

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UMA FAMÍLIA COM NEM2A E SUAS IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

M.C. LEMOS, F. CARRILHO, F.J. RODRIGUES, M. CARVALHEIRO, F.J. REGATEIRO, M.M.A. RUAS
Serviço Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo. Hospitais da Universidade de Coimbra. Serviço de Genética Médica.
Faculdade de Medicina de Coimbra. Coimbra

RESUMO/SUMMARY

Introdução: A NEM2A constitui uma síndrome hereditária autossômica dominante caracterizada pela presença de carcinoma medular da tireóide, feocromocitoma e hiperparatiroidismo primário. O defeito molecular subjacente a esta entidade reside em mutações germinais do proto-oncogene RET que podem ser identificadas nos doentes. O rastreio genético dos familiares em risco possibilita o diagnóstico precoce e uma intervenção preventiva, antes do aparecimento das primeiras manifestações clínicas.

Apresentamos uma família com vários membros afetados com NEM2A, a sua caracterização molecular e as implicações clínicas decorrentes do estudo genético.

População e métodos: Foram identificados 18 membros de uma família, distribuídos por três gerações e dos quais quatro membros foram diagnosticados clinicamente como afetados por NEM2A e líquen cutâneo amiloidótico. Procedeu-se à pesquisa da mutação do gene RET nos indivíduos afetados e respectivos descendentes, através de técnicas de PCR-RFLP.

Resultados: O estudo genético revelou uma mutação pontual no codão 634 (TGC>TGG) em heterozigotia em todos os indivíduos afetados. A mesma mutação foi encontrada numa criança assintomática, com cinco anos de idade, que após tireoidectomia total revelou já possuir um carcinoma medular da tireóide multifocal.

Discussão: O rastreio genético é o método de eleição para o diagnóstico pré-sintomático da

Molecular characterisation of a kindred with MEN2A and clinical implications.

Introduction: MEN2A is an autosomal dominant cancer syndrome characterised by the presence of medullary thyroid cancer, pheochromocytoma and primary hyperparathyroidism. Germline mutations of the RET protooncogene constitute the molecular defect and can be identified in affected individuals. Genetic screening of family members at risk allows early diagnosis and preventive measures before the appearance of the disease. We present a family with several members affected with MEN2A, their molecular characterisation and the clinical implications of genetic testing.

Population and methods: We studied 18 members distributed among three generations of a family of which four members were clinically affected with MEN2A and cutaneous lichen amyloidosis. RET gene mutations were screened for in affected individuals and their offspring by PCR-RFLP techniques.

Results: Genetic testing revealed a point mutation at codon 634 (TGC>TGG), in the heterozygous state, in all affected individuals. The same mutation was also found in a five years old asymptomatic child which after total thyroidectomy showed to have multifocal medullary thyroid carcinoma.

Discussion: Genetic screening is the most suitable method for pre-symptomatic diagnosis of MEN2A allowing an efficient and early identification of individuals who will later develop the disease. These can be monitored more closely and be

NEM2A permitindo identificar de forma segura, eficaz e numa fase muito precoce, os familiares que irão manifestar a doença. Estes poderão ser alvo de uma maior vigilância e ser submetidos a uma tiroidectomia profiláctica antes do aparecimento das primeiras manifestações biológicas do carcinoma medular da tiróide. O momento ideal para esta intervenção é, ainda, objecto de discussão embora os resultados deste estudo sugiram que este deverá ser antes dos cinco anos de idade.

Palavras chave: NEM2A, neoplasia endócrina múltipla tipo 2A, proto-oncogene RET, rastreio genético.

INTRODUÇÃO

As neoplasias endócrinas múltiplas do tipo 2 (NEM2) são síndromas hereditárias transmitidas de forma autossómica dominante e subdividem-se em três formas clínicas. A NEM2A caracteriza-se pela presença de carcinoma medular da tiróide (CMT), feocromocitoma e hiperparatiroidismo primário. A NEM2B caracterizam-se pela presença de CMT, feocromocitoma, dismorfia do tipo Marfan e neuroangliomas do tubo digestivo. O carcinoma medular da tiróide familiar (CMTF) define-se pela existência de quatro ou mais familiares afectados com CMT e a ausência do envolvimento de outras glândulas endócrinas. Esta entidade é geralmente incluída nas NEM2 por ter a mesma origem molecular, apesar do envolvimento de uma só glândula¹.

