

Mutações do Gene do Receptor Sensível ao Cálcio Extracelular e Suas Doenças Associadas

*Kozue Miyashiro
Omar M. Hauache*

*Laboratório de Endocrinologia
Molecular, Disciplina de
Endocrinologia, Departamento de
Medicina, Universidade Federal de
São Paulo (UNIFESP/EPM), SP.*

RESUMO

O receptor sensível ao cálcio extracelular (CaR) é um receptor acoplado à proteína G (GPCR), que exerce um papel essencial na regulação da homeostase do cálcio extracelular. O CaR encontra-se expresso em todos os tecidos relacionados com o controle desta homeostase (paratiróides, células C tiroideanas, rins, intestino e ossos). Logo após a clonagem do CaR, mutações inativadoras e ativadoras do gene deste receptor foram associadas com doenças genéticas humanas: hipercalcemia hipocalciúrica familiar (FHH) e hiperparatiroidismo neonatal severo (NSHPT) são causados por mutações inativadoras do gene do CaR, enquanto que a hipocalcemia autossômica dominante é resultante de mutações ativadoras do gene do CaR. Apesar de raras, tais doenças devem ser consideradas no diagnóstico diferencial de distúrbios hipercalcêmicos e hipocalcêmicos. O reconhecimento do papel fundamental do CaR na manutenção da homeostase do cálcio extracelular motivou o desenvolvimento de drogas capazes de modular a função do CaR, ativando-o (drogas calcimiméticas) ou inativando-o (drogas calciolíticas). Tais drogas têm uma implicação terapêutica potencial, como o controle clínico de casos específicos de hiperparatiroidismo primário e urêmico com o uso de drogas calcimiméticas e um tratamento promissor para osteoporose com o uso de drogas calciolíticas. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2002;46/4:411-417**).

Descritores: Receptor sensível ao cálcio extracelular; Hipercalcemia hipocalciúrica familiar; Hiperparatiroidismo neonatal severo; Hipocalcemia autossômica dominante

ABSTRACT

Mutations of the Extracellular Calcium-Sensing Receptor Gene and its Associated Diseases.

The extracellular calcium-sensing receptor (CaR) is a G protein coupled receptor (GPCR) that plays a key role in the regulation of extracellular calcium homeostasis, being expressed in all tissues related to this control (parathyroid glands, thyroid C-cells, kidneys, intestine and bones). The cloning of the CaR was immediately followed by the association of genetic human diseases with inactivating and activating mutations of the CaR gene: familial hypocalciuric hypercalcemia (FHH) and neonatal severe hyperparathyroidism (NSHPT) are caused by inactivating mutations of the CaR gene, whereas autosomal dominant hypoparathyroidism is secondary to activating mutations of the CaR gene. In spite of being rare, these diseases should be considered in the differential diagnosis of hypercalcemic and hypocalcemic disorders. Recognition of the important role of the CaR for the regulation of extracellular calcium homeostasis motivated the development of drugs that modulate the CaR function, by either activating (calcimimetic drugs) or antagonizing it (calcilytic drugs). These drugs have potential therapeutic implications, such as medical control of specific cases of primary and uremic hyperparathyroidism with calcimimetic drugs and a potential

*Recebido em 15/01/2002
Revisado em 27/02/2002
Aceito em 03/03/2002*

treatment for osteoporosis with a calcilytic drug. (Arq Bras Endocrinol Metab 2002;46/4:411-417).

Keywords: Calcium-sensing receptor; Familiar hypocalciuric hypercalcemia; Neonatal severe hyperparathyroidism; Autosomal dominant hypoparathyroidism

Regulação da Homeostase do Cálcio Extracelular

O ÍON CÁLCIO (Ca^{2+}) é fundamental para uma grande variedade de processos intracelulares e extracelulares em todos os organismos. Intracelularmente, o cálcio está envolvido principalmente na proliferação, diferenciação e motilidade celular, no controle de diversas funções celulares como contração muscular, secreção hormonal e metabolismo do glicogênio, além de atuar como mensageiro secundário e cofator enzimático. No processo extracelular, participa de numerosas funções essenciais, tais como coagulação sanguínea, adesão celular, manutenção da integridade do esqueleto e regulação da excitabilidade extracelular (1,2).

