi:10.1210/jcem.83.3.4619)
- Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordini C, Conte-Devolx B, Falchetti A, Gheri RG, Libroia A et al. 2001 Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86** S658–S671. (doi:10.1210/jcem.86.12.8070)
- Brauer VF, Scholz GH, Neumann S, Lohmann T, Paschke R & Koch CA 2004 *RET* germline mutation in codon 791 in a family representing 3 generations from age 5 to age 70 years: should thyroidectomy be performed? *Endocrine Practice* **10** 5–9. (doi:10.4158/EP.10.1.5)
- Carlino MS, Kwan V, Miller DK, Saunders CA, Yip D, Nagrial AM, Tomlinson J, Grimmond SM, Scolyer RA, Kefford RF et al. 2014 New RAS-mutant pancreatic adenocarcinoma with combined BRAF and MEK inhibition for metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology* (In Press). (doi:10.1200/JCO.2013.51.5783)
- Carlomagno F, Guida T, Anaganti S, Vecchio G, Fusco A, Ryan AJ, Billaud M & Santoro M 2004 Disease associated mutations at valine 804 in the RET receptor tyrosine kinase confer resistance to selective kinase inhibitors. *Oncogene* **23** 6056–6063. (doi:10.1038/sj.onc.1207810)
- Cerutti JM & Maciel RM 2013 An unusual genotype–phenotype correlation in MEN 2 patients: should screening for RET double germline mutations be performed to avoid misleading diagnosis and treatment? *Clinical Endocrinology* **79** 591–592. (doi:10.1111/cen.12155)
- Colombo-Benkmann M, Li Z, Riemann B, Hengst K, Herbst H, Keuser R, Gross U, Rondot S, Raue F, Senninger N et al. 2008 Characterization of the *RET* protooncogene transmembrane domain mutation S649L associated with nonaggressive medullary thyroid carcinoma. *European Journal of Endocrinology* **158** 811–816. (doi:10.1530/EJE-07-0817)
- Cosci B, Vivaldi A, Romei C, Gemignani F, Landi S, Ciampi R, Tacito A, Molinaro E, Agate L, Bottici V et al. 2011 *In silico* and *in vitro* analysis of rare germline allelic variants of *RET* oncogene associated with medullary thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer* **18** 603–612. (doi:10.1530/ERC-11-0117)
- Edery P, Lyonnet S, Mulligan LM, Pelet A, Dow E, Abel L, Holder S, Nihoul-Fékété C, Ponder BA & Munnich A 1994 Mutations of the *RET* proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* **367** 378–380. (doi:10.1038/367378a0)
- Eng C 2010 Mendelian genetics of rare – and not so rare – cancers. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1214** 70–82. (doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05789.x)
- Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, van Amstel HK, Lips CJ, Nishisho I, Takai SI et al. 1996 The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *Journal of the American Medical Association* **276** 1575–1579. (doi:10.1001/jama.1996.03540190047028)
- Erlic Z, Hoffmann MM, Sullivan M, Franke G, Peczkowska M, Harsch I, Schott M, Gabbert HE, Valimäki M, Preuss SF et al. 2010 Pathogenicity of DNA variants and double mutations in multiple endocrine neoplasia type 2 and von Hippel-Lindau syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **95** 308–313. (doi:10.1210/jc.2009-1728)
- Feldman GL, Edmonds MW, Ainsworth PJ, Schuffenecker I, Lenoir GM, Saxe AW, Talpos GB, Roberson J, Petrucelli N & Jackson CE 2000 Variable expressivity of familial medullary thyroid carcinoma (FMTC) due to a *RET* V804M (GTG→ATG) mutation. *Surgery* **128** 93–98. (doi:10.1067/msy.2000.107103)
