

DIAGNOSTICO PRECOZ DE NEOPLASIA ENDOCRINA MULTIPLE TIPO 2 (MEN 2) POR LA DETECCION DE PORTADORES DE MUTACIONES EN EL PROTO-ONCOGEN RET*

GABRIELA SANZO¹, HORACIO M. DOMENE¹, SONIA IORCANSKY², MARTA BARONTINI¹

Grupo colaborativo para el estudio de MEN: ¹ Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE), Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez; ² Servicio de Endocrinología, Hospital de Pediatría J. P. Garrahan, Buenos Aires

Resumen El MEN 2 es un síndrome hereditario autosómico dominante, en el cual mutaciones del RET dan origen a tres fenotipos diferentes: carcinoma medular de tiroides familiar (CMTF), MEN 2A y MEN 2B. La identificación de mutaciones en el proto-oncogen RET predice el desarrollo de la enfermedad antes de las evidencias clínicas y bioquímicas. En este trabajo se identificaron portadores del RET por caracterización de mutaciones en pacientes y sus familiares. Se estudiaron 2 familias con CMTF (5 y 6 miembros), 4 con MEN 2A (dos de 5, una de 4 y otra de 3 miembros) y 2 con MEN 2B (5 y 1 miembros). Se obtuvieron muestras de ADN de sangre, en todos los casos y de tejido de feocromocitoma y/o tejido tiroideo en los operados. Se utilizó PCR para amplificar los exones 10, 11 y 16 con oligonucleótidos específicos, realizándose secuenciación directa de los fragmentos. En las familias con CMTF y con MEN 2A se encontraron mutaciones en el codón 634 del exón 11 en 16 sujetos, detectándose 9 casos con la mutación TGC → CGC (cisteína a arginina), 3 con TGC → TAC (cisteína a tirosina) y 4 con TGC → TTC (cisteína a fenilalanina). En los pacientes con MEN 2 B se encontró una mutación en el codón 918 del exón 16 ATG → ACG (metionina a treonina). En tejido tumoral se detectó la misma mutación que en sangre periférica. El diagnóstico de MEN 2 fue confirmado en los 8 pacientes y detectado en 10 familiares. En los 5 portadores tiroidectomizados se encontró hiperplasia de células C o microcarcinoma in situ en 2 niños (9 y 12 años) y CMT en 3 adultos. La detección temprana de mutaciones del RET, especialmente en familiares seguida por tiroidectomía total, podría prevenir el desarrollo de CMT, modificando el desenlace fatal que ocurre cuando es diagnosticado tardíamente.

Abstract *Early diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 2 by detection of mutated RET proto-oncogene carriers.* RET proto-oncogene mutation results in a dominant autosomic inherited syndrome (MEN 2) presenting three distinct subtypes: MEN 2A, MEN 2B, and familial medullary thyroid carcinoma (FMTC). Detection of RET proto-oncogene mutation is a predictor before clinical or biochemical evidence of the disease is present and leads to preventive thyroid removal since there is no effective treatment for metastases. The aim of the present study was to characterize mutations in the RET proto-oncogene in affected patients and to identify potential carriers in their families. Two families with FMTC (5 and 6 members), 4 with MEN 2A (5, 5, 4 and 3 members) and 2 with MEN 2B (5 and 1 members), were studied. DNA was obtained from blood samples in all patients and from thyroid or from pheochromocytoma tissues in patients submitted to surgery. PCR amplification was performed using specific primers for exons 10, 11 and 16, followed by direct sequencing. Mutations at codon 634 in exon 11 were found in 16 subjects with FMTC and MEN 2A: TGC → CGC (cysteine to arginine) in 9 cases, TGC → TAC (cysteine to tyrosine) in 3, and TGC → TTC (cysteine to phenylalanine) in 4. A unique mutation at codon 918 in exon 16, ATG → ACG (methionine to threonine), was found in both MEN 2 B affected patients. The mutations detected in DNA from peripheral blood were the same as those present in DNA extracted from tumor material. RET mutations were detected in all affected patients, confirming the diagnosis, and in 10 members of their families. In five of the carriers total thyroidectomy was performed. Anatomopathological study showed C-cells hyperplasia or in-situ microcarcinoma in two children (9 and 12 y) with no clinical signs of disease and medullary thyroid carcinoma in three adults, who were previously unaware of the presence of thyroid nodules. The early detection of RET mutation followed by total thyroidectomy may prevent the development of the disease, specially in affected families, and avoid the fatal outcome of delayed medullary thyroid carcinoma diagnosis.