O valor basal do cálcio intracelular (Ca^{2+}_i), geralmente em torno de 100nM, é aproximadamente 10.000 vezes menor do que a concentração do cálcio ionizado extracelular (Ca^{2+}_o), que é de cerca de 1mM. O Ca^{2+}_i pode sofrer rápidas elevações quando ocorre ativação celular, devido à liberação de cálcio do estoque intracelular e/ou proveniente do cálcio extracelular (2). Em contraste, o valor de Ca^{2+}_o medido no sangue varia muito pouco, permanecendo dentro de um intervalo estreito (1,14 – 1,30mmol/L). Neste sentido, um mecanismo ultra-sensível a pequenas mudanças de Ca^{2+}_o regula e mantém a homeostase desse íon (1,2).

A elucidação de um dos principais componentes deste mecanismo veio em 1993, quando Brown e cols. (3) identificaram o gene do receptor sensível ao cálcio extracelular (CaR) em células paratiroideanas bovinas, através de clonagem de expressão em oócitos de *Xenopus laevis*. O CaR é o mecanismo molecular pelo qual as células paratiroideanas e outras células reconhecem e respondem a pequenas mas fisiologicamente relevantes mudanças de Ca^{2+}_o , tendo, portanto, um papel fundamental no sistema homeostático responsável pela manutenção da constância do Ca^{2+}_o (1,4).

A homeostase do Ca^{2+}_o em mamíferos é mantida através de um complexo processo envolvendo a interação de alguns hormônios [paratormônio (PTH), 1,25-dihidroxitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), calcitonina] e sistemas orgânicos, como as glândulas paratiróides, células-C tiroideanas, rins, ossos e intestino (1).

Alterações na concentração de Ca^{2+}_o são reconhecidas pelas células sensíveis a essas mudanças por intermédio do CaR, resultando na ativação a curto prazo (minutos a horas) e a longo prazo (dias a semanas) da resposta homeostática, com a finalidade de normalizar o nível de cálcio (1,2).

Na vigência de hipocalcemia, por exemplo, há um aumento rápido da secreção de PTH pelas células paratiroideanas e, em questão de horas, há um aumento no nível de mRNA para a síntese de PTH. Esta resposta de aumento de secreção de PTH está diretamente relacionada ao mecanismo de percepção dos níveis séricos de cálcio, mediado pelo CaR. O PTH mobiliza o cálcio ósseo, aumentando o fluxo de cálcio do osso para a circulação sanguínea, reduz a excreção renal de cálcio (aumentando a reabsorção de cálcio pelos túbulos distais) e aumenta a produção de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a nível renal. Por sua vez, este metabólito ativo da vitamina D age no intestino aumentando a absorção do cálcio proveniente da dieta. Assim, através da ação conjunta do PTH e da vitamina D, a concentração de cálcio sérico se eleva, resultando na diminuição de PTH, completando o mecanismo clássico de *feedback* negativo (1,2,5).

Em contraste, na hipercalcemia ocorre a supressão da secreção de PTH e conseqüente redução da síntese de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, com resultante diminuição da reabsorção renal de cálcio, da mobilização do cálcio do osso e da absorção do cálcio pelo intestino. Neste caso, o excesso de cálcio circulante é “sentido” pelo CaR, que, uma vez ativado, sinaliza a informação para a célula paratiroideana secretar menos PTH. A hipercalcemia também estimula diretamente a secreção de calcitonina pelas células C tiroideanas através de um mecanismo de *feedback* positivo. A calcitonina é um hormônio que possui uma atividade hipocalcêmica e exerce sua função reduzindo o fluxo de cálcio do osso para o fluido extracelular e aumentando a excreção de cálcio. Entretanto, a calcitonina possui um efeito hipocalcêmico modesto em circunstâncias normais, quando comparado aos efeitos do PTH e da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (1,2,5). Assim, esses 3 hormônios calciotrópicos agem em seus órgãos efetores, principalmente osso, intestino e rins, alterando o transporte dos íons cálcio para o interior ou para o exterior do fluido extracelular, modulando desta forma a manutenção da homeostase desse íon (1,4).

