

IMPACTO DO RASTREAMENTO DO GENE RET NA ABORDAGEM DE UMA FAMÍLIA COM NEOPLASIA ENDÓCRINA MÚLTIPLA TIPO IIA

THE IMPACT OF RET GENE MUTATIONS SCREENING IN THE MANAGEMENT OF A FAMILY WITH MULTIPLE ENDOCRINE NEOPLASIA TYPE IIA

ELIZABETE ROSÁRIA DE MIRANDA*; PAÓLLA FREITAS PERDIGÃO**; MARIA MARTA SARQUIS SOARES***; LUIZ ARMANDO CUNHA DE MARCO****

RESUMO

Introdução: A neoplasia endócrina múltipla tipo IIA (NEM IIA) é uma doença familiar com padrão de herança autossômico dominante, expressão clínica variável e se caracteriza pela presença do carcinoma medular da tireóide, feocromocitoma e hiperparatireoidismo. Há 12 anos, mutações no gene RET foram identificadas como responsáveis pela NEM IIA. Esse gene codifica um receptor de membrana da família das tirosina-quinases, associado à proliferação e diferenciação celulares, sendo expresso nas células derivadas do neuroectoderma (células C parafoliculares e da medula adrenal), bem como nas paratireóides. **Objetivo:** Estudar uma família com NEM IIA (quatro gerações), através do caso índice que apresentava carcinoma medular da tireóide e hiperparatireoidismo. **Método:** Foram analisados o heredograma e a expressão fenotípica de 20 membros da família, bem como o seqüenciamento do gene RET (exon 11). **Resultados:** Cinco indivíduos apresentavam carcinoma medular da tireóide, tendo um deles também hiperparatireoidismo (caso-índice). O feocromocitoma não foi identificado. O estudo molecular do gene RET em 17 indivíduos revelou a presença da mutação Cys634Tyr no códon 634 nos cinco indivíduos com carcinoma medular da tireóide e em cinco indivíduos sem este diagnóstico (portadores). **Conclusões:** O estudo clínico e molecular desta família permitiu a identificação dos indivíduos em risco de desenvolver o carcinoma medular da tireóide, uma doença potencialmente letal, bem como a adequada orientação e aconselhamento genético desses pacientes.

Palavras-chave: Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 2 a/ genética; Carcinoma Medular/ prevenção e controle; Hiperparatireoidismo

INTRODUÇÃO

A neoplasia endócrina múltipla tipo IIA (NEM IIA) é uma doença complexa que se caracteriza por carcinoma medular da tireóide (CMT) em 95% a 100% dos casos, feocromocitoma em 30-50%, e hiperparatireoidismo em 10-20%. É transmitida por um padrão de herança autossômico dominante com elevada penetrância e expressividade clínica variável^{1,2,3,4}.

O CMT origina-se das células C parafoliculares que são derivadas do neuroectoderma e que produzem calcitonina. É a única apresentação clínica da NEM IIA com característica de malignidade. Seu diagnóstico pode ser feito através do aumento dos níveis plasmáticos de calcitonina, mas a identificação de mutações no gene RET, disponível há cerca de 12 anos, é capaz de antever o aparecimento do CMT e auxiliar o tratamento desses indivíduos, uma vez que a mutação desse gene determina, em quase 100% dos casos, o aparecimento dessa doença potencialmente fatal.

O feocromocitoma é a segunda manifestação fenotípica mais comum e acomete as células medulares da adrenal, também derivadas do neuroectoderma.^{5,6,7} Pode ser unilateral ou bilateral e apresenta uma taxa de malignidade inferior a 10%^{6,7,8,9}. Seu diagnóstico é feito por meio da dosagem de catecolaminas e metanefrinas plasmáticas ou urinárias que geralmente estão aumentadas. A investigação clínica e a retirada cirúrgica devem anteceder a tireoidectomia profilática.¹¹ O diagnóstico do hiperparatireoidismo pode ser feito através da dosagem plasmática do cálcio e do hormônio da paratireóide (PTH) que devem estar aumentados.