Key words: multiple endocrine neoplasia type 2, proto-oncogen RET, familiar medullary thyroid carcinoma

La Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2 (MEN 2) es un síndrome hereditario caracterizado por la predisposición

a desarrollar tumores endocrinos. Pueden distinguirse tres formas clínicas diferentes: MEN 2A que presenta carcinoma medular de tiroides (90%), feocromocitoma (50%) e hiperplasia paratiroidea (10-20%); MEN 2B en el que se asocian carcinoma medular de tiroides (> 95%), feocromocitoma (50%) y anomalías tales como neuromas mucosos, hábito marfanoide (100%) y megacolon; y carcinoma medular de tiroides familiar (CMTF), en que el

* Trabajo premiado en la reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata, noviembre 1997

carcinoma medular de tiroides es la única manifestación clínica encontrada¹.

Clásicamente, el diagnóstico de la enfermedad requería la determinación de los niveles séricos de calcitonina basales y estimulados con calcio y/o pentagastrina para detectar el CMT, la medición de los niveles plasmáticos y urinarios de catecolaminas para evidenciar el feocromocitoma y las determinaciones de calcio y parathormona para revelar el hiperparatiroidismo. Además, debido a la naturaleza familiar de este síndrome, la identificación de un paciente afectado requería el estudio y seguimiento de todos sus familiares directos por períodos muy prolongados.

Los estudios genéticos han mapeado el loci para el MEN 2A, MEN 2B y el CMTF en un intervalo del cromosoma 10q11.2². Esta región comprende el proto-oncogen RET, un gen que codifica para un receptor tirosina quinasa que se expresa en el carcinoma medular de tiroides y feocromocitoma y en tejido tiroideo y adrenal normales. Recientemente se han descrito distintas mutaciones del proto-oncogen RET en todas las formas clínicas de esta enfermedad³, permitiendo la caracterización molecular de este síndrome clínico, y aún más importante, la detección temprana de individuos sanos, familiares de pacientes, portadores de mutaciones en este oncogen.

La importancia de la detección temprana de alteraciones en el proto-oncogen RET reside en la posibilidad de prevenir el desarrollo del cáncer medular de tiroides, altamente agresivo y para el cual no se dispone de tratamiento efectivo cuando se extiende fuera de la glándula. Además de la identificación de pacientes, el estudio molecular del RET en sus familiares, permite evitar los controles clínicos y bioquímicos en aquellos que no sean portadores de la mutación, concentrando el seguimiento en los portadores, en los que la tiroidectomía preventiva puede cambiar el curso de la enfermedad.

El objetivo del presente estudio fue detectar mutaciones en el proto-oncogen RET en pacientes con cáncer medular de tiroides y/o feocromocitoma de presentación familiar, y una vez identificada la mutación en los pacientes extender el estudio a sus familiares directos para la detección de portadores en etapa pre-clínica realizando un tratamiento precoz que permita modificar el curso natural de la enfermedad.

Se estudiaron 8 familias: 4 con MEN 2A (18 individuos), 2 con CMTF (13 individuos) y 2 con MEN 2B (6 individuos).

El diagnóstico de MEN 2A se realizó por la asociación de cáncer medular de tiroides y feocromocitoma presente en más de un miembro de una familia. El diagnóstico de CMTF se realizó en familias presentando sólo cáncer medular de tiroides. MEN 2B se diagnosticó por la presencia de cáncer medular de tiroides y/o

feocromocitoma en pacientes con el fenotipo característico.

En todos los sujetos se obtuvo ADN genómico de muestras de sangre periférica entera obtenida sobre EDTA y de muestras congeladas de tejidos tiroideo y adrenal en aquellos pacientes que fueron intervenidos quirúrgicamente. El ADN de sangre periférica se extrajo con fenol-cloroformo/alcohol isoamílico⁴ y el ADN de los tejidos congelados se preparó utilizando reactivos comerciales (genomic DNA purification, Wizard, Promega Corp., Madison, WI).

