

OLÍVIA LAQUIS DE MORAES

DESCRIÇÃO CLÍNICA, IMUNOHISTOQUÍMICA E ESTUDO DOS GENES VHL,
SDHB, SDHC, SDHD E MAX EM UMA SÉRIE DE PACIENTES COM
FEOCROMOCITOMA E PARAGANGLIOMA DO DISTRITO FEDERAL

BRASÍLIA

2014

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

OLÍVIA LAQUIS DE MORAES

DESCRIÇÃO CLÍNICA, IMUNOHISTOQUÍMICA E ESTUDO DOS GENES VHL,
SDHB, SDHC, SDHD E MAX EM UMA SÉRIE DE PACIENTES COM
FEOCROMOCITOMA E PARAGANGLIOMA DO DISTRITO FEDERAL.

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Lofrano Alves Porto

BRASÍLIA

2014

OLÍVIA LAQUIS DE MORAES

DESCRIÇÃO CLÍNICA, IMUNOHISTOQUÍMICA E ESTUDO DOS GENES VHL,
SDHB, SDHC, SDHD E MAX EM UMA SÉRIE DE PACIENTES COM
FEOCROMOCITOMA E PARAGANGLIOMA DO DISTRITO FEDERAL.

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Aprovado em 27 de fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Adriana Lofrano Alves Porto
Universidade de Brasília

Michella Soares Coelho
Universidade de Brasília

Augusto Cesar Florencio Costa
Universidade de Brasília

Dedico este trabalho ao meu avô Bráulio Magalhães Castro, eterno professor da Universidade de Brasília, idealizador da pesquisa brasileira e meu grande mestre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Adriana Lofrano Alves Porto por ter acreditado em mim desde o início, por ser meu exemplo, pela amizade, pela confiança, por saber me acalmar nos tempos de ansiedade, e por estar sempre disponível.

À minha eterna professora Fernanda Costa Vinhaes de Lima por ter me ensinado os primeiros passos da pesquisa científica e por sempre ter me incentivado. Muito obrigada pelo carinho e amizade durante todos esses anos.

À minha família, em especial minha mãe, pai e avó, que sempre apoiaram os meus sonhos e que muitas vezes colocaram os meus sonhos à frente dos deles.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa, por todo apoio e ajuda durante os experimentos, em especial à Beatriz Araújo e Cinthia Gabriel, pelo companheirismo e amizade.

À professora Juliana Mazzeu e à Pollyana Almeida por terem me acompanhado durante uma parte essencial deste trabalho, e por todos os ensinamentos.

Aos médicos que acompanharam os pacientes, em especial Mariani Batista, Cristiana, e as residentes de endocrinologia do HUB.

Aos professores, Leonora Vianna, Florêncio Cavalcanti, Yanna Nobrega e à técnica de laboratório Viviane Leal pela realização e interpretação da técnica de imunohistoquímica.

À Dayana Carla Oliveira, aluna de PIBIC, pela imensa ajuda com o resgate dos blocos de parafina e das informações clínicas nos prontuários.

Aos professores e alunos do FARMOL pelo apoio diário e cumplicidade, e em especial ao professor Francisco Assis Rocha Neves.

Ao Laboratório de Pediatria, especialmente ao Dr. Riccardo Pratesi, pelo apoio técnico e financeiro, para aquisição do material para o MLPA e realização dos sequenciamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao longo do período do mestrado, como bolsista.

Às minhas queridas amigas do laboratório Ádria do Prado, Isabella Gontijo e Mariella Lacerda pela convivência diária, acompanhamento nos experimentos, conversas filosóficas e risadas.

Às minhas “marmotas” Jéssica Merino, Flávia Cordeiro, Ramiro Cerb e Poliana Pereira, por serem os melhores amigos que alguém pode ter.

“The beautiful thing about learning is that nobody can take it away from you”.

(B.B. King)

RESUMO:

INTRODUÇÃO: Feocromocitomas (FEO) e paragangliomas (PGL) são tumores neuroendócrinos, originários de células chromafins, localizados na medula suprarrenal e em tecidos extra-adrenais, respectivamente. FEO e PGL são geralmente benignos, com morbidade e mortalidade relacionadas com a produção de catecolaminas. Malignidade é relatada em aproximadamente 10%, dos casos. Estudos recentes têm mostrado que, pelo menos, 25% de todos os casos de FEO / PGL podem ter uma base genética. **MÉTODOS:** 17 pacientes com FEO / PGL foram incluídos. Os dados clínicos, bioquímicos e radiológicos foram obtidos dos prontuários médicos. Estudos histopatológicos e imuno-histoquímico para marcadores neuroendócrinos foram realizados. DNA genômico foi extraído e as regiões codificantes dos genes *VHL*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *MAX* foram amplificadas e seqüenciadas automaticamente. A técnica de MLPA foi utilizada para a triagem de grandes deleções / inserções. A análise do gene *RET* foi realizada em um paciente com evidência clínica de neoplasia endócrina múltipla do tipo 2A (MEN2A). O consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos os pacientes. **RESULTADOS:** Este estudo é composto por 6 casos de PGL e 11 FEO, 5 pacientes tiveram história familiar positiva e 4 apresentaram malignidade. A análise Imunohistoquímica confirmou a origem de neuroendócrina de todos os tumores. A análise genética revelou a mutação (p.Q164R) no gene *VHL* em uma paciente do sexo feminino com FEO e hemangioblastoma cerebelar e sua filha assintomática. Uma mutação no gene *RET* foi encontrada (p.C618R), em uma paciente do sexo feminino com FEO e carcinoma medular da tireóide (CMT; NEM2A) e seus 2 filhas com CMT. Uma grande deleção do exon 1 do gene *SDHB* foi encontrada em quatro pacientes: Duas irmãs com PGL paraaortico, e dois casos aparentemente esporádicos apresentando PGL. **DISCUSSÃO:** O diagnóstico molecular feito pelo seqüenciamento de Sanger juntamente com o MLPA constitui uma estratégia adequada para procurar tanto mutações pontuais quanto grandes deleções. Associações genótipo-fenótipo para *VHL* e *RET* são bem descritos, mas os efeitos fisiopatológicos das grandes deleções no *SDHB* ainda não estão bem elucidados. Correlações fenotípicas ainda não foram bem caracterizados já que grandes deleções no *SDHB* tem uma apresentação muito variável. O *SDHB* pode atuar como um gene supressor tumoral, e uma grande deleção pode conduzir a um fenótipo tumoral. Estudos genéticos em pacientes com FEO e

PGL são recomendados, uma vez que as mutações podem também ser encontrados em casos aparentemente esporádicos, e que um resultado positivo pode influenciar a monitorização clínica e o aconselhamento genético dos pacientes e seus descendentes.

Palavras-chave: Feocromocitoma; Paraganglioma; Deleção; *SDHB*.

ABSTRACT:

INTRODUCTION: Pheochromocytomas (PCC) and Paragangliomas (PGL) are neuroendocrine tumors originating from chromafin cells, located in the adrenal medulla and extra-adrenal tissue, respectively. PCC and PGL are usually benign, with morbidity and mortality related to the production of catecholamines. Malignancy is reported in approximately 10% of cases. Recent studies have shown that at least 25% of all PCC/PGL cases may have a genetic basis. **METHODS:** 17 patients with PCC/PGL were included. Clinical, biochemical and radiological data were obtained from medical records. Histopathological and immunohistochemical studies for neuroendocrine markers were performed. Genomic DNA was extracted and the coding regions of *VHL*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *MAX* were amplified and automatically sequenced. Multiplex ligand-probe amplification (MLPA) was used for screening large deletions/insertions. *RET* gene analysis was also performed in one patient with clinical evidence of multiple endocrine neoplasia type 2A (MEN2A). Genuine consent was obtained from all. **RESULTS:** Our series consisted of 6 PGLs and 11 PCCs patients; 5 had familial history and 4 were malignant. Immunohistochemistry confirmed the neuroendocrine origin of all tumors. Genetic analysis revealed the (p.Q164R) *VHL* mutation in a woman with PCC and cerebellar hemangioblastoma and her asymptomatic daughter. A *RET* mutation was found (p.C618R) in a woman with PCC and thyroid medullary carcinoma (TMCa; MEN2A) and her 2 daughters with TMCa. A large deletion of *SDHB* exon 1 was found in 4 patients: Two sisters with paraortic PGL, and two apparently sporadic cases presenting with PGL. **DISCUSSION:** Molecular diagnosis done by Sanger's sequencing combined with MLPA constitute an adequate strategy to search for both point mutations and large deletions. Genotype-phenotype associations for *VHL* and *RET* are well described, but the pathophysiological effects of large deletions on *SDHB* are still unclear. No phenotype correlations have been characterized for large *SDHB* deletions due to a highly variable presentation. *SDHB* may act as a tumor suppressor, and a large deletion may lead to a tumor phenotype. Rational recommendations for genetic studies in PCCs and PGLs are in progress given that mutations may also be found in apparently sporadic cases, and that a positive result might influence clinical monitoring and genetic counseling of patients and their offspring.

Key-words: Pheochromocytoma; Paraganglioma; Deletion; *SDHB*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto histopatológico e imunohistoquímico característico de feocromocitoma.

Figura 2. Vias de sinalização mediadas por genes relacionados ao FEO/PGL, destacando aqueles em que comumente são encontradas mutações (círculos vermelhos) e seu provável efeito na célula.

Figura 3. Aspecto histológico e imunoexpressão da proteína SDHB em amostras de paragangliomas obtidos das pacientes 3 e 4 (PGL familiar).

Figura 4. Aspectos radiológicos e representação gráfica do resultado do MLPA para os genes *SDHx* da paciente nº 3

Figura 5. Aspectos radiológicos e representação gráfica do resultado do MLPA para os genes *SDHx* da paciente nº 4

Figura 6. Aspectos radiológicos representativos do paraganglioma do paciente nº 5.

Figura 7. Representação gráfica do resultado do MLPA para os genes *SDHx* da paciente nº 5, mostrando a deleção do exon 1 do *SDHB* (seta) em heterozigose.

Figura 8. Aspecto dos paragangliomas do caso nº 6 à tomografia computadorizada.

Figura 9. Aspectos dos paragangliomas do do caso nº 6.

Figura 10. Representação gráfica do resultado do MLPA para os genes *SDHx* da paciente nº 6, mostrando a deleção do exon 1 do *SDHB* em heterozigose.

Figura 11. Aspecto tomográfico do feocromocitoma e eletroferograma de parte da sequência do exon 3 do gene *VHL* da paciente nº 8.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos *primers* para amplificação do gene *VHL*.

Tabela 2. Sequência dos *primers* para amplificação do gene *SDHB*.

Tabela 3. Sequência dos *primers* para amplificação do gene *SDHD*.

Tabela 4. Sequência dos *primers* para amplificação do gene *MAX*

Tabela 5. Sequência dos *primers* para amplificação do gene *SDHC*

Tabela 6. Protocolo de amplificação do gene *VHL*.

Tabela 7. Protocolo de amplificação do gene *SDHB*.

Tabela 8. Protocolo de amplificação do gene *SDHD*.

Tabela 9. Protocolo de amplificação do gene *SDHC*.

Tabela 10. Protocolo de amplificação do gene *MAX*.

Tabela 11. Características clínicas e mutações genéticas em uma série de indivíduos portadores de feocromocitoma e paraganglioma atendidos no Hospital Universitário de Brasília.

Tabela 12. Perfil imunohistoquímico de uma série de feocromocitomas e paragangliomas atendidos no Hospital Universitário de Brasília.

Tabela 13. Levantamento de registros internacionais de deleções do exon 1 do gene *SDHB* em pacientes com feocromocitoma e paraganglioma.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CMT: Carcinoma Medular de Tireóide

CVD: Ciclofosfamida, Vincristina, Dacarbazina

DA: Dopamina

EPI: Epinefrina

FEO/PGL: Feocromocitoma ou Paraganglioma

FEO: Feocromocitoma

HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

HRT: Hospital Regional de Taguatinga

HUB: Hospital Universitário de Brasília

MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

NE: Norepinefrina

NEM2A: Neoplasia Endócrina Múltipla do tipo 2A

PASS: Pheochromocytoma of the adrenal gland scaled score

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PGL: Paraganglioma

PHD: Prolil Hidroxilase

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

SDH: Succinato Hidrogenase

TC: Tomografia Computadorizada

UnB: Universidade de Brasília

VEGF: Fator de crescimento epithelial

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1. DIAGNÓSTICO	17
2. ASPECTOS HISTOLÓGICOS E IMUNOHISTOQUÍMICOS	18
3. MALIGNIDADE	19
4. TRATAMENTO	21
5. GENÉTICA DOS FEOCROMOCITOMAS E PARAGANGLIOMAS	23
6. GENES RELACIONADOS À PATOGÊNESE DOS FEOCROMOCITOMAS E PARAGANGLIOMAS ANALISADOS NESSE ESTUDO	26
6.1 RET	26
6.2 VHL	27
6.3 MAX	28
6.4 SDHx	29
JUSTIFICATIVA	31
OBJETIVOS	33
1. OBJETIVO GERAL	33
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
MATERIAIS E MÉTODOS	34
1. SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES	34
2. IMPLICAÇÕES ÉTICAS	34
3. CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS SUJEITOS DO ESTUDO	35
4. ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO	35
5. EXTRAÇÃO DE DNA	38
6. QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO	38
7. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	39
8. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	42
9. SEQUENCIAMENTO GÊNICO	43
10. AMPLIFICAÇÃO MÚLTIPLA COM SONDAS DEPENDENTES DE LIGAÇÃO (MLPA - <i>Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification</i>)	43
RESULTADOS	44
1. IMUNOHISTOQUÍMICA	49
2. ESTUDO MOLECULAR	53
2.1 CASO 3	54
2.2 CASO 4	55

2.3 CASO 5	58
2.4 CASO 6	59
2.5 CASO 8	62
2.6 CASO 10	64
DISCUSSÃO	65
1.CONSIDERAÇÕES INICIAIS: ASPECTOS MOLECULARES E IMUNOHISTOQUÍMICA	66
2.CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ASPECTOS CLÍNICOS E MOLECULARES.....	67
3.DELEÇÃO DO EXON 1 DO GENE <i>SDHB</i>	69
CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	80
APÊNDICE B – TABELA DE ANÁLISE MOLECULAR POR GENES INDIVIDUAIS.	83
ANEXO A - APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA 061/12 PELO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA COM SERES HUMANOS DA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE.	84

INTRODUÇÃO

A organização mundial de saúde define os feocromocitomas (FEO) como tumores neuroendócrinos derivados das células cromafins localizados na medula da glândula adrenal, enquanto os paragangliomas (PGL) são tumores de origem semelhante, porém de localização extra-adrenal (1). Os paragangliomas podem ser originários do gânglios do sistema nervoso autônomo parassimpático ou tecido simpático (2, 3).