Mutações missense, ou seja, a troca de uma única base que acarreta a mudança de um aminoácido, no proto-oncogene RET (Rearranged after Transfection), constituem a base genética da NEM tipo IIA.¹²

O proto-oncogene *RET*, localiza-se no cromossomo 10 (10q11.2) e codifica um receptor de membrana da família das tirosina-quinases, associado à proliferação e diferenciação celulares.¹³ Mutações missense no proto-oncogene RET (gene potencialmente oncogênico) determinam a transcrição de um receptor (receptor RET) permanentemente ativo sem a presença do ligante natural, ocasionando a proliferação e diferenciação celulares desordenadas.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Caso Clínico

A família investigada foi identificada a partir de uma paciente de 31 anos (III-8), que apresentou litíase renal com aumento do nível plasmático de cálcio e de PTH. Durante a cirurgia para a retirada de uma das paratireóides, o cirurgião notou a presença de nódulos na tireóide, que foram também retirados e enviados ao serviço de anatomia patológica. A peça operatória mostrou tratar-se de provável CMT. Um segundo tempo operatório para

*Mestre e Professora substituta do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

**Doutora pela Universidade Federal de Minas Gerais

***Doutora e Professora Adjunta do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

****Doutor e Professor Titular da Universidade Federal de Minas Gerais.

Endereço para correspondência

Rua Timbiras 832 / 501 – Funcionários. Belo Horizonte. Minas Gerais. CEP: 30.140.060

E-mail: elizabetemiranda@ufmg.br

Telefones: (31)3213-3410 e (31)3226-7799

a totalização da tireoidectomia confirmou o achado de CMT, com o estudo imunohistoquímico positivo para calcitonina. A identificação desta paciente levou ao conhecimento de dois outros familiares de primeiro grau (II-3 e III-3) que já tinham o diagnóstico de CMT há três anos. Decidimos, então, pela visita ao grupo familiar.

Todos os membros da família foram entrevistados individualmente e orientados sobre a importância do diagnóstico clínico e laboratorial das enfermidades que compõem a NEM tipo IIA. Também foram esclarecidos a respeito da causa da NEM IIA, incluindo o significado do gene RET e suas mutações. Foram informados sobre as características de hereditariedade da NEM tipo IIA e o significado do encontro ou não de mutações neste gene.

Em duas pacientes (III-4 e III-13) fizemos o diagnóstico de CMT, antes mesmo do rastreamento do gene RET, através da análise de dados clínicos e presença de nódulos na tireóide. Realizamos a punção biópsia de agulha fina (P.A.A.F) destes nódulos, que confirmou nossa suspeita de CMT. O estudo da peça operatória da tireoidectomia reafirmou o achado da P.A.A.F.

Foi colhida uma amostra de sangue periférico daqueles pacientes que assinaram o termo de consentimento

livre e esclarecido. O material colhido foi enviado para o Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), onde foram processadas as etapas de extração do DNA de leucócito e a purificação do DNA extraído, usando-se o WIZARD® GENOMIC DNA PURIFICATION KIT (PROMEGA WI), conforme orientação do fabricante. Seguiram-se as etapas de reação em cadeia da polimerase (PCR)¹⁴ e o sequenciamento genético para a busca de mutações no gene RET (exon 11).

O estudo teve aprovação dos comitês de ética da Fundação Hospitalar Mário Penna e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFMG, bem como do Departamento de Extensão e Pesquisa (DEPE) do Hospital das Clínicas da UFMG.

RESULTADOS

O contato com as três pacientes inicialmente investigadas e as várias visitas domiciliares permitiram a construção do heredograma (Figura 1).