Los fragmentos de ADN correspondientes a los exones 10, 11 y 16 fueron amplificados por reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) usando los siguientes oligonucleótidos sintéticos⁵:

exón 10:

10F 5'-GCGCCCCAGGAGGCTGAGTG-3' y

10R 5'-CGTGGTGGTCCCGGCCGCC-3'

exón 11:

11F 5'-CCTCTGCGGTGCCAAGCCTC-3' y

11 R 5'-CACCGGAAGAGGAGTAGCTG-3'

exón 16:

16F 5'-AGGGATAGGGCCTGGGCTTC-3' y

16R 5'-TAACCTCCACCCCAAGAGAG-3' y ADN

polimerasa termoestable (*Taq* DNA Polymerase, Promega Corp., Madison, WI). La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 50 µl, con 0,1-1,0 µg de ADN genómico, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-CIH, 0,1% Triton X-100, 250 µM de cada deoxi-NTP, 2 µM de cada primer y 2,5 U de *Taq* polimerasa. Las reacciones de ciclado se llevaron a cabo en un Ciclador MJ Reserch Model PTC-100. Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: para exón 10: 30 ciclos consistentes de desnaturalización a 94°C por 45 seg., asociación a 68°C por seg y extensión a 72°C por 90 seg.; exón 11: 30 ciclos consistentes de desnaturalización a 94°C por 45 seg., asociación a 66°C por 60 seg. y extensión a 72°C por 60 seg.; y exón 16: 35 ciclos consistentes de desnaturalización a 94°C por 45 seg., asociación a 60°C por 60 seg. y extensión a 72°C por 60 seg. Al final de todos los ciclos se incluyó un paso de extensión de 10 min. a 72°C⁵. Los productos de amplificación de PCR fueron evaluados para especificidad de amplificación y tamaño del fragmento por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio y corridos conjuntamente con patrones de tamaño conocido (DNA ladder 100 bp marker, Promega Corp., Madison, WI).

Los productos de amplificación fueron tratados con Exonucleasa I y Fosfatasa Alcalina de camarón y secuenciados en ambas direcciones por el método de la reacción de terminación de cadena⁶, usando los mismos oligonucleótidos utilizados para la amplificación (Sequenase PCR Product Sequencing kit, Amersham,

Arlington Heights, IL) y [³⁵S]-dATP (New England Nuclear, Boston, MA). Los productos de la reacción fueron separados en geles desnaturalizantes de 6% de acrilamida/bis-acrilamida (Bio-Rad, Hercules, CA); 7 M urea, 0.5 x TBE. Los geles de 0.4 mm de espesor fueron corridos en una cuba de secuencia (Sequi-Gen Nucleic Acid Sequencing Cell, Bio-Rad, Richmond, CA) a 75-80 W, durante 2-4 h, secados en una secadora de geles (Gel Dryer, Bio-Rad, Hercules, CA) y se obtuvieron autorradiografías por exposición a película X-OMAT AR (Eastman Kodak Co., Rochester, NY).

Para el diagnóstico de CMT, se realizó ecografía, centellograma con ¹³¹I, dosaje de calcitonina basal y/o estimulada por pentagastrina-calcio y en algunos paciente punción con aguja fina. El estudio para feocromocitoma incluyó valoración de catecolaminas urinarias y plasmáticas, de ácido vainillín mandélico urinario, seguidas de TAC o RMN según los pacientes.

Los niveles séricos de calcitonina se determinaron por radioinmunoensayo utilizando un equipo comercial (Ultra-sensitive calcitonin, DSL, Webster, TX). Las catecolaminas urinarias se determinaron por método fluorimétrico, las plasmáticas por HPLC, con detección electroquímica y el ácido vainillín mandélico por método espectrofotométrico.

El estudio molecular del proto-oncogen RET en familias con MEN 2 comenzó por el estudio del caso índice (n = 8, señalados con una flecha en la Fig. 1). Una vez caracterizada la mutación, se extendió el estudio a sus familiares directos (padres, hermanos, hijos).

Para todas las alteraciones se ha encontrado que el ADN contiene un alelo normal y otro mutado, sugiriendo que el RET ejerce su efecto en el estado heterocigota.

En las familias con CMTF y en las familias con MEN 2 A se encontraron mutaciones en un alelo del codón 634 del exón 11 en 17 sujetos (sobre 32 individuos estudiados), detectándose 9 casos con una transición TGC → CGC (cisteína a arginina), 4 con una transición TGC → TAC (cisteína a tirosina) y 4 una transversión TGC → TTC (cisteína a fenilalanina). En MEN 2B se encontró una mutación en el codón 918 del exón 16, transición ATG → ACG (metionina a treonina), únicamente en los dos pacientes afectados (Fig. 2).