A NEM2A tem uma penetrância superior a 90% e uma expressividade variável, isto é, o número de órgãos afectados e a idade do início das manifestações clínicas têm uma variabilidade intra- e interfamiliar. O CMT ocorre em 95-100% dos casos, sendo quase sempre a primeira forma de apresentação clínica e a principal causa de mortalidade; o feocromocitoma ocorre em cerca de 50% e o hiperparatiroidismo em 5-30% dos casos^{2,3}. Existem, ainda, variantes raras de NEM2A associadas à doença de Hirschprung ou associadas a manifestações cutâneas, traduzidas por líquen cutâneo amiloidótico (LCA), localizadas na região interescapular (variante NEM2A-LCA)¹.

As NEM2 foram o primeiro exemplo de neoplasias hereditárias com origem em mutações dominantes de um proto-oncogene. A origem destas síndromas reside em mutações germinais do proto-oncogene *RET* (locus

submitted to a prophylactic thyroidectomy before the appearance of medullary thyroid carcinoma. The ideal moment for this intervention is still under discussion although the results of this study suggest that it should be undertaken before the age of five.

Key words: MEN2A, multiple endocrine neoplasia type 2A, RET protooncogene, genetic screening.

10q11.2) que codifica um receptor transmembranar com actividade de cinase da tirosina^{4,5}. O seu ligando é uma proteína envolvida na migração e diferenciação de células derivadas da neuroectoderme (GDNF, *Glial Derived Nerve Growth Factor*)^{6,7}. A ligação deste factor ao receptor RET, com a participação do co-receptor GDNFa, provoca a dimerização do RET e conseqüente activação do seu domínio catalítico^{8,9}. As mutações observadas nas NEM2 induzem a auto-activação, do domínio catalítico, na ausência do ligando, levando ao aumento da fosforilação dos seus substratos intracelulares¹⁰.

No caso da NEM2A, as mutações descritas localizam-se, em 98% dos casos, nos exões 10 (codões 609, 611, 618 e 620) e 11 (codão 634) do proto-oncogene *RET*, correspondendo ao domínio extracelular do receptor¹. Estas mutações pontuais levam à substituição de um aminoácido cisteína, na sequência polipeptídica, por outro diferente, condicionando uma alteração conformacional e dimerização espontânea do receptor.

O conhecimento do defeito molecular subjacente a estas patologias permitiu, não só uma melhor compreensão das suas etiopatogenias, mas também, uma nova abordagem das famílias afectadas³.

A identificação de um caso de NEM2A numa família implica a necessidade de rastrear os restantes membros, para um diagnóstico precoce e uma terapêutica atempada, reduzindo a morbidade e a mortalidade. Os métodos clássicos de rastreio assentavam nos doseamentos periódicos da calcitonina plasmática basal e após estimulação com pentagastrina, das metanefrinas urinárias, da calcémia e da hormona paratiroideia. Estes métodos têm o inconveniente de ser necessário realizá-los anualmente

em todos os familiares em risco e, caso o resultado seja negativo, prosseguir até pelo menos aos 35 anos de idade, devido à possibilidade de uma expressão tardia da doença. Por outro lado, estão descritos casos de falsos positivos, de falsos negativos e por vezes o rastreio bioquímico só se torna positivo numa fase mais tardia da evolução da neoplasia, impedindo uma terapêutica eficaz¹¹.

Com o desenvolvimento da genética molecular, o rastreio bioquímico deu lugar ao rastreio genético, como método de eleição no estudo dos familiares em risco. O conhecimento da mutação presente num indivíduo doente permite realizar a pesquisa da mesma mutação, nos restantes membros da família e identificar, numa fase muito precoce, aqueles que irão manifestar a doença. Estes poderão ser alvo de uma maior vigilância laboratorial e ser submetidos a tiroidectomia profiláctica. Igualmente importante, o estudo genético permite excluir do seguimento, os familiares que não apresentem essa mutação, evitando o gasto de recursos e a carga psicológica associada.