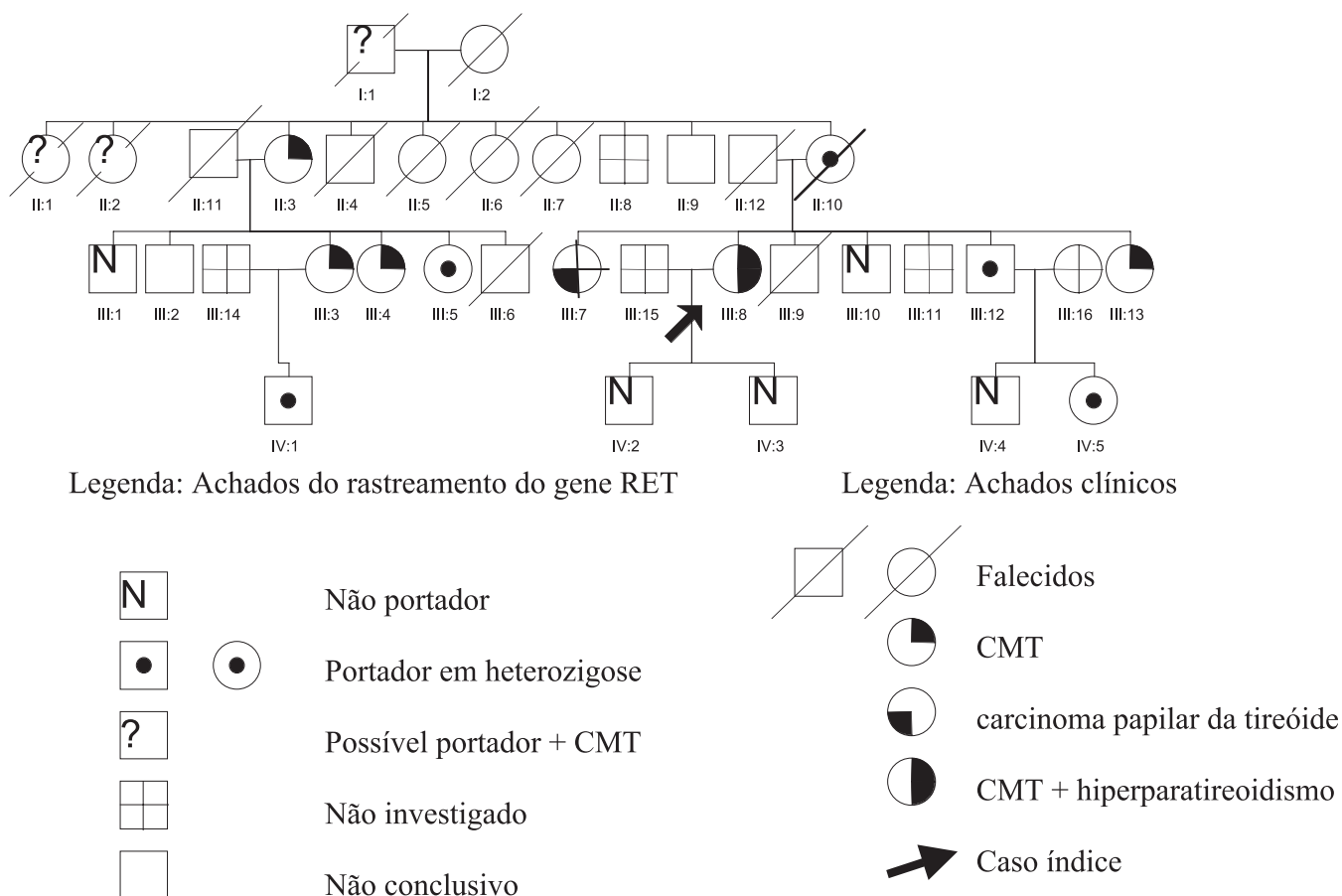


Figura 1 - Heredograma da família com NEM tipo 2A. Achados clínicos e de rastreamento molecular do gene RET para a mutação Cys634tyr

Identificamos neste grupo familiar a presença de 20 indivíduos (em quatro gerações diferentes), sendo 15 adultos e cinco crianças. Três indivíduos não quiseram participar desta investigação, embora tenham sido exaustivamente esclarecidos sobre a importância da pesquisa clínica e laboratorial das manifestações da NEM tipo IIA, bem como do rastreamento de mutações no gene RET (Tabela 1).