El diagnóstico a nivel molecular fue confirmado en los 8 pacientes: 4 MEN 2A, 2 MEN 2B y 2 CMTF. En los MEN 2B no se detectaron familiares afectados, presentando uno de ellos el antecedente de madre fallecida aparentemente con la misma enfermedad. Se detectaron 11 familiares de los pacientes con MEN 2A y CMTF portadores de la mutación. De ellos, 8 no presentaron signos de carcinoma medular de tiroides o de feocromocitoma al examen clínico. Otros 2 individuos portadores, pertenecientes a la familia N° 2, presentaron clínica evidente de patología tiroidea, inadvertida hasta ese momento. En esta familia se detectaron 2 her-

manos, una gemela de 36 años (II-3) con el antecedente de feocromocitoma operado 5 años antes y un hermano de 40 años (II-1) asintomático. Al examen clínico ambos presentaron tiroides palpable, multinodular por ecografía e hipocaptante a la centellografía con ¹³¹I, con niveles basales de calcitonina elevados (950 y 370 pmol/L, respectivamente), y punción positiva para carcinoma medular de tiroides. La tiroidectomía total reveló además múltiples metástasis en las cadenas ganglionares. En la familia N° 6, el paciente (II-1) y su hermana (II-2) habían sido tiroidectomizados por carcinoma medular de tiroides previo a la disponibilidad del diagnóstico molecular. En los familiares (III-7 y III-8) de 9 y 12 años de edad, los niveles de calcitonina basales preoperatorios fueron de 17 y 21 pmol/L y aumentaron a 89 y 158 pmol/L, respectivamente, en la prueba de pentagastrina. La tiroidectomía total reveló hiperplasia de células C (III-7) e hiperplasia de células C y microcarcinoma *in situ* (III-8). Al presente el resto de los portadores continúan en estudio.

Se estudió el proto-oncogen RET en tejido tiroideo proveniente de 3 pacientes con MEN 2A (Familia 2, II-1, II-2 y II-3); un paciente con CMTF (Familia 6, III-7) y 1 con MEN 2B (Familia 7, II-1) y tejido adrenal de 1 con MEN 2A (Familia 2, II-1) y 1 con MEN 2B (Familia 7, II-1), encontrándose en los tejidos estudiados la misma mutación que en sangre periférica.

El MEN 2 es una afección que se hereda en forma autosómica dominante por lo que afecta igualmente a hombres y mujeres. De los 8 pacientes que originaron este estudio, 3 fueron varones y 5 mujeres. No todos los pacientes desarrollaron los distintos componentes del síndrome simultáneamente, siendo muy variable el tiempo de aparición de las manifestaciones correspondientes a las distintas glándulas afectadas, coincidiendo con datos de la literatura⁷. La penetrancia del gen del MEN 2 es casi completa; sin embargo, la expresión clínica de cada componente del síndrome en los familiares afectados es variable⁸. Por lo tanto, algunos paciente con enfermedad familiar pueden haberla heredado de un progenitor que aún no haya presentado síntomas de la enfermedad. Tal es el caso de la familia N° 2, donde el estudio molecular de la paciente condujo a la detección de un feocromocitoma asintomático en la generación precedente (I-1).

La manifestación más común, y que marca el pronóstico del MEN 2A, es la hiperplasia de las células C tiroideas, productoras de calcitonina, que progresa hasta desarrollar el carcinoma medular de tiroides. Se ha descrito que más del 90% de los individuos portadores de mutaciones en el proto-oncogen RET desarrollan un carcinoma medular de tiroides⁹. En este estudio, todos los pacientes y portadores estudiados hasta el momento presentaron enfermedad tiroidea. Aquellos que presentaban enfermedad tiroidea en estadios subclínicos

