

ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS RS2435357 E RS1800858 NO PROTO-ONCOGENE RET COM DOENÇA DE HIRSCHSPRUNG: REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE

Association of rs2435357 and rs1800858 polymorphisms in RET proto-oncogene with Hirschsprung disease: systematic review and meta-analysis

Abdolhamid AMOOEE¹, Mohamad Hosein LOOKZADEH², Seyed Reza MIRJALILI², Seyed Mohsen MIRESMAEILI³, Kazem AGHILI⁴, Masoud ZARE-SHEHNEH⁵, Hossein NEAMATZADEH⁵

Como citar este artigo: Amooee A, Lookzadeh MH, Mirjalili SR, Miresmaeili SM, Aghili K, Zare-Shehneh M, Neamatzadeh H. Associação dos polimorfismos rs2435357 e rs1800858 no proto-oncogene RET com doença de Hirschsprung: revisão sistemática e metanálise. ABCD Arq Bras Cir Dig. 2019;32(3):e1448. DOI: /10.1590/0102-672020190001e1448

Trabalho realizado no ¹Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, General Surgery; ²Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Pediatrics; ³Science and Art University, Biology; ⁴Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Radiology; ⁵Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Medical Genetics, Yazd, Yazd, Iran

DESCRIPTORIOS - Doença de Hirschsprung. Polimorfismo de nucleotídeo único. Metanálise.

Correspondência:
Mohamad Hosein Lookzadeh
E-mail: drlookzadeh@gmail.com

Fonte de financiamento: não há
Conflito de interesse: não há

Recebido para publicação: 26/06/2018
Aceito para publicação: 16/01/2019

HEADINGS - Hirschsprung disease. Polymorphism. Single Nucleotide. Meta-Analysis.

RESUMO - Introdução: Muitos estudos publicados estimaram a associação dos polimorfismos rs2435357 e rs1800858 do proto-oncogene rearranjado durante a transfecção (RET) com o risco de doença por Hirschsprung (HSCR). No entanto, os resultados permanecem inconsistentes e controversos. **Objetivo:** Realizar metanálise para obter estimativa mais precisa da associação dos polimorfismos rs2435357 e rs1800858 no proto-oncogene RET com risco de HSCR. **Método:** A literatura elegível foi pesquisada pelo PubMed, Google Scholar, EMBASE e CNKI até 30 de junho de 2018. **Resultados:** Um total de 20 estudos, incluindo dez (1.136 casos 2.420 controles) para rs2435357 e dez (917 casos 1.159 controles) para rs1800858 foram incluídos. Os resultados globais indicaram que o rs2435357 (modelo alelo: OR=0,230, IC 95% 0,178-0,298, p=0,001; modelo homocigoto: OR=0,079, IC 95% 0,048-0,130, p=0,001; modelo heterocigoto: OR=0,149, IC 95% 0,048-0,130, p=0,001, modelo dominante: OR=0,132, IC 95% 0,098-0,179, p=0,001 e modelo recessivo: OR=0,239, IC 95% 0,161-0,353, p=0,001) e rs1800858 (modelo alelo: OR=5,594, IC 95% 3,653-8,877, p=0,001; modelo homocigoto: OR=8,453, IC 95% 3,783-18,890, p=0,001; modelo dominante: OR=3,469, IC 95% 1,881- 6,396, p=0,001 e modelo recessivo: OR=6,120, 95% CI 3,608-10,381, p=0,001) polimorfismos foram associados com o aumento do risco de HSCR em geral. **Conclusões:** Os resultados sugerem que os polimorfismos rs2435357 e rs1800858 no proto-oncogene RET podem estar associados ao HSCR.

ABSTRACT - Introduction: Many published studies have estimated the association of rs2435357 and rs1800858 polymorphisms in the proto-oncogene rearranged during transfection (RET) gene with Hirschsprung disease (HSCR) risk. However, the results remain inconsistent and controversial. **Aim:** To perform a meta-analysis get a more accurate estimation of the association of rs2435357 and rs1800858 polymorphisms in the RET proto-oncogene with HSCR risk. **Methods:** The eligible literatures were searched by PubMed, Google Scholar, EMBASE, and Chinese National Knowledge Infrastructure (CNKI) up to June 30, 2018. Summary odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were used to evaluate the susceptibility to HSCR. **Results:** A total of 20 studies, including ten (1,136 cases 2,420 controls) for rs2435357 and ten (917 cases 1,159 controls) for rs1800858 were included. The overall results indicated that the rs2435357 (allele model: OR=0.230, 95% CI 0.178-0.298, p=0.001; homozygote model: OR=0.079, 95% CI 0.048-0.130, p=0.001; heterozygote model: OR=0.149, 95% CI 0.048-0.130, p=0.001; dominant model: OR=0.132, 95% CI 0.098-0.179, p=0.001; and recessive model: OR=0.239, 95% CI 0.161-0.353, p=0.001) and rs1800858 (allele model: OR=5.594, 95% CI 3.653-8.877, p=0.001; homozygote model: OR=8.453, 95% CI 3.783-18.890, p=0.001; dominant model: OR=3.469, 95% CI 1.881-6.396, p=0.001; and recessive model: OR=6.120, 95% CI 3.608-10.381, p=0.001) polymorphisms were associated with the increased risk of HSCR in overall. **Conclusions:** The results suggest that the rs2435357 and rs1800858 polymorphisms in the RET proto-oncogene might be associated with HSCR risk.