O estudo bioquímico deixou de ter interesse na identificação de familiares que herdaram este carácter, salvo nos raros casos de mutações ainda não identificadas. O seu papel principal é o seguimento do carcinoma medular da tiróide, após tiroidectomia, e o rastreio do feocromocitoma e do hiperparatiroidismo em indivíduos com testes genéticos positivos.

No presente trabalho, apresentamos uma família com vários membros clinicamente afectados com NEM2A e líquen cutâneo amiloidótico (NEM2A-LCA), a sua caracterização molecular e as implicações clínicas decorrentes do estudo genético.

MATERIAL E MÉTODOS

Identificou-se uma família com quatro membros diagnosticados como clinicamente afectados com NEM2A-CLA e elaborou-se o respectivo heredograma (figura 1). De

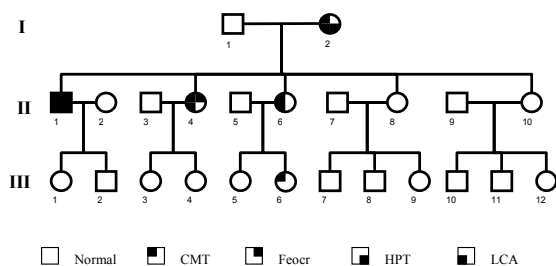


Fig. 1 - Heredograma representativo da família estudada e respectivos fenótipos. CMT- carcinoma medular da tiróide; Feocr- feocromocitoma; HPT- hiperparatiroidismo primário; LCA- líquen cutâneo amiloidótico. I₂, II₄, II₆ e III₅ diagnosticados aos 60, 46, 28, 27 e 5 anos de idade, respectivamente.

acordo com a informação colhida, identificaram-se os familiares em risco de herdarem a doença. Os familiares que solicitaram a realização do rastreio genético de NEM2A foram esclarecidos acerca das implicações do mesmo.

Após consentimento informado, do próprio ou dos pais quando menor, colheram-se 10 ml de sangue venoso em tubos com EDTA e procedeu-se ao isolamento do DNA genómico por métodos previamente descritos¹². A quantificação do DNA e a determinação do seu grau de pureza foi realizada por espectrofotometria. Procedeu-se à amplificação, por PCR, dum fragmento com 234pb correspondente ao exão 11 do gene *RET*, utilizando *primers* e condições previamente descritas⁴, num volume final de 50 µl contendo 100-200 ng de DNA. Os produtos da PCR foram submetidos a uma electroforese em gel de agarose a 1% para a confirmação da presença do fragmento amplificado. Procedeu-se à digestão de 20 µl do produto da PCR com 5U da enzima de restrição *HhaI*, num tampão de reacção contendo 10 mM de MgCl₂, 50 mM de NaCl e 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0). A reacção de digestão decorreu a 37°C durante 10-16 horas. Os fragmentos resultantes da digestão foram submetidos a uma electroforese em gel de poliácridamida a 8%, corados com brometo de etídio e visualizados num transiluminador de luz ultravioleta. A presença de fragmentos de 234pb foi interpretada como correspondendo à presença do alelo normal e a presença de fragmentos digeridos, de 170pb e de 64pb foi interpretada como correspondendo à presença do alelo mutado (figura 2).

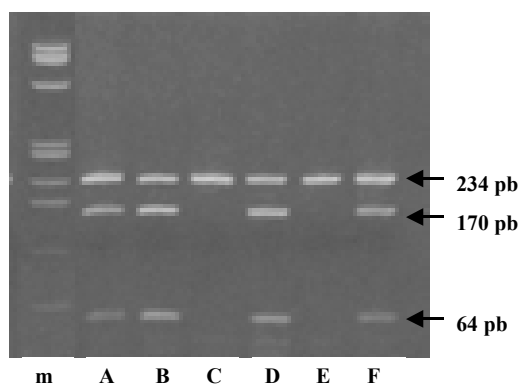


Fig. 2 - Padrão electroforético dos fragmentos do gene *RET*, mutados e normais. A sequência mutada cria um novo local de restrição para a enzima *HhaI* originando a clivagem do fragmento inicial de 234pb em dois fragmentos de 170 e 64pb. A, B, D e F representam indivíduos heterozigotos. C e E representam indivíduos homozigotos normais. Marcador de peso molecular (m), φX174/HaeIII.