O primeiro estudo a demonstrar a presença de noradrenalina nos feocromocitomas foi o estudo de Holton³ e colaboradores em 1949. A partir de então, vários autores demonstraram a presença de catecolaminas produzidas pelas células cromafins dos feocromocitoma (4). Os paragangliomas de cabeça e pescoço, originários do tecido parassimpático são geralmente “silenciosos” e não produzem catecolaminas, enquanto os paragangliomas do tecido simpático são produtores de catecolaminas e normalmente estão localizados no abdômen, tórax e pelve (5-8).

A prevalência estimada dos FEO/PGL é de 1:4500/1:7000, com uma incidência anual de 3 a 8 casos por um milhão por ano na população geral (4, 9). Os tumores tem distribuição igual entre os sexos e podem aparecer em qualquer idade, mas ocorrem mais comumente entre as décadas de 40 e 50 anos (8, 10). Esses tumores podem produzir grandes quantidades de catecolaminas, principalmente adrenalina e noradrenalina em taxas muito superiores às normais (8, 11). A hipertensão é um sintoma frequente, e pode ser sustentada ou paroxística. Outros sintomas recorrentes são cefaleia, palpitações e sudorese. Também pode ocorrer ansiedade, tremores, náuseas, palidez, dor abdominal ou no tórax. Cerca de 10% dos pacientes são assintomáticos e existe um crescente número de tumores encontrados incidentalmente em exames de imagem de rotina (8, 12). Em alguns casos, feocromocitomas podem causar manifestações graves, tais como choque circulatório, insuficiência cardíaca, convulsões e acidente vascular cerebral, os quais representam importante causa de morbi-mortalidade (8).

Embora praticamente todos os feocromocitomas apresentem potencial de produção de catecolaminas, seu conteúdo e padrão de secreção é bastante variável

e depende da expressão de enzimas para sua biossíntese, bem como da presença de vias secretoras regulatórias e constitutivas. A maioria dos paragangliomas produzem norepinefrina (NE), enquanto os feocromocitomas produzem tanto NE quanto epinefrina (EPI). Alguns tumores produzem predominantemente EPI, geralmente tumores adrenais em pacientes com neoplasia endócrina múltipla do tipo 2 (MEN2) ou com neurofibromatose do tipo 1 (NF1). A quantificação dos metabólitos das catecolaminas, normetanefrinas e metanefrinas, tem sido uma forma de avaliar a produção global de NE e EPI, respectivamente.

As catecolaminas são metabolizadas dentro das células cromafins. Esse processo metabólico ocorre independentemente da secreção de catecolaminas para a corrente sanguínea. Dessa forma, foi demonstrado que a quantificação dos metabólitos das catecolaminas na urina e no plasma fornecem um diagnóstico mais sensível em relação à quantificação apenas das catecolaminas não metabolizadas (13). Em relação à produção de dopamina (DA), esta é facilmente convertida em NE, mas alguns feocromocitomas raramente produzem somente DA, ou DA e NE. A metoxitiramina é o metabólito que geralmente é utilizado para indicar a presença de tumores produtores de DA, porém de custo elevado e ainda pouco empregado na prática clínica (4).

1. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico dos FEO/PGL é feito com base em suspeição clínica e confirmado por meio da dosagem plasmática e/ou urinária das catecolaminas produzidas pelos tumores, ou de seus metabólitos. A análise bioquímica das catecolaminas é recomendada em pacientes sintomáticos, pacientes com incidentaloma adrenal, e em pacientes que apresentam risco hereditário de desenvolver a doença (13).

Uma vez evidenciada a hipersecreção de catecolaminas, por meio de dosagens bioquímicas, é realizada a busca para localização do tumor. Nesse sentido, tanto a tomografia computadorizada (TC) quanto a ressonância magnética nuclear (RMN) com contraste são indicadas, sendo a ressonância magnética escolhida em casos de pacientes grávidas, lactantes ou crianças, devido à ausência de radiação (13, 14). A

TC tem uma sensibilidade de 77-98% e uma especificidade de 22-92% na localização de tumores adrenais e extra adrenais. A RMN demonstrou uma precisão maior, com sensibilidade de 90-100% e especificidade de 50-100%, especialmente nos casos de tumores extra adrenais (14). O bloqueio farmacológico adrenérgico deve ser utilizado como medida preventiva antes da infusão de contrastes (15), os quais podem desencadear liberação aguda de catecolaminas e crise hipertensiva grave. A cintilografia com metaiodobenzilguanidina ([123I]-MIBG ou [131I]-MIBG) tem sido amplamente utilizada como técnica complementar ao diagnóstico por imagem (TC ou RMN), principalmente nos pacientes com PGL, cuja localização é variável e pode ser múltipla (13, 14). O MIBG apresenta similaridade química com a norepinefrina e se concentra nos tecidos cromafins por utilizar o mesmo transportador de norepinefrina humana, o que é altamente expresso nessas células e é responsável pela recaptação das catecolaminas do citoplasma, onde ocorre a maior parte do sua síntese, para as vesículas de estocagem dentro da célula. O [123I]-MIBG é superior ao [131I]-MIBG em termos de propriedades físicas, qualidade de imagens e sensibilidade. Um rastreamento do corpo inteiro pode permitir uma avaliação melhor de tumores com localização extra adrenal, de múltiplos tumores e de sítios metastáticos (14).

2.ASPECTOS HISTOLÓGICOS E IMUNOHISTOQUÍMICOS

Histologicamente, os FEO/PGL podem se apresentar de forma muito variada, mas geralmente se caracterizam por células basofílicas e anfofílicas com citoplasma abundante e um núcleo vesicular grande, (16) raramente o tipo celular dominante é pequeno ou fusiforme (17) Outra característica histológica desses tumores é a formação de núcleos alveolares ou “células de Zellballen”. Pleomorfismos celulares e nucleares são geralmente proeminentes, e glóbulos hialinos citoplasmáticos são frequentemente presentes, enquanto traços mitóticos são incomuns (16, 17).

Quanto ao perfil imunohistoquímico, as células desses tumores usualmente são positivas para cromogranina e sinaptofisina, os quais são antígenos marcadores de células neuroendócrinas (16, 18, 19). As células sustentculares são positivas para a proteína S-100, uma proteína ligada ao cálcio, expressa em uma série de células mesenquimais (16, 17). A ausência de positividade para o antígeno epitelial de

membrana, um marcador de diferenciação epitelial, é útil na diferenciação entre feocromocitomas e tumores renais de células claras. FEO/PGL são positivos para cromogranina A, e negativos para melanina A e queratinas, que são utilizadas como marcadores epiteliais, enquanto os tumores adrenocorticais são positivos para melanina A, inibina A, marcador de tumores do estroma e dos cordões sexuais das gônadas, (16, 20) fracamente positivos para queratina e negativos para cromogranina A (16). A figura 1 mostra cortes histológicos de um feocromocitoma.

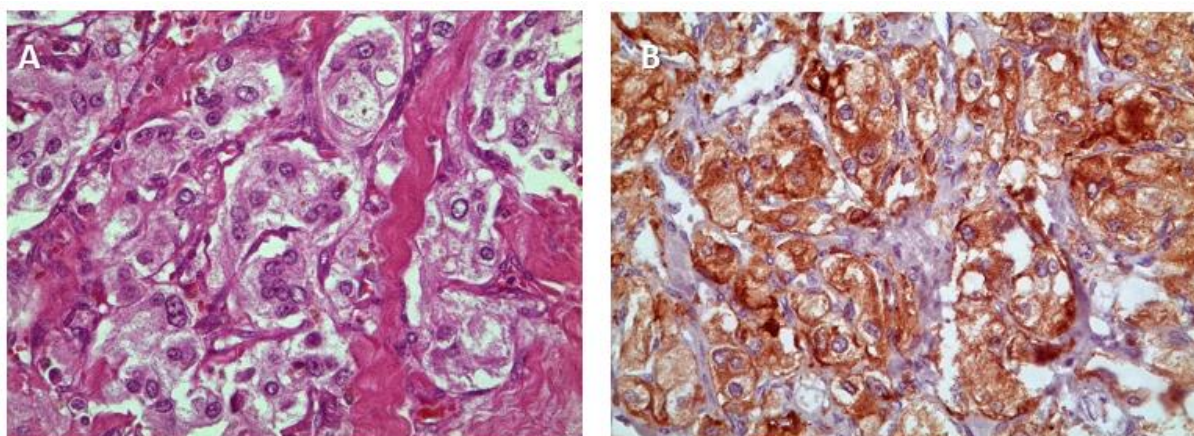


Figura 1. Aspecto histopatológico e imunohistoquímico característico de feocromocitoma. **A:** Fragmento de tecido tumoral, corado com Hematoxilina-Eosina, demonstrando células alveolares características desse tipo de tumor, com núcleos vesiculares e pleomórficos (Aumento de 1000x). **B:** Fragmento tumoral apresentando positividade para cromogranina A nas células tumorais (Aumento de 1000x).

3.MALIGNIDADE

A maioria dos FEO/PGL é benigna, porém cerca de 5% a 13% dos casos de FEO apresentam comportamento maligno. Nos casos de PGL, malignidade tem sido observada em 15% a 23% nos tumores simpáticos e em 2% a 20% nos tumores parassimpáticos. Essas frequências podem ser ainda maiores em pacientes com mutações germinativas, isto é, com doença hereditária (16, 21-23). O entendimento da patologia molecular desses tumores tem sido de grande importância, e durante a última década vem crescendo exponencialmente. Estudos recentes demonstram que mais de 30% dos pacientes acometidos com FEO/PGL tem predisposição hereditária, e cerca de 50% dos pacientes com doença metastática tem alguma mutação

germinativa (24, 25). O gene *SDHB* (*Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit*), que codifica a subunidade B da enzima succinato desidrogenase parece ter um papel importante na patogênese molecular desses tumores. Mutações nesse gene associam-se com risco maior de desenvolver malignidade e tumores extra adrenais (22, 23, 26).

A malignidade nos FEO/PGL é definida pela presença de metástases distantes do tumor de origem, frequentemente situadas em locais onde normalmente não há tecido cromafim. Essas metástases ocorrem principalmente nos ossos, fígado e pulmões (1, 8, 27).

Durante muitos anos tem se tentado estabelecer um critério histopatológico para diferenciar FEO/PGL benignos e malignos. O sistema do PASS (*Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score*) proposto por Thompson²⁸ e colaboradores, em 2002 foi o mais conhecido e utilizado, mas apresentava falhas como discrepância entre resultados de diferentes estudos, variabilidade quanto a análise por patologistas diferentes e falta de conhecimento das associações entre a classificação pelo sistema do PASS e o genótipo (21, 28)

Quanto aos critérios imunohistoquímicos, vários estudos também tentaram propor marcadores para diferenciar tumores malignos dos benignos, no entanto nenhum marcador de rotina foi de fato recomendado. O Ki-67 (*Antigen KI-67*), que é um marcador de proliferação celular utilizado para vários tipos de câncer foi proposto mas não demonstrou resultados satisfatórios (21).

Até o momento, não existem marcadores histológicos ou imunohistoquímicos suficientemente acurados para definir a malignidade dos FEO/PGL. Entretanto, algumas características histológicas podem ser indicativas de malignidade, como invasão capsular, invasão vascular, extensão para os tecidos adiposos peri-adrenais, crescimento difuso, necrose, aumento da celularidade, macronúcleos e aumento das mitoses. Células sustentaculares geralmente estão escassas ou ausentes nos tumores malignos (16).

4. TRATAMENTO

A ressecção cirúrgica constitui a base do tratamento dos FEO/PGL. Tem por objetivo a remoção total do tumor primário e, quando possível, a ressecção das metástases. A taxa de sobrevivência de 5 anos para pacientes com PGL maligno varia de 34% a 60% e costuma depender dos locais onde se encontram as metástases. Tumores com metástase para o fígado e pulmão tendem a conferir um prognóstico pior do que os que metastatizam para os ossos (14). No entanto o estudo de Ayla-Ramirez²⁹ e colaboradores (2013), recentemente demonstrou que FEO/PGL que apresentam metástases para os ossos tendem a ser de difícil tratamento e os pacientes costumam apresentar recidivas mais frequentes (29).

Desde o Primeiro Simpósio Internacional em Feocromocitomas, que aconteceu em 2005, foram feitas recomendações pré-operatórias para os pacientes com FEO/PGL. Foi estabelecido que todo paciente com tumor bioquimicamente ativo deveria receber tratamento pré-operatório para bloquear os efeitos da hiperssecreção de catecolaminas (30). A partir de então vários estudos tentaram padronizar um tratamento, mas até o momento não se chegou a nenhum consenso. Antagonistas adrenérgicos, bloqueadores dos canais de cálcio ou bloqueadores de receptor de angiotensina são recomendados no preparo pré-operatório. Para as taquiarritmias, bloqueadores adrenérgicos são mais frequentemente recomendados, porém alternativamente, bloqueadores dos canais de cálcio podem ser utilizados. Recomenda-se iniciar bloqueadores adrenérgicos alguns dias após a administração de antagonistas adrenérgicos para evitar crise hipertensiva causada pela hiperestimulação adrenérgica (14, 15).

O objetivo principal do tratamento pré-operatório medicamentoso de um paciente com FEO/PGL é normalizar a pressão arterial, a frequência cardíaca e a função dos outros órgãos sujeitos ao excesso de catecolaminas circulantes. Além disso, é necessário restabelecer a volemia e prevenir que o paciente entre em crise adrenérgica com consequências ao sistema cardiovascular. Geralmente o bloqueio adrenérgico se inicia de 7 a 14 dias antes da cirurgia, porém isso pode variar de acordo com cada centro de tratamento (15).

A abordagem laparoscópica dos tumores é a técnica cirúrgica preferencial, em serviços com experiência para a mesma, porém, em casos de tumores grandes e/ou com risco de malignidade, a via tradicional, por laparotomia, deve ser indicada (14).

Tratamento com radiofármacos pode ser considerado em pacientes com doença metastática ou lesões que não podem ser ressecadas. Normalmente é realizado com a utilização de isótopos beta-emissores associados ao MIBG ou análogos de somatostatina, ambos com grande afinidade pelo tecido tumoral. A expressão de receptores de somatostatina nos PGL e em alguns FEO malignos possibilita o tratamento com análogos de somatostatina (octreotide) marcados radioativamente, sendo os radionuclídeos mais comuns em utilização são os de Ítrio (^{90}Y -DOTA-TOC) e os de Lutécio (^{177}Lu -DOTATATE) (14).

Em pacientes com tumores locais avançados ou metastáticos, sem possibilidade de ressecção cirúrgica e/ou resistentes ao tratamento com radiofármacos, quimioterapia citotóxica pode estar indicada. O objetivo do tratamento com a quimioterapia é a redução do tumor, e o controle dos sintomas associados à secreção das catecolaminas. O protocolo mais utilizado e considerado eficaz utilizado até o momento é a combinação de Ciclofosfamida, Vincristina, e Dacarbazina (CVD) (14, 31).

O entendimento das vias moleculares responsáveis pela formação dos FEO/PGL pode conduzir à novas terapias alvo-, com intuito de melhorar a eficácia do tratamento. A efetividade dessas terapias se deve ao seu efeito citostático, já que interferem em alvos moleculares específicos que fazem parte do processo de carcinogênese (14).