Receptor Sensível ao Cálcio Extracelular (CaR)

O CaR, estando expresso em todos os tecidos relacionados à manutenção da homeostase do Ca^{2+}_o (6-11), exerce importante papel na manutenção desta homeostase. Expressão do CaR também é encontrada em

tecidos sem função aparente no controle homeostático do Ca^{2+}_o , como por exemplo mamas, pâncreas, diversas áreas do sistema nervoso central, queratinócitos, dentes etc... A função específica do CaR nestes tecidos ainda não está claramente estabelecida (1).

Subseqüentemente à clonagem do cDNA do CaR em paratiróide bovina (BoPCaR1) (3), homólogos do CaR bovino foram isolados em ratos (células C, cérebro, rim) (12), humanos (paratiróide, rim) (13,14), coelho (rim) (15) e galinha (paratiróide) (16), todos muito similares ao BoPCaR1. Os CaRs humano (1078 aminoácidos) e do rato (1079 aminoácidos), possuem estruturas altamente conservadas, com 93% de identidade com o BoPCaR1 (2,6,11). As características estruturais do CaR humano incluem um largo domínio extracelular (ECD) amino-terminal de 612 aminoácidos, um domínio central com cerca de 250 aminoácidos formando sete regiões transmembranas, característico dos receptores acoplados à superfamília da proteína G (GPCRs), e uma cauda carboxi-terminal com mais de 200 aminoácidos (4,17).

O CaR pertence a uma subfamília de GPCRs onde também estão incluídos os seguintes receptores: receptor metabotrópico do ácido glutâmico (18), receptores de feromônios (19-21), receptores gustativos (22) e receptor do GABA_B (23).

A clonagem do CaR também possibilitou a identificação de doenças hereditárias decorrentes de mutações inativadoras e ativadoras do gene desse receptor (1,4,24). Esses fatos reforçaram a importância do CaR na homeostase do Ca^{2+}_o e levaram os pesquisadores a uma reavaliação do conceito tradicional do papel desse íon. Neste sentido, o Ca^{2+}_o não pode mais ser visto como um componente passivo do fluido extracelular, mas sim comportando como um hormônio que modula a função do tecido alvo através de seu próprio receptor (1).

Doenças associadas com mutações inativadoras do gene do CaR: Hipercalcemia Hipocalciúrica Familiar (FHH) e Hiperparatireoidismo Neonatal Severo (NSHPT)

Na FHH e no NSHPT, mutações inativadoras do gene do CaR levam a uma resistência generalizada ao Ca^{2+}_o . Mais de 35 mutações inativadoras do gene do CaR já foram descritas em pacientes, com conseqüente FHH ou NSHPT (4,24). Muitas destas mutações são pontuais e se localizam no longo domínio extracelular do CaR, local de ligação do agonista cálcio ao receptor com sua conseqüente ativação (25). Entretanto, algumas mutações inativadoras já foram identificadas nos domínios transmembranosos e na cauda carboxi-

terminal (4,24). Estudos funcionais com células HEK293 transfectadas com DNA do CaR contendo estas mutações descritas em pacientes com FHH ou NSHPT comprovam a capacidade diminuída desta CaR mutado em “sentir” os níveis de cálcio extracelular circulantes (26,27), através da demonstração de um EC_{50} aumentado (por EC_{50} entende-se a concentração efetiva de cálcio extracelular que proporciona metade da resposta máxima referente à liberação de cálcio intracelular, medida por estes estudos funcionais).