- Fitze G, Schierz M, Bredow J, Saeger HD, Roesner D & Schackert HK 2002 Various penetrance of familial medullary thyroid carcinoma in patients with *RET* protooncogene codon 790/791 germline mutations. *Annals of Surgery* **236** 570–575. (doi:10.1097/0000658-200211000-00006)
- Fitze G, Saeger HD, Roesner D & Schackert HK 2004 Management of multiple endocrine neoplasia syndrome type 2 families in association with rare germline mutations of the RET proto-oncogene. *Klinische Pädiatrie* **216** 270–276. (doi:10.1055/s-2004-44902)
- Frank-Raue K, Machens A, Scheuba C, Niederle B, Dralle H, Raue F & German MEN2 Study Group 2008 Difference in development of medullary thyroid carcinoma among carriers of RET mutations in codons 790 and 791. *Clinical Endocrinology (Oxford)* **69** 259–263. (doi:10.1111/j.1365-2265.2008.03215.x)
- Frank-Raue K, Döhring J, Scheumann G, Rondot S, Lorenz A, Schulze E, Dralle H, Raue F & Leidig-Bruckner G 2010 New mutations in the RET protooncogene-L881V – associated with medullary thyroid carcinoma and -R770Q – in a patient with mixed medullar/follicular thyroid tumour. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* **118** 550–553. (doi:10.1055/s-0029-1241851)
- Freudenberg-Hua Y, Jan Freudenberg J, Vacic V, Abhyankar A, Emde AK, Ben-Avraham D, Barzilai N, Oschwald D, Christen E, Koppel J et al. 2014 Disease variants in genomes of 44 centenarians. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* **2** 438–450. (doi:10.1002/mgg3.86)
- Gimm O, Niederle BE, Weber T, Bockhorn M, Ukkat J, Brauckhoff M, Thanh PN, Frilling A, Klar E, Niederle B et al. 2002 RET proto-oncogene mutations affecting codon 790/791: a mild form of multiple endocrine neoplasia type 2A syndrome? *Surgery* **132** 952–959. (doi:10.1067/msy.2002.128559)
- Hyndman BD, Gujral TS, Krieger JR, Cockburn JG & Mulligan LM 2013 Multiple functional effects of RET kinase domain sequence variants in Hirschsprung disease. *Human Mutation* **34** 132–142. (doi:10.1002/humu.22170)
- Jindrichova S, Vcelak J, Vlcek P, Neradilova M, Nemec J & Bendlova B 2004 Screening of six risk exons of the RET proto-oncogene in families with medullary thyroid carcinoma in the Czech Republic. *Journal of Endocrinology* **83** 257–265. (doi:10.1677/joe.1.05838)
- 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. (doi:10.1089/thy.2008.0403)
- Krieger E, Joo K, Lee J, Lee J, Raman S, Thompson J, Tyka M, Baker D & Karplus K 2009 Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: four approaches that performed well in CASP8. *Proteins* **77** (Suppl 9) 114–122. (doi:10.1002/prot.22570)
- Li Y, Willer CJ, Ding J, Scheet P & Abecasis GR 2010 MaCH: using sequence and genotype data to estimate haplotypes and unobserved genotypes. *Genetic Epidemiology* **34** 816–834. (doi:10.1002/gepi.20533)
- Margraf RL, Crockett DK, Krautscheid PM, Seamons R, Calderon FR, Wittwer CT & Mao R 2009 Multiple endocrine neoplasia type 2 RET protooncogene database: repository of MEN2-associated RET sequence variation and reference for genotype/phenotype correlations. *Human Mutation* **30** 548–556. (doi:10.1002/humu.20928)
- Peczkowska M, Kowalska A, Sygut J, Waligorski D, Malinoc A, Janaszek-Sitkowska H, Prejbisz A, Januszewicz A & Neumann HP 2013 Testing new susceptibility genes in the cohort of apparently sporadic pheochromocytoma/paraganglioma patients with clinical