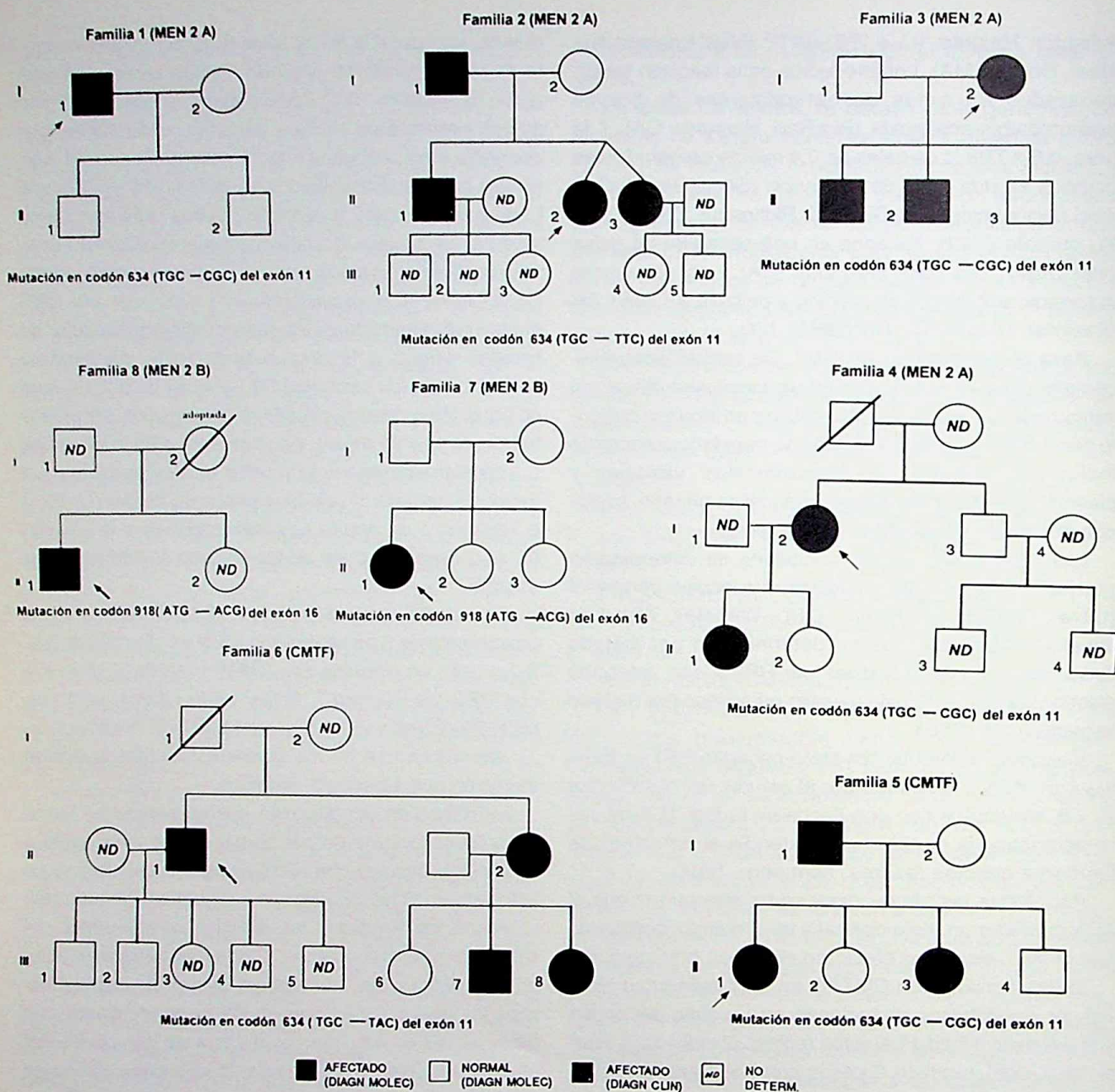


Fig. 1.— Arbol genealógico de 4 familias con MEN 2A, 2 familias con MEN 2B y 2 familias con CMTF. Las generaciones se indican con números romanos. Los individuos pertenecientes a la familia son designados con números arábigos correlativos dentro de cada generación. La flecha indica el caso índice.

(hiperplasia de las células C y carcinoma microscópico) no tuvieron niveles elevados de calcitonina, presentando sólo uno de ellos una hiperrespuesta a la prueba provocativa de pentagastrina; por el contrario, en los pacientes con carcinoma medular de tiroides con metástasis ganglionares, los niveles basales de calcitonina se encontraron francamente elevados. La aparición de feocromocitoma en el MEN 2 es precedida por hiperplasia difusa y/o nodular de la médula adrenal. Con frecuencia, esta enfermedad se diagnostica con posterioridad a la aparición del carcinoma medular de tiroides; sin embargo, en algunos casos el feocromocitoma precede a la

enfermedad tiroidea. Esta evolución fue la observada en la paciente II-3 de la Familia 2, en quien se detectó el CMT a los 5 años posteriores a la adrenalectomía unilateral por feocromocitoma, diagnóstico que se efectuó como consecuencia de la citación de los familiares del paciente afectado. El objetivo más importante de la búsqueda del feocromocitoma es la identificación y tratamiento de los pacientes antes que desarrollen manifestaciones clínicas del tumor que pongan en riesgo su vida. En este estudio, siete pacientes presentaron feocromocitoma.