INTRODUÇÃO

A doença de Hirschsprung (HSCR), também conhecida como megacólon congênito, é um defeito congênito com risco de vida caracterizado pela ausência de gânglios entéricos nos plexos submucoso e mioentérico do trato gastrointestinal⁶. Sua incidência varia de 1:5.000 a 1:10.000 nascidos vivos, com uma proporção total de homens para mulheres de 3:1 a 5:1, particularmente naqueles com segmentos curtos^{16,21}. O diagnóstico é estabelecido em 15% no primeiro mês de vida, em 40-50% nos primeiros três meses, em 60% no final do primeiro ano de vida e em 85% em quatro anos⁷. O mecanismo exato dela é desconhecido, mas é claro que fatores genéticos e ambientais estão envolvidos⁶. O cromossomo 21 da trissomia é a anormalidade cromossômica mais frequente (>90% dos casos) associada à doença HSCR¹. Além disso, está acompanhada de outras malformações congênicas em 5-32%

dos casos, incluindo o trato gastrointestinal, por anomalias do SNC, deficiência auditiva e anomalias congênitas do rim e do trato urinário^{28,31}. Fatores de risco perinatais e ambientais para a HSCR, como vitamina A, idade materna, obesidade, paridade, hipotireoidismo durante a gravidez, uso de medicamentos têm sido pouco estudados; no entanto, os resultados não foram consistentes^{15,22,43}.

A HSCR pode ser hereditária autossômica dominante, autossômica recessiva e até mesmo poligênica¹. Entretanto, aproximadamente em 30% dos casos, está associado a outras malformações⁸. Análises de associação genética identificaram 12 loci de susceptibilidade incluindo EDNRB, EDN3, GDNF, NTN, SOX10, PHOX2B, ECE1, KIAA1279 /KBP, ZFH1B, TTF-1 e NRG113. Entretanto, variações na maioria desses locos são encontradas principalmente nos casos síndromicos, nos quais a HSCR está associada a outras malformações congênitas^{1,8}. Análises de ligação de famílias de HSCR multiplexadas estabeleceram que o proto-oncogene rearranjado durante a transfecção (RET) é o principal gene de susceptibilidade ao seu desenvolvimento⁸. O RET é um receptor tirosina quinase transmembrana que também está envolvido na neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (NEM 2), causando carcinoma medular de tireoide, feocromocitoma e hiperparatireoidismo primário^{18,25}. Entre as variações do gene RET, os polimorfismos rs2435357 e rs1800858, localizados no íntron 1 e no éxon 2 do gene RET, respectivamente, foram amplamente investigados no HSCR. No entanto, os resultados de diferentes estudos são controversos⁸.

Portanto, realizamos revisão sistemática atual e metanálise para esclarecer as associações do SNP rs2435357 e rs1800858 com a susceptibilidade à HSCR.

MÉTODO

Estratégia de pesquisa da literatura

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica abrangente utilizando PubMed, EMBASE, Google scholar, banco de dados chinês de biomédica, WanFang e VIP para identificar todos os estudos elegíveis avaliando a associação dos polimorfismos Rs2435357 e rs1800858 com risco de PCR até junho 30, 2018. As palavras-chave foram as seguintes: ("Doença de Hirschsprung" OU "HSCR" OR "megacólon congênito") E ("Reorganizar durante transfecção" OR "RET Proto-oncogene" OU "Proto-Oncogene C-Ret" OU "gene RET" OU "Membro da Família Relacionada com Caderina 16" OR "Membro da Família Caderina 12") AND ("rs1800858" OR "c.135G>A" OU "Ala45Ala") E ("rs2435357" OU "IVS1 + 9277C>T" OU "c.73 + 9277C>T") AND ("polimorfismo" OR "SNPs" OR "variação" OR "locus" OR "mutation"). A pesquisa foi limitada a estudos em humanos e estudos publicados. Além disso, a lista de referências de estudos relevantes de caso-controle e revisões foram manualmente pesquisadas para identificar quaisquer estudos elegíveis adicionais. Se dois ou mais estudos tivessem dados iguais ou sobrepostos, apenas o estudo com a maior amostra ou o estudo publicado mais recentemente foi incluído na meta-análise.

Coleção de dados

Os dados dos estudos publicados relevantes foram extraídos independentemente por dois dos autores e digitados em um questionário personalizado. Em seguida, os dados extraídos foram comparados e os desacordos foram resolvidos por meio de discussão entre os dois pesquisadores. Para cada estudo elegível, os seguintes dados foram extraídos: nome do primeiro autor, ano de publicação, país de origem, etnia, métodos de genotipagem, fonte de controles (base populacional e hospitalar), números de casos e controles, frequência genotípica de SNPs, frequência alélica menor nos controles e equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) nos controles. A etnia foi dividida em asiáticos e caucásianos ou outros. Além disso, estudos foram realizados em diferentes populações foram considerados como estudos

independentes.

Crítérios de inclusão e exclusão

Os estudos selecionados foram incluídos na metanálise se atendessem aos seguintes critérios: 1) estudos caso-controle ou coorte; 2) avaliar a associação dos polimorfismos rs2435357 e rs1800858 do gene RET com a susceptibilidade à HSCR; 3) estudos com dados suficientes para realizar uma metanálise. Assim, estudos com as seguintes características foram excluídos: 1) não caso-controle ou coorte; 2) sem população controle; 3) estudos com dados insuficientes disponíveis ou ausência de dados de distribuição de genótipos; 4) resumos, comentários, relatos de casos, cartas, editoriais, revisões e revisões sistemáticas; 5) estudos publicados contendo dados duplicados.

