

# MUTAÇÕES NO *RET* PROTO-ONCOGENE EM ASSOCIAÇÃO COM NEOPLASIAS ENDÓCRINAS MÚLTIPLAS TIPO 2 (MEN 2)

## Implicações Clínicas

MARIA JOÃO M. BUGALHO, LUÍS G. SOBRINHO

Serviço de Endocrinologia. Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil. Lisboa

### RESUMO

As neoplasias endócrinas múltiplas tipo 2 (MEN 2) são uma síndrome neoplásica genética de transmissão autossómica dominante. Revêem-se os aspectos clínicos, de diagnóstico e tratamento desta síndrome. Salienta-se o avanço que representa a passagem duma fase de rastreio bioquímico para uma de rastreio genético dos indivíduos em risco. Discutem-se as implicações clínicas do emprego de novos métodos de biologia molecular.

### SUMMARY

**Mutations of the *Ret* Proto-oncogene related to multiple endocrine neoplasia type 2 (Men 2).  
Clinical Implications**

Multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN 2) is an autosomal dominant cancer syndrome. Clinical features and diagnostic aspects of this syndrome are reviewed with a focus on progress biochemical screening to genetic analysis of those at risk. The clinical implications resulting from the application of the new methods of molecular biology are discussed.

### INTRODUÇÃO

MEN é a abreviação consagrada na literatura anglo-saxónica para Multiple Endocrine Neoplasia. A sistematização em tipo 1 e 2 deve-se a Steiner<sup>1</sup>. O tipo 1 corresponde à associação inicialmente descrita por Erdheim em 1903<sup>2</sup> em que há envolvimento das paratiroideias, pâncreas endócrino/duodeno e hipófise anterior<sup>3,4</sup>. O tipo 2 foi inicialmente descrito por Sipple em 1962<sup>5</sup> como a associação de feocromocitoma e carcinoma da tiroideia. Apesar de clinicamente distintas, estas entidades têm em

comum o facto de serem síndromes neoplásicas genéticas de transmissão autossómica dominante<sup>6</sup> e envolvimento pluriglandular com expressão clínica dependente da hipersecreção hormonal.

Limitaremos a presente revisão ao MEN 2. Ao falar de MEN 2, consideram-se 2 subtipos. MEN 2A, o subtipo mais comum, define-se pela associação de carcinoma medular da tiroideia (CMT), feocromocitoma/s, hiperplasia/adenoma/s das paratiroideias. Dentro deste subtipo, para além da forma clássica, reconhecem-se três variantes: 1- CMT de carácter familiar não associado aos

outros tumores endócrinos habituais (CMTF); 2 - MEN 2A associado a líquen cutâneo amiloidótico<sup>7,8</sup>; 3 - MEN 2A associado a doença de Hirschsprung<sup>9-11</sup>. MEN 2B define-se pela associação de CMT e feocromocitoma em indivíduos com hábito *marfanoide* e ganglioneuromatose difusa incluindo o tubo digestivo.

A descoberta recente de mutações no Ret proto-oncogene<sup>12,13</sup> em associação com MEN 2<sup>14-16</sup> para além de representar um notável avanço no conhecimento dos mecanismos moleculares destas neoplasias abre novas perspectivas no rastreio das famílias com MEN 2.

Revêem-se os métodos clássicos de rastreio e discute-se a orientação terapêutica à luz dos novos conhecimentos de genética molecular.

## ASPECTOS CLÍNICOS

### MEN 2A:

O CMT tem origem nas células C da tiroideia e está presente em mais de 90% dos doentes afectados<sup>17</sup> sendo quase sempre a primeira manifestação da síndrome. Habitualmente envolve os dois lobos e é multicêntrico. A hiperplasia das células C precede o CMT<sup>18</sup>. O espectro clínico do CMT é variável de indivíduo para indivíduo e de família para família<sup>19,20</sup>. No entanto, é reconhecido que esta neoplasia metastiza precocemente para os gânglios loco-regionais. Estão descritos casos de hiperplasia de células C em crianças com menos de 2 anos<sup>21</sup>, de CMT aos 3 anos<sup>21</sup> e de CMT com metastização ganglionar aos 6 anos<sup>22</sup>.

O feocromocitoma, com expressão clínica, desenvolve-se em cerca de 50% dos casos. Menos de 20% dos doentes exprimem sinais antes dos 20 anos<sup>23</sup> e geralmente o quadro clínico é fruste e bem tolerado. Não obstante, foi descrito um caso de encefalopatia hipertensiva numa criança de 13 anos<sup>24</sup>. Como o CMT, também o feocromocitoma é geralmente multicêntrico surgindo no contexto de hiperplasia medular das suprarrenais. Cerca de 50% são bilaterais e as formas malignas variam entre 0% e 8%<sup>25,26</sup>.