De las dos familias estudiadas con MEN 2B, sólo pudo completarse el estudio de padres y hermanos en una en

MUTACIONES DEL PROTO-ONCOGEN RET

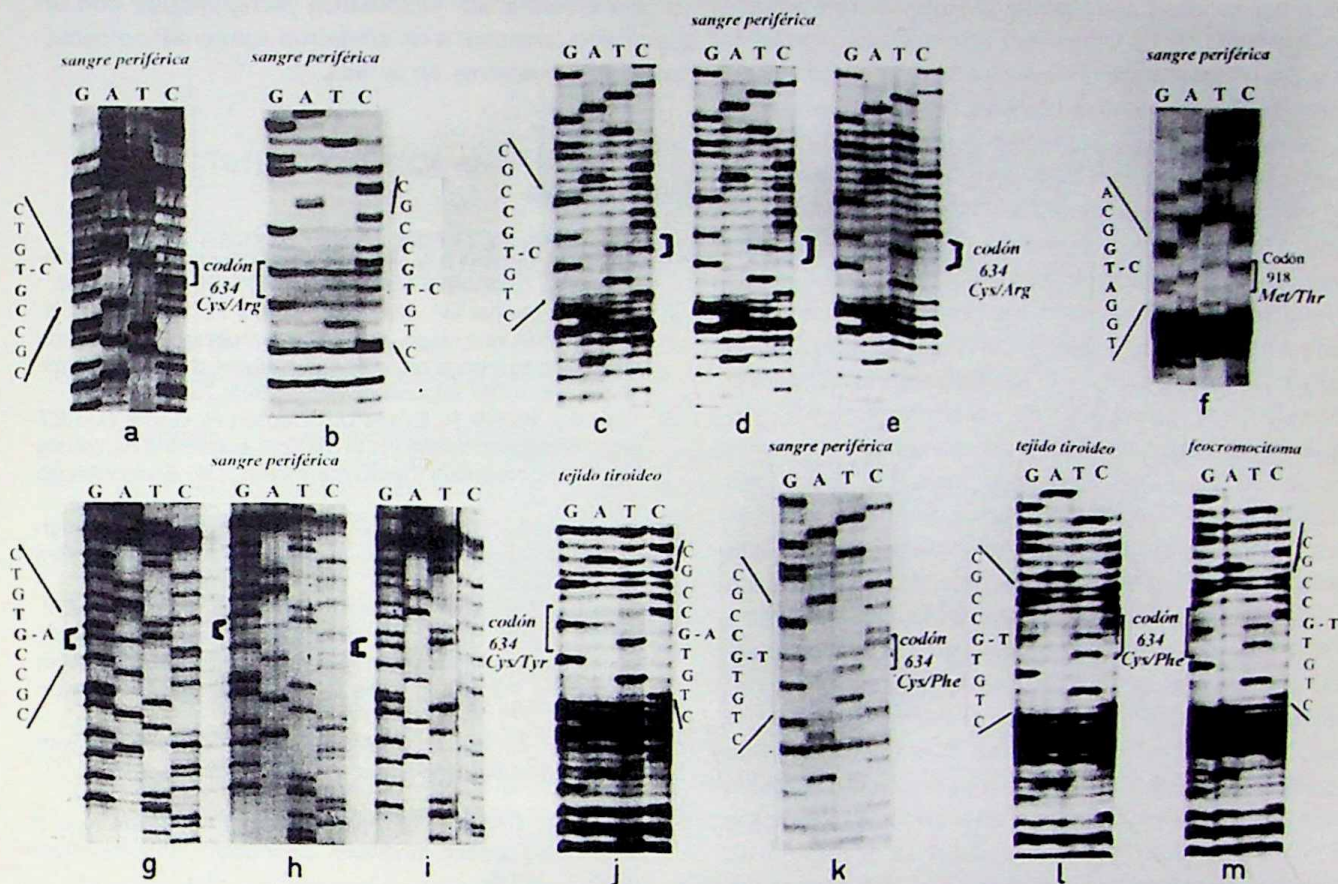


Fig. 2.- Detección de mutaciones del proto-oncogen RET por secuenciación directa a partir de productos de PCR. Esta figura muestra ejemplos de las mutaciones encontradas en el codón 634 del exón 11 y en el codón 918 del exón 16. En cada una de las mutaciones identificadas, una cisteína altamente conservada, es convertida en otro aminoácido por una mutación puntual. a: sangre periférica de (Familia 4, I-2); b: sangre periférica de (Familia 1, I-1); c, d, e: sangre periférica de (Familia 3, II-1, II-2, II-3 respectivamente). En estos pacientes se muestra el codón 634, Cisteína (TGC) convertido en Arginina (CGC), excepto el familiar 3 de la familia 3 que no presenta la mutación. f: sangre periférica de (Familia 7, II-1). En este caso se muestra el codón 918, Metionina (ATG), convertido en Treonina (ACG). g, h, i: sangre periférica de (Familia 6, II-2, III-7, III-6, respectivamente); j: tejido tiroideo de (Familia 6, III-7). En estos pacientes se muestra el codón 634, Cisteína (TGC), convertido a Tirosina (TAC), excepto el familiar 8 que no presenta la mutación. k: sangre periférica de (Familia 2, II-3); l, m: tejido tiroideo y feocromocitoma de (Familia 2, II-2), respectivamente. En estos casos se muestra el codón 634, Cisteína (TGC), convertido en Fenilalanina (TTC).

la que no se encontraron familiares portadores, revelando el carácter de mutación *de novo* en el proto-oncogen RET. En el otro paciente que presentaba la misma mutación en el codón 918, aunque sus padres no pudieron ser estudiados, el antecedente de madre fallecida de cáncer de tiroides con fenotipo compatible con el síndrome, sugiere la posibilidad de que el paciente haya heredado la mutación por el alelo materno. La naturaleza esporádica de la mutación genómica en el codón 918 de pacientes con MEN 2B parece ser el mecanismo predominante, aunque algunos pocos casos de mutación heredada han sido previamente reportados³.

La identificación de mutaciones del proto-oncogen RET en MEN 2 no sólo conduce a un mejor entendi-