Nos indivíduos identificados como portadores da mutação, foi realizado o rastreio bioquímico do CMT, através da prova de estimulação da calcitonina com pentagastrina.

Esta consistiu na administração endovenosa de 0,5mg/kg de pentagastrina com doseamento da calcitonina plasmática basal e aos 2, 5 e 10 minutos. Foram, também, realizados o rastreio de feocromocitoma através do doseamento das metanefrinas na urina de 24 horas, e do hiperparatiroidismo primário, através dos doseamentos da calcémia e da hormona paratiroideia sérica.

RESULTADOS

A análise genética revelou a presença de uma mutação pontual no codão 634 (TGC>TGG), em heterozigotia em todos os indivíduos clinicamente afectados (I₂, II₁, II₄ e II₆). A análise dos indivíduos II₈ e II₁₀ revelou homozigotia para o alelo normal pelo que foi considerado desnecessário o rastreio dos seus descendentes. O estudo dos seis membros da terceira geração, descendentes directos de indivíduos clinicamente afectados, revelou a presença da mutação descrita em apenas um indivíduo do sexo feminino (III₆) com quatro anos de idade. Este apresentava valores de calcitonina basal de 28 pg/ml e após estimulação com pentagastrina, de 105 pg/ml, 72 pg/ml e 38 pg/ml, aos 2, 5 e 10 minutos, respectivamente. Foi submetido a tiroidectomia total tendo o exame anatomopatológico revelado focos de hiperplasia das células C e três focos de carcinoma medular da tiróide com as dimensões de 3,8 mm, 1,4 mm e 2,5 mm.

DISCUSSÃO

O estudo molecular dos indivíduos afectados revelou a presença de uma mutação pontual do codão 634, no exão 11 do gene *RET*. A substituição de uma citosina por uma guanina, na terceira posição deste codão (TGC>TGG), leva à substituição dum aminoácido cisteína por um triptofano, na sequência polipeptídica final, rompendo uma ligação dissulfídrica na região extracelular do receptor RET. A alteração da estrutura conformacional da proteína condiciona, por mecanismos ainda não completamente conhecidos, a activação constitucional do receptor, com consequente estimulação de vias de sinalização intracelulares^{10,13}. O codão 634 é o que se apresenta mutado mais frequentemente em famílias com NEM2A (85% dos casos) e a mutação cys634trp foi já descrita em outras famílias com NEM2A¹.

De acordo com o consórcio internacional para o estudo do RET, a variante NEM2A-LCA está descrita em apenas 18 famílias e a análise molecular revelou que em todas estas, as mutações limitam-se exclusivamente ao codão 634¹. No entanto, a quase totalidade dos casos de NEM2A, por mutações deste codão, não apresenta esta peculiaridade fenotípica pelo que se admite a existência de outros factores genéticos desconhecidos, envolvidos na etiologia da

variante NEM2A-LCA. A este propósito, é interessante a constatação da existência de alguns casos de LCA isolado, transmitidos de forma autossómica dominante e sem ligação ao locus do gene *RET*^{14,15}. As lesões cutâneas, na NEM2A-LCA, limitam-se à região interescapular e caracterizam-se por prurido com liquenificação e depósitos de amiloide em resposta à fricção^{16,17}. O mecanismo de aparecimento destas alterações poderá estar em relação com alterações das terminações nervosas locais, uma vez que o gene *RET* é expresso no sistema nervoso periférico durante a embriogénese¹⁸.

Relativamente à família estudada, foi possível confirmar a presença da mutação cys634trp em todos os indivíduos clinicamente afectados. Não foi possível confirmar a existência desta patologia nos ascendentes e colaterais do indivíduo I₂ pelo que se desconhece se se trata de um caso de neomutação.