A FHH é doença com herança autossômica dominante com uma penetrância superior a 90% (28-30). A maioria das famílias com FHH apresenta um *linkage* do gene afetado com o cromossomo 3 (banda q21-24), que sabidamente alberga o gene do CaR. Uma exceção diz respeito a uma família aparentemente portadora de FHH e que apresenta *linkage* com o braço curto do cromossomo 19 (banda 19p13.3) (31). A FHH é um distúrbio raro do metabolismo mineral caracterizado por hipercalcemia leve a moderada, geralmente assintomática. Esta hipercalcemia na maior parte dos casos não ultrapassa um valor de mais de 10% acima do limite superior da normalidade. O nível de PTH é inapropriadamente normal, e estes são os casos que podem criar dificuldades no diagnóstico diferencial entre FHH e os casos de hiperparatireoidismo primário com níveis de PTH normais. Os pacientes com FHH apresentam uma hipocalciúria relativa, frente à hipercalcemia vigente. Nestes casos, a razão do *clearance* renal de cálcio sobre o *clearance* de creatinina é inferior a 0,01. Esta razão geralmente é maior em pacientes com hiperparatireoidismo primário ou com outros distúrbios hipercalcêmicos. Os sintomas característicos e complicações que afetam pacientes com outras formas de hipercalcemia parecem não fazer parte da FHH. Entretanto, mesmo algumas famílias com FHH portadoras de hipercalcemia e/ou nefrolitíase já foram descritas (29,32). Alguns indivíduos de famílias com FHH apresentaram pancreatite, colelitíase ou condrocalcinose (24).

Em resumo, o diagnóstico de FHH pode ser estabelecido através da combinação de uma razão de *clearance* de cálcio sobre *clearance* de creatinina inferior a 0,01, nível de PTH normal e uma hipercalcemia leve e assintomática com herança autossômica dominante. Baseado nisso, é muito importante o diagnóstico diferencial com hiperparatireoidismo primário. Paratireoidectomia não está indicada nos pacientes com FHH e não deve melhorar a hipercalcemia destes casos, comprovando que o defeito nestes pacientes é intrínseco ao gene do CaR.

Via de regra, o valor da hipercalcemia nos pacientes com NSHPT é maior que nos pacientes com FHH. Os pacientes portadores de NSHPT apresentam hiperplasia de todas as paratiróides e esta doença pode ser fatal caso paratiroidectomia total não for realizada nas primeiras semanas de vida. O quadro clínico pode ser dramático, com presença de desmineralização óssea e múltiplas fraturas de ossos longos e costelas. Algumas crianças com NSHPT representam a forma homozigota da FHH (33). Mais raramente, pode ser verificada heterozigose composta, onde duas mutações inativadoras distintas foram herdadas, uma do pai e outra da mãe (34). Em alguns casos, pode ser observado o fenômeno de dominância negativa, onde um alelo mutado exerce um efeito inibidor sobre o alelo normal. Nesta situação, uma mutação inativadora heterozigota do gene do CaR, seja herdada ou *de novo* em uma criança com pais sem mutação no gene do CaR, pode levar à manifestação do fenótipo de NSHPT (35). Entretanto, é importante destacar que alguns relatos recentes documentam uma forma de NSHPT onde a hipercalcemia não era tão elevada e/ou transitória. Estes casos não estavam relacionados a famílias com FHH e podem responder bem ao tratamento clínico medicamentoso (24). Camundongos apresentando unicamente inativação heterozigota ou homozigota do gene do CaR foram estudados (36). Estes animais compartilham as alterações bioquímicas apresentadas por pacientes portadores de FHH e NSHPT, o que reforça a importância fisiológica do CaR no metabolismo mineral iônico.

Doença associada com mutações ativadoras do CaR: Hipocalcemia Autossômica Dominante

A hipocalcemia autossômica dominante é decorrente de mutações ativadoras do gene do CaR. Até o presente, mais de 20 mutações ativadoras distintas já foram descritas em pacientes portadores de hipocalcemia autossômica dominante (4,24). Da mesma forma que as mutações inativadoras, a maioria das mutações ativadoras do gene do CaR localiza-se no ECD. Mutações do gene do CaR em pacientes com hipocalcemia autossômica dominante via de regra levam a uma sensibilidade aumentada ao cálcio extracelular (37,38). A exceção a esta regra diz respeito a uma mutação constitutivamente ativadora (A843E) localizada no sétimo domínio transmembranoso do CaR (39). Estas mutações ativadoras, quando expressas em células HEK293 e estudadas funcionalmente, resultam em reduções do EC₅₀, o que denota uma sensibilidade aumentada ao agonista cálcio