O estudo de Welsh³² e colaboradores (2004), utilizando o PX-478, um agente que inibe os níveis intracelulares dos fatores induzíveis por hipóxia do tipo 1 (HIF-1: *hypoxia-inducible factor*) em células cancerosas, demonstrou que esse fármaco pode ter atividade antitumoral contra vários tipos celulares de câncer. Embora o aumento da expressão de HIFs seja achado comum em FEO/PGLs, estudos mais aprofundados em tumores desse tipo ainda devem ser conduzidos (32).

O estudo de Oh³³ e colaboradores (2012), utilizando monoterapia com everolimus (RAD001), um inibidor do mTOR (*Mammalian target of rapamycin*), em

pacientes com FEO/PGL maligno, demonstrou que 80.8% dos pacientes tiveram diminuição dos tumores. O everolimus mostrou-se ser uma droga promissora no tratamento de tumores neuroendócrinos silenciosos, tendo eficácia moderada em pacientes com FEO/PGL (33).

Estudos com sunitinib, um inibidor de receptores do tipo tirosina quinase, também mostraram que esse fármaco pode ser considerado um importante agente terapêutico, com potencial para uso clínico. Receptores do tipo tirosina quinase medeiam os efeitos celulares de moléculas importantes na angiogênese, como, por exemplo, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF: *Vascular endothelial growth factor*). Ao inibir a ação do VEGF, o sunitinib parece ter importante efeito no bloqueio da angiogênese por meio da inibição da via intracelular PI3K/Akt/mTOR/S6K1 (34) (PI3K: *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*) ; (Akt: *Protein Kinase B*); (S6K1: *Ribosomal protein S6 kinase beta-1*), tanto em células de feocromocitoma *in vitro*, quanto *in vivo* (34, 35).

Observa-se que um grande número de estudos tem buscado verificar os efeitos citostáticos de vários fármacos alvo-específicos, porém, a aplicação clínica dos mesmos ainda carece de mais evidências (14).

5.GENÉTICA DOS FEOCROMOCITOMAS E PARAGANGLIOMAS

A maioria dos casos de FEO e PGL tem um desenvolvimento esporádico, no entanto, cerca de 30-40% dos casos associam-se à herança genética (36-38). Os principais genes que estão envolvidos na susceptibilidade à manifestação desses tumores são: o gene supressor tumoral *VHL* (*Von-Hippel Lindau*) associado à síndrome de von Hippel-Lindau; o protooncogene *RET* (*ret proto-oncogene*) associado à neoplasia endócrina múltipla do tipo 2A (NEM2A); o gene supressor tumoral *NF1* (*Neurofibromatosis type 1*) associado à neurofibromatose do tipo 1; os genes que codificam as quatro subunidades (A, B, C e D) do complexo da succinato desidrogenase (SDH), e o gene *SDHAF2* (*Succinate Dehydrogenase Assembly Factor 2*) que codifica a enzima responsável por adicionar um grupamento flavina à subunidade SDHA; Os genes *TMEM127* (*transmembrane protein 127*), *MAX* (*MYC associated factor X*) e *HIF2A* (*endothelial PAS domain protein 1*) também foram

descritos como relacionados a patogênese desses tumores e, mais raramente, os genes *KIF1Bb* (*isoform of kinesin superfamily motor protein B*) e o gene *PHD2* (*PHD finger protein 2*) também foram associados aos FEO/PGL (36, 39).

Mutações somáticas nos genes *HIF2A*, *RET*, *VHL*, *NF1* e *MAX* também parecem constituir um papel importante na patogênese desses tumores. Portanto, a proporção de mutações encontradas em pacientes com FEO/PGL considerando mutações somáticas e germinativas, é estimada em 50% (36).

A classificação da patogênese molecular dos FEO/PGL pode ser dividida em dois grupos de acordo com vias diferentes de tumorigênese. O grupo 1 inclui mutações associadas com pseudo-hipóxia e com alterações na sinalização intracelular mediada pelo VEGF, enquanto o grupo 2 está relacionado com a ativação anormal das vias dependentes de sinalizadores do tipo quinase (40). As mutações do grupo 1 estão relacionadas com os genes *VHL* e *SDHx* (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*). As mutações do grupo 2 estão relacionadas aos genes *NF1*, *RET* e *KIF1Bb*. Os genes descritos mais recentemente, *TMEM127* e *MAX*, tem mais probabilidade de estarem relacionados ao grupo 2, enquanto os genes *HIF2A* e *PHD2* ao grupo 1 (36).

Mutações nos genes *VHL* e *SDHx* induzem a alterações na degradação de HIF-1 e HIF-2a, e resultam em seu acúmulo. Dessa forma a célula entra em estado de pseudo-hipóxia, aumentando as espécies reativas de oxigênio, diminuindo a resposta oxidativa e aumentando a angiogênese (36).

Mutações nos genes *SDHx* levam a um acúmulo de succinato, e, conseqüentemente, à queda na atividade da PHD a qual normalmente interrompe a hidrólise do HIF-1, preparando-o para ubiquitinação por meio da proteína VHL. Mutações no gene *VHL* alteram a formação da proteína VHL, que então deixa de ser capaz de degradar HIF-1 (36, 40). Na figura 2, encontram-se esquematizados esses processos que compõe as principais vias de sinalização tumorigênica dos FEO/PGL conhecidas até o presente.

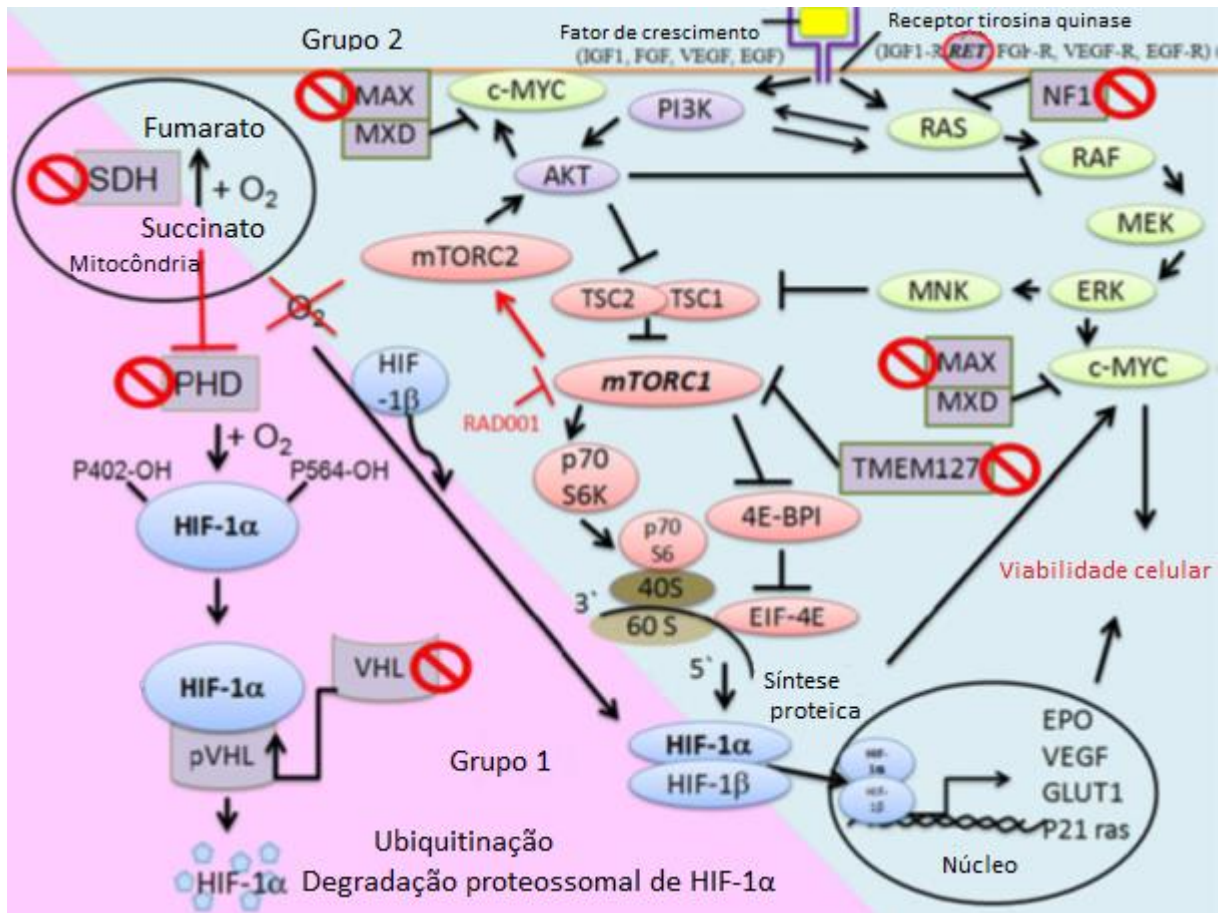


Figura 2: Vias de sinalização mediadas por genes relacionados ao FEO/PGL, destacando aqueles em que comumente são encontradas mutações (círculos vermelhos) e seu provável efeito na célula. Adaptado de Nolting e Grossmn⁴⁰.

O grupo 2 está relacionado com a ativação das vias de sinalização das quinases. O protooncogene *RET* é um receptor do tipo tirosina quinase expresso nas células da crista neural. Mutações nesse gene estão associadas com aumento da ativação da via PI3K/Akt. O gene *NF1* (supressor tumoral) codifica a proteína neurofibromina que inativa o RAS (*RAS oncogene*) mutações nesse gene ativam sinalização angiogênica através de RAS-mTOR. Mutações no gene *TMEM127* aumentam a atividade do mTOR por uma via independente das de *RET* e *NF1* (36, 40).

6.GENES RELACIONADOS À PATOGÊNESE DOS FEOCROMOCITOMAS E PARAGANGLIOMAS ANALISADOS NESSE ESTUDO

6.1 *RET*

O gene *RET* é um protooncogene que contém 21 exons, os quais compreendem 61kb. Codifica uma proteína de 1100 aminoácidos (41). Essa proteína é receptor transmembrânico do tipo tirosina quinase que atua no desenvolvimento da crista neural (39). Mutações germinativas de ganho de função no *RET* conferem predisposição a duas síndromes autossômicas dominantes: Neoplasia Endócrina Múltipla do tipo 2A (NEM2A) e Neoplasia Endócrina Múltipla do tipo 2B. Ambas apresentam predisposição ao desenvolvimento de Feocromocitoma e Carcinoma Medular de Tireóide (CMT) (36, 38, 39, 41).

A maioria das mutações identificadas no gene *RET* são mutações pontuais, do tipo *missense*, mas existem ainda algumas pequenas deleções ou inserções. As mutações nesse gene já são bem documentadas e caracterizadas, como por exemplo, a mutação C634R, e a M918T que são muito comuns (41). Mutações no gene *RET* tem relações genótipo-fenótipo bem caracterizadas (39, 41). As mutações que causam a NEM2 acontecem predominantemente na fase de leitura aberta, e a maioria altera uma cisteína do domínio extracelular (41).

Smith-Hicks⁴² e colaboradores (2000), desenvolveram um camundongo *knock-out* com a mutação mais comum do gene *RET* (M918T), o qual foi o primeiro camundongo com NEM2 a desenvolver feocromocitoma. Ainda, não foi encontrada nenhuma outra malformação que poderia ter sido causada pela presença da mutação (42).

A Neoplasia Endócrina Múltipla do tipo 2 ainda não foi associada à outro gene até o momento. As mutações *missense* e com ganho de função no *RET* estão relacionadas à NEM2, enquanto mutações *nonsense* e com perda de função estão relacionadas ao megacólon congênito (39, 41).

O estudo extensivo desse gene permitiu que fosse possível formular um modelo de gerenciamento da doença baseado no contexto molecular (39). O teste

genético em pacientes com MEN2A tem sido utilizado como forma efetiva de manejo da doença. A idade recomendada para realizar a análise do *RET* em membros da família de pessoas afetadas, bem como a tireoidectomia profilática depende do fenótipo da NEM2 e do genótipo do *RET*, respectivamente. Pacientes cujos genótipos conferem um prognóstico mais agressivo devem ser acompanhados com cautela (41).

6.2 VHL

A síndrome de von Hippel-Lindau (VHL) é autossômica dominante e está relacionada com o aumento da susceptibilidade à vários tumores, tais como hemangioblastoma do sistema nervoso central, feocromocitoma, carcinoma renal de células claras e angioma de retina. Cistos renais, pancreáticos e epididimais também são encontrados (38, 43, 44).

A síndrome de VHL é causada por mutações germinativas e somáticas no gene *VHL*, um gene supressor tumoral de 10.444 pb que codifica a proteína pVHL. Tumores com mutações no *VHL* são altamente vascularizados e produzem uma quantidade excessiva de mRNAs induzidos pela hipóxia como o VEGF. Vários mRNAs induzidos por hipóxia são controlados pelos fatores de transcrição heterodiméricos (HIF-1 e HIF-2). Em condições de normóxia, HIF-1a e HIF-2a são rapidamente poliubiquitilados e destruídos pelo proteassoma, mas em condições de hipóxia, o acúmulo de HIF-1 e HIF-2 ativa a transcrição de um variado repertório de mRNAs induzidos por hipóxia. A proteína pVHL tem assim o papel de “marcar” HIFs por meio de ubiquitinação, para que esse seja degradado pelo proteassoma (44).

Correlações genótipo-fenótipo foram descritas na síndrome de VHL, e esta pode ser dividida em dois subtipos: A síndrome de VHL tipo 1 não inclui o feocromocitoma como característica clínica, enquanto na síndrome de VHL tipo 2, o feocromocitoma é frequente. A síndrome de VHL do tipo 2 divide-se ainda em três categorias: tipo 2A, que está associada com baixo risco de carcinoma renal de células claras; tipo 2B, com alto risco de câncer renal; e tipo 2C, que é caracterizada apenas por feocromocitoma (43).

As características genéticas desses subgrupos também são distintas. A síndrome de VHL tipo 1 apresenta-se geralmente com mutações *missense* enquanto o tipo 2 apresenta grandes deleções, mutações *nonsense* e algumas mutações *missense*. A proteína pVHL alterada, em diferentes formas, age de forma diferente, o que pode contribuir para a variabilidade clínica da doença (39, 43, 44).

Pacientes que apresentam uma ou mais manifestações clínicas da síndrome de VHL ou tem um histórico familiar positivo devem ser submetidos ao teste genético para identificar mutações germinativas no gene *VHL*. Mutações germinativas no gene *VHL* também podem apresentar-se “de novo” e em alguns casos raros pode ocorrer mosaïcismo somático, o que dificulta ainda mais o diagnóstico (43).

6.3 MAX

A primeira descrição do gene *MAX* relacionada com FEO/PGL foi feita por Comino-Méndez⁴⁵ e colaboradores em 2005, em um estudo amplo do exoma de pacientes com feocromocitoma familiar sem mutação identificada nos genes de susceptibilidade descritos até então (45). Mutações somáticas também foram descritas relacionando esse gene aos feocromocitomas (46).