Análise estatística

A força da associação dos polimorfismos rs2435357 e rs1800858 do RET com o risco de HSCR foi medida por odds ratios (OR) com intervalos de confiança de 95% (IC). A significância estatística do resumo OR foi determinada usando o teste-Z. Foram utilizados cinco modelos para avaliar as associações dos polimorfismos rs2435357 e rs1800858 do RET com o risco de HSCR incluindo: modelo de alelo (B vs. A), modelo homocigoto (BB vs. AA), modelo heterocigótico (BB vs. BA), modelo dominante (BB + BA vs. AA) e modelo recessivo (BB vs. AA + BA). A heterogeneidade entre os estudos foi avaliada pelo teste Q baseado no qui-quadrado, em que um valor de p menor que <0,05 foi considerado uma heterogeneidade óbvia. Além disso, o valor de I² foi utilizado para testar o grau de heterogeneidade, em que I²<25%, sem heterogeneidade; I² 25-50%, heterogeneidade moderada; I²>50%, heterogeneidade grande ou extrema¹⁷. O modelo de efeitos fixos foi usado para agrupar as OR e 95% de intervalo confidencial (IC) quando não houve heterogeneidade significativa. Caso contrário, o modelo de efeitos aleatórios (o método DerSimonian e Laird) foi usado. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado pelo teste qui-quadrado de ajuste de bondade. Uma análise de sensibilidade foi realizada principalmente pela omissão de um único estudo de cada vez para avaliar a estabilidade das RUP agrupadas obtidas. Além disso, análises de sensibilidade foram realizadas por omissão de estudos violadores de HWE. O possível viés de publicação foi estimado pelo gráfico de funil, no qual o erro padrão de log (OR) de cada estudo foi plotado contra seu log (OR). Além disso, a assimetria do gráfico de funil foi posteriormente avaliada pelo método do teste de regressão linear de Egger, no qual p<0,05 foi considerado um viés de publicação significativo. A qualidade dos dados genotípicos foi estimada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e estudos de baixa qualidade desviados do HWE foram excluídos na análise de sensibilidade. Todos os testes nesta metanálise foram realizados com o software Comprehensive meta-analysis CMA (versão 2.0; College Station, TX). Valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos. A aprovação ética não foi necessária, uma vez que se tratava de uma metanálise baseada em estudos anteriores, e sem a entrega direta de dados pessoais ou o recrutamento de participantes.

RESULTADOS

Características do estudo

Após a pesquisa on-line de vários bancos de dados, 131 publicações potencialmente relevantes foram recuperadas. Conforme mostrado na Figura 1, após excluir as duplicatas, 89 publicações foram mantidas. Dentre eles, 69 foram excluídas por serem irrelevantes, revisões/resumos, não sobre seres humanos, ou não publicadas em inglês. Finalmente, 20 estudos caso-controle, incluindo nove com 1.136 casos de HSCR 2.420 controles para rs2435357^{3,14,19,27,30,32,40,41,42} e dez com 917 casos de HSCR 1.159 controles para rs1800858^{5,9,10,12,23,24,30,34,37,39} foram

incluídos. As características de cada estudo estão resumidas na Tabela 1. Entre os 18 de caso-controle, 14 foram realizados em asiáticos e quatro em caucasianos. Todos incluídos foram publicados entre 2003 e 2017. O tamanho da amostra dos casos da HSCR variou de 16 a 362. Os métodos de genotipagem utilizados incluíram PCR, PCR-RFLP, ensaio TaqMan e PCR-HRM. Quatorze correspondências para os controles foram baseados na população, dois foram hospitalares e dois não declararam. Todos os estudos mostraram que a distribuição dos genótipos no grupo controle estava de acordo com o EHW ($p < 0,05$), com exceção de dois estudos^{22,23} para polimorfismos rs2435357 e dois^{28,29} para rs1800858.

Síntese de dados quantitativos
rs2435357

A Tabela 2 listou os principais resultados da metanálise do polimorfismo rs2435357 no proto-oncogene RET e risco de HSCR. Agrupamos todos os dez estudos de caso-controle para avaliar a associação global do polimorfismo rs2435357 com o risco de HSCR. A análise global combinada sugere associação significativa entre o polimorfismo rs2435357 e o risco de HSCR nas estimativas gerais em todos os cinco modelos genéticos, isto é, alelo (C vs. T: OR=0,230, IC 95% 0,178-0,298, $p=0,001$, Figura 2A), homocigoto (CC vs. TT: OR=0,079, IC 95% 0,048-0,130, $p=0,001$); heterocigoto (CT vs. TT: OR=0,149, IC 95% 0,048-0,130, $p=0,001$); dominante (CC + CT vs. TT: OR=0,132, IC 95% 0,098-0,179, $p=0,001$); e recessivo (CC vs. CT + TT: OR=0,239, IC 95% 0,161-0,353, $p=0,001$).

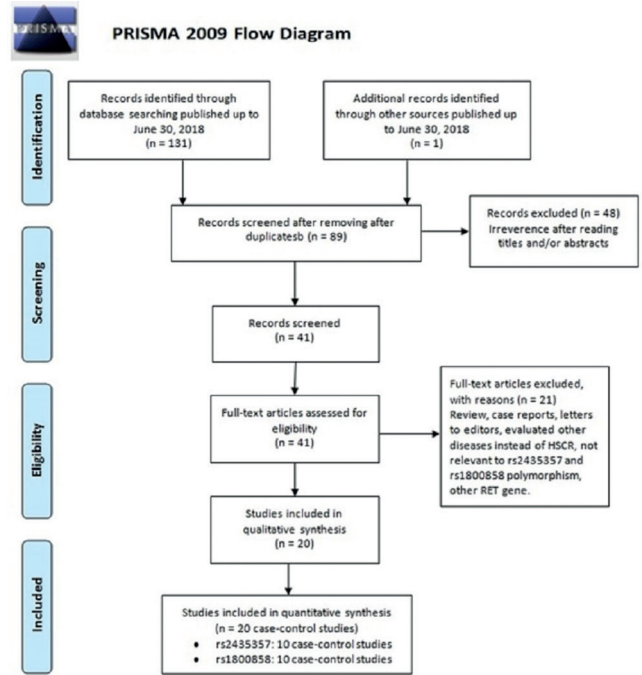


FIGURA 1 - Fluxograma que descreve a exclusão/inclusão de estudos individuais para metanálise