Cerca de 20% de doentes com MEN 2A desenvolvem hiperparatiroidismo como manifestação tardia<sup>27</sup>. Raramente é causa de morte.

A variante de MEN 2A associada a líquen cutâneo amiloidótico descrita recentemente<sup>7,8,28-31</sup> caracteriza-se por queixas intermitentes de prurido crónico com localização à região interescapular. Nesta área, é possível ver uma zona circunscrita de pele de aspecto espessado com sulcos marcados e hiperpigmentada. Na grande maioria dos casos descritos, esta lesão não cruza a linha média. No entanto, já foi descrito um caso<sup>30</sup> com envolvimento bilateral em asa de borboleta. Foi possível demonstrar a presença de amiloide em alguns, mas não todos, os casos em que foi feita biópsia cutânea. Nestes casos, estudos de imunohistoquímica revelaram positividade para queratina e não para calcitonina<sup>8</sup>. Estes achados estão em concordância com a evidência de que as queixas de prurido antecedem em muitos casos o aparecimento de CMT<sup>7,8,30</sup>. As lesões cutâneas constituem uma marca fenotípica de penetrância variável<sup>32</sup> devendo a sua pesquisa ser sistemática por altura do rastreio das famílias afectadas.

Os indivíduos em que as mesmas estiverem presentes deverão ser alvo duma maior vigilância.

Foram descritas famílias com MEN 2A em que alguns dos membros afectados além de MEN 2A são portadores de doença de Hirschsprung<sup>9-11</sup>. A doença de Hirschsprung caracteriza-se pela ausência de gânglios entéricos, condicionando obstrução intestinal.

### MEN 2B:

Neste subtipo, o CMT é encontrado em 100% dos doentes e o feocromocitoma em cerca de 75% dos doentes.

É a forma mais agressiva de MEN 2. A apresentação clínica e a progressão para os gânglios loco-regionais ocorrem em idades mais precoces. O CMT foi descrito numa criança com 18 meses<sup>33</sup> e o CMT com metástases aos 4 anos<sup>21</sup>. A mortalidade é também superior à registada no MEN 2A. Sugestivo da presença do tipo 2B é o fenótipo resultante dum hábito marfanoide associado à presença de neuromas dos lábios, língua, pálpebras ou córnea a par de ganglioneuromatose difusa do tubo digestivo. O envolvimento das paratiroides é raro<sup>34</sup>.

Na ausência de neuromas visíveis ou de história familiar, o diagnóstico pode ser difícil. História de obstipação alternando com períodos de diarreia é também comum nestas crianças que muitas vezes se apresentam com atraso de crescimento. Também o atraso pubertário tem sido descrito associado a esta síndrome<sup>35</sup>.

## RASTREIO BIOQUÍMICO

Depois dum melhor conhecimento da história natural e do padrão de transmissão familiar desta síndrome, o passo seguinte foi o desenvolvimento de métodos de rastreio bioquímico.

A presença de marcadores tumorais séricos permite a detecção dos indivíduos afectados. Assim, encontram-se valores elevados de calcitonina (CT) sérica nos doentes com CMT; aumento das catecolaminas urinárias ou dos seus metabolitos nos doentes com feocromocitoma e hipercalcémia associada a aumento da PTH sérica nos indivíduos com hiperparatiroidismo.

As células C da tiroideia secretam habitualmente CT. Esta secreção pode ser estimulada por diferentes secretagogos<sup>36</sup>, sendo a pentagastrina (PG) o mais usado. A resposta à estimulação permite distinguir os indivíduos normais daqueles com hiperplasia de células C ou com CMT não permitindo no entanto o diagnóstico diferencial entre estas duas situações.

Habitualmente, a estimulação faz-se através da administração e.v. de PG (0.5 µg/Kg) com doseamentos de CT sérica antes da administração 2, 5 e 10 minutos depois. Os efeitos indesejáveis mais frequentes são náusea, *flush* e aperto subesternal. Estes sintomas surjem 20 a 30 segundos após a administração de PG e desaparecem 2 a 3 minutos depois.

Era geralmente recomendado que o rastreio bioquímico começasse aos 5 anos de idade<sup>27,37</sup>. Actualmente, aceita-se que comece por volta dos 2/3 anos ou mais cedo nos casos de MEN 2B<sup>21,22</sup>. A periodicidade deverá ser anual até aos 35 anos. A continuar o rastreio depois

desta idade, sugere-se que seja a intervalos maiores já que a probabilidade dum indivíduo com mais de 35 anos e um teste negativo ser portador do gene para MEN 2 é menor que 5%<sup>27,37,38</sup>.