Após a identificação da mutação, nos doentes, foi possível testar os restantes familiares em risco, com o objectivo de realizar o diagnóstico pré-sintomático e eventual terapêutica profiláctica. Os indivíduos II₈ e II₁₀, sem doença aparente, necessitaram de ser testados uma vez que, sendo uma doença de manifestação tardia, não se pode excluir a possibilidade de desenvolverem futuramente a doença, mesmo que presentemente sejam adultos saudáveis. Este risco, num indivíduo saudável, é tanto menor quanto mais avançada for a sua idade, dado que a penetrância da NEM2A, em portadores duma mutação, aumenta ao longo dos grupos etários^{19,20}. Sendo, também, uma doença com penetrância incompleta, não se pode excluir a possibilidade de um indivíduo não a exprimir, apesar de ter herdado o alelo mutado e apesar de a poder transmitir à geração seguinte. No entanto, a análise do DNA dos indivíduos II₈ e II₁₀ não revelou a mutação, pelo que foi possível excluí-los do programa de vigilância. Face a estes resultados, tornou-se desnecessária a realização da análise genética dos seus descendentes que foram, também, excluídos do seguimento. Relativamente aos descendentes dos indivíduos afectados, II₁, II₄ e II₆, podemos constatar que, de acordo com as regras mendelianas da hereditariedade, cada um dos seis indivíduos possuía um risco de 50% de herdar o alelo mutado. Contudo, a análise genética revelou a presença da mutação cys634trp em apenas uma jovem assintomática com quatro anos de idade e a ausência desta mutação nos restantes cinco que foram, posteriormente, excluídos do seguimento.

A detecção dum portador numa idade tão precoce levanta a complexa questão do momento mais oportuno para a realização de tiroidectomia profiláctica. Apesar de

existir unanimidade quanto à necessidade de intervir em casos com evidência laboratorial de CMT, no caso de crianças com rastreio bioquímico negativo e rastreio genético positivo, não existe consenso quanto à idade ideal para intervir, embora a tendência actual seja a de fazê-lo cada vez mais precocemente. Por um lado, há a considerar os riscos cirúrgicos associados a uma tiroidectomia realizada nos primeiros anos de vida, bem como, por vezes, uma certa relutância da família em aceitar esta modalidade terapêutica numa criança aparentemente saudável. Por outro lado, há a considerar a incerteza quanto à idade de aparecimento das primeiras lesões neoplásicas e o risco, sempre presente, duma intervenção demasiado tarde para impedir a progressão do CMT. Existem casos descritos de CMT em idades tão precoces como os dois anos^{21,22} e casos de CMT metastizado aos cinco anos de idade²³.

Uma alternativa possível é a monitorização destas crianças através de provas da pentagastrina periódicas, com o objectivo de detectar precocemente os primeiros indícios de hiperplasia das células C e intervindo apenas nesse momento. No entanto, estão descritos casos de falsos negativos para esta prova e, por vezes, os resultados apenas se tornam positivos em fases mais avançadas da doença¹¹. Por estes motivos, a maioria dos autores defende uma intervenção precoce, antes do aparecimento das primeiras alterações bioquímicas e de preferência não ultrapassando a idade dos cinco a seis anos^{2,24-29}.

No caso presente, a criança apresentava, aos quatro anos e dez meses de idade, valores de calcitonina basal de 28 pg/ml e após estimulação com pentagastrina de 105 pg/ml, 72 pg/ml e 38 pg/ml, aos 2, 5 e 10 minutos, respectivamente. Existem algumas dificuldades na interpretação de provas desta natureza, em crianças, relacionadas com o estabelecimento de um limite de normalidade. Existem outras causas de hiperplasia das células C, não relacionadas com a NEM2A, que poderão originar uma prova da pentagastrina positiva^{11,30}. Alguns estudos apresentam o limite máximo, para o pico da calcitonina estimulada, de três vezes o valor basal ou de 300 pg/ml^{22,24}. Outros estabeleceram que, face a um teste genético positivo, o valor preditivo da prova da pentagastrina é maior e o limite máximo aceitável, para calcitoninas estimuladas, deve ser reduzido para 10 pg/ml²¹.