Tabela 1 - Descrição da genealogia, sexo, e idade dos pacientes da família com NEM tipo IIA investigados clinicamente

Genealogia	Sexo	Idade(anos)
II-3	F	58
II-9	M	46
II-10	F	60
III-1	M	20
III-2	M	27
III-3	F	32
III-4	F	30
III-5	F	33
III-8	F	32
III-10	M	28
III-12	M	30
III-13	F	31
IV-1	M	5
IV-2	M	5
IV-3	M	7
IV-4	M	13
IV-5	F	3

Realizamos a investigação laboratorial para a pesquisa de hiperparatiroidismo nos pacientes com CMT (II-3, III-3, III-4, III-8 e III-13) e em um paciente portador da mutação Cys634Tyr (III-12). Somente a paciente III-8 (caso-índice) apresentou um aumento significativo do cálcio total plasmático, acompanhado de um aumento do paratormônio (PTH), podendo ser considerada positiva a presença deste fenótipo. O paciente III-12 apresentou o valor do cálcio plasmático no limite superior da normalidade (11mg/dl), entretanto o PTH esteve surpreendentemente baixo (1pg/ml) (Tabela 2).

A investigação laboratorial para a identificação de feocromocitoma foi realizada em quatro dos cinco pacientes com CMT (III-3, III-4, III-8, III-13) e em um paciente portador da mutação Cys634Tyr (III-12). Nenhum desses pacientes apresentou uma excreção urinária aumentada de catecolaminas e metanefrinas, o que nos permitiu dizer que este fenótipo não esteve presente nesses indivíduos. Não investigamos a presença do feocromocitoma nos indivíduos

II-3; III-5; IV-1 e IV-5 porque não conseguimos uma coleta adequada da amostra de urina de 24 horas (Tabela 3).

Tabela 2 Dosagens bioquímicas para a pesquisa de hiperparatiroidismo entre os casos de carcinoma medular da tireóide, da família estudada, em um paciente (III-12) portador da mutação no gene RET

Caso	PTH (pg/ml)	Cálcio total (mg/ml)	Cálcio iônico (mg/ml)	Fósforo (mg/ml)
II-3	30	9	4,2	4,1
III-3	51	9	3,9	3,1
III-4	26	10,2	4,5	4
III-8	292	11	5	3,3
III-12	1	11	4,9	2,4
III-13	18	9,6	4,6	2,7
VR:	7 a 53	8,8 a 11	4,0 a 5,5	2,5 a 4,8

VR: Valor de referência

Tabela 3 Dosagens bioquímicas para a pesquisa de feocromocitoma em urina de 24 horas de quatro pacientes com carcinoma medular da tireóide e um paciente (III-12) portador da mutação no gene RET

Identificação	Epinefrina (ug/24h)	Norepinefrina (ug/24h)	Dopamina (ug/24h)	Normetanefrina (mg/g creatinina)	Metanefrina (mg/g creatinina)
III-3	5,8	30,3	1	0,14	0,05
III-4	5,9	6,6	14,2	0,19	0,15
III-8	6,8	7,5	10	0,2	0,16
III-12	5,1	6,3	2,6	0,27	0,14
III-13	38,5	127	348,5	0,3	0,1
VR	< 50	< 150	< 400	< 0,41	< 0,30

VR: Valor de referência

O rastreamento de mutações no gene RET foi realizado em todos os 17 pacientes que permitiram sua inclusão na investigação. Em 10 indivíduos, cinco deles já com o diagnóstico de CMT (II-3, III-3, III-4, III-8, III-13) e cinco assintomáticos (II-10, III-5, III-12, IV-1, IV-5), identificamos a mutação Cys634Tyr no exon 11, códon 634. Entre os pacientes assintomáticos (portadores), cinco eram crianças, com idade inferior a 12 anos (Tabela 4).

Nos pacientes II-9 e III-2 (inconclusivos) não houve definição da presença ou não da mutação.

No rastreamento do gene RET encontramos a sobreposição da base guanina (G) e adenina (A), apontada pela seta (Figura 2), no codon 634, exon 11, que nos informa a presença da mutação Cys634Tyr.