Ao realizar as provas de estimulação é preciso ter presente que a secreção de CT pode ser estimulada em doentes com neoplasias que não o CMT embora a resposta seja claramente mais exuberante nos doentes com CMT<sup>39</sup>.

O emprego de métodos cada vez mais sensíveis<sup>40,41</sup> aumentou a acuidade diagnóstica mas veio criar alguns problemas de especificidade revelando que a hipercalcitoninémia se podia associar a diferentes situações fisiológicas e patológicas. A hipercalcitoninémia pode estar presente em insuficientes renais<sup>40</sup>. Alterações mínimas de CT, em relação com o exercício<sup>42</sup>, podem ser indistinguíveis das encontradas nas fases precoces de MEN 2. Por outro lado, é conhecido que nas crianças abaixo de 6 anos e nos idosos a elevação de CT sérica e a hiperplasia de células C se associam a diferentes condições clínicas como tiroidite autoimune, nódulos benignos e doença de Graves<sup>43-46</sup>.

Nas famílias exaustivamente estudadas, a percentagem de testes de estimulação falsamente positivos varia entre 1% e 3%. Nalguns casos, a histologia não revelou alterações de células C e noutros, a análise genética subsequente viria revelar que, apesar da resposta à estimulação ser apropriada à presença de células C, esses indivíduos não eram portadores do gene<sup>47</sup>.

O rastreio de anomalias da medula suprarrenal é ainda matéria de alguma controvérsia. Geralmente depende do doseamento das catecolaminas urinárias ou dos seus metabolitos. A evolução dos valores de adrenalina urinária e da razão adrenalina urinária/noradrenalina urinária é considerada de valor predictivo no diagnóstico de feocromocitoma<sup>23</sup>.

Relativamente ao hiperparatiroidismo, recomendam-se doseamentos de calcémia anualmente depois dos 10 anos sendo os doseamentos de PTH reservados para os casos de calcémia elevada<sup>48</sup>.

## RASTREIO GENÉTICO

Nos últimos 7 anos, registaram-se avanços vários no conhecimento dos mecanismos moleculares implicados no MEN 2. Esta síndrome genética é de transmissão autossómica dominante mas pode aparecer como 1º caso ou *nova mutação* sem história familiar.

Em 1987, através de análise de *linkage*, o locus do gene para MEN 2 foi localizado à região centromérica do cromossoma 10<sup>49,50</sup>. Posteriormente, comprovou-se que todas as variantes de MEN 2A e MEN 2B se associavam ao mesmo locus.

Em 1993, foi possível circunscrever a localização do gene para MEN 2 a um intervalo de 480 kilobases, no cromossoma 10q11.2<sup>51,52</sup>. Esta região inclui o *Ret* proto-oncogene que codifica um receptor de membrana com função tirosino-cinase que se expressa no CMT, no feocromocitoma, e nas células C normais<sup>53-55</sup>, e que se tornou assim num gene candidato para o MEN 2. O ligando específico deste receptor não foi ainda caracterizado.

No início de 1994, foram descritas as primeiras mutações germinais no *Ret* proto-oncogene em associação com MEN 2A e passados 6 meses, são já conhecidas 16 mutações diferentes (*Quadro 1*) em relação com esta síndrome<sup>14,56,57</sup>. Todas as mutações descritas foram encontradas em dois únicos exões – 10 e 11 – envolvendo a substituição de bases singulares condicionando, secundariamente, alterações nos códons que codificam os resíduos de cisteína presentes na porção extracelular do receptor. Foram já descritas mutações nos códons 609, 611, 618 e 620 (exão 10) e no codão 634 (exão 11). Estão descritos casos de mutações simultâneas de 3 códons no mesmo indivíduo e no mesmo alelo<sup>12</sup>. As mutações mais frequentes ocorrem no codão 634<sup>14</sup>.

*Quadro 1* – Mutações no *Ret* proto-oncogene e MEN 2A: a alteração da sequência de bases habitualmente codificadora da cisteína (Cis) condiciona a sua substituição por outros aminoácidos

CODÃO	NORMAL	MUTAÇÃO
609	TGC – Cis	TAC – Tir
611	TGC – Cis	TGG – Trp
618	TGC – Cis	GGC – Gli CGC – Arg AGC – Ser TCC – Ser
620	TGC – Cis	CGS – Arg TAC – Tir TTC – Fen
634	TGC – Cis	CGC – Arg GGC – Gli TAC – Tir TCC – Ser TTC – Fen AGC – Ser TGG – Trp

Admite-se que os resíduos de cisteína sejam importantes para a conservação da estrutura tridimensional do receptor e que a alteração da mesma interfira com a ligação do/s ligandos ao receptor<sup>13</sup>.

O facto das mesmas mutações terem sido encontradas no MEN 2A e na variante CMTF sugere que haja outros determinantes do fenótipo e da evolução clínica.