TABELA 1 - Principais características dos estudos incluídos nesta metanálise

Primeiro autor/ano	País (Etnia)	Técnica genotipagem	SOC	Caso/controle	Casos					Controles					MAFs	HWE
					Genotipo			Alelo		Genotipos			Alelo			
rs2435357					TT	TC	CC	T	C	TT	TC	CC	T	C		
Zhang 2007	China (asiática)	PCR	HB	99/132	57	28	14	142	56	29	62	41	120	144	0,545	0,544
Arnold 2008	Europeu*	TaqMan	HB	62/30	12	27	23	51	70	2	14	14	18	42	0,700	0,542
Miao 2010	China (asiática)	PCR	HB	315/352	228	65	22	521	109	62	169	95	293	359	0,550	0,390
Phusantisampan 2012	Tailândia (asiática)	PCR-RFLP	HB	68/120	47	14	7	108	28	31	64	25	126	114	0,475	0,447
Prato 2009	Itália (caucasiano)	PCR	HB	22/85	11	6	5	28	16	3	32	50	38	132	0,776	0,435
Zhang 2015	China (asiática)	TaqMan	NS	59/59	42	16	1	100	18	13	30	16	56	62	0,525	0,880
Gunadi 2016	Indonésia (asiática)	PCR-RFLP	NS	93/136	67	22	4	156	30	27	83	26	137	135	0,496	0,010
Yang 2017	China (asiática)	TaqMan	PB	362/1448	209	126	27	544	180	329	802	317	1460	1436	0,495	=0,001
Li 2017	China (asiática)	TaqMan	NS	99/114	69	27	3	165	33	19	58	37	96	132	0,578	0,641
rs1800858					GG	AG	AA	G	A	GG	AG	AA	G	A		
Fitze 2003	Alemão (caucasiano)	NS	HB	80/120	10	30	40	50	110	65	47	8	177	63	0,262	0,899
Garcia-Barcelo 2005	China (asiática)	PCR-RFLP	HB	172/194	14	40	118	68	276	58	100	36	216	172	0,443	0,536
Burzynski 2004	Holanda (caucasiano)	NS	HB	105/126	21	27	57	69	141	77	40	9	184	58	0,230	0,242
Zhang 2005	China (asiática)	PCR	HB	16/40	2	1	13	5	27	15	12	13	42	38	0,475	0,011
Du 2006	China (asiática)	PCR	HB	94/122	4	33	57	41	147	13	88	21	144	130	0,532	=0,001
Liu 2008	China (asiática)	LDR	PB	116/144	11	42	63	64	168	42	73	29	157	131	0,454	0,789
Saryono 2010	Indonésia (asiática)	PCR-RFLP	PB	54/46	5	23	26	33	75	10	30	6	5	23	0,456	0,033
Liu 2010	China (asiática)	PCR	HB	125/148	12	45	68	69	181	43	75	30	161	135	0,456	0,794
Tou 2011	China (asiática)	PCR	HB	123/168	10	32	81	52	194	52	85	31	10	32	0,437	0,716
Phusantisampan 2012	Tailândia (asiática)	PCR-RFLP	HB	68/120	36	23	9	95	41	40	51	29	36	23	0,454	0,117

* Autores declararam que a ascendência dos participantes era europeia (caucasiana); PCR=restricção da reação em cadeia da polimerase; PCR-RFLP=polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição da reação em cadeia da polimerase; LDR=reacção de detecção da ligase; HB=hospitalar; PB=população baseada; NS=não declarado; MAFs=frequências alélicas menores; HWE=equilíbrio hardy-weinberg.

TABELA 2 - Resultados da associação do polimorfismo RET com risco de OA

Subgrupo	Modelo genético	Tipo de modelo	Heterogeneidade		Odds Ratio			Viés publicação		
			I2 (%)	PH	OR	95% CI	Ztest	POR	PBegg	PEgger
rs2435357										
Overall	C vs. T	Aleatória	74,18	=0,001	0,230	0,178-0,298	-11,129	=0,001	0,858	0,209
	CC vs. TT	Aleatória	60,85	0,006	0,079	0,048-0,130	-10,008	=0,001	0,371	0,178
	CT vs. TT	Aleatória	58,02	0,011	0,149	0,108-0,205	-11,670	=0,001	1,000	0,156
	CC+CT vs. TT	Aleatória	59,29	0,009	0,132	0,098-0,179	-13,220	=0,001	0,371	0,068
	CC vs. CT+TT	Aleatória	52,17	0,027	0,239	0,161-0,353	-7,184	=0,001	0,107	0,219
rs1800858										
Overall	A vs. G	Aleatória	89,58	=0,001	5,594	3,653-8,877	7,679	=0,001	0,210	0,469
	AA vs. GG	Aleatória	86,57	=0,001	8,453	3,783-18,890	5,203	=0,001	0,591	0,934
	AG vs. GG	Aleatória	88,56	=0,001	1,238	0,575-2,666	0,547	0,585	1,000	0,883
	AA+AG vs. GG	Aleatória	83,71	=0,001	3,469	1,881-6,396	3,984	=0,001	0,591	0,800
	AA vs. AG+GG	Aleatória	83,23	=0,001	6,120	3,608-10,381	6,720	=0,001	1,000	0,798