- characteristics of hereditary syndromes. *Clinical Endocrinology* **79** 817–823. (doi:10.1111/cen.12218)
- Plaza-Menacho I, van der Sluis T, Hollema H, Gimm O, Buys CH, Magee AI, Isacke CM, Hofstra RM & Eggen BJ 2007 Ras/ERK1/2-mediated STAT3 Ser⁷²⁷ phosphorylation by familial medullary thyroid carcinoma-associated RET mutants induces full activation of STAT3 and is required for *c-fos* promoter activation, cell mitogenicity, and transformation. *Journal of Biological Chemistry* **282** 6415–6424. (doi:10.1074/jbc.M608952200)
- Plaza-Menacho I, Barnouin K, Goodman K, Martínez-Torres RJ, Borg A, Murray-Rust J, Mouilleron S, Knowles P & McDonald NQ 2014 Oncogenic RET kinase domain mutations perturb the autophosphorylation trajectory by enhancing substrate presentation in trans. *Molecular Cell* **53** 738–751. (doi:10.1016/j.molcel.2014.01.015)
- Ren J, Wen L, Gao X, Jin C, Xue Y & Yao X 2009 DOG 1.0: illustrator of protein domain structures. *Cell Research* **19** 271–273. (doi:10.1038/cr.2009.6)
- Rich TA, Feng L, Busaidy N, Cote GJ, Gagel RF, Hu M, Jimenez C, Lee JE, Perrier N, Sherman SI et al. 2014 Prevalence by age and predictors of medullary thyroid cancer in patients with lower risk germline RET proto-oncogene mutations. *Thyroid* **24** 1096–1106. (doi:10.1089/thy.2013.0620)
- Rückert F, Görgens H, Richter I, Krex D, Schackert G, Kuhlisch E, Fitze G, Saeger HD, Pilarsky C, Grützmann R et al. 2011 RET-protooncogene variants in patients with sporadic neoplasms of the digestive tract and the central nervous system. *International Journal of Colorectal Disease* **26** 835–840. (doi:10.1007/s00384-011-1150-7)
- Ruiz-Ferrer M, Fernández RM, Antiñolo G, López-Alonso M, Eng C & Borrego S 2006 A complex additive model of inheritance for Hirschsprung disease is supported by both RET mutations and predisposing RET haplotypes. *Genetics in Medicine* **8** 704–710. (doi:10.1097/O1.gim.0000245632.06064.f1)
- Seri M, Yin L, Barone V, Bolino A, Celli I, Boccardi R, Pasini B, Ceccherini I, Lerone M, Kristofferson U et al. 1997 Frequency of RET mutations in long- and short-segment Hirschsprung disease. *Human Mutation* **9** 243–249. (doi:10.1002/(SICI)1098-1004(1997)9:3<243::AID-HUMU5>3.0.CO;2-8)
- Tamanaha R, Camacho CP, Ikejiri ES, Maciel RM & Cerutti JM 2007 Y791F RET mutation and early onset of medullary thyroid carcinoma in a Brazilian kindred: evaluation of phenotype-modifying effect of germline variants. *Clinical Endocrinology* **67** 806–808. (doi:10.1111/j.1365-2265.2007.02964.x)
- Toledo SP, dos Santos MA, Toledo RA & Lourenço DM Jr 2006 Impact of RET proto-oncogene analysis on the clinical management of multiple endocrine neoplasia type 2. *Clinics (Sao Paulo)* **61** 59–70. (doi:10.1590/S1807-59322006000100011)
- Toledo RA, Wagner SM, Coutinho FL, Lourenço DM Jr, Azevedo JA, Longuini VC, Reis MT, Siqueira SA, Lucon AM, Tavares MR et al. 2010 High penetrance of pheochromocytoma associated with the novel C634Y/Y791F double germline mutation in the RET protooncogene. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **95** 1318–1327. (doi:10.1210/jc.2009-1355)
- Valente FO, Dias da Silva MR, Camacho CP, Kunii IS, Bastos AU, da Fonseca CC, Simião HP, Tamanaha R, Maciel RM & Cerutti JM 2013 Comprehensive analysis of RET gene should be performed in patients with multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN 2) syndrome and no apparent genotype–phenotype correlation: an appraisal of p.Y791F and p.C634Y RET mutations in five unrelated Brazilian families. *Journal of Endocrinological Investigation* **36** 975–981. (doi:10.3275/8997)
- Vestergaard P, Vestergaard EM, Brockstedt H & Christiansen P 2007 Codon Y791F mutations in a large kindred: is prophylactic thyroidectomy always indicated? *World Journal of Surgery* **31** 996–1001. (doi:10.1007/s00268-006-0446-1)
- Vierhapper H, Rondot S, Schulze E, Wagner L, Hanslik S, Niederle B, Bieglmayer C, Kaserer K & Baumgartner-Parzer S 2005 Primary hyperparathyroidism as the leading symptom in a patient with a Y791F RET mutation. *Thyroid* **15** 1303–1308. (doi:10.1089/thy.2005.15.1303)
- Virtanen VB, Pukkala E, Kivisaari R, Salo PP, Koivusalo A, Arola J, Miettinen PJ, Rintala RJ, Perola M & Pakarinen MP 2013 Thyroid cancer and co-occurring RET mutations in Hirschsprung disease. *Endocrine-Related Cancer* **20** 595–602. (doi:10.1530/ERC-13-0082)
- Weber F & Eng C 2005 Editorial: Germline variants within RET: clinical utility or scientific playtoy? *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **90** 6334–6336. (doi:10.1210/jc.2005-2030)
- Wells SA Jr, Gosnell JE, Gagel RF, Moley J, Pfister D, Sosa JA, Skinner M, Krebs A, Vasselli J & Schlumberger M 2010 Vandetanib for the treatment of patients with locally advanced or metastatic hereditary medullary thyroid cancer. *Journal of Clinical Oncology* **28** 767–772. (doi:10.1200/JCO.2009.23.6604)

Received in final form 24 November 2014

Accepted 25 November 2014

Made available online as an Accepted Preprint

25 November 2014