Até agora, só uma mutação associada ao MEN 2B foi descrita. Localiza-se no exão 16 do *Ret* proto-oncogene e substitui a metionina codificada pelo codão 918 por uma treonina<sup>15,16</sup>. Ao contrário do observado no MEN 2A, aqui não é a região rica em cisteínas do domínio extracelular que é alterada mas sim, o domínio tirosino-cinase do receptor, uma região sem dúvida importante para a ligação ao substracto. A mesma mutação foi descrita nalguns CMT esporádicos<sup>15,16</sup>.

A variante MEN 2A/liquen cutâneo amiloidótico associou-se, em 8 famílias estudadas, com diferentes mutações sempre no codão 634 levando à substituição dum resíduo de cisteína por um de cinco diferentes aminoácidos

(Gagel et al, resultados não publicados). A observação das mesmas mutações em indivíduos sem lesões cutâneas sugere que outros eventos possam estar envolvidos na gênese desta variante.

Relativamente à associação de CMT com hiperparatiroidismo Mulligan (14) descreveu em mais de 73% das famílias afectadas a mesma mutação no codão 634 (TGC → CGC) levando à substituição duma cisteína por arginina. Com base nestes achados, o mesmo autor defende que esta mutação possa ser preditiva do envolvimento das paratiroides.

Em cerca de 3% das famílias com MEN 2A, não foi possível demonstrar mutação nem no exão 10 nem no 11.

A evidência de que as mutações são causativas da síndrome decorre do facto da transmissão da mutação se cosegregar com a síndrome clínica e por outro lado, de não terem sido identificadas em indivíduos normais<sup>58</sup>.

## ATITUDE TERAPÊUTICA

A possibilidade dum diagnóstico precoce dos portadores do gene para MEN 2, eventualmente ainda numa fase pré-natal, tem duas consequências imediatas:

1. Permitir excluir, de futuros programas de rastreio, os 50% de familiares que se revelarem como não portadores do gene. Obviamente que isto diminui significativamente os custos económicos<sup>58</sup> bem como o *stress* emocional que qualquer programa de rastreio bioquímico anual envolve.
2. Permitir antecipar a tiroidectomia nos portadores do gene numa tentativa de obviar à disseminação ganglionar aumentando assim as possibilidades da cirurgia ser curativa.

A decisão duma tiroidectomia em idades precoces obriga a ponderar a relação benefícios/riscos.

Algumas das perguntas que se colocam e que condicionam a decisão terapêutica são:

1. Qual é a percentagem de portadores do gene que desenvolverão CMT?
2. Em que idade se desenvolve o CMT?
3. São os riscos duma tiroidectomia total maiores numa criança que num adulto?
4. Qual a aderência ao programa de tratamento de substituição?

A penetrância clínica da síndrome é incompleta. Cerca de 41% dos portadores do gene atingem os 70 anos sem expressão clínica. Quando o diagnóstico depende do rastreio bioquímico, mais de 90% dos portadores do gene revelam doença de células C antes dos 31 anos<sup>38</sup>.

A idade média de conversão dum teste negativo para positivo era 13 anos<sup>27,38</sup>. O desenvolvimento de métodos de doseamento da CT mais sensíveis antecipou a viragem das provas para os 10 anos<sup>59</sup>.

O *follow-up* bioquímico de 27 crianças pertencentes a uma das maiores famílias com MEN 2A descritas na literatura<sup>59</sup> e operadas com base nos achados de CT sérica elevada veio revelar que das 15 em que a histologia só revelou hiperplasia de células C todas tinham valores

séricos de CT normais enquanto que duas, das 12 em que já era patente micro CMT à altura da cirurgia, mantinham valores de CT elevados 10 e 15 anos após a cirurgia sugerindo que apesar de não ser visível já devia ter ocorrido disseminação ganglionar previamente à cirurgia. Metastização ganglionar foi descrita num caso de MEN 2A, comprovado histologicamente, numa criança com 6 anos<sup>22</sup>.

A complicação mais frequente, na sequência duma tiroidectomia total é o hipoparatiroidismo definitivo. A incidência desta complicação varia entre 0.6 - 8%<sup>60-62</sup>. A diminuição da incidência desta complicação para percentagens em torno de 1.6% está associada ao aumento das cirurgias em estadios mais precoces e aos avanços técnicos incluindo autotransplante das paratiroides. A segunda complicação em frequência é a paralisia do nervo recorrente variando entre 0.5 - 2.3%<sup>60-62</sup>. Nas crianças estas também são as complicações mais habituais. Telander et al<sup>21</sup> num grupo de 17 crianças com idades compreendidas entre 1.5 e 12 anos registou um caso de hipoparatiroidismo definitivo não tendo havido em nenhum caso lesão dos recorrentes. Na série de Graham et al<sup>22</sup> incluindo 7 crianças com idades entre 3 e 16 anos não houve nenhum caso de hipoparatiroidismo ficando uma criança com parésia do recorrente direito. Na série de Desjardins et al<sup>10</sup>, de 23 doentes com idades compreendidas entre 22 meses e 27 anos, 3 ficaram com hipoparatiroidismo definitivo.