rs1800858

A Tabela 2 listou os principais resultados da metanálise do polimorfismo rs1800858 no proto-oncogene RET e risco de HSCR. A análise global combinada sugere associação significativa do polimorfismo rs1800858 e do risco de HSCR em quatro modelos genéticos, i. e. alelo (A vs. G: OR=5,594, IC 95% 3,653-8,877, p=0,001); homocigoto (AA vs. GG: OR=8,453, IC 95% 3,783-18,890, p=0,001); dominante (AA + AG vs. GG: OR=3,469, IC 95% 1,881-6,396, p=0,001); e recessivo (AA vs. AG + GG: OR=6,120, IC 95% 3,608-10,381, p=0,001), mas não sob modelo heterocigoto (GA vs. GG: OR=1,238, IC 95% 0,575-2,666, p=0,585, Figura 2B).

nenhuma evidência de assimetria óbvia em todos os cinco modelos genéticos. Além disso, a regressão linear de Egger também não mostrou evidência estatística significativa de viés de publicação para rs2435357 em todos os cinco modelos genéticos, ou seja, alelo (C vs. T: PBegg=0,858 e PEgger=0,209), homocigoto (CC vs. TT: PBegg=0,371 e PEgger=0,178, Figura 3A), heterocigoto (CT vs. TT: PBegg=1,000 e PEgger=0,156), dominante (CC + CT vs. TT: PBegg=0,371 e PEgger=0,068) e recessivo (CC vs CT + TT: PBegg=0,107 e PEgger=0,219). Além disso, o teste de Egger não revelou polimorfismo rs1800858 de viés de publicação em todos os cinco modelos genéticos, ou seja, alelo (A vs. G: PBegg=0,210 e PEgger=0,469), homocigoto (AA vs. GG: PBegg=0,591 e PEgger=0,934), heterocigoto (AG vs. GG: PBegg=1,000 e PEgger=0,883), dominante (AA + AG vs. GG: PBegg=0,591 e PEgger=0,800) e recessivo (AA vs. AG + GG: PBegg=1,000 e PEgger=0,798, Figura 3B).

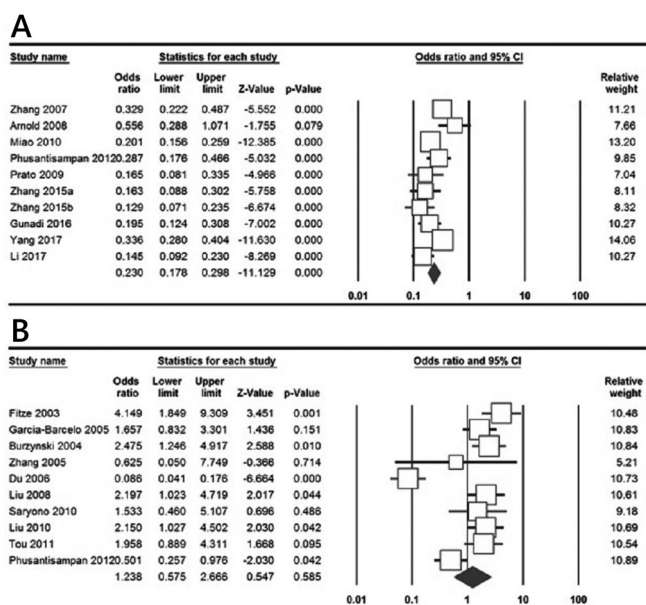


FIGURA 2 - Plots de floresta dos polimorfismos rs2435357 e rs1800858 no gene RET e risco de HSCR: A) rs2435357 (modelo alelo: C vs. T); B) rs1800858 (modelo heterocigoto: AG vs. GG)

Análise sensitiva

A análise de sensibilidade foi realizada omitindo cada estudo em cada modelo genético ou removendo certos estudos, tais como os estudos que não estavam em conformidade com o HWE. Após a omissão do estudo individual, a OR combinada correspondente não foi alterada de forma significativa. Isso indica que nossos resultados são estatisticamente robustos em todos os cinco modelos genéticos que examinam associações de polimorfismos rs2435357 e rs1800858 com risco de HSCR.

Viés de publicação

O gráfico de funil de Begg e o teste de Egger foram realizados para avaliar o possível viés de publicação dos estudos incluídos. As formas da trama do funil de Begg não revelaram

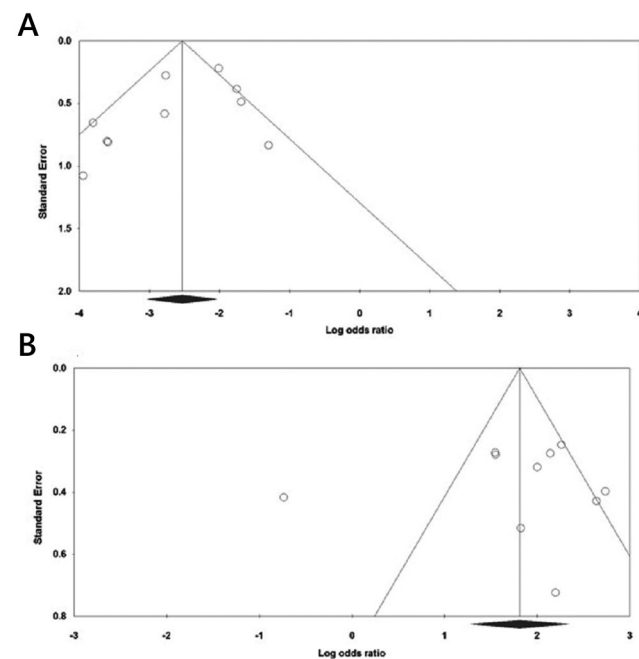


FIGURA 3 - Gráfico de funil para a detecção do viés de publicação para a associação dos polimorfismos rs2435357 e rs1800858 no gene RET com risco de HSCR, foi utilizado um modelo de efeitos aleatórios: A) rs2435357 (modelo homocigoto: CC vs. TT); B) rs1800858 (modelo recessivo: AA vs. AG + GG).