(26,38,40). Indivíduos afetados de famílias com hipocalcemia autossômica dominante apresentam hipocalcemia de graus variados (geralmente entre 6,0 e 8,0mg/dL) na presença de níveis de PTH inapropriadamente baixos. Os níveis de PTH geralmente são mais baixos nos pacientes portadores de hipoparatiroidismo do que nos pacientes com hipocalcemia autossômica dominante. A presença de uma mutação ativadora do CaR, contrariamente ao que é observado na FHH, reduz a reabsorção renal de cálcio diante de uma calcemia inapropriadamente baixa (37). Desta forma, observamos uma hiper calciúria relativa nestes pacientes com hipocalcemia autossômica dominante.

Os pacientes com hipocalcemia autossômica dominante geralmente apresentam poucos sintomas. Entretanto, alguns pacientes mais jovens podem apresentar convulsões. Outros sintomas de hipocalcemia, como parestesias e tetania não são comuns (24). Hiperfosfatemia e hipomagnesemia podem ser observadas em alguns pacientes. A resposta ao tratamento com vitamina D é um diferencial em relação ao hipoparatiroidismo. No caso de pacientes com hipocalcemia autossômica dominante, a tentativa de reposição de cálcio e principalmente de vitamina D com o intuito de normalizar a calcemia pode piorar a hiper calciúria, podendo chegar ao ponto de apresentarem nefrocalcinose. Alguns pacientes também apresentam um diabetes insipidus nefrogênico. Isto reforça a idéia de que, nestes pacientes com hipocalcemia autossômica dominante, o sistema homeostático do cálcio está adaptado a uma calcemia inferior à calcemia normal e eventuais tentativas de torná-los normocalcêmicos podem resultar em hiper calciúria e diabetes insipidus nefrogênico (41). Assim, muito cuidado deve ser tomado no sentido de evitar o excesso de tratamento da hipocalcemia autossômica dominante com vitamina D ou suplementos de cálcio. O risco de nefrocalcinose durante o tratamento pode ser minimizado através da monitorização periódica da excreção urinária de cálcio (42).

Comentário final: Potencial terapêutico de drogas que modulam a atividade do CaR

Considerando que o CaR representa um alvo terapêutico em potencial, alguns compostos estão sendo testados com o objetivo de ativar o CaR (calcimiméticos) (43,44) ou inativá-lo (calciolíticos) (45,46).

Os calcimiméticos são compostos orais que ativam o CaR e conseqüentemente aumentam a sensibilidade do CaR ao cálcio extracelular, resultando em uma menor secreção de PTH. Diferentemente do agonista cálcio que ativa o CaR ligando-se a sítios de ligação situados principalmente no domínio extracelular (25), o

local de ação do calcimimético R-568 parece estar situado especificamente nos domínios transmembranosos (40). Esta inibição da secreção de PTH foi demonstrada *in vitro* e em pacientes portadores de hiperparatiroidismo primário (47,48) e urêmico (49,50). Desta maneira, constituem-se em excelentes candidatos para o manejo clínico de determinados casos de hiperfunção paratiroideana e de sua conseqüente hipercalcemia, como por exemplo em pacientes sem condições clínicas para um procedimento cirúrgico.

Neer e cols. (51) recentemente comprovaram o efeito benéfico do PTH 1-34 no tratamento de osteoporose na pós-menopausa. Estes autores verificaram que o uso de PTH 1-34 por via subcutânea diária esteve associado a um aumento significativo de massa óssea em fêmur e coluna vertebral e a um menor risco de fraturas vertebrais e não vertebrais. Com isto em mente, o desenvolvimento e a aplicabilidade clínica de uma droga calciolítica para o tratamento da osteoporose parece muito promissor. Tal droga, cuja farmacodinâmica é muito atraente por ser administrada via oral, age antagonizando o CaR e conseqüentemente estimula a secreção de PTH (45,46).