A anestesia geral também comporta riscos operatórios e pós-operatórios sobretudo para as crianças. Em 1980 a mortalidade associada a anestesia era 3 a 4 vezes superior nas crianças que nos adultos<sup>63</sup>. Quando a anestesia é feita por anestesistas experientes e em centros vocacionados para a cirurgia pediátrica as complicações anestésicas reduzem-se muito<sup>64</sup>.

Uma tiroidectomia total implica em terapêutica de substituição. Hipotiroidismo antes dos 3 anos pode condicionar lesões irreversíveis do SNC e atraso de crescimento<sup>65</sup>. O eutiroidismo clínico e bioquímico depende exclusivamente da aderência à terapêutica o que nas crianças implica na colaboração dos pais.

A tiroidectomia total, quando realizada por cirurgiões experientes, parece recomendável nas crianças com mutações no *Ret* proto-oncogene claramente associadas ao desenvolvimento de MEN 2A. A idade ideal deverá ser estabelecida individualmente considerando a agressividade da doença na família a que a criança pertence e a dinâmica familiar em relação à doença. Gagel et al<sup>58</sup> propõe a tiroidectomia antes dos 6 anos com realização de provas de estimulação entre os 2 anos de idade e a cirurgia. Na prática, a interpretação dos resultados das provas de estimulação nestas faixas etárias não é fácil porque até agora a idade recomendada de início das mesmas era aos 5 anos<sup>27,37,38</sup>. Alternativamente, o mesmo autor sugere a realização de tiroidectomia por volta dos 3 anos de idade, nas crianças que se revelarem portadoras do gene, dispensando a necessidade de realização de testes de estimulação.

Os avanços no diagnóstico genético não alteram substancialmente a orientação preconizada em relação às outras componentes da síndrome: feocromocitoma e hiperparatiroidismo. No entanto, a identificação dos por-

tadores de mutações permite excluir, de futuros rastreios, os dos indivíduos normais.

A suprarrenalectomia bilateral profiláctica está contraindicada considerando que a mortalidade e morbilidades associadas a este procedimento são elevadas<sup>66</sup>.

## CONCLUSÃO

A identificação recente de mutações no *Ret* proto-oncogene associadas ao MEN 2 é o primeiro passo para o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos nesta síndrome.

Uma única análise de sangue periférico permite definir o estado de portador do gene de MEN 2A. Toda a análise positiva, deverá ser confirmada a partir de material de nova colheita.

A presença de mutações idênticas face a fenótipos clínicos diferentes nas famílias com MEN 2A e naquelas que apresentam as diferentes variantes desta síndrome permanece por esclarecer.

Relativamente a todos os componentes da síndrome: CMT, feocromocitoma e hiperparatiroidismo, a definição do estado de portador de mutações permite excluir, de futuros rastreios bioquímicos, os indivíduos duma família afectada que se revelem normais.

Particularmente ao CMT, a definição do estado de portador poderá conduzir à decisão terapêutica de tireoidectomia total numa fase precoce, antes da disseminação ganglionar ocorrer. Ainda em termos de CMT a análise genética ajuda na interpretação dos resultados *border line* das provas de estimulação e obvia à decisão terapêutica tomada com base em testes falsamente positivos.

Nas famílias em que não for possível demonstrar a presença de mutação germinal o diagnóstico precoce continuará a depender do rastreio bioquímico.

Os mecanismos envolvidos na progressão de hiperplasia de células C até CMT são ainda desconhecidos e poderão depender doutras mutações para além das já conhecidas.

Face a novos casos, em que não há história familiar, o estudo genético poderá ajudar à decisão de ulterior rastreio familiar. Assim, se o novo caso apresentar uma mutação germinal no exão 10 ou 11 do *Ret* proto-oncogene estaremos perante um caso de MEN 2A justificando-se o início do rastreio familiar. A inexistência duma mutação num destes exões não é 100% exclusiva desta eventualidade. Da mesma forma, a presença duma mutação germinal no exão 16 do *Ret* proto-oncogene permite o diagnóstico de MEN 2B justificando o rastreio familiar. Por outro lado, nos casos em que não for patente uma mutação germinal mas for possível documentar uma mutação somática nas células tumorais, no codão 918 (exão 16) do *Ret* proto-oncogene, poderemos concluir tratar-se duma forma esporádica de CMT dispensando-se o rastreio familiar.