Face a estes dados, foi decidido realizar uma tiroidectomia total nesta criança aos cinco anos e seis meses de idade tendo o exame anatomopatológico revelado focos de hiperplasia de células C e a presença de três focos de carcinoma medular da tiróide com as dimensões de 3,8 mm, 1,4 mm e 2,5 mm. A presença de CMT nesta jovem vem confirmar a necessidade de uma intervenção cirúrgica

precoce, em portadores de mutações do gene *RET* e sugere que a idade ideal para intervir é mais baixa do que habitualmente se considera. Com base em estudos recentes, alguns autores chegam mesmo a recomendar a tiroidectomia profiláctica aos dois anos de idade^{21,22}.

Na família descrita é evidente a discrepância entre a idade do aparecimento das primeiras manifestações clínicas nos adultos afectados e a idade do aparecimento das lesões neoplásicas na criança afectada. Este facto demonstra a pouca utilidade dos critérios de manifestação tardia e de menor agressividade tumoral no progenitor afectado, como factores preditivos dum início mais tardio da doença nos descendentes.

O rastreio bioquímico de feocromocitoma e de hiperparatiroidismo, nesta criança, foi negativo, o que está de acordo com a habitual manifestação mais tardia destas patologias. Impõe-se, no entanto, o rastreio bioquímico anual para a detecção precoce duma eventual neoplasia em qualquer outro dos órgãos alvos.

CONCLUSÃO

O rastreio genético é o método de eleição para o diagnóstico pré-sintomático de situações de NEM2A, nos familiares de indivíduos afectados.

A identificação da mutação germinal, presente num indivíduo doente, permite a pesquisa da mesma mutação em todos os familiares em risco. Contrariamente ao rastreio bioquímico, o rastreio genético permite identificar de forma segura, eficaz e numa fase muito precoce, os familiares que irão manifestar a doença. Estes poderão ser alvo de uma maior vigilância e ser submetidos a uma tiroidectomia profiláctica, antes do aparecimento das primeiras manifestações biológicas do carcinoma medular da tiróide. O momento ideal para esta intervenção é, ainda, objecto de discussão embora os resultados do estudo apresentado sugiram que este deverá ser antes dos cinco anos de idade.

O rastreio genético permite, também, identificar os familiares que não herdaram o gene mutado, evitando os inconvenientes associados a um programa de seguimento com mais de três décadas de duração.

BIBLIOGRAFIA

1. ENG C, CLAYTON D, SCHUFFENECKER I et al: The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. JAMA 1996;276:1575-9
2. ENG C: The RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 and Hirschsprung's disease. N Engl J Med 1996;335:943-51
3. CONTE-DEVOLX B, NICCOLI-SIRE P, MODIGLIANI E et al: Néoplasies endocriniennes multiples de type 2: évolution du diag-