DISCUSSÃO

O gene para o proto-oncogene RET, membros da família do fator neurotrófico derivado da linhagem glial (GDNF),

mapeia para o cromossomo 10q¹¹⁻²¹, contém 21 exons e cobre 60 kbp DNA³⁶. O proto-oncogene RET codifica uma proteína tirosina quinase do receptor trans-membrana com um domínio extracelular rico em cisteína e um domínio intracelular enriquecido em tirosina, que é importante na transferência de sinais de crescimento e diferenciação celular³³. As mutações de perda de função germinativa proto-oncogênica RET estão associadas ao desenvolvimento de HSCR, enquanto mutações de ganho de função são responsáveis pelo desenvolvimento de vários tipos de câncer humano, incluindo carcinoma medular de tireoide, neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (MEN 2) e 2B, feocromocitoma e hiperplasia das paratireóides⁴. Até o momento, várias correlações genótipo-fenótipo foram definidas em associação de mutações no RET com diferentes variantes da síndrome de MEN2, incluindo MEN 2A, MEN 2B e carcinoma medular de tireoide (FMTC)³⁸.

Diversos estudos foram publicados explorando a associação dos polimorfismos rs2435357 e rs1800858 no proto-oncogene RET com risco de HSCR. No entanto, os resultados desses estudos foram inconsistentes e inconclusivos, devido às diferenças étnicas e ao pequeno tamanho da amostra. Portanto, a metanálise como uma ferramenta poderosa para resumir os resultados dos diferentes estudos é necessária para alcançar uma conclusão mais abrangente e confiável em ambos os polimorfismos, a fim de fornecer mais informações sobre este assunto debatido. Esta metanálise e revisão sistemática, incluindo dez estudos com 1.136 casos 2.420 controles para rs2435357 e dez com 917 casos 1.159 controles para rs1800858 foram identificados e analisados nesta metanálise. Descobrimos que os polimorfismos rs2435357 e rs1800858 no gene RET estão associados ao risco de HSCR. Esses achados são consistentes com a metanálise de Liang et al.²⁰. Eles realizaram uma metanálise sobre a associação do polimorfismo rs2435357 com cinco estudos (566 casos e 719 controles) e polimorfismo rs1800858 com nove estudos (863 casos e 1.118 controles) com risco de HSCR. Descobriram que os polimorfismos rs2435357 e rs1800858 do RET estão associados à suscetibilidade à HSCR. No entanto, sua metanálise mostra que o tamanho da amostra é pequeno e não é suficiente para detectar as possíveis associações.

A heterogeneidade entre estudos é comum em metanálises e a identificação de fontes potenciais de heterogeneidade é um componente essencial da metanálise^{26,35}. As fontes mais potenciais de heterogeneidade em metanálise de associação genética são o desenho do estudo, etnia, métodos de genotipagem, fonte de controles e assim por diante^{2,11,29}. O viés de seleção, embora não tenha sido observado viés de publicação, é uma possível fonte importante de heterogeneidade. Portanto, realizamos análise de subgrupo e análise de sensibilidade removendo estudos que violam HWE para descobrir a fonte de heterogeneidade nesta metanálise. No entanto, a heterogeneidade antes e após a análise do subgrupo e o processo de remoção do estudo individual não diminuíram ou desapareceram. Assim, este achado confirmou que os resultados da metanálise foram estatisticamente robustos e que nossos resultados foram confiáveis e estáveis.

Este estudo tem duas vantagens principais: primeiro, esta foi a metanálise mais precisa e abrangente sobre os polimorfismos rs2435357 e rs1800858 do RET com risco de HSCR; segundo, nenhum viés de publicação foi observado nos resultados dela, indicando que nossos resultados podem ser imparciais. No entanto, houve algumas limitações para este estudo que podem ter afetado nossas conclusões. Primeiro, o presente estudo foi limitado pelo número relativamente pequeno de estudos e tamanho da amostra nos polimorfismos rs2435357 e rs1800858, o que levou a trabalhos menores na análise de subgrupos e enfraquecer o poder estatístico; assim, precisa-se de mais estudos. Em segundo lugar, apenas estudos em populações asiáticas e caucasianas foram envolvidos nesta metanálise. Esse viés pode existir porque não conseguimos determinar o papel dos polimorfismos rs2435357 e rs1800858

em populações inteiras. Assim, estudos em outras etnias, como africanos e latinos, devem ser realizados para determinar os efeitos potenciais da variação étnica na suscetibilidade à HSCR. Terceiro, incluímos apenas os dados de estudos publicados, o viés de publicação pode existir, embora nossos resultados de testes de viés de publicação não tenham significado. Quarto, porque as informações relevantes eram insuficientes nos dados originais, não realizamos análises de estratificação por outras co-variáveis como idade, gênero e assim por diante. Isso pode ter causado um viés de confusão. Por fim, sabe-se que o HSCR tem causa multifatorial do envolvimento em gene-gene e interações do ambiente gênico. No entanto, essas interações não puderam ser investigadas na presente metanálise devido a nenhum dado apropriado.