REFERÊNCIAS

1. Brown EM. Physiology and pathophysiology of the extracellular calcium sensing receptor. **Am J Med** 1999;106:238-53.
2. Brown EM. Extracellular Ca²⁺ sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca²⁺ and other ions as extracellular (first) messengers. **Physiol Rev** 1991;71:371-411.
3. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca²⁺ sensing receptor from bovine parathyroid. **Nature** 1993;366:575-80.
4. Hauache OM. Extracellular calcium-sensing receptor: structural and functional features and association with diseases. **Braz J Med Biol Res** 2001;34:577-84.
5. Brown EM, Pollak M, Seidman CE, Seidman JG, Chou YH, Riccardi D, et al. Calcium-ion-sensing cell-surface receptors. **N Engl J Med** 1995;333:234-40.
6. Garrett JE, Tamir H, Kifor O, Simin RT, Rogers KV, Mithal A, et al. Calcitonin-secreting cells of the thyroid express an extracellular calcium receptor gene. **Endocrinology** 1995;136:5202-11.
7. Freichel M, Zinc-Lorenz A, Hollishi A, Hafner M, Flockerzi V, Raue F. Expression of a calcium-sensing receptor in a human medullary thyroid carcinoma cell line and its contribution to calcitonin secretion. **Endocrinology** 1996;137:3842-8.
8. Gama L, Baxendale-Cox LM, Breitwieser GE. Ca²⁺-sensing receptor in intestinal epithelium. **Am J Physiol** 1997;273:C1168-75.
9. Chattopadhyay N, Cheng I, Rogers K, Riccardi D, Hall A, Diaz R, et al. Identification and localization of extracellular Ca²⁺-sensing receptor in rat intestine. **Am J Physiol** 1998;274:G122-30.
10. Yamaguchi T, Chattopadhyay N, Kifor O, Brown EM. Extracellular calcium (Ca²⁺)_o-sensing receptor in a murine bone marrow-derived stromal cell line (ST2): Potential mediator of the action of Ca²⁺_o on the function of ST2 cells. **Endocrinology** 1998;139:3561-8.
11. Yamaguchi T, Chattopadhyay N, Kifor O, Butters RR, Sugimoto T, Brown EM. Mouse osteoblastic cell line (MC3T3-E1) expresses extracellular calcium (Ca²⁺)_o-sensing receptor and its agonists stimulate chemotaxis and proliferation of MC3T3-E1 cells. **J Bone Miner Res** 1998;13:1530-8.
12. Riccardi D, Park J, Lee W-S, Gamba G, Brown EM, Hebert SC. Cloning and functional expression of a rat kidney extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor. **Proc Natl Acad Sci USA** 1995;92:131-5.
13. Garrett JE, Capuano IV, Hammerland LG, Hung BCP, Brown EM, Hebert SC, et al. Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs. **J Biol Chem** 1995;270:12919-25.
14. Aida K, Koishi S, Tawata M, Onaya T. Molecular cloning of a putative Ca²⁺-sensing receptor cDNA from human kidney. **Biochem Biophys Res Commun** 1995;214:524-9.
15. Butters RR Jr, Chattopadhyay N, Nielsen P, Smith CP, Mithal A, Kifor O, et al. Cloning and characterization of a calcium-sensing receptor from the hypercalcemic New Zealand white rabbit reveals unaltered responsiveness to extracellular calcium. **J Bone Miner Res** 1997;12:568-79.
16. Diaz R, Hurwitz S, Chattopadhyay N, Pines M, Yang Y, Kifor O, et al. Cloning, expression and tissue localization of the calcium-sensing receptor in the chicken (*Gallus Domesticus*). **Am J Physiol** 1997;273:R1008-16.
17. Bai M. Structure and function of the extracellular calcium-sensing receptor (review). **Int J Mol Med** 1999;4:115-25.
18. Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. **Science** 1992;258:597-603.
19. Matsunami H, Buck LB. A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. **Cell** 1997;90:775-84.
20. Ryba NJ, Tirindelli R. A new multigene family of putative pheromone receptors. **Neuron** 1997;19:371-9.
21. Herrada G, Dulac C. A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. **Cell** 1997;90:763-73.
22. Hoon MA, Adler E, Lindemeier J, Battey JF, Ryba NJP, Zuker CS. Putative mammalian taste receptors: a class