## AGRADECIMENTOS

Trabalho parcialmente subsidiado por uma Bolsa da Liga Portuguesa Contra o Cancro / Núcleo Regional do Sul (LPCC/NRS)

## BIBLIOGRAFIA

1. STEINER AL, GOODMAN AD & POWERS SR: Study of a kindred with pheochromocytoma, medullary carcinoma, hyperparathyroidism and Cushing's disease: Multiple endocrine neoplasia, type 2. *Medicine* 1968; 47: 371-409
2. ERDHEIM J: Zur normalen und pathologischen histologia der glandula thyreoidea, parathyreoidea und hypophysis. *Beitr Pathol Anat* 1903; 33: 158-236
3. LIPS CJ, VASEN HF & LAMERS CB: Multiple endocrine neoplasia syndromes. *Crit Rev Oncol Hematol* 1984; 2: 117-184
4. BRANDI ML, MARX SJ, AURBACH GD & FITZPATRICK LA: Familial multiple endocrine neoplasia type I: a new look at pathophysiology. *Endocr Rev* 1987; 8: 391-405
5. SIPPLE JH: The association of pheochromocytoma with carcinoma of the thyroid gland. *Am J Med* 1961; 31: 163-166
6. SCHINKE RN: Genetic aspects of multiple endocrine neoplasia. *Annu Rev Med* 1984; 35: 25-31
7. NUNZIATA V, GIANNATTOSIO R, DI GIOVANNI G, D'ARMIENTO MR & MAUCINI 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
8. GAGEL RF, LEVY ML, DONOVAN DT, ALFORD BR, WHEELER T & TSCHEN JA: Multiple endocrine neoplasia type 2a associated with cutaneous lichen amyloidosis. *Ann Intern Med* 1989; 111: 802-806
9. VERDY M, WEBER AM, ROY CC, MORIN CL, CADOTTE M, BROCHU P: Hirschsprung's disease in a family with multiple endocrine neoplasia type 2. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1982; 1 (4): 603-607
10. DESJARDINS JG, BASS J, LEBOEUF G, et al: A twenty-year experience with thyroid carcinoma in children. *J Pediatr Surg* 1988; 23: 709-713
11. FRILLING A, BECKER H, ROEHR HD: Unusual features of multiple endocrine neoplasia. *Henry Ford Hosp. Med J* 1992; 40 (3-4): 253-255
12. MULLIGAN LM, KWOK JBJ, HEALEY CS, et al: Germline mutations of the *Ret* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A (MEN 2A). *Nature* 1993; 363: 458-460
13. DONIS-KELLER H, DOU S, CHI D, et al: Mutations in the *Ret* proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 851-856
14. MULLIGAN LM, ENG C, HEALEY CS, et al: Specific mutations of the *Ret* proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC. *Nature Genet* 1994; 6: 70-74
15. HOFSTRA RMW, LANDSVATER RM, CECCHERINI I, et al: A mutation in the *Ret* proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature* 1994; 367: 375-376
16. ENG C, SMITH DP, MULLIGAN LM, et al: Point mutation within the tyrosine kinase domain of the *Ret* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B and related sporadic tumours. *Hum Mol Genet* 1994; 3(2): 237-241
17. PADBERG BC, HOLL K, SCHRODER S: Pathology of multiple endocrine neoplasia 2A and 2B: a review *Horm Res* 1992; 38 (suppl 2): 24-30
18. WOLFE HJ, LELVIN KEW, CERVI-SKINNER SJ et al: C-cell hyperplasia preceding medullary thyroid carcinoma. *N Engl J Med* 1973; 289: 437-441
19. KAKUDO K, CARNEY JA, SIZEMORE GW: Medullary carcinoma of thyroid. Biologic behavior of the sporadic and familial neoplasm. *Cancer* 1985; 55: 2818-2821
20. SAMAAAN NA, SCHULTZ PN, HICKEY RC: Medullary thyroid carcinoma: prognosis of familial versus sporadic disease and the role of radiotherapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 801-805
21. TELANDER RL, ZIMMERMAN D, HEERDEN JA, SIZEMORE GW: Results of early thyroidectomy for medullary thyroid carcinoma in children with multiple endocrine neoplasia type 2. *J Pediatr Surg* 1986; 21: 1190-1194
22. GRAHAM SM, GENEL M, TOULOUKIAN RJ, BARWICK KW, GERTNER JM, TORONY C: Provocative testing for occult medullary carcinoma of the thyroid: findings in seven children with multiple endocrine neoplasia type IIa. *J Pediatr Surg* 1987; 22: 501-503
23. GAGEL RF, TASHJIAN AH, CUMMINGS T et al: The clinical outcome of prospective screening for multiple endocrine neoplasia type 2A: an 18-year experience. *N Engl J Med* 1988; 318: 478-484
24. JADOUL M, LEO JR, BERENDS MJ et al: Pheochromocytoma-induced hypertensive encephalopathy revealing MEN - IIa syndrome in