- nostic et du traitement depuis l'identification du proto-oncogène RET. *Rev Franç Endocrinol Clin* 1998;39:407-16
4. DONIS-KELLER H, DOU S, CHI D et al: Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Molec Genet* 1993;2:851-6
 5. MULLIGAN LM, KWOK JBJ, HEALEY CS et al: Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993;363:458-60
 6. TRUPP M, ARENAS E, FAINZILBER M et al: Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. *Nature* 1996;381:785-9
 7. DURBEC P, MARCOS-GUTIERREZ CV, KILKENNY C et al: GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 1996;381:789-93
 8. TREANOR JJ, GOODMAN L, DE SAUVAGE F et al: Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 1996;382:80-3
 9. JING S, WEN D, YU Y et al: GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* 1996;85:1113-24
 10. SANTORO M, CARLOMAGNO F, ROMANO A et al: Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science* 1995;267:381-3
 11. LIPS CJ, LANDSVATER RM, HÖPPENER JW et al: Clinical screening as compared with DNA analysis in families with multiple endocrine neoplasia type 2A. *N Engl J Med* 1994;331:828-35
 12. MILLER SA, DYKES DD, POLESKY HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215
 13. SEGOUFFIN-CARIOU C, BILLAUD M: Transforming ability of MEN2A-RET requires activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway. *J Biol Chem* 2000;275:3568-76
 14. LEE DD, HUANG JY, WONG CK, GAGEL RF, TSAI SF: Genetic heterogeneity of familial primary cutaneous amyloidosis: lack of evidence for linkage with the chromosome 10 pericentromeric region in Chinese families. *J Invest Dermatol* 1996;107:30-3
 15. HOFSTRA RMW, SIJMONS RH, STELWAGEN T et al: RET mutation screening in familial cutaneous lichen amyloidosis and in skin amyloidosis associated with multiple endocrine neoplasia. *J Invest Dermatol* 1996;107:215-8
 16. GAGEL RF, LEVY ML, DONOVAN DT, ALFORD BR, WHEELER T, TSCHEN JÁ: Multiple endocrine neoplasia type 2a associated with cutaneous lichen amyloidosis. *Ann Intern Med* 1989;111:802-6
 17. NUNZIATA V, GIANNATTASIO R, DI GIOVANNI G, D'ARMIENTO MR, MANCINI M: Hereditary localized pruritus in affected members of a kindred with multiple endocrine neoplasia type 2A (Sipple's syndrome). *Clin Endocrinol* 1989;30:57-63
 18. ATTIE-BITACH T, ABITBOL M, GERARD M et al: Expression of the RET proto-oncogene in human embryos. *Am J Med Genet* 1998;80:481-6
 19. PONDER BA, PONDER MA, COFFEY R et al: Risk estimation and screening in families of patients with medullary thyroid carcinoma. *Lancet* 1988;1:397-401
 20. EASTON DF, PONDER MA, CUMMINGS T et al: The clinical and screening age-at-onset distribution for the MEN-2 syndrome. *Am J Hum Genet* 1989;44:208-15
 21. NICCOLI-SIRE P, MURAT A, BAUDIN E et al: Early or prophylactic thyroidectomy in MEN 2/FMTC gene carriers: results in 71 thyroidectomized patients. The French Calcitonin Tumours Study Group (GETC). *Eur J Endocrinol* 1999;141:468-74
 22. VAN HEURN LW, SCHAAP C, SIE G et al: Predictive DNA testing for multiple endocrine neoplasia 2: a therapeutic challenge of prophylactic thyroidectomy in very young children. *J Pediatr Surg* 1999;34:568-71
 23. GILL JR, REYES-MUGICA M, IYENGAR S et al: Early presentation of metastatic medullary carcinoma in multiple endocrine neoplasia, type IIA: implications for therapy. *J Pediatr* 1996; 129: 459-64
 24. WELLS SA JR, CHI DD, TOSHIMA K et al: Predictive DNA testing and prophylactic thyroidectomy in patients at risk for multiple endocrine neoplasia type 2A. *Ann Surg* 1994;220:237-47
 25. HESHMATI HM, HOFBAUER LC: Multiple endocrine neoplasia type 2: recent progress in diagnosis and management. *Eur J Endocrinol* 1997;137:572-8
 26. LALLIER M, ST-VIL D, GIROUX M et al: Prophylactic thyroidectomy for medullary thyroid carcinoma in gene carriers of MEN2 syndrome. *J Pediatr Surg* 1998;33:846-8
 27. ILER MA, KING DR, GINN-PEASE ME, O'DORISIO TM, SOTOS JF: Multiple endocrine neoplasia type 2A: a 25-year review. *J Pediatr Surg* 1999;34:92-6
 28. EVANS DB, FLEMING JB, LEE JE, COTE G, GAGEL RF: The surgical treatment of medullary thyroid carcinoma. *Semin Surg Oncol* 1999;16:50-63
 29. JOHNSTON LB, CHEW SL, TRAINER PJ et al: Screening children at risk of developing inherited endocrine neoplasia syndromes. *Clin Endocrinol* 2000;52:127-36
 30. LANDSVATER RM, ROMBOUTS AGM, TE MEERMAN GJ et al: The clinical implications of a positive calcitonin test for C-cell hyperplasia in genetically unaffected members of an MEN2A kindred. *Am J Hum Genet* 1993;52:335-42