- of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. **Cell** 1999;96:541-51.
23. Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ, et al. Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. **Nature** 1997;386:239-46.
 24. Hendy GN, D'Souza-Li L, Yang B, Canaff L, Cole DE. Mutations of the calcium-sensing receptor (CASR) in familial hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia. **Hum Mutat** 2000;16:281-96.
 25. Bräuner-Osborne H, Jensen AA, Sheppard PO, O'Hara , Krogsgaard-Larsen P. The agonist-binding domain of the calcium-sensing receptor is located at the amino-terminal domain **J Biol Chem** 1999;274:18382-6.
 26. Bai M, Quinn S, Trivedi S, Kifor O, Pearce SHS, Pollak MR, et al. Expression and characterization of inactivating and activating mutations in the human Ca^{2+}_0 -sensing receptor. **J Biol Chem** 1996;271:19537-45.
 27. Bai M, Janicic N, Trivedi S, Quinn SJ, Cole DEC, Brown EM, et al. Markedly reduced activity of mutant calcium-sensing receptor with an inserted Alu element from a kindred with familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. **J Clin Invest** 1997;99:1917-25.
 28. Foley T Jr, Harrison H, Arnaud C, Harrison H. Familial benign hypercalcemia. **J Pediatr** 1972;81:1060-7.
 29. Marx SJ, Attie MF, Levine MA, Spiegel AM, Downs RW Jr, Lasker RD. The hypocalciuric or benign variant of familial hypercalcemia: clinical and biochemical features in fifteen kindreds. **Medicine (Baltimore)** 1981;60:397-412.
 30. Law WM Jr, Heath III H. Familial benign hypercalcemia (hypocalciuric hypercalcemia). Clinical and pathogenetic studies in 21 families. **Ann Intern Med** 1985;105:511-9.
 31. Heath H, Jackson C, Otterud B, Leppert M. Genetic linkage analysis of familial benign (hypocalciuric) hypercalcemia: evidence for locus heterogeneity. **Am J Hum Genet** 1993;53:193-200.
 32. Carling T, Szabo E, Bai M, Ridefelt P, Westin G, Gustavsson P, et al. Familial hypercalcemia and hypercalciuria caused by a novel mutation in the cytoplasmic tail of the calcium receptor. **J Clin Endocrinol Metab** 2000;85:2042-7.
 33. Pollak MR, Chou YH, Marx SJ, Steinmann B, Cole DE, Brandt ML, et al. Familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. Effects of mutant gene dosage on phenotype. **J Clin Invest** 1994;93:1108-12.
 34. Kobayashi M, Tanaka H, Tsuzuki K, Tsuyuki M, Igaki H, Ichinose Y, et al. Two novel missense mutations in calcium-sensing receptor gene associated with neonatal severe hyperparathyroidism. **J Clin Endocrinol Metab** 1997;82:2716-9.
 35. Bai M, Pearce SH, Kifor O, Trivedi S, Stauffer UG, Thakker RV, et al. *In vivo* and *in vitro* characterization of neonatal hyperparathyroidism resulting from a *de novo*, heterozygous mutation in the Ca^{2+} -sensing receptor gene: normal maternal calcium homeostasis as a cause of secondary hyperparathyroidism in familial benign hypocalciuric hypercalcemia. **J Clin Invest** 1997;99:88-96.
 36. Ho C, Conner DA, Pollak MR, Ladd DJ, Kifor O, Warren HB, et al. A mouse model of human familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. **Nat Genet** 1995;11:389-94.
 37. Pearce SH, Williamson C, Kifor O, Bai M, Coulthard MG, Davies M, et al. A familial syndrome of hypocalcemia with hypercalciuria due to mutations in the calcium-sensing receptor. **N Engl J Med** 1996;335:1115-22.