CONCLUSÃO

Esta metanálise sugeriu que os polimorfismos rs2435357 e rs1800858 no proto-oncogene RET podem estar associados à suscetibilidade à HSCR. No entanto, devido ao tamanho relativamente pequeno dos trabalhos incluídos, futuros estudos de larga escala sobre diferentes etnias são necessários para confirmar esses achados.

ORCID

Abdolhamid Amooee: 0000-0002-0864-341X

REFERÊNCIAS

- Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S, et al. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *Journal of Medical Genetics*. 2007;45(1):1-14.
- Aslebahar F, Neamatzadeh H, Meibodi B, Karimi-Zarchi M, Tabatabaei RS, Noori-Shadkam M, et al. Association of Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) -308G>A and -238G>A Polymorphisms with Recurrent Pregnancy Loss Risk: A Meta-Analysis. *International Journal of Fertility & Sterility*. 2019;4(4).
- Arnold S, Pelet A, Amiel J, Borrego S, Hofstra R, Tam P, et al. Interaction between a chromosome 10 RET enhancer and chromosome 21 in the Down syndrome-Hirschsprung disease association. *Human mutation*. 2009;30(5):771-5.
- Borrego S, Wright FA, Fernández RM, Williams N, López-Alonso M, Davuluri R, et al. A Founding Locus within the RET Proto-Oncogene May Account for a Large Proportion of Apparently Sporadic Hirschsprung Disease and a Subset of Cases of Sporadic Medullary Thyroid Carcinoma. *The American Journal of Human Genetics*. 2003;72(1):88-100.
- Burzynski GM, Nolte IM, Osinga J, Ceccherini I, Twigt B, Maas S, et al. Localizing a putative mutation as the major contributor to the development of sporadic Hirschsprung disease to the RET genomic sequence between the promoter region and exon 2. *European Journal of Human Genetics*. 2004;12(8):604-12.
- Butler Tjaden NE, Trainor PA. The developmental etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*. 2013;162(1):1-15.
- Chumpitazi B, Nurko S. Pediatric gastrointestinal motility disorders: challenges and a clinical update. *Gastroenterology & hepatology*. 2008;4(2):140-8.
- de Pontual L, Pelet A, Trochet D, Jaubert F, Espinosa-Parrilla Y, Munnich A, et al. Mutations of the RET gene in isolated and syndromic Hirschsprung's disease in human disclose major and modifier alleles at a single locus. *Journal of medical genetics*. 2006;43(5):419-23.
- Du H, Wang G, Zhang Y, Tao K, Tang S, Niu Y. [Association between RET proto-oncogene polymorphisms and Hirschsprung disease in Chinese Han population of Hubei district]. *Zhonghua weichang waike zazhi = Chinese journal of gastrointestinal surgery*. 2006;9(2):152-6.
- Fitze G, Appelt H, König IR, Görgens H, Stein U, Walthert W, et al. Functional haplotypes of the RET proto-oncogene promoter are associated with Hirschsprung disease (HSCR). *Human Molecular Genetics*. 2003;12(24):3207-14.
- Forat-Yazdi M, Jafari M, Kargar S, Abolbaghaei SM, Nasiri R, Farahnak S, et al. Association between SULT1A1 Arg213His (Rs9282861) polymorphism and risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Research in Health Sciences*. 2017;17(4).