Tabela 4 Estudo molecular da família com NEM tipo IIA, presença (+) ou ausência da mutação Cys634Tyr (TGC/ TAC) no codon 634 do exon 11

Fenótipo	Genealogia	Mutação TAC
CMT	II-3	+
	III-3	+
	III-4	+
	III-13	+
NEM IIA	III-8	+
Assintomáticos	II-9	Inconclusivo
	II-10	+
	III-1	Ausente
	III-2	Inconclusivo
	III-5	+
	III-10	Ausente
	III-12	+
	IV-1	+
	IV-2	Ausente
	IV-3	Ausente
	IV-4	Ausente
IV-5	+	

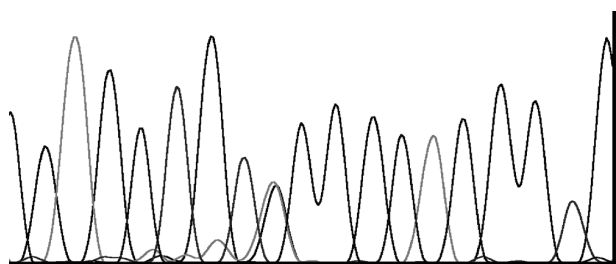


Figura 2 - Códon 634; Exon 11 (III-4)

DISCUSSÃO

Aspectos Clínicos

A identificação do caso índice (III-8) e de seus familiares com CMT (II-3 e III-3) foi de fundamental importância para a busca dos pacientes em risco de apresentarem os fenótipos da NEM tipo IIA. O contato com os membros da família ofereceu a oportunidade de esclarecê-los sobre a NEM tipo IIA, a sua característica de hereditariedade e risco que cada indivíduo apresentava para o aparecimento de um dos fenótipos desta síndrome, bem como a necessidade de investigação laboratorial das doenças presentes na NEM tipo IIA. Os indivíduos também foram esclarecidos sobre o gene RET e o significado de suas mutações. Apenas três indivíduos se recusaram a participar do estudo (II-8, III-7 e III-11). O CMT esteve presente nas três gerações

investigadas, seguindo o padrão de hereditariedade autossômico dominante dessa síndrome.³ Nas pacientes III-4 e III-13, o diagnóstico clínico do CMT, antecedeu o estudo molecular do gene RET.

O hiperparatireoidismo foi investigado em todos os pacientes com CMT (II-3, III-3, III-4, III-8 e III-13), sendo visto apenas no caso índice (III-8). Um dos pacientes apresentou, em uma ocasião, calcemia elevada, o que poderia ser decorrente de interferências, tais como garroteamento prolongado, desidratação e uso de alguma medicação. Essa dosagem foi, portanto, considerada inconclusiva, mas o paciente se negou a fazer nova coleta. Até o momento, o feocromocitoma foi descartado, clínica e laboratorialmente, entre os indivíduos com CMT investigados.

Aspectos moleculares

No seqüenciamento do gene RET dos dezessete indivíduos investigados, detectamos a troca de uma base nitrogenada no exon 11, em um dos alelos, a guanina (G), no códon 634 por adenina (A), no caso índice (III-8) e nos outros quatro membros com CMT (II-3, III-3, III-4 e III-13). Cinco indivíduos assintomáticos (II-10, III-5, III-12, IV-1 e IV-5) também apresentaram esta mutação. A mutação encontrada nesta família parece ser uma mutação freqüente nas famílias brasileiras com NEM tipo IIA¹⁵.

O Consenso Internacional de Diretrizes para o acompanhamento dos pacientes com NEM tipo IIA⁷ classifica as mutações do gene RET em três níveis de risco para o desenvolvimento do CMT: muito alto risco, alto risco e baixo risco. A mutação Cys634Tyr encontrada nos membros dessa família é classificada como de alto risco para o desenvolvimento do carcinoma medular da tireóide. Portanto esse consenso aconselha que os pacientes com tipo IIA, portadores dessa mutação, devam ser submetidos a tireoidectomia profilática, antes dos cinco anos de vida.

Para os pacientes portadores da mutação propusemos a tireoidectomia total. Os pacientes nos quais não encontramos a mutação Cys634Tyr (III-1, III-10, IV-2, IV-3 e IV-4) não necessitam de acompanhamento adicional porque nem eles nem seus descendentes têm risco para a NEM IIA, além do habitual encontrado na população.