- a 13-year old boy: Implications for screening procedures and surgery. *Horm Metab Res Suppl* 1989; 21: 46-49
25. SCOTT HW, HALTER SA: Oncologic aspects of the pheochromocytoma: the importance of follow-up. *Surgery* 1984; 96: 1061-1066
26. STENSTROM G, ERNEST I, TISELL LE: Long-term results in 64 patients operated upon for pheochromocytoma. *Acta Med Scand* 1988; 223: 345-352
27. GAGEL RF, JACKSON CE, BLOCK MA: Age-related probability of development of hereditary medullary thyroid carcinoma. *J Pediatr* 1982; 101: 941-946
28. FERRER JP, HALPERIN I, CONGET JI et al: Primary localized cutaneous amyloidosis and familial medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol* 1991; 34: 435-439
29. CHABRE O, LABAT-MOLEUR F, BERTHOD F, et al: Atteinte cutanée associée à la néoplasie endocrinienne multiple type 2A (syndrome de Sipple). Un marqueur clinique précoce. *Presse Med* 1992; 21(7): 299-303
30. BUGALHO MJ, LIMBERT E, SOBRINHO LG et al: A kindred with multiple endocrine neoplasia type 2A associated with pruritic skin lesions. *Cancer* 1992; 70: 2664-2667
31. BERTHOD F, BEANI JC, BACHELOT I, et al: Localized scapular pruritus associated with Sipple syndrome (MEN 2A). *Eur J Dermatol* 1993; 3: 553-556
32. ROBINSON MF, FURST EJ, NUNZIATA V et al: Characterization of the clinical features of five families with hereditary primary cutaneous lichen amyloidosis and multiple endocrine neoplasia type 2. *Henry Ford Hosp Med J* 1992; 40(3-4): 249-252
33. STJERNHOLM MR, FRENDENBORG JC, MOONEY HS, KINNEY FJ, DEFTOS LJ: Medullary carcinoma of the thyroid before age 2 years. *Clin. Endocrinol Metab* 1980; 51: 252
34. CARNEY JA, ROTH SI, HEATH III H, SIZEMORE GW, HAYLES, A.B.: The parathyroid glands in multiple endocrine neoplasia type 2b. *Am J Pathol* 1980; 99: 387-398
35. VASSEN HF, VAN DER FELTZ M, RAUE F, et al: The natural course of multiple endocrine neoplasia type IIb. A study of 18 cases. *Arch Intern Med* 1992; 152(6): 1250-1252
36. TELENUS-BERG M, ALMQVIST S, BERG B, et al: Screening for medullary carcinoma of the thyroid in families with Sipple's syndrome: evaluation of new stimulation tests. *Eur J Clin Invest* 1977; 7: 7-16
37. PONDER BAJ, COFFEY R, GAGEL RF et al: Risk estimation and screening in families of patients with medullary thyroid carcinoma. *Lancet* 1988; 1: 397-400
38. 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: 208-215
39. SAMAN NA, CASTILLO S, SCHULTZ PN, KHALIL KG, JOHNSTON DA: Serum calcitonin after pentagastrin stimulation in patients with bronchogenic and breast cancer compared to that in patients with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51: 237-241
40. Bugalho MJM, Santos MA, Martins JM, Sobrinho LG, Limbert E: Interesse clínico do doseamento da calcitonina sérica por um método imunoradiométrico ultrasensível. *Arq Med* 1990; 4 (1): 35-40
41. BARBOT N, CALMETTES C, SCHUFFENECKER I, et al: Pentagastrin stimulation test and early diagnosis of medullary thyroid carcinoma using an immunoradiometric assay of calcitonin: comparison with genetic screening in hereditary medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78(1): 114-120
42. ALOIA JF, RASULO P, DEFTOS LJ, VASWANI A, YEH JK: Exercise-induced hypercalcemia and the calciotropic hormones. *J Lab Clin Med* 1985; 106: 229-239
43. BIDDINGER PW, BRENNAN MF, ROSEN PP: Symptomatic C-cell hyperplasia associated with chronic lymphocytic thyroiditis. *Am J Surg Pathol* 1991; 15: 599-604
44. BARBOT N, GUYTANT S, BELDENT V et al: Thyroïdite chronique auto-immune et hyperplasie des cellules C: étude de la sécrétion de calcitonine chez 24 patients. *Ann. Endocrinol (Paris)* 1991; 52 (2): 109-112
45. GIBSON WGH, PENG TC, CROKER BP: C-cell nodules in adult human thyroid: a common autopsy finding. *Am J Clin Pathol* 1981; 75: 347-350