 38. De Luca F, Ray K, Mancilla EE, Fan GF, Winer KK, Gore P, et al. Sporadic hypoparathyroidism caused by *de novo* gain-of-function mutations of the Ca^{2+} -sensing receptor. **J Clin Endocrinol Metab** 1997;82:2710-5.
 39. Zhao XM, Hauache O, Goldsmith PK, Collins R, Spiegel AM. A missense mutation in the seventh transmembrane domain constitutively activates the human Ca^{2+} receptor. **FEBS Lett** 1999;448:180-4.
 40. Hauache OM, Hu J, Ray, Xie R, Jacobson KA, Spiegel AM. Effects of a Calcimimetic Compound and Naturally Activating Mutations on the Human Ca^{2+} Receptor and on Ca^{2+} Receptor/Metabotropic Glutamate Chimeric Receptors. **Endocrinology** 2000;141:4156-63.
 41. Chattopadhyay N, Mithal A, Brown EM. The calcium-sensing receptor: a window into the physiology and pathophysiology of mineral ion metabolism. **Endocrine Rev** 1996;17:289-307.
 42. Lienhardt A, Bai M, Lagarde JP, Rigaud M, Zhang Z, Jiang Y, et al. Activating mutations of the calcium-sensing receptor: management of hypocalcemia. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86:5313-23.
 43. Nemeth EF, Steffey ME, Hammerland LG, Hung BCP, Van Wagenen BC, DelMar EG, et al. Calcimimetics with potent and selective activity on the parathyroid calcium receptor. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998;95:4040-5.
 44. Nemeth EF, Steffey ME, Fox J. The parathyroid calcium receptor: a novel therapeutic target for treating hyperparathyroidism. **Pediatr Nephrol** 1996;10:275-9.
 45. Gowen M, Stroup GB, Dodds RA, James IE, Votta BJ, Smith BR, et al. Antagonizing the parathyroid calcium receptor stimulates parathyroid hormone secretion and bone formation in osteopenic rats. **J Clin Invest** 2000;105:1595-604.
 46. Nemeth EF, Delmar EG, Heaton WL, Miller MA, Lambert LD, Conklin RL, et al. Calcilytic compounds: potent and selective Ca^{2+} receptor antagonists that stimulate secretion of parathyroid hormone. **Pharmacol Exp Ther** 2001;299:323-31.
 47. Silverberg SJ, Bone HG 3rd, Marriott TB, Locker FG, Thys-Jacobs S, Dziem G, et al. Short-term inhibition of parathyroid hormone secretion by a calcium-receptor agonist in patients with primary hyperparathyroidism. **N Engl J Med** 1997;337:1506-10.
 48. Collins MT, Skarulis MC, Bilezikian JP, Silverberg SJ, Spiegel AM, Marx SJ. Treatment of hypercalcemia secondary to

parathyroid carcinoma with a novel calcimimetic agent. **J Clin Endocrinol Metab** 1998;83:1083-8.

49. Chin J, Miller SC, Wada M, Nagano N, Nemeth EF, Fox J. Activation of the calcium receptor by a calcimimetic compound halts the progression of secondary hyperparathyroidism in uremic rats. **J Am Soc Nephrol** 2000;11:903-11.
50. Goodman WG, Frazao JM, Goodkin DA, Turner SA, Liu W, Coburn JW. A calcimimetic agent lowers plasma parathyroid hormone levels in patients with secondary hyperparathyroidism. **Kidney Int** 2000;58:436-45.
51. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, et al. Effect of parathyroid hormone (1-34)

on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. **N Engl J Med** 2001;344:434-41.

Endereço para correspondência:

Omar M. Hauache
Disciplina de Endocrinologia – UNIFESP/EPM
Rua Pedro de Toledo 781 – 12º andar
04039-032 São Paulo, SP
Fax: (011) 5084-5231
e.mail: ohauache-endo@pesquisa.epm.br