miento de la patogénesis de estos síndromes, sino también al manejo de estos cánceres hereditarios¹⁰. En familias con mutaciones conocidas es ahora posible predecir con certeza qué miembros de la familia son portadores de la mutación y extremar los esfuerzos de seguimiento y detección de este síndrome, para así realizar la terapéutica correspondiente con mayores posibilidades de curación de los miembros afectados.

La incidencia de estas enfermedades en la población general no es aún conocida. Sin embargo el carácter hereditario autosómico dominante en el caso de las mutaciones del proto-oncogen RET, posibilita que esta enfermedad se extienda en proporciones geométricas dentro de la población, por lo que la detección de los

familiares afectados y el desarrollo de técnicas adecuadas para su pesquisa adquiere especial relevancia. Avalando esto, de las 6 familias aquí estudiadas con MEN 2A y CMTF solamente en una de ellas, no se transmitió la mutación a la progenie (Familia 1), estando presente en 10 de 20 familiares directos estudiados (50%). En nuestros pacientes con MEN 2A y CMTF se encontraron mutaciones en la cisteína 634 del exón 11. Está descrito que las mutaciones del codón 634 están más comúnmente asociadas con el MEN 2A clásico (constituyendo del 80-90% de las mutaciones reportadas), aunque se han descrito algunos CMTF presentando mutaciones en este codón^{8, 11, 12}. Sin embargo la frecuencia variable de aparición de feocromocitoma y/o hiperparatiroidismo en el MEN 2A, hace que el diagnóstico de CMTF sea muchas veces provisorio, sobre todo en familias poco numerosas. De las 6 familias estudiadas 4 presentaron sustitución de cisteína por arginina (66%), una presentó sustitución de cisteína por tirosina (17%) y otra sustitución de la cisteína por una fenilalanina (17%). La frecuencia de las 2 primeras mutaciones coincide con las frecuencias descritas previamente en la literatura (60 y 20% respectivamente), mientras que la mutación cisteína-fenilalanina es muy poco frecuente (aproximadamente 5%). La única mutación descrita en MEN 2B es metionina-treopina, en el codón 918 del exón 16^{13, 14}. En las dos familias estudiadas se encontró esta mutación. Debe también señalarse que la misma mutación encontrada en sangre periférica fue encontrada en los tejidos disponibles quirúrgicamente, confirmando el diagnóstico molecular.