46. O'TOOLEK K, FENOGLIO-PREISER C, PUSHPARAG N: Endocrine changes associated with the human aging process. III. Effect of age on the number of calcitonin immunoreactive cells in the thyroid gland. *Hum Pathol* 1985; 16: 991-1000
47. LANDSVATER RM, ROMBOUTS AGM, MEERMAN GJ, et al: The clinical implications of a positive calcitonin test for C-cell hyperplasia in genetically unaffected members of an MEN 2A kindred. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 335-342
48. THOMAS PM, GAGEL RF: Advances in genetic screening for multiple endocrine neoplasia type 2 and the implications for management of children at risk. *The Endocrinologist* 1994; 4 (2): 140-146
49. MATHEW CGP, CHIN KS, EASTON DF: A linked genetic marker for multiple endocrine neoplasia type 2A on chromosome 10. *Nature* 1987; 328: 527-528
50. SIMPSON NE, KIDD KK, GOODFELLOW PJ, et al: Assignment of multiple endocrine neoplasia type 2A to chromosome 10 by linkage. *Nature* 1987; 328: 528-530
51. GARDNER E, PAPI L, EASTON DF, et al: Genetic linkage studies map the multiple endocrine neoplasia type 2 loci to a small interval on chromosome 10q11.2. *Hum Molec Genet* 1993; 2: 241-246
52. MOLE SE, MULLIGAN LM, HEALEY CS, PONDER BAJ, TUNNACLIFFE A: Localisation of the gene for multiple endocrine neoplasia type 2A to a 480 Kb region in chromosome band 10q11.2. *Hum Molec Genet* 1993; 2: 247-252
53. SANTORO M, ROSATI R, GRIECO M, et al: The Ret proto-oncogene is consistently expressed in human pheochromocytomas and thyroid medullary carcinomas. *Oncogene* 1990; 5: 1595-1598
54. MIY A A, YAMAMOTO M, MORIMOTO H, et al: Expression of the Ret proto-oncogene in human medullary thyroid carcinomas and pheochromocytomas of MEN 2A. *Henry Ford Hosp Med J* 1992; 40 (3-4): 215-219
55. FABIEN N, PAULIN C, SANTORO M, et al: The Ret proto-oncogene is expressed in normal human parafollicular thyroid cells. *Int J Oncology* 1994; 4: 623-626
56. McMahon R, Mulligan LM, Healey CS, et al: Direct, non-radioactive detection of mutations in multiple endocrine neoplasia type 2A families. *Hum Mol Genet* 1994; 3 (4): 643-646
57. Xue F, Yu H, Herbert Maurer L, et al: Germline Ret mutations in Men 2A and FMTC and their detection by simple DNA diagnostic tests. *Hum Mol Genet* 1994; 3(4): 635-638
58. GAGEL RF, COTE GC, BUGALHO MJ et al: Clinical use of molecular information in the management of multiple endocrine neoplasia type 2A. *J Int Med (Scand)* (in press)
59. KAPLAN MM, STALL GM, CUMMINGS T, et al: High sensitivity serum calcitonin assays applied to screening for thyroid C-cell disease in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Henry Ford Hosp Med J* 1992; 40 (3-4): 227-231
60. SHEMEN LJ, STRONG EW: Complications after total thyroidectomy. *Otolaryngol. Head Neck Surg* 1989; 101: 472-475
61. TOVI F, NOYEK AM, CHAPNIK JS, FREEMAN JL: Safety of total thyroidectomy: review of 100 consecutive cases. *Laryngoscope* 1989; 99: 1233-1237
62. HERRANZ-GONZALEZ J, GAVILAN J, MARTINEZ-VIDAL J, GAVILAN C: Complications following thyroid surgery. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg* 1991; 117: 516-518
63. MOTOYAMA EK: Safety and outcome in pediatric anesthesia. In *Smith's Anesthesia for infants and children*. Edited by Motoyama, EK, Davis, PJ, pp 847-856; St Louis, MO, CV, Mosby 1990
64. KONG AS, BRENNAN L, BINGHAM R, MORGAN-HUGHES J: An audit of induction of anesthesia in neonates and small infants using pulse oximetry. *Anaesthesia* 1992; 47: 896-899
65. DALLAS JS, FOLEY TP: Hypothyroidism. In *Pediatric Endocrinology: A clinical guide*, Ed2. Edited by Lifshitz F, pp 469-481. New York, Marcel Dekker USA 1990
66. LAIRMORE TC, BALL DW, BAYLIN SB, WELLS SA Jr: Management of pheochromocytomas in patients with multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes. *Ann Surg* 1993; 217(6): 595-601