MAX é um gene supressor tumoral que codifica uma proteína de mesmo nome que contém um domínio de leucina e está associada com o fator de transcrição MYC, que é um oncogene comum em vários cânceres humanos. O heterodímero MYC-MAX se ligam às regiões promotoras de mais de 1000 genes que codificam proteínas com diversas funções celulares, incluindo, metabolismo, crescimento e angiogenese (39).

O mecanismo pelo qual as mutações no *MAX* causam FEO/PGL ainda é desconhecido, mas especula-se que esses tumores apresentam um aumento na transcrição de genes marcados pelo MYC (39).

6.4 SDHx

A enzima succinato desidrogenase é uma enzima mitocondrial que tem função no processo de geração de energia. Ela se localiza dentro da membrana interna mitocondrial e consiste em quatro subunidades diferentes: A, B, C e D (9). SDHA é uma flavoproteína hidrofílica que é utilizada como sítio para ligação de substratos. Juntamente com a SDHB, que é uma proteína de ferro-enxofre, forma a parte catalítica da enzima. A parte hidrofóbica é formada pelas subunidades SDHC e SDHD e estas servem como âncoras de membrana e sítio de ligação para a ubiquitinona (9, 47).

Três das quatro subunidades da SDH, B, C e D, estão fortemente associadas ao desenvolvimento de FEO/PGL. O mecanismo de tumorigênese das mutações nos genes *SDHx* também está relacionado com a pseudo-hipoxia, e a via de sinalização angiogênica através de HIF, porém de maneira um pouco diferente do mecanismo envolvido nas mutações do *VHL*. A perda da função da enzima SDH resulta em acúmulo de succinato, o qual afeta o processo de degradação de HIF. A degradação de HIF é dependente de sua hidroxilação em alguns resíduos de prolina, o que é feito pelas enzimas proil hidroxilazes (PHD). Na deficiência de SDH, o succinato acumula e inibe a atividade das PHDs (37).

No que diz respeito à correlação genótipo-fenótipo, pacientes com mutação nos genes *SDHx* mostram diferenças significantes na apresentação dos sintomas, de acordo com a subunidade da SDH que contém a mutação. Tumores com mutação no *SDHB* estão associados a elevado potencial de malignidade e são predominantes no abdômen, enquanto mutações no *SDHC* causam tumores, na sua maioria, benignos e comumente localizados na cabeça ou pescoço (48).

O padrão de herança dos tumores com mutação nos *SDHx* parece também diferir de acordo com a subunidade envolvida. Enquanto as mutações no *SDHB* e *SDHC* tem herança predominantemente autossômica dominante, aquelas no *SDHD* e *SDHFA2* costumam apresentar herança paterna de transmissão (48).

Além dos testes genéticos para identificar mutações nos genes *SDHx*, técnicas de imunohistoquímica vem sendo implantadas com o objetivo de facilitar a identificação dessas mutações. Como proposto inicialmente por van Nederveen⁴⁹ e colaboradores (2009), tumores com mutações nos *SDHx* aparentam ter uma perda de

expressão da enzima, impedindo ou comprometendo significativamente sua identificação na célula, isto é, a sua marcação por um anticorpo anti-SDH (49). Acredita-se que a ausência de marcação possa representar um valioso método de diagnóstico complementar nos casos com mutações nos SDHx. Essa técnica foi confirmada recentemente por Castelblanco⁵⁰ e colaboradores (2013), que demonstraram que a ausência de reatividade imunohistoquímica para SDHB é uma técnica útil para indicar mutações nos *SDHx*, e poderia ser utilizada para um rastreamento inicial e até mesmo para substituir técnicas de rastreamento genético de alto custo (50).

JUSTIFICATIVA

Os tumores produtores de catecolaminas são neoplasias raras. Cerca de 10% podem ter comportamento maligno. O padrão histológico e bioquímico dos feocromocitomas malignos é indistinguível dos tumores benignos. Até o momento, não há marcador histopatológico, imunohistoquímico ou molecular confiável para distinguir lesões benignas de malignas. Portanto, a malignidade só é comprovada pela ocorrência de metástases em células não-cromafins em locais distantes do tumor primário, o que pode ocorrer até 20 anos após a ressecção do tumor primário (51).

Ainda não existe tratamento eficaz para o feocromocitoma maligno. Estabelecer as vias de tumorigênese e malignidade no feocromocitoma e identificar seus marcadores moleculares representam objetivos importantes que possibilitariam tirar proveito da natureza da funcionalidade e do fundo genético destes tumores para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Nesse contexto, o estudo das causas moleculares dos feocromocitomas/paragangliomas muito tem contribuído para o esclarecimento de sua fisiopatologia, com potencial impacto sobre o seu tratamento e prognóstico, estendendo-se ao tratamento de diversos outros tipos de câncer. Evidências científicas recentes sugerem que o estudo molecular de genes envolvidos no desenvolvimento de tumores familiares deve ser realizado em todos os casos de FEO/PGL, inclusive naqueles aparentemente esporádicos (52). A identificação de mutações nos indivíduos afetados pode contribuir de maneira significativa para melhoria do prognóstico da doença, uma vez que permite o desenvolvimento de estratégias de rastreamento de recidivas e tratamento racionais e individualizadas.

O presente estudo constitui investigação sobre os defeitos genéticos presentes em uma série de 17 casos de feocromocitoma e paraganglioma atendidos em ambulatório de referência, no Distrito Federal. Trata-se da descrição detalhada de uma série inicial, porém significativa, de casos brasileiros, a qual vem somar-se aos demais descritos na literatura, procedentes de diversas partes do mundo.

Em revisão ampla da literatura realizada para o presente estudo, não foram identificadas séries de casos de FEO/PGL provenientes do Brasil. Há apenas uma família brasileira descrita, cujo estudo molecular foi realizado em colaboração com um grupo de pesquisa dos Estados Unidos (53). Embora realizado em número

relativamente pequeno de pacientes, em se tratando de uma doença rara, o presente trabalho pode trazer importante contribuição aos dados internacionais já existentes. Ademais, representa o primeiro estudo brasileiro em que foi realizada a análise molecular de genes relacionados à patogênese desses intrigantes tumores endócrinos, cuja patogênese é ainda pouco esclarecida e vem sendo investigada de forma crescente nos últimos anos.

OBJETIVOS

1.OBJETIVO GERAL

Investigar os aspectos clínicos, bioquímicos, imunohistoquímicos e genético-moleculares de uma série de casos de feocromocitoma e paraganglioma atendidos no ambulatório de Endocrinologia das Gônadas e Adrenais do Hospital Universitário de Brasília (HUB)

2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os aspectos clínicos de uma série de casos de feocromocitoma e paraganglioma atendidos no ambulatório de Endocrinologia das Gônadas e Adrenais do Hospital Universitário de Brasília.
- Investigar os aspectos bioquímicos ao diagnóstico de uma série de casos de feocromocitoma e paraganglioma atendidos no ambulatório de Endocrinologia das Gônadas e Adrenais do Hospital Universitário de Brasília.
- Investigar os aspectos imunohistoquímicos de uma série de feocromocitomas e paragangliomas de pacientes atendidos no ambulatório de Endocrinologia das Gônadas e Adrenais do Hospital Universitário de Brasília.
- Investigar a ocorrência de mutações germinativas nos genes *VHL*, *SDHB*, *SDHD*, *SDHC* e *MAX* em indivíduos portadores de feocromocitomas ou paragangliomas atendidos no ambulatório de Endocrinologia das Gônadas e Adrenais do Hospital Universitário de Brasília.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de estudo observacional, com um componente descritivo e um analítico. O componente descritivo baseou-se em revisão de dados clínicos provenientes de prontuários de indivíduos portadores de feocromocitoma ou paraganglioma atendidos no ambulatório de Endocrinologia das Gônadas e Adrenais do Hospital Universitário de Brasília. O componente analítico incluiu: a) a realização de estudo imunohistoquímico em amostras de tecido tumoral, e b) a realização de estudo genético-molecular de 5 genes relacionados à patogênese de feocromocitomas e paragangliomas nesses indivíduos.

1.SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES

Os sujeitos desta pesquisa foram selecionados no ambulatório de Endocrinologia das Gônadas e Adrenais do Hospital Universitário de Brasília.

Foram selecionados todos os indivíduos diagnosticados previamente com feocromocitoma ou paraganglioma, entre 2002 e 2013, que foram submetidos à cirurgia e nos quais foi comprovada a doença com base em estudo histopatológico das amostras de tumor obtidas na cirurgia.

Foram excluídos os indivíduos que não apresentavam dados clínicos suficientes, ou estudo histopatológico, ou dos quais não foi possível dispor de amostras de sangue para estudo genético-molecular.

2.IMPLICAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi aprovado sob o número 061/ 12 pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília (UnB) (ANEXO A). A aprovação foi baseada na resolução 196/96 do Conselho Nacional da Saúde, Ministério da Saúde. Todos os sujeitos participaram da pesquisa mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A).

3.CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS SUJEITOS DO ESTUDO

As informações clínicas dos pacientes selecionados para este estudo foram obtidas por meio de consulta aos prontuários dos mesmos no acervo de registros do Hospital Universitário de Brasília.

Os parâmetros considerados foram: dosagem de metanefrinas e/ou catecolaminas urinárias (na ausência de registros da dosagem das catecolaminas urinárias foram consideradas as plasmáticas); exames de imagem como Ressonância Magnética Nuclear ou Tomografia Computadorizada; Cintilografia com ¹³¹I- ou ¹²³I-MIBG; e histórico familiar de tumores neuroendócrinos ou tumores associados a síndromes de neoplasia endócrina múltipla.

4.ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO

Os blocos de parafina contendo fragmentos de tumores extraídos dos sujeitos do estudo foram resgatados dos arquivos do Hospital Universitário de Brasília e do Hospital Regional da Asa Sul, locais onde foram realizadas cirurgias e onde os mesmos foram disponibilizados, sob concordância dos sujeitos. Os procedimentos de imunohistoquímica foram realizados no laboratório de anatomia patológica do Hospital Universitário de Brasília, por meio de colaboração com a professora Leonora Maciel Vianna, e no laboratório privado LIB & BIÓPSIA, em colaboração com o professor Dr. Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto, ambos patologistas e professores da Universidade de Brasília.

As amostras de tecido tumoral emblocadas em parafina foram cortadas em micrótomo Microm HM340 (Thermo Scientific, Canadá), e cortes histológicos de 5 µm de espessura, transversais em relação ao maior eixo do fragmento do tumor, foram realizados.

Os cortes histológicos foram fixados em lâminas previamente silanizadas com Poly-L-Lisina a 0.01% (Sigma-Aldrich, EUA), e em seguida foram colocados em estufa a 37°C por cerca de 1h, para iniciar o processo de desparafinização, que se continuou com xilol em concentrações decrescentes para clarificação do material e remoção total da parafina. Na etapa seguinte, as lâminas foram submetidas à remoção do xilol e à

hidratação com etanol em concentrações decrescentes (99.5%, 90%, 70%). E na etapa final foram colocadas em água destilada para hidratação total.

Como normalmente as amostras de tecido tumoral antes de serem emblocadas são submetidas à fixação com formol a 10%, as proteínas celulares ou antígenos alvos sofrem alterações em seus epítomos, o que torna o reconhecimento antigênico difícil. Desta forma, depois que as lâminas estavam hidratadas, foram submetidas ao processo de recuperação antigênica. Para essa etapa, as lâminas foram colocadas em solução de ácido cítrico 10x e pH 6.02, e submetidas à temperatura de 100-120°C sob pressão de 1.44-2.0 atm, por 5 min, e resfriadas em temperatura ambiente. Esse processo expõe os epítomos alterados pela fixação com formol a 10%.

Após a recuperação antigênica, as lâminas foram bloqueadas para a presença da enzima peroxidase, geralmente endógena nas células teciduais. O bloqueio é realizado com peróxido de hidrogênio 3% em metanol, por 17 minutos, tempo suficiente para esgotamento da peroxidase endógena, e em seguida as lâminas foram lavadas em água destilada.

Em seguida, as lâminas foram incubadas em tampão fosfato, pH 7,02, em temperatura ambiente por 5 minutos e depois lavadas com água destilada. No passo seguinte as lâminas foram incubadas em tampão fosfato contendo albumina bovina sérica (BSA) a 3% por 5 minutos, para que as ligações proteicas inespecíficas fossem bloqueadas.

Às lâminas contendo os cortes foram adicionados os anticorpos, e foi utilizada a caneta Dako Pen para delimitar os cortes histológicos, quando a lâmina continha mais de um corte. Os anticorpos primários específicos foram diluídos (1/200 ou 1/250) em BSA a 1% em tampão fosfato, e 25 µL do anticorpo diluído foram colocados na lâmina por 2 horas a temperatura ambiente e em câmara úmida. Em seguida, as lâminas foram lavadas por 3 vezes com água destilada e 25 µL do anticorpo biotilado secundário correspondente foi adicionado e incubado nas mesmas condições por 15 minutos. Depois de transcorrido o tempo, novas lavagens foram feitas e 25 µL do substrato estreptoavidina marcada com peroxidase foram colocados e incubados por 5 minutos, nas mesmas condições (kit DAKO LSAB+, Peroxidase-Universal-K0690). Em seguida as lâminas foram incubadas por 15 minutos com 25 µL de diaminobenzidina (DAB), um cromógeno que reage com a peroxidase associada a estreptoavidina, emitindo coloração. A reação foi interrompida com água destilada e

as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer por 18 minutos, para que as estruturas não marcadas pudessem também ser visualizadas ao microscópio; em seguida foram embebidas em solução de hidróxido de amônia 3% (Vetec, Brasil), lavadas em água destilada, e montadas para análise microscópica (desidratação em etanol com concentração crescente e depois retirada do álcool em xilol de concentração crescente). Após a secagem das lâminas, as lamínulas foram fixadas com Entellan (Merck Millipore, Alemanha) para conservação da amostra.

Os anticorpos utilizados e suas diluições são demonstrados abaixo:

- *Goat anti-rabbit secondary antibody conjugated to HRP – DHPR – 999*
(Spring)
- *Liquid DAB+ Substrate Chromogen System* (Dako)
- *Monoclonal Mouse Anti- Vimentin - Clone V9 – 1:200* (Dako)
- *Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen - Clone MIB-1 – 1:200* (Dako)
- *Monoclonal Mouse Anti-Human Neuron-Specific Enolase (NSE) – 1:200*
(Dako)
- *Monoclonal Mouse Anti-Synaptophysin - Clone SY38 - 1:200* (Dako)
- *Mouse monoclonal [21A11AE7] to SDHB – 1:250* (ABcam)
- *Polyclonal Rabbit Anti- S100 – 1:200* (Dako)
- *Polyclonal Rabbit Anti-Cromogranin A – 1:200* (Dako)
- *Rabbit anti-mouse secondary antibody – DCMT – 999* (Spring)

À exceção do anticorpo anti-SDHB, todos os demais foram utilizados com o intuito de confirmar a origem neuroendócrina dos tumores. A imunohistoquímica para SDHB foi realizada com o objetivo de verificar a expressão dessa proteína nos tumores e correlacionar esse achado com a ocorrência de mutações no gene que a codifica.