12. Garcia-Barcelo M, Ganster RW, Lui VCH, Leon TYY, So M-T, Lau AMF, et al. TTF-1 and RET promoter SNPs: regulation of RET transcription in Hirschsprung's disease. *Human Molecular Genetics*. 2005;14(2):191-204.
13. Goldstein AM, Hofstra RMW, Burns AJ. Building a brain in the gut: development of the enteric nervous system. *Clinical genetics*. 2013;83(4):307-16.
14. Gunadi, Dwihantoro A, Iskandar K, Makhmudi A, Rochadi. Accuracy of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for RET rs2435357 genotyping as Hirschsprung risk. *Journal of Surgical Research*. 2016;203(1):91-4.
15. Heuckeroth RO. Hirschsprung disease-integrating basic science and clinical medicine to improve outcomes. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2018;15(3):152-67.
16. Hofstra RMW, Elfferich P, Osinga J, Verlind E, Franssen E, López-Pisón J, et al. Hirschsprung disease and L1CAM: is the disturbed sex ratio caused by L1CAM mutations? *Journal of medical genetics*. 2002;39(3):E11.
17. Kamali M, Hantoushzadeh S, Borna S, Neamatzadeh H, Mazaheri M, Noori-Shadkam M, et al. Association between Thrombophilic Genes Polymorphisms and Recurrent Pregnancy Loss Susceptibility in the Iranian Population: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Iranian biomedical journal*. 2018;22(2):78-89.
18. Krampitz GW, Norton JA. RET gene mutations (genotype and phenotype) of multiple endocrine neoplasia type 2 and familial medullary thyroid carcinoma. *Cancer*. 2014;120(13):1920-31.
19. Li Q, Zhang Z, Diao M, Gan L, Cheng W, Xiao P, et al. Cumulative Risk Impact of RET, SEMA3, and NRG1 Polymorphisms Associated With Hirschsprung Disease in Han Chinese. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2017;64(3):385-90.
20. Liang C, Ji D, Yuan X, Ren L, Shen J, Zhang H. RET and PHOX2B Genetic Polymorphisms and Hirschsprung's Disease Susceptibility: A Meta-Analysis. *Leung FCC, editor. PLoS ONE*. 2014;9(3):e90091.
21. Lin Y-C. Nationwide Population-Based Epidemiologic Study of Hirschsprung's Disease in Taiwan. *Pediatrics & Neonatology*. 2016;57(3):165-6.
22. Lo f Granstro m A, Svenningsson A, Hagel E, Oddsberg J, Nordenskjöld A, Wester T. Maternal Risk Factors and Perinatal Characteristics for Hirschsprung Disease. *PEDIATRICS*. 2016;138(1):e20154608-e20154608.
23. Liu C, Jin L, Li H, Lou J, Luo C, Zhou X, et al. RET polymorphisms and the risk of Hirschsprung's disease in a Chinese population. *Journal of Human Genetics*. 2008;53(9):825-33.
24. Liu C-P, Tang Q-Q, Lou J-T, Luo C-F, Zhou X-W, Li D-M, et al. Association Analysis of the RET Proto-Oncogene with Hirschsprung Disease in the Han Chinese Population of Southeastern China. *Biochemical Genetics*. 2010;48(5-6):496-503.
25. Machens A, Dralle H. Multiple endocrine neoplasia type 2: achievements and current challenges. *Clinics*. 2012;67(S1):113-8.
26. Mashhadiabbas F, Neamatzadeh H, Nasiri R, Foroughi E, Farahnak S, Piroozmand P, et al. Association of vitamin D receptor Bsm1, Taq1, Fok1, and Apal polymorphisms with susceptibility of chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis based on 38 case-control studies. *Dental Research Journal*. 2018;15(3):155.
27. Miao X, Leon TY-Y, Ngan ES-W, So M-T, Yuan Z-W, Lui VC-H, et al. Reduced RET expression in gut tissue of individuals carrying risk alleles of Hirschsprung's disease. *Human Molecular Genetics*. 2010;19(8):1461-7.
28. Moore SW. The contribution of associated congenital anomalies in understanding Hirschsprung's disease. *Pediatric Surgery International*. 2006;22(4):305-15.
29. Namazi A, Forat-Yazdi M, Jafari MA, Foroughi E, Farahnak S, Nasiri R, et al. Association between polymorphisms of ERCC5 gene and susceptibility to gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2017;18(10).
30. Phusantisampan T, Sangkhathat S, Phongdara A, Chiengkriwate P, Patrapinyokul S, Mahasirimongkol S. Association of genetic polymorphisms in the RET protooncogene and NRG1 with Hirschsprung disease in Thai patients. *Journal of human genetics*. 2012;57(5):286-93.
31. Pini Prato A, Rossi V, Mosconi M, Holm C, Lantieri F, Griseri P, et al. A prospective observational study of associated anomalies in Hirschsprung's disease. *Orphanet journal of rare diseases*. 2013;8:184.
32. Prato AP, Musso M, Ceccherini I, Mattioli G, Giunta C, Ghiggeri GM, et al. Hirschsprung Disease and Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract (CAKUT). *Medicine*. 2009;88(2):83-90.
33. Santos MACG dos, Quedas EP de S, Toledo R de A, Lourenço DM, Toledo SP de A. Screening of RET gene mutations in multiple endocrine neoplasia type-2 using conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE). *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2007;51(9):1468-76.
34. Saryono S, Rochadi R, Lestariana W, Artama WT, Sadewa AH. RET single nucleotide polymorphism in Indonesians with sporadic Hirschsprung's disease. *Universa Medicina*. 2016;29(2):71-7.
35. Sobhan MR, Mahdinezhad-Yazdi M, Aghili K, Zare-Shehneh M, Rastegar S, Sadeghizadeh-Yazdi J, et al. Association of TNF- α -308G>A and -238G>A polymorphisms with knee osteoarthritis risk: A case-control study and meta-analysis. *Journal of Orthopaedics*. 2018;15(3):747-53.
36. Tan L, Hu Y, Tao Y, Wang B, Xiao J, Tang Z, et al. Expression and copy number gains of the RET gene in 631 early and mid stage non-small cell lung cancer cases. *Thoracic cancer*. 2018;9(4):445-51.
37. Tou J, Wang L, Liu L, Wang Y, Zhong R, Duan S, et al. Genetic variants in RET and risk of Hirschsprung's disease in Southeastern Chinese: a haplotype-based analysis. *BMC Medical Genetics*. 2011;12(1):32.
38. Wang J, Zhang B, Liu W, Zhang Y, Di X, Yang Y, et al. Screening of RET gene mutations in Chinese patients with medullary thyroid carcinoma and their relatives. *Familial Cancer*. 2016;15(1):99-104.
39. Xiansheng Z, Ying Z, Ya G, Quan X, Yitao D, Xinkui G, et al. The relationship between Hirschsprung disease and single nucleotide polymorphisms of c135 in RET proto-oncogene. *JOURNAL OF XI'AN JIAOTONG UNIVERSITY (MEDICAL SCIENCES)*. 2005 ;26(5):470-472,492.
40. Yang D, Yang J, Li S, Jiang M, Cao G, Yang L, et al. Effects of RET, NRG1 and NRG3 Polymorphisms in a Chinese Population with Hirschsprung Disease. *Scientific Reports*. 2017;7:43222.
41. Zhang X-N, Zhou M-N, Qiu Y-Q, Ding S-P, Qi M, Li J-C. Genetic Analysis of RET, EDNRB, and EDN3 Genes and Three SNPs in MCS + 9.7 in Chinese Patients with Isolated Hirschsprung Disease. *Biochemical Genetics*. 2007;45(7-8):523-7.
42. Zhang Z, Jiang Q, Li Q, Cheng W, Qiao G, Xiao P, et al. Genotyping analysis of 3 RET polymorphisms demonstrates low somatic mutation rate in Chinese Hirschsprung disease patients. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015 ;8(5):5528-34.
43. Zwink N, Jenetzky E. Maternal drug use and the risk of anorectal malformations: systematic review and meta-analysis. *Orphanet journal of rare diseases*. 2018;13(1):75.