Correlação fenótipo-genótipo

Segundo o estudo de Mulligan et al.⁷, a mutação encontrada nessa família normalmente se correlaciona, além do CMT, com maior risco de desenvolvimento de feocromocitoma, mas não de hiperparatireoidismo. Encontramos 100% de correspondência entre o fenótipo CMT e o genótipo (ou seja, presença da mutação Cys634Tyr). No entanto, nem todos os pacientes portadores da mutação Cys634Tyr apresentavam o CMT, o que significa que o diagnóstico molecular pode anteceder o clínico. Como a penetrância do CMT na NEM tipo IIA é próxima de 100%^{7,8}, pacien-

tes assintomáticos e com a mutação Cys634Tyr devem ser submetidos à tireoidectomia total profilática, mesmo que não se encontrem nódulos tireoidianos, o que preveniria o aparecimento desta doença potencialmente letal.

A mutação encontrada nesses pacientes está frequentemente associada ao fenótipo feocromocitoma⁵, embora esta não tenha sido, até o momento, diagnosticado nos membros dessa família, provavelmente devido à faixa etária dos pacientes. O aparecimento dessa doença, no entanto, deverá ser monitorado pelo menos anualmente. Quanto à predisposição para o desenvolvimento do hiperparatireoidismo, sabe-se que essa mutação não está frequentemente associada a esse fenótipo¹⁶, apesar de ter sido encontrado um caso confirmado (III-8), o que também faz requerer nesta família o acompanhamento periódico da calcemia naqueles indivíduos portadores da mutação.

Como a NEM tipo IIA é uma doença familiar de padrão de herança autossômico dominante que apresenta manifestações clínicas de grande impacto na sobrevida do indivíduo, como o CMT, e que tem alta penetrância na sua expressão clínica, entendemos que o rastreamento de mutações no gene *RET* nessas famílias seja a única maneira eficiente, até o momento, para a identificação precoce dos indivíduos em risco para esse fenótipo. Dessa maneira, identificamos nessa família cinco pacientes portadores assintomáticos para o CMT (sendo duas crianças) que seguramente se beneficiariam da tireoidectomia profilática. Além disso, a investigação nos permitiu esclarecer, aos indivíduos da família a causa da NEM tipo IIA, incluindo o significado do gene *RET* e suas mutações, as características de sua hereditariedade e o significado do encontro ou não de mutações. Assim, pudemos realizar o aconselhamento genético aos pacientes portadores e a tranquilização dos não-portadores da mutação.

SUMMARY

Introduction: Multiple Endocrine Neoplasia type IIA (MEN type IIA) is a familiar hereditary dominant autosomic disease with different clinical expressions. The most common clinical manifestations are medullary thyroid carcinoma, pheochromocytoma and hyperparathyroidism. Twelve years ago mutations in the *RET* gene were identified as the cause of MEN type IIA. This gene encodes a tyrosine kinase receptor associated with cellular proliferation and differentiation, and is expressed in the neuroectodermic cells (C cells and adrenal medulla), as well as in parathyroids. **Objective:** To study a family with MEN type IIA (four generations), following the identification of the index case who presented with medullary thyroid carcinoma and hyperparathyroidism, and two other family members, with only medullary thyroid carcinoma. **Methods:** We analysed the pedigree, the phenotypic expressions of the family group and the molecular study of the *RET* gene (exon 11). **Results:** The pedigree showed that 20 in-

dividuals were “under risk” of the clinical manifestations of MEN type IIA. Five individuals had medullary thyroid carcinoma, but one of them had also hyperparathyroidism (index case). Pheochromocytoma was not found. The molecular study of *RET* in 17 out of 20 individuals “under risk”, revealed the presence of Cys634Tyr mutation in five individuals with medullary thyroid carcinoma and in five asymptomatic (carriers). Five individuals did not have the mutation. **Conclusion:** These clinical and molecular studies allowed us to select the individuals for the adequate treatment and the genetic counseling.