As lâminas foram analisadas por microscopia óptica.

5. EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA genômico foi obtido de leucócitos do sangue periférico por meio de punção venosa de 12 a 16 mL de sangue em 4 tubos contendo o anticoagulante EDTA. A extração do DNA foi feita por meio do método *salting out* adaptado de John e colaboradores (54). Um dos tubos foi congelado a fim de manter material viável por mais tempo, caso fosse necessário realizar uma nova extração. O material dos outros três tubos foi transferido para um tubo falcon de 50 mL e acrescentado 30mL de tampão de lise de hemácias (1mM NH_4HCO_3 +1,4 mM NH_4Cl). A solução foi homogeneizada e incubada durante 30 minutos em gelo e posteriormente o material foi centrifugado a 3000rpm, 4°C, durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e mais tampão de lise foi acrescentado, novamente incubado e centrifugado. Essa etapa foi repetida de três a cinco vezes até se obter um sedimento de leucócitos limpo ao fundo do tubo cônico.

A esse sedimento acrescentou-se 9mL de TEN (TRIS 10mM ph8, EDTA 10mM ph8, NaCl_2 150mM ph8), 180 μL de SDS10% e 45 μL de Proteinase K. Em seguida, foi feita homogeneização com pipeta Pasteur de plástico, e incubou-se a 37° C *overnight*. Após a incubação foram acrescentados 3,6mL de NaCl super saturado (6M), centrifugado a 3000rpm por 15 minutos em temperatura ambiente, e o sobrenadante foi transferido para outro tubo cônico. Ao sobrenadante foram acrescentados cerca de 20mL de etanol absoluto gelado (JT Baker) para precipitar o DNA, e este foi retirado com auxílio de uma pinça ou bastão de vidro e transferido para um tubo de 1,5mL. Por fim, foram realizadas três lavagens com álcool 70% (JT Baker), e após a secagem, o DNA foi eluído em TE (TRIS 2mM ph8, EDTA 0,5 mM ph8).

6. QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO

Para avaliar a quantificação e pureza do DNA extraído foi utilizado o espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Eletronics), que quantifica ácidos nucleicos à um comprimento de onda de 260nm. A pureza do DNA pode ser avaliada pela razão entre a quantificação a 260nm e 280nm (que corresponde à absorbância para proteínas). Quando a razão se mostrou acima de 1,8 o DNA foi considerado puro. Se

a concentração (aceitável acima de 50ng/μL) ou a pureza do DNA se apresentassem insuficiente, outra amostra era extraída.

7.AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

As reações de PCR para os genes *VHL*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* e *MAX* foram feitas utilizando a GoTaq® Green Master Mix (Promega) de acordo com as orientações do fabricante. Para amplificação dos genes escolhidos foram utilizados iniciadores (*primers*) que foram desenhados para amplificar as regiões codantes de cada gene com o auxílio do software Primer-BLAST. As reações de PCR foram realizadas nos termocicladores TC-3000 (Techne) e T100™ (Bio-Rad).

A sequência dos *primers* para cada exon de cada gene, bem como os protocolos de amplificação podem ser visualizados nas tabelas de 1 a 10.

Tabela 1. Sequência dos *primers* para amplificação do gene *VHL*.

<i>VHL</i>	<i>Primer</i>
1F	5' CCATCCTCTACCGAGCGCGCG 3'
1R	5' GGGCTTCAGACCGTGCTATCG 3'
2F	5' CTTTAACAACCTTTGCTTGTCCCGATA 3'
2R	5' GTCTATCCTGTACTIONTACCACAACAAC 3'
3F	5' CTGAGACCCTAGTCTGCCACTGAGGA 3'
3R	5' CAAAAGCTGAGATGAAACAGTGTA 3'

Tabela 2. Sequência dos *primers* para amplificação do gene *SDHB*.

<i>SDHB</i>	<i>Primer</i>
1F	5' TCCTCAGTGGATGTAGGCTG 3'
1R	5' TATGCTTCCTCAGTCTCTCCG 3'
2F	5' ATCCAGCGTTACATCTGTTGTG 3'
2R	5' AGCCATCGGATGATCTCAGA 3'
3F	5' TACATCCAGGTGTCTCCGATTA 3'
3R	5' CAGAACTTGCACCATGGTTAG 3'
4F	5' ACAGCAAGGAGGATCCAGAA 3'
4R	5' GGTCCCTCCTGCCATAATA 3'
5F	5' TGGACGAGTAGTCAGTGTCCAA 3'
5R	5' GCCAGTTCCTCTCCAGAATACA 3'
6F	5' AATTCACATGCAAGTAGGCACT 3'
6R	5' CTCAGAATGGCTGGCTTACAG 3'

7F	5' ATCAAGTGAAGCTACAAGTGTTGG 3'
7R	5' TACTCCTTGCAACTAAGAGCCA 3'
8F	5' ATTCACCTTGCTTGGACACTG 3'
8R	5' ATTATGTTGAGCTCTGAGCTGG 3'

Tabela 3. Sequência dos *primers* para amplificação do gene *SDHD*.

<i>SDHD</i>	<i>Primer</i>
1F	5' TCACCCAGCATTTCCTCTTCC 3'
1R	5' GGGTAAACATCTGGACCCCT 3'
2F	5' ACTTCACAGTAACCCAGTGA 3'
2R	5' TAATGGCACTGTCTGCCCAA 3'
3F	5' CAGTTTGGGTTACTGTGTGGC 3'
3R	5' GGCATTTCAATCAACTTCTCCCTC 3'
4F	5' CAGTGGAGTGGCAAATGGAGA 3'
4R	5' GGCATGACAAAGCAGAGGCA 3'

Tabela 4. Sequência dos primers para amplificação do gene *SDHC*.

<i>SDHC</i>	<i>Primer</i>
1F	ACTCTCGTCACATGACACCC
1R	TGCCCAGGCACAGGATAAAC
2F	ACTTTTAATCTATCCCTTCACCCCT
2R	TGTCTACAACACTGCCCACTGTC
3F	TTCTCCATGTTGGTCAGGCT
3R	CTGGCTCCAGAATCCTTCCT
4F	GTGCCTATTTCAGAATTAGTTT
4R	GAATCTGAGCACAGTGCAAAC
5F	GCTGTGACAAGCTACTTGGT
5R	TGTGCAAATCCCGAATTAAC
6F	AGGTGGGGCATAAGGGTAGA

Tabela 5. Sequência dos *primers* para amplificação do gene *MAX*.

<i>MAX</i>	<i>Primer</i>
1F	5'AGAGGGACAAGAACTACAAGTCTCG 3'
1R	5'CGGAGGGGAGCGAACCG 3'
2F	5'CCGCCGGCATTTCCTTTCTTA 3'
2R	5'CCCCACCTCACCTTAGTGGTT 3'
3F	5'ATGTTCCCTGTCGCAAGCGTT3'
3R	5'CCCAATAGGTGAGTGCTCTGC 3'
4F	5'AGCTCGTTCTCCCAAGCTATTTA3'
4R	5'AGGTCAGTGGCTGATTCAGT 3'

Tabela 6. Protocolo de amplificação do gene *VHL*.

GENE <i>VHL</i>		
Temperatura	Tempo	Nº ciclos
95°C	3 min	1
96°C	30 seg	
56°C	30 seg	35
72°C	1 min	
72°C	10 min	1
4°C	∞	∞

Tabela 7. Protocolo de amplificação do gene *SDHB*.

Gene <i>SDHB</i>		
Temperatura	Tempo	Nº ciclos
95°C	5 min	1
95°C	1 min	
53°C	1 min	35
72°C	1 min	
72°C	10 min	1
4°C	∞	∞

Tabela 8. Protocolo de amplificação do gene *SDHD*.

Gene <i>SDHD</i>		
Temperatura	Tempo	Nº ciclos
95°C	3 min	1
95°C	30 seg	
55°C	30 seg	30
72°C	1 min	
72°C	10 min	1
4°C	∞	∞

Tabela 9. Protocolo de amplificação do gene *SDHC*.

Gene <i>SDHC</i>		
Temperatura	Tempo	Nº ciclos
95°C	3 min	1
95°C	30 seg	
55°C	30 seg	35
72°C	1 min	
72°C	10 min	1
4°C	∞	∞

Tabela 10. Protocolo de amplificação do gene *MAX*.

Gene <i>MAX</i>		
Temperatura	Tempo	Nº ciclos
95°C	3 min	1
95°C	30 seg	
55°C	30 seg	35
72°C	1 min	
72°C	10 min	1
4°C	∞	∞

8.ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos de PCR foram analisados em géis de agarose 1% em TAE 1x (40mM TRIS, 20mM ÁCIDO ÁCEITO E 1mM EDTA), com a utilização de brometo de etídeo na concentração de 10mg/mL para visualização das bandas correspondentes à amplificação. Para cada 100mL de gel foram utilizados 5µL de Brometo de etídeo. Foram aplicados em cada poço 10 µL dos produtos de

PCR. Para definição dos pesos moleculares dos produtos de PCR foram utilizados 3µL do marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen).

9. SEQUENCIAMENTO GÊNICO

Os produtos de PCR foram purificados, com o uso do sistema Exo-SAP-IT (Invitrogen) ou utilizando colunas de sílica por meio do *Kit Qiaquick* (Qiagen) e em seguida enviados para sequenciamento em empresa especializada (*Macrogen Inc.*, Seoul, Coréia do Sul), a qual realiza sequenciamentos automáticos pelo método de Sanger, utilizando os sequenciadores ABI3730XL e ABI3700 (*Applied Biosystems*). Os resultados dos sequenciamentos foram expressos em eletroferogramas e analisados por meio do software *Sequencher 5.0* (*Gene Codes*).

10. AMPLIFICAÇÃO MÚLTIPLA COM SONDAS DEPENDENTES DE LIGAÇÃO (MLPA - *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*)

Com o intuito de investigar a ocorrência de grandes deleções nos genes *VHL*, e nos genes *SDHA*, *SDHB*, *SDHC* e *SDHD*, foi utilizado o método de MLPA, o qual emprega sondas específicas para os genes a serem estudados ligadas à um fluorocromo, as quais, ao hibridarem-se ao DNA, emitem luz que é quantificada por eletroforese capilar. Para realização da MLPA foram utilizados os *kits* SALSA MLPA P226 *SDH probemix* e SALSA MLPA P016 *VHL probemix* (*MRC-Holland*) de acordo com as instruções do fabricante, no termociclador Veriti (*Applied Biosystems*). A eletroforese capilar foi realizada no aparelho ABI3130 (*Applied Biosystems*) e os resultados foram analisados por meio do software *Coffalyser.NET* (*MRC-Holland*).

RESULTADOS

Foram avaliados 17 indivíduos portadores de FEO/PGL, sendo 9 do sexo feminino e 8 do sexo masculino, com diagnóstico confirmado por estudo histopatológico de amostras obtidas por extração cirúrgica dos tumores. As características clínicas principais desses indivíduos, bem como os resultados dos estudos genéticos encontram-se sumarizados na tabela 11.

Tabela 11. Características clínicas e mutações genéticas em uma série de indivíduos portadores de feocromocitoma e paraganglioma atendidos no Hospital Universitário de Brasília

Nº	Gênero; idade ao diagnóstico (anos)	Localização do tumor primário; tamanho (cm)	Metanefrinas e/ou catecolaminas elevadas ¹	Metástase ou recidiva (localização)	História familiar	Diagnóstico adicional	Estudo molecular
1	F, 12	Adrenal; 5,2	uDOPA, uNE	Ausente	Negativa		Negativo
2	M, 12	Para-aórtico; 4,3	pNE	Ausente	Negativa		Negativo
3	F, 13	Para-aórtico; 5,2	uNMT, uNE, uDOPA	Ausente	PGL (Irmã n ^o 4); Pai HAS e morte súbita		SDHB Del exon1
4	F, 38	Para-aórtico; 5,5	uNMT, uNE,	Ausente	PGL (irmã n ^o 3); Pai HAS e morte súbita		SDHB Del Exon 1
5	M, 13	Tórax; 6,1	uNMT, uNE, uDOPA	Pulmões	Negativa		SDHB Del Exon 1
6	M, 15	Para-aórticos; 6,3 e 5,0	² uDOPA	Linfonodo periaórtico	Negativa		SDHB Del Exon 1
7	F, 35	Adrenal bilateral; 7,5/1,5	uNMT	Pâncreas (?)	Mãe: carcinoide estômago aos 40a	Metástase Feo ou carcinoide de pâncreas (?) e estômago	Negativo

8	F, 39	Adrenal; 5,4	pNE	Ausente	Filha, assintomática; irmã HAS severa, óbito no parto; sobrinha, óbito, TNE metastático no fígado, TU adrenal e pâncreas	Síndrome de VHL: hemangioblastoma de cerebelo, angioma de retina	VHL p.Q164R
9	M, 39	Adrenal; 9,7	Não disponível	Linfonodos, Ossos, Pulmão	Duas filhas HAS		Negativo
10	F, 42	Adrenal; 3,7	uNE, uDOPA	Ausente	2 filhas com carcinoma medular de tireoide	NEM2A, Carcinoma medular de tireoide	RET p.C618R
11	M, 45	Adrenal; 12,0	uNE, uEPI, uDOPA, uNMT	Linfonodos periaórticos	Negativo	Hiperparatiroidismo normocalcêmico	Negativo
12	M, 48	Adrenal; 10,0	³ normais	Ausente	Negativo	IAM aos 42 anos	Negativo
13	F, 48	Adrenal; 5,8	uNMT, uMT	Ausente	Negativo	Cisto Pancreático	Negativo
14	F, 51	Adrenal; 6,2	uNMT	Ausente	Negativo		Negativo
15	M, 52	Bexiga; 4,1	Não disponível	Ausente	Negativo		Negativo
16	M, 57	Adrenal; 4,1	uNMT, uNE	Ausente	Negativo		Negativo
17	M, 68	Adrenal; 4,3	uNMT, uNE, uEPI, uMT	Ausente	Negativo	Adenocarcinoma de próstata	Negativo

¹Dosagens de catecolaminas urinárias e plasmáticas realizadas por HPLC e de metanefrinas e normetanefrinas urinárias, por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas.

²Paciente teve apenas uma dosagem de dopamina urinária que foi discretamente aumentada, determinada por HPLC. Demais dosagens urinárias de catecolaminas e metanefrinas foram normais, em uma única amostra.

³Paciente apresentou todos os resultados normais em uma única amostra de urina de 24h.

F: feminino, M: masculino; uNMT: normetanefrinas urinárias; uNE: norepinefrina urinária; uEPI: epinefrina urinária; uDOPA: dopamina urinária; uMT: Metanefrina urinária pNE: Normetanefrina plasmática; HAS: hipertensão arterial sistêmica; IAM: infarto agudo do miocárdio; TNE: tumor neuroendócrino; TU: tumor

Dentre os 17 pacientes incluídos nesse estudo, 11 foram diagnosticados com feocromocitoma e 6 com paraganglioma. O tamanho médio dos tumores foi de 6,58 cm e a média de idade global ao diagnóstico foi de 36,8 anos, variando entre 12 e 68 anos.

Cinco pacientes (29,4%) apresentaram o tumor em idade juvenil (entre 12 e 15 anos), sendo um feocromocitoma e quatro paragangliomas (casos 1, 2, 3, 5 e 6).

Em 4 pacientes (23.5%) foi confirmada malignidade pela presença de metástases distantes do tumor de origem (casos 5, 6, 9 e 11).

A maioria dos pacientes (n=12; 70,5%) apresentou catecolaminas e/ou pelo menos um de seus metabólitos elevados em amostra de urina de 24 horas. Cinco pacientes apresentaram pelo menos uma dosagem de catecolamina urinária ou plasmática elevada (casos 2, 6, 7, 8 e 14), enquanto apenas um paciente (caso 12) apresentou todas as medidas dentro dos valores de normalidade. Ainda, em um caso, não foi realizado exame bioquímico no pré-operatório, uma vez que a natureza neuroendócrina do tumor e o diagnóstico de paraganglioma foi determinada somente após o exame histopatológico e imunohistoquímico da peça cirúrgica (caso 15).

Ainda em relação aos marcadores bioquímicos, observou-se que a maioria dos pacientes apresentou aumento de NE e/ou NMT em amostra de urina ou de sangue (n=13; 73,4%), e seis pacientes apresentaram tumores co-secretores de DOPA. Um paciente teve aumento isolado, muito discreto, de DOPA urinária (caso 6) em dosagem por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

1.IMUNOHISTOQUÍMICA

Após a ressecção do tumor foi feita imunohistoquímica com intuito de: a) confirmar a origem neuroendócrina dos mesmos, e b) avaliar o padrão de expressão da subunidade B da enzima succinato desidrogenase e sua possível associação com a ocorrência de mutações nos genes *SDHx*.

A tabela 12 apresenta o resultado da análise imunohistoquímica para os marcadores utilizados.

Tabela 12. Perfil imunohistoquímico de uma série de feocromocitomas e paragangliomas atendidos no Hospital Universitário de Brasília.

No.	Vimentina	Ki67	Enolase	Cromogranina	Sinaptofisina	S100	SDH
1	(++++)	<2	(-)	(++++)	(++++)	(-)	(+)
2*	Não realizada	(+)	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	Não realizada
3	(++)	<2	(-)	(++++)	(++++)	(-)	(++++)
4	(++++)	2<5	(-)	(++++)	(++++)	(-)	(+++)
5	Indisponível	Indisponível	Indisponível	Indisponível	Indisponível	Indisponível	Indisponível
6*	Não realizada	(+)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	Não realizada
7	(+++)	<2	(++)	(++++)	(++++)	(+)	(++++)
8	(+++)	<2	(-)	(++++)	(++++)	(+)	(++++)
9	Indisponível	Indisponível	Indisponível	Indisponível	Indisponível	Indisponível	Indisponível
10	(+++)	<2	(++++)	(++++)	(++++)	(+)	Granular (++++)
11	(-)	<2	(+++)	(++++)	(++++)	(-)	(++++)

12	Focal (++++)	<2	Focal (++)	(++++)	(++)	(-)	(++++)
13	(-)	<2	(-)	(-)	(-)	(++)	Granular (+++)
14	Indisponível	Indisponível	Indisponível	Indisponível	Indisponível	Indisponível	Indisponível
15	(-)	<2	(++++)	(++++)	(++++)		Difuso (+++)
16	(-)	2	Focal (++)	(++++)	(++++)	Nuclear (+)	(+++)
17	Focal (++++)	<2	Focal (+++)	(+++)	(++++)	(++)	(++++)

*Imunohistoquímica realizada em outro serviço; Indisponível: casos cujas amostras de tecido fixadas em parafina não foram disponibilizados ou não foram localizados até o final deste estudo.

A figura 3 contém o resultado do estudo histopatológico (coloração hematoxilina-eosina; HE) e imunohistoquímica para SDHB, dos casos 3 e 4. Esta análise foi realizada com a finalidade de verificar se há associação entre a expressão da proteína SDHB e a ocorrência de mutações no gene que a codifica.

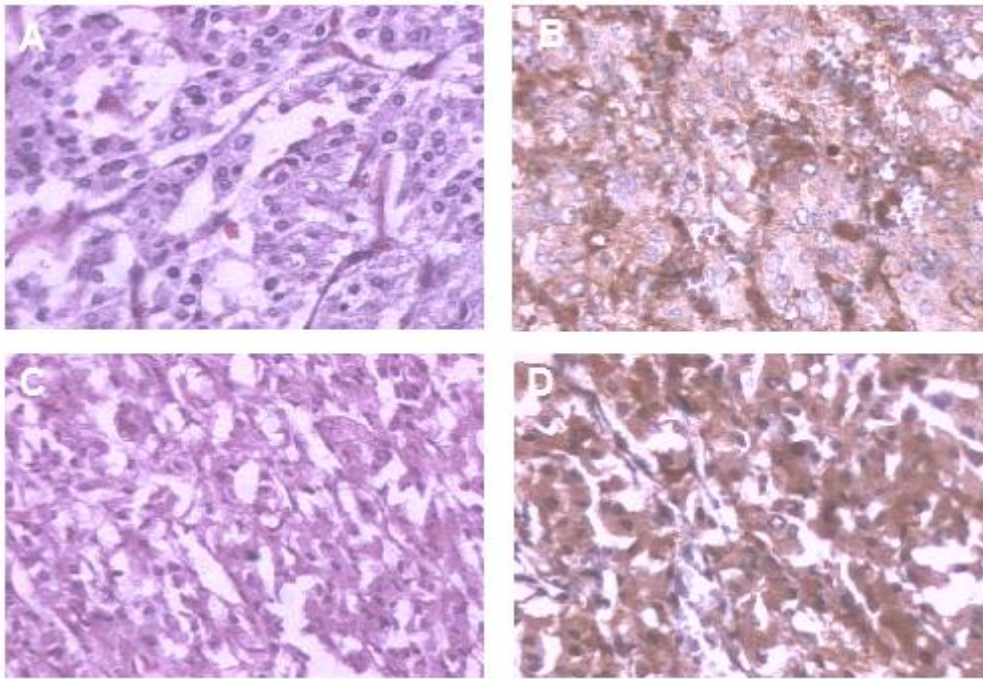


Figura 3. Aspecto histológico e imunoposição da proteína SDHB em amostras de paragangliomas obtidos das pacientes 3 e 4 (PGL familiar). **A e C:** Lâminas das pacientes 3 e 4, respectivamente, coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) demonstrando arquitetura celular característica de paraganglioma (aumento de 200x). **B e D:** Lâminas das pacientes 3 e 4, marcadas com o anticorpo anti-SDHB, demonstrando positividade (aumento de 200x).

2. ESTUDO MOLECULAR

Foram realizados sequenciamentos de toda a região codante dos genes *VHL*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* e *MAX*, bem como MLPA para os genes *VHL* e *SDHx* (*SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHA* e *SDHAF2*), em todos os sujeitos do estudo.

Seis pacientes (35,3%) apresentaram mutação germinativa em um dos genes estudados (casos 3, 4, 5, 6, 8 e 10), sendo uma mutação *missense* no gene *RET*, uma *missense* no *VHL* e quatro grandes deleções no *SDHB*. No total, foram observadas 3 mutações nessa série de casos, como detalhado a seguir e apresentado previamente na Tabela 11:

a) Foi identificada uma mutação em heterozigose no gene *VHL* (p.Q164R) em uma paciente do gênero feminino (nº 8) com feocromocitoma, hemangioblastoma cerebelar, angioma de retina e história familiar compatível com Síndrome VHL. A mesma mutação foi encontrada em sua filha de 8 anos, que até o momento ainda não apresentou sinais e sintomas da doença.

b) Foi identificada uma deleção completa do exon 1 do gene *SDHB*, em heterozigose, em 4 pacientes: Duas meia-irmãs paternas com paraganglioma para-aórtico (casos 3 e 4); um paciente de 15 anos com paragangliomas múltiplos, retroperitoniais (para-aórticos), recorrente e aparentemente esporádico (caso 6); e um paciente de 13 anos com paraganglioma de tórax maligno. (caso 5)

c) Foi encontrada também uma mutação em heterozigose no exon 10 do proto-oncogene *RET* (p.C618R) em uma paciente do sexo feminino (caso 10) com feocromocitoma e carcinoma medular de tireoide (CMT), e em duas de suas filhas que também apresentavam CMT, caracterizando assim o diagnóstico de NEM2A. Considerando o diagnóstico clínico, o estudo molecular do *RET* foi solicitado pela equipe médica assistente e foi então gentilmente realizado pela Prof Ana Luiza Maia, pesquisadora do Hospital das Clínicas de Porto Alegre (UFRGS). A família afetada vem sendo acompanhada regularmente no HUB e, portanto, foi incluída na casuística desse trabalho.

A seguir, os casos que apresentaram mutação são descritos mais detalhadamente, na ordem em que foram listados na tabela 11.

2.1 CASO 3

Sexo feminino, 13 anos, procurou emergência do Hospital Regional de Taguatinga (HRT - DF), apresentando dor abdominal, cefaléia, vômitos, sudorese e hipertensão arterial severa. Como antecedente familiar, seu pai, hipertenso, havia falecido por morte súbita aos 46 anos de idade. Duas tias paternas também apresentavam HAS severa.

O exame bioquímico demonstrou norepinefrina, dopamina, e normetanefrina urinárias elevadas (1000µg/24h, normal: <97 µg/24h; 1000µg/24h, normal: <500 µg/24h; 7849.1µg/24h, normal: <800µg/24h, respectivamente). A TC de abdome e a cintilografia com ¹³¹I-MIBG revelaram um tumor sólido na região para-aórtica esquerda, medindo 5,2 centímetros no eixo maior (Figura 4). Foi então iniciado α-bloqueio seguido de β-bloqueio, com melhora dos sintomas. A paciente foi encaminhada para tratamento cirúrgico, mas cerca de 30 dias após o diagnóstico, enquanto aguardava cirurgia, apresentou um episódio de crise adrenérgica grave, que evoluiu com, choque cardiogênico, edema agudo de pulmão e óbito. Estudo histopatológico e imunohistoquímico de fragmento tumoral obtido em necrópsia confirmou o diagnóstico de paraganglioma.

A paciente foi submetida ao exame molecular para os genes *VHL*, *SDHB* e *SDHD*. Após sequenciamento de toda a região codante desses genes, nenhuma mutação de ponto foi encontrada. Foi então realizado MLPA para todos os genes *SDHx* e para o *VHL*, e uma deleção completa do exon 1 do *SDHB* foi encontrada (Figura 4C).

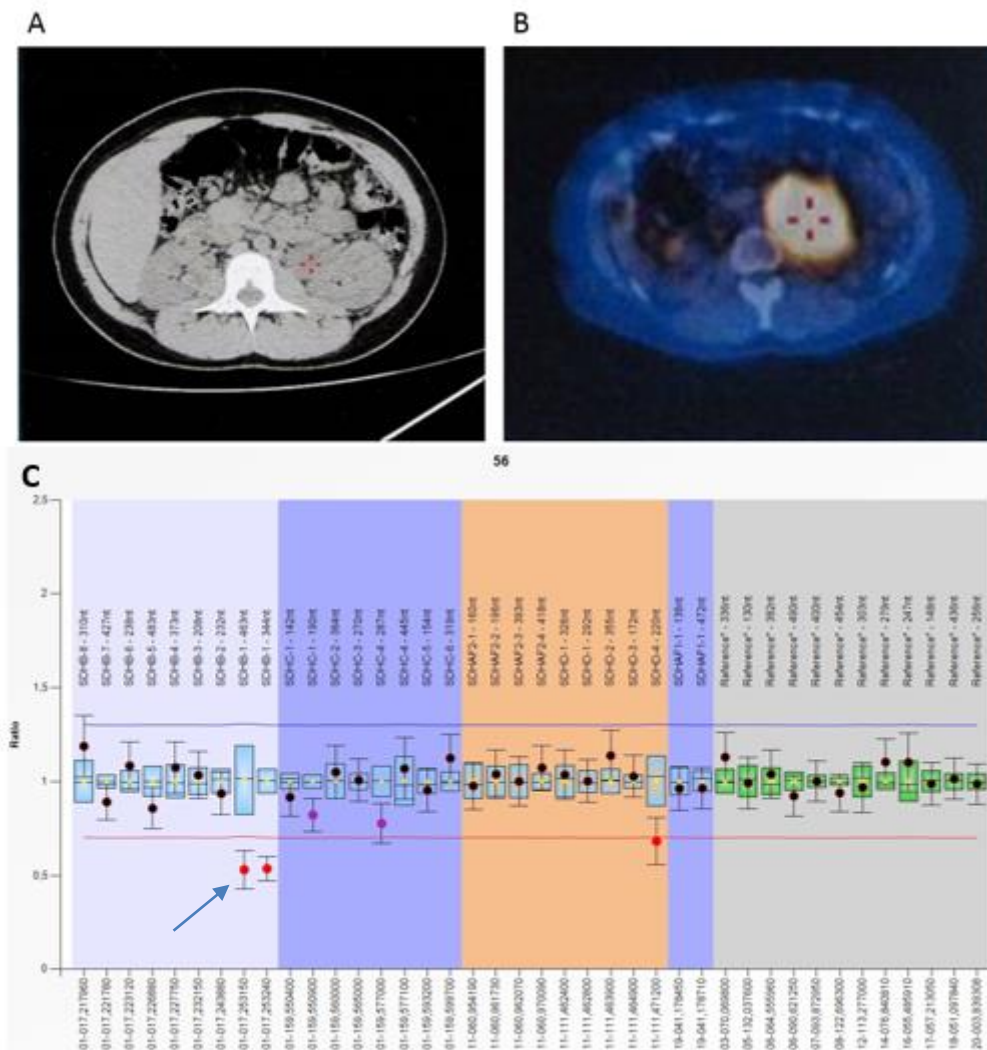


Figura 4. Aspectos radiológicos e representação gráfica do resultado do MLPA para os genes *SDHx* da paciente nº. 3. **A:** Tomografia Computadorizada demonstrando tumor para-aórtico de 5.2 cm; **B:** Cintilografia com ^{131}I -MIBG sugestiva de tumor de células cromafins (paraganglioma) **C:** Deleção do exon 1 do gene *SDHB* (seta), em heterozigose, caracterizada pela redução de 50% (0,5) do sinal fluorescente de hibridização de duas sondas do MLPA.

2.2 CASO 4

Irmã da paciente nº. 3, foi convocada pela equipe assistente devido à suspeita de paraganglioma familiar. Aos 38 anos compareceu ao serviço de endocrinologia do HRT, 10 meses após o óbito da irmã. Relatava HAS de difícil controle por mais de 10 anos, associada a episódios recorrentes de cefaléia, tonturas e náuseas. Dois anos antes da primeira avaliação endocrinológica, apresentou eclâmpsia em sua única gestação, e evoluiu com crise hipertensiva

severa e parada cardiorrespiratória durante o parto. Foi submetida às manobras de ressuscitação cardiopulmonar e, após o parto completado com histerectomia, necessitou de suporte respiratório prolongado em terapia intensiva. Recém-nascido prematuro, sexo feminino, com boa evolução pós-natal, e até a conclusão desse estudo apresentando-se assintomática aos 3 anos de idade.

Foi então encaminhada ao Ambulatório de Endocrinologia das Gônadas e Adrenais, no HUB, para investigação clínica e molecular e tratamento. As norepinefrinas e normetanefrinas urinárias se apresentaram elevadas (1632.3µg/24h, Normal: <97 µg/24h; 10692.4µg/24h, Normal: <800 µg/24h respectivamente). A paciente também reportava diabetes. Ressonância magnética nuclear de abdômen e cintilografia com ¹³¹I-MIBG mostraram tumor irregular, com realce de contraste intenso, localizado na área paraortica esquerda, medindo 5,5 centímetros, muito semelhante ao de sua irmã. (Figura 5). Após adrenalectomia a paciente evoluiu bem, normotensa em uso de apenas um antihipertensivo e com glicemia normal. Histopatológico e imunohistoquímica confirmaram o diagnóstico.

O sequenciamento genético não revelou mutações pontuais, e o MLPA evidenciou a deleção do exon 1 do *SDHB* (Figura 5C), também encontrada em sua irmã.

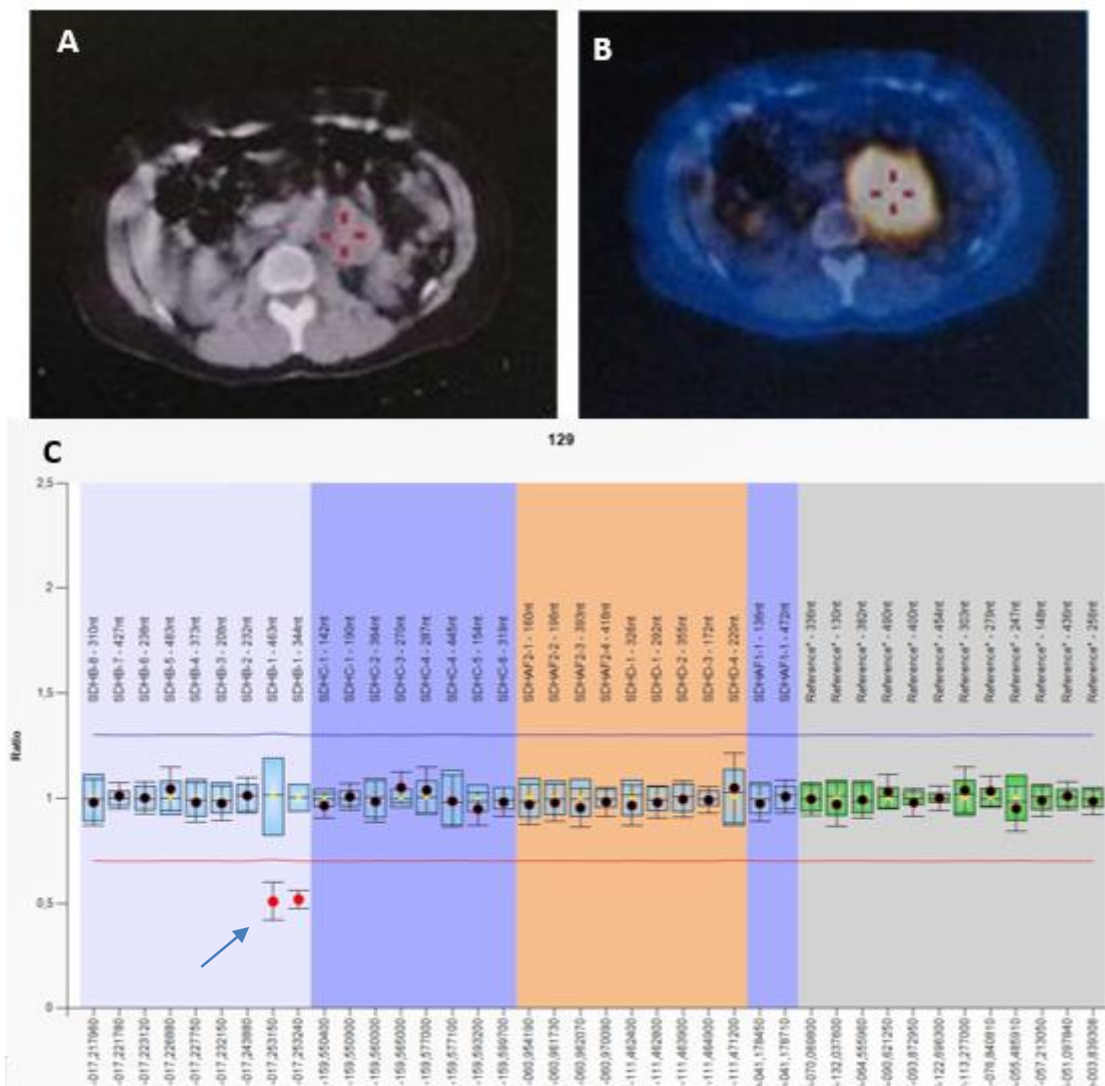


Figura 5. Aspectos radiológicos e representação gráfica do resultado do MLPA para os genes *SDHx* da paciente nº 4. **A:** Tomografia Computadorizada demonstrando tumor para-aórtico de 5.5 cm; **B:** Cintilografia com ^{131}I -MIBG sugestiva de tumor de células cromafins (paraganglioma) **C:** Deleção do exon 1 do gene *SDHB* (seta), em heterozigose, caracterizada pela redução de 50% (0,5) do sinal fluorescente de hibridização de duas sondas do MLPA, semelhante ao caso nº 3.

Diante da evidência de paraganglioma familiar, os demais familiares foram convocados para exames clínicos e rastreamento da deleção no *SDHB*, visando aconselhamento genético e identificação precoce dos portadores. Até a conclusão desse estudo, foi realizada análise por MLPA de uma tia paterna, que mostrou-se normal, e da filha de 3 anos, cujo resultado identificou a presença da mesma deleção.

2.3 CASO 5

Sexo masculino, 13 anos, encaminhado ao ambulatório de Endocrinologia das Gônadas e Adrenais do HUB apresentando crises de taquicardia, sudorese e vômitos, desde os nove anos de idade.

Seus níveis de catecolaminas e metanefrinas urinárias apresentavam-se muito acima do normal. As normetanefrinas estavam acima do limite de detecção do método ($>4620 \mu\text{g}/24\text{h}$; normal: $<732 \mu\text{g}/24\text{h}$), a Norepinefrina era de $1.018,2 \mu\text{g}/24\text{h}$ (normal: $<97 \mu\text{g}/24\text{h}$), e dopamina de $1032,40 \mu\text{g}/24\text{h}$ (normal: $<540 \mu\text{g}/24\text{h}$). A ressonância magnética do abdômen foi normal, porém, na TC de tórax foi observada uma lesão subpleural medindo $6,1 \text{ cm}$ no maior eixo, na base do pulmão direito, causando erosão de vértebra e costelas adjacentes (Figura 6). Havia ainda 2 outras lesões menores, uma em lobo superior ipsilateral ($1,2 \text{ cm}$) e outra no segmento apical posterior esquerdo ($0,6 \text{ cm}$). RMN cervical mostrou também uma lesão de $2,2 \text{ cm}$ na bifurcação da carótida esquerda.

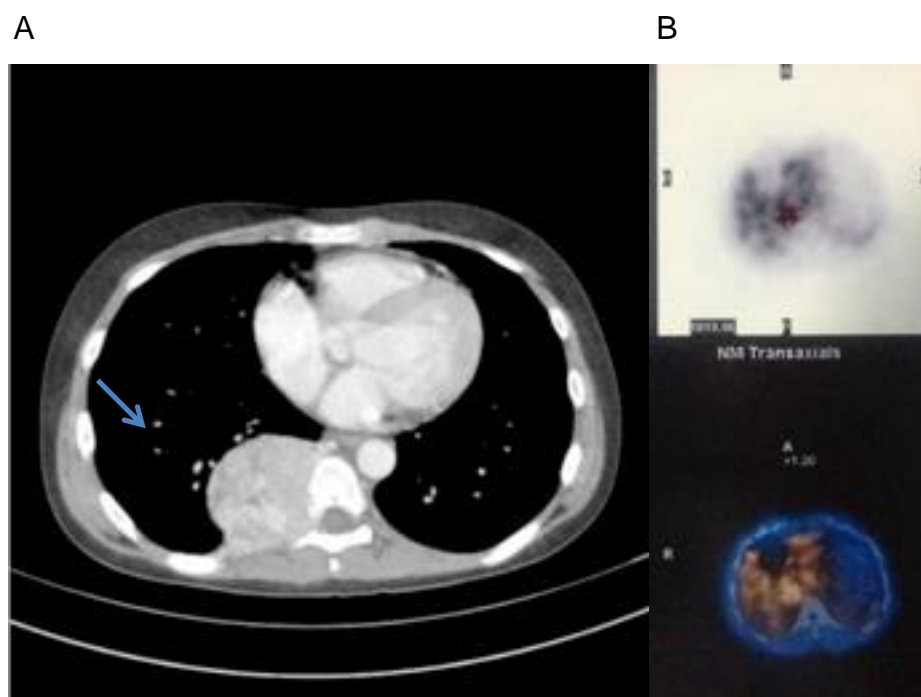


Figura 6. Aspectos radiológicos representativos do paraganglioma do paciente nº 5. **A:** Tomografia computadorizada de tórax com contraste, mostrando tumor subpleural de $6,1 \times 5,3 \text{ cm}$ (seta), localizado na borda dorsal da base pulmonar direita, causando erosão da vertebra e costela adjacente. **B:** Cintilografia com ^{123}I -MIBG revela captação aumentada na lesão subpleural.

O estudo molecular feito por sequenciamento não revelou mutações de ponto, e a análise do MLPA revelou a deleção completa no exon 1 do gene *SDHB* (Figura 7).

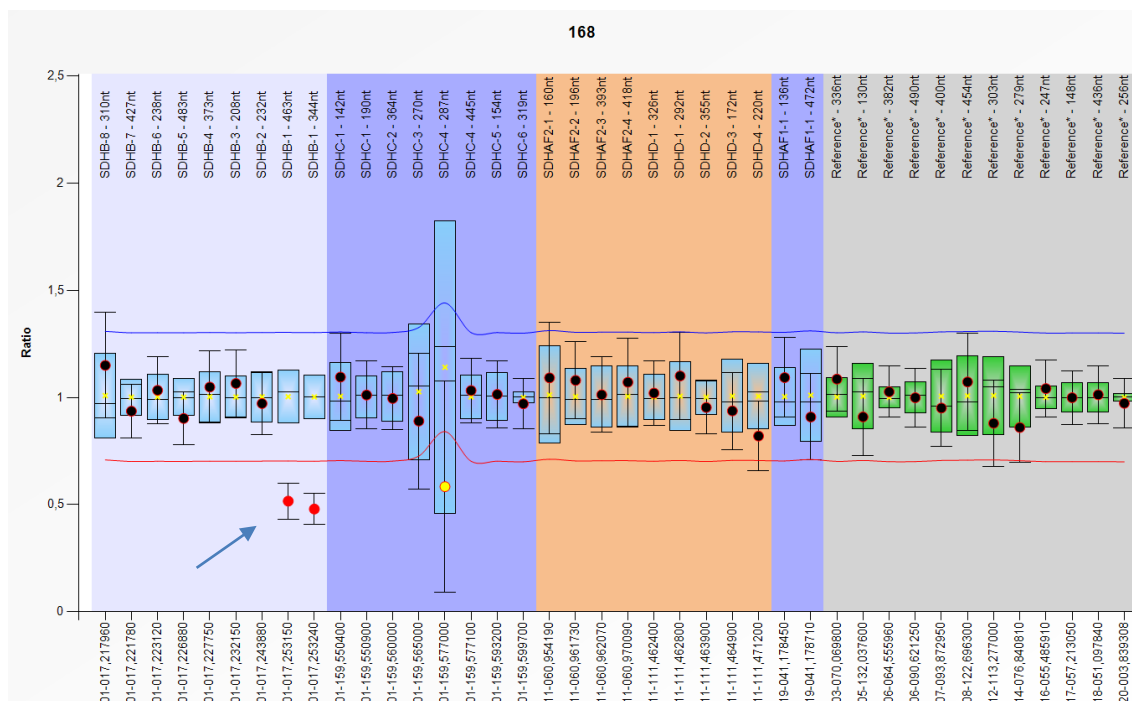


Figura 7. Representação gráfica do resultado do MLPA para os genes *SDHx* da paciente nº 5, mostrando a deleção do exon 1 do *SDHB* (seta) em heterozigose.

2.4 CASO 6

Sexo masculino, 15 anos, havia recebido o diagnóstico de enxaqueca há cerca de 2 anos. Relatava ainda episódios de sudorese intensa, eritema malar e palmar, tremores e taquicardia. Ao apresentar-se no serviço de emergência de um hospital privado com pressão arterial de 250X190mmHg, o mesmo foi internado para diagnóstico diferencial. Seus níveis de catecolaminas e metanefrinas urinárias foram normais, porém foi feita uma única dosagem por HPLC. A dopamina urinária apresentou-se discretamente elevada (271pg/ml, Normal: <200 pg / ml). A ressonância magnética de abdômen revelou duas tumorações no retroperitônio, em região para-aórtica, medindo 6,3 cm e 5,0 cm (Figura 8). A cintilografia com ¹³¹I-MIBG mostrou que ambos os tumores eram captantes, compatíveis com tumor de células cromafins, e uma tomografia por emissão de pósitrons (PET-CT) com flúor-desoxiglicose (18F-FDG) confirmou

que se tratavam de 2 lesões hipermetabólicas, compatíveis com neoplasia, sem evidencia de lesões à distância (Figura 9).

Foi realizada ressecção cirúrgica dos tumores, em um só tempo, com normalização completa da pressão arterial e demais sintomas no pós-operatório. Histopatológico e imunohistoquímica foram compatíveis de paragangliomas, aparentemente esporádico. Contudo, quatro anos após a recessão dos tumores, em seguimento de rotina, cintilografia com ^{131}I -MIBG mostrou pequena área de captação em região periaórtica, podendo corresponder a metástase para linfonodo ou recorrência locorregional de paraganglioma. Foi proposta re-intervenção cirúrgica, seguido de dose terapêutica de ^{131}I -MIBG, porém, o paciente não foi mais localizado e perdeu seguimento.

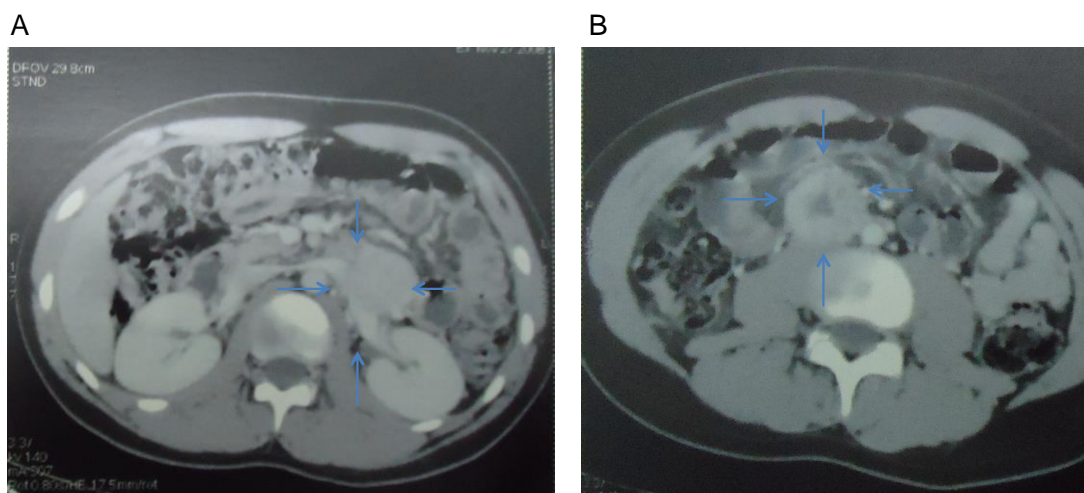


Figura 8. Aspecto dos paragangliomas do caso nº. 6 à tomografia computadorizada. **A:** Tumor para-aórtico retroperitoneal à esquerda, medindo 6,3 cm no maior eixo; **B:** Tumor retroperitoneal próximo à linha mediana, medindo 5,0 cm no maior eixo, com captação heterogênea do contraste.

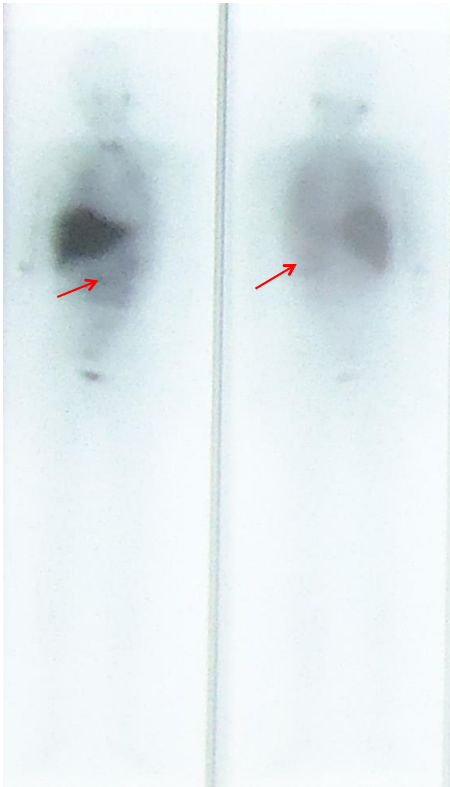
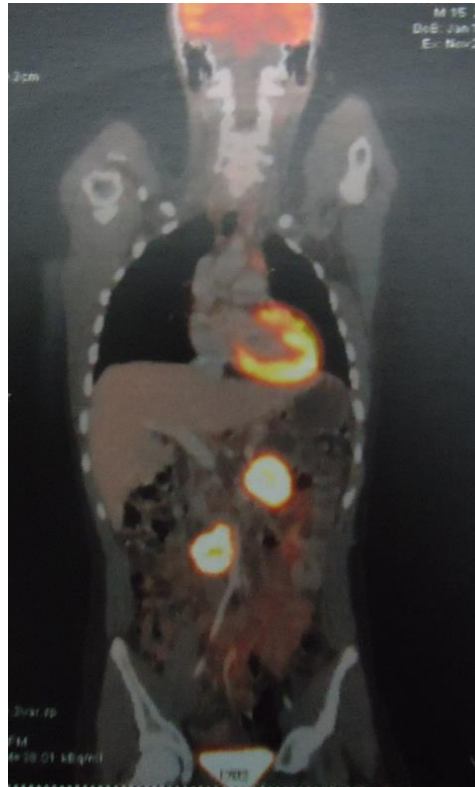
A**B**

Figura 9: Aspectos dos paragangliomas do caso nº. 6. **A:** À cintilografia com ^{131}I -MIBG, confirmando a captação do radiofármaco e origem cromafim de ambos os tumores; **B:** À tomografia por emissão de pósitrons (PET-CT), mostrando alta taxa metabólica, compatível com doença neoplásica e confirmando a ausência de outros sítios tumorais.

O sequenciamento genético foi realizado para os genes *VHL*, *SDHB*, *SDHD*, e nenhuma mutação pontual foi encontrada. A análise do MLPA mostrou deleção completa do exon 1 do *SDHB* (Figura 10)

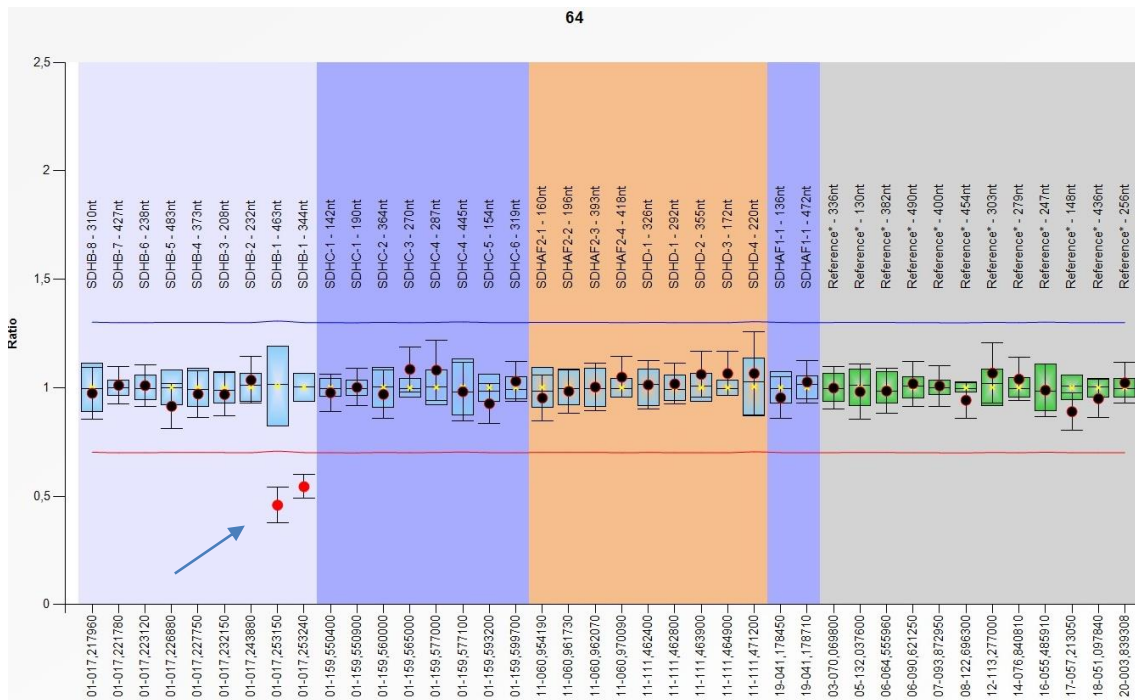


Figura 10: Representação gráfica do resultado do MLPA para os genes *SDHx* da paciente nº 6, mostrando a deleção do exon 1 do *SDHB* em heterozigose.

2.5 CASO 8

Paciente de 39 anos, sexo feminino, foi encaminhada ao ambulatório de Endocrinologia das Gônadas e Adrenais do HUB, referindo hipertensão arterial sistêmica (170x100mmHg), cefaléia, episódios de síncope, sudorese e dormência nas mãos. Esses episódios costumavam acontecer uma vez ao mês e vinham durando há mais de um ano. A paciente teve duas gestações nas quais ela apresentou pré-eclâmpsia, sendo que, na primeira gestação, cursou com edema agudo pulmonar e parada cardiorrespiratória, que respondeu bem à ressuscitação convencional.

Os níveis de catecolaminas urinárias se apresentaram normais, mas a NE plasmática estava muito acima do limite de normalidade (10.783 pg / mL; normal <1700). Ainda, uma tomografia computadorizada abdominal (TC) revelou uma lesão de 5.5 cm na adrenal direita (figura 11A). Após bloqueio farmacológico alfa e beta-adrenérgico, foi realizada adrenalectomia direita e o estudo imunohistoquímico revelou-se positivo para cromogranina A e sinaptofisina, confirmando a origem neuroendócrina do tumor.

Quanto à história familiar, a paciente tinha uma irmã com hipertensão arterial severa e sudorese profusa, que apresentou parada cardiorrespiratória e faleceu durante um parto, aos 30 anos de idade. Além disso, constatou-se que sobrinha, que também relatava episódios paroxísticos de sudorese e taquicardia, havia falecido aos 26 anos de idade, poucas semanas após identificação de um tumor adrenal de 3 cm de aspecto indeterminado aos exames de imagem, um tumor pancreático de 8 cm, e metástases hepáticas difusas de um carcinoma neuroendócrino moderadamente diferenciado, segundo laudo histopatológico e imunohistoquímico de biópsia hepática percutânea. Não havia informações sobre exames bioquímicos nesses casos. Com base na apresentação clínica da paciente e seu histórico familiar, a análise molecular foi iniciada pelo gene *VHL*. O sequenciamento revelou uma mutação *missense* em heterozigose no éxon 3 (c.491A>G; Q164R), como mostrado na figura 11 B. Outros membros da família também foram rastreados, e a mutação foi encontrada em sua filha de 8 anos de idade, que não mostrou nenhuma manifestação da doença de Von Hippel-Lindau até o final do estudo.

Durante o seguimento clínico, sete anos após a adrenalectomia, a paciente apresentou um pequeno angioma de retina e dois hemangioblastomas localizados em ambos os hemisférios cerebelares e foi à óbito após complicações relacionadas ao procedimento neurocirúrgico.

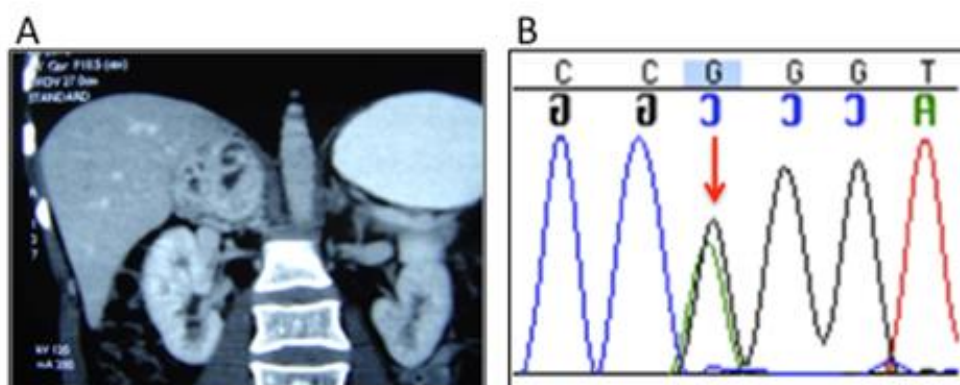


Figura 11. Aspecto tomográfico do feocromocitoma e eletroferograma de parte da sequência do éxon 3 do gene *VHL* da paciente nº. 8. **A:** Tomografia computadorizada com contraste venoso demonstrando uma lesão de 5.5cm na adrenal direita com captação heterogênea do contraste, sugestiva de áreas de necrose central; **B:** Mutação germinativa no gene *VHL* em heterozigose: 491A>G (Q164R).

2.6 CASO 10

Paciente do sexo feminino, diagnosticada com carcinoma medular de tireoide aos 41 anos, após rastreamento clínico direcionado devido à identificação de um CMT com metástase hepática em sua filha, à época, com 12 anos de idade. A paciente foi submetida à tiroidectomia total e, um ano após, durante seguimento clínico de rotina, foi identificado aumento predominante de metanefrinas urinárias (valor encontrado: 579.2 µg/24h; normal: < 400), apesar de a paciente permanecer assintomática e normotensa. Tomografia computadorizada revelou um tumor heterogêneo de 3,7 cm na glândula adrenal esquerda. Histopatológico e imunohistoquímica confirmaram tratar-se de feocromocitoma. Tratava-se de um feocromocitoma associado à NEM2A, assintomático, identificado em exames de rotina. Curiosamente, é de se destacar que durante a internação pré-operatória, a paciente apresentou um único episódio de hipertensão arterial e cefaleia intensa, associado ao uso de dexametasona 1mg por via oral.

O estudo molecular do proto-oncogene *RET* nessa paciente revelou a mutação (p.C618R) em heterozigose. Duas de suas filhas com CMT também apresentam a mesma mutação, enquanto outra filha, um filho e o esposo apresentaram genótipo selvagem (não afetados).

DISCUSSÃO

O presente estudo trouxe uma descrição detalhada das características clínicas e apresentação de uma série de 17 casos de feocromocitoma e paraganglioma atendidos no Distrito Federal. Até o momento não se tem registro de outro estudo que tenha apresentado uma casuística de FEO/PGL unicamente brasileira, apresentando dados clínicos, imunohistoquímicos e genéticos, que englobaram o estudo molecular de genes mais comumente relacionados à patogênese desses tumores.

Considerando a raridade desses tumores, a importância desse estudo reside no fato de que acrescenta dados clínicos e genéticos às grandes casuísticas e consórcios internacionais, corroborando os seus achados. Embora em número restrito, os casos aqui descritos apresentavam características muito peculiares, que muito intrigam ainda os clínicos e pesquisadores nessa área. A organização de um segmento brasileiro em casuísticas de feocromocitoma e paraganglioma poderá contribuir para a difusão desse conhecimento em nosso país, para que profissionais da área de saúde possam formar centros de referência em assistência, pesquisa e aconselhamento de pacientes com FEO/PGL.

Outro ponto importante de difusão do conhecimento é o fato de que tumores produtores de catecolaminas tendem a ser sub-diagnosticados. Muitas vezes são descobertos apenas em exames de imagem de rotina, ou até mesmo em crises adrenérgicas graves, de alta morbi-mortalidade, associadas a procedimentos médicos invasivos, uso de contrastes ou indução anestésica.

Com base no conhecimento disponível até o momento sobre os aspectos genéticos da patogênese de FEO/PGLs e de suas características hereditárias, foi possível obter informações clínicas e moleculares detalhadas sobre os pacientes e suas famílias para formar associações genótipo-fenótipo e estabelecer estratificações de riscos, acompanhamento e aconselhamento genético dos pacientes e de seus familiares (39).

O presente estudo buscou descrever uma série de pacientes diagnosticados com feocromocitoma ou paraganglioma atendidos no ambulatório de gônadas e adrenais do Hospital Universitário de Brasília, o qual

é um serviço de endocrinologia de referência no diagnóstico, aconselhamento e tratamento desses pacientes.

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS: ASPECTOS MOLECULARES E IMUNOHISTOQUÍMICA

O subdiagnóstico de pacientes com feocromocitoma e paraganglioma hereditário é resultado de uma combinação