Con anterioridad a la identificación del gen involucrado en la patogénesis de esta enfermedad, la identificación de los portadores requería el seguimiento periódico con la determinación de calcitonina por el estímulo de pentagastrina y/o calcio de todos los familiares directos de los pacientes. Sin embargo, la sensibilidad de la prueba está en revisión debido a la presencia de falsos resultados negativos. En base a estos hallazgos, la mayoría de los autores recomienda la realización de la tiroidectomía total a edades muy tempranas de la vida (entre 1 y 5 años) en todo familiar portador de la mutación¹⁵. En apoyo a esta recomendación, de nuestros 4 pacientes con MEN 2A y CMTF tiroidectomizados, se encontró hiperplasia de células C o microcarcinoma *in situ* en los pacientes en edad pediátrica, mientras que en los 2 adultos se encontró carcinoma medular de tiroides multicéntrico con desarrollo de metástasis ganglionares. Esta estrecha correlación entre el grado evolutivo de la lesión y la edad del tratamiento quirúrgico, enfatiza la importancia del diagnóstico precoz a nivel molecular para así realizar la tiroidectomía antes de la diseminación del cáncer tiroideo, cambiando de esta forma la evolución de la enfermedad y mejorando la expectativa de vida en estos pacientes. Como resultado

de esta estrategia diagnóstica, el MEN 2 puede cambiar de una enfermedad sintomática pluriglandular con un pronóstico ominoso, a un síndrome asintomático detectado tempranamente en la vida.

Bibliografía

1. Raue F, Frank-Raue K, Grauer A. Multiple endocrine neoplasia type 2. *Endocrinol Metab Clinics NA* 1994; 23: 137-56.
2. Tsai MS, Ledger GA, Khosla S, Gharib H, Thibodeau SN. Identification of multiple endocrine neoplasia, type 2 gene carriers using linkage analysis and analysis of the RET proto-oncogene. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 1261-4.
3. Cote GJ, Wohllk N, Evans D, Goepfert H, Gagel G. RET proto-oncogene mutations in multiple endocrine neoplasia type 2 and medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocr Metab* 1995; 9: 609-29.
4. Blin N, Stafford DW. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eucaryotes. *Nucleic Acid Res* 1976; 3: 2303-9.
5. Pausova Z, Soliman E, Amizuka N, Janicic N, Konrad EM, Arnold A, et al. Role of the RET proto-oncogene in sporadic hyperparathyroidism and in hyperparathyroidism of Multiple Endocrine Neoplasia Type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2711-8.
6. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977; 74: 5463-7.
7. Shern LC, Charis E. Multiple endocrine neoplasia type 2 and related genetic conditions. *Curr Opin Endocrinol Diab* 1995; 2: 121-6.
8. Xing S, Smanik PA, Oglesbee MJ, Trosco JE, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Characterization of ret oncogenic activation in MEN 2 inherited cancer syndromes. *Endocrinology* 1996; 137: 1512-9.
9. Mulligan LM, Eng C, Healey CS, Clayton D, Kwok JBJ, Gardner E, et al. Specific mutations of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTc. *Nature Genetics* 1994; 6: 70-4.
10. Siegelman M, Mohabeer A, Fahey III TJ, Tomlinson G, Mayambala C, Jafari S, et al. Rapid, nonradioactive screening for mutations in exons 10, 11 and 16 of the RET proto-oncogene associated with inherited medullary thyroid carcinoma. *Clin Chem* 1997; 43: 453-7.
11. Quadro L, Pinariello L, Salvatore D, Carlomagno F, Del Prete M, Santoro M. Frequent RET proto-oncogene mutations in multiple neoplasia type 2A. *J Clin Endocr Metab* 1994; 79: 590-4.
12. Mulligan LM, Kwok JBJ, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Ponder BAJ. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993; 363: 458-60.
13. Carlson KM, Dou S, Chi D, Scavarda N, Tushima K, Donis-Keller H. Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the RET proto-oncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. *Med Sci* 1994; 91: 1579-83.
14. Hofstra RMW, Landsvater RM, Ceccherini I, Stulp RP, Stelwagen T, Buys CHGM. A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature* 1994; 367: 375-6.
15. Skinner NA, De Benedetti MK, Moley JF. Medullary thyroid carcinoma in children with multiple endocrine neoplasia Types 2A and 2B. *J Pediatr Surg* 1996; 31: 177-82.