Key-words: Multiple Endocrine Neoplasia Type 2a/genetics; Carcinoma, Medullary/ prevention & control; Hyperparathyroidism

Agradecimentos

Agradecemos ao Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e ao Laboratório de Análises Clínicas da Fundação Hospitalar Mário Penna, que viabilizaram a tireoidectomia em alguns dos pacientes da família estudada, bem como as dosagens bioquímicas para a pesquisa de hiperparatireoidismo e feocromocitoma, sem quaisquer ônus.

Agradecemos também ao PRONEX pelo financiamento desta investigação e à Coordenação e Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio como bolsa de estudo para a autora Elizabete Rosária de Miranda.

REFERÊNCIAS

1. Sipple JH. Multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes: historical perspectives. *Henry Ford Hosp Med J* 1984; 32 (4): 219-21.
2. Steiner AL, Goodman JA, Powers SR. Study of a kindred with pheochromocytoma, medullary thyroid carcinoma, hyperparathyroidism and cushing's disease: multiple endocrine disease, type 2. *Medicine (Baltimore)* 1968; 47 (5): 317-409.
3. Schimke RN. Genetic aspects of multiple endocrine neoplasia. *Ann Rev Med* 1984; 35: 25-31.
4. Brauckhoff M, Lorenz K, Ukkat J, Brauckhoff K, Gimm O, Dralle H. Medullary thyroid carcinoma. *Scand J.Surg* 2004; 93 (4): 249-60.
5. Lairmore TC, Ball DW, Baylin SB, Wells SA Jr. Management of pheochromocytomas in patients with multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes. *Ann Surg* 1993 Jun; 217 (6): 595-601.
6. Frank-Raue K, Kratt T, Höppner W, Buhr H, Ziegler R, Raue F. Diagnosis and management of pheochromocytomas in patients with multiple endocrine neoplasia type 2: relevance of specific mutations in the *RET* proto-oncogene. *Eur J Endocrinol* 1996 Aug; 135 (2): 222-5.
7. Mulligan LM, Marsh DJ, Robinson BG, Schuffenecker I, Zedenius J, Lips CJ et al. genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2: report of the International *RET* Mutation Consortium. *J Inter Med* 1995 Oct; 238 (4):343-6.

**IMPACTO DO RASTREAMENTO DO GENE RET NA ABORDAGEM
DE UMA FAMÍLIA COM NEOPLASIA ENDÓCRINA MÚLTIPLA TIPO IIA**

8. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF. et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. The International RET mutation consortium analysis. *JAMA* 1996 Nov 20; 276 (19) :1575-9.
9. Machens A, Gimm O, Hinze R, Hoppner W, Boehm BO, Dralle H. Genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid carcinoma: oncological features and biochemical properties. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Mar; 86 (3): 1104-9.
10. Casanova S, Rosenberg-Bourgin M, Farkas D, Calmettes C, Feingold N, Heshmati HM. et al. Pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2A: survey of 100 cases. *Clin Endocrinol (Oxford)* 1993 May; 38 (5): 531-7.
11. Correia MJ, Lopes LO, Bugalho MJ, Cristina L, Santos AI, Bordalo AD. et al. Multiple endocrine neoplasia type 2A. Study of a family. *Cardiology* 2000 Jan; 19 (1): 11-31.
12. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E. et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993 Jun 3; 363 (6428): 458-60.
13. Santoro M, Carlomagno F, Melillo RM, Billaud M, Vecchio G, Fusco A. Molecular mechanism of RET activation in human neoplasia. *J Endocrinol Invest* 1999 Nov; 22 (10): 811-9.
14. Sambrook J, Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. 3v.
15. Puñales MK, Rocha AP, Gross JL, Maia AL. Carcinoma medular de tireóide: aspectos moleculares, clínico-oncológicos e terapêuticos. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2004 fev; 48 (1): 137-46.
16. Mulligan LM, Eng C, Healey CS, Clayton D, Kwok JB, Gardner E. et al. Specific mutations of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC. *Nat Genet* 1994 jan; 6 (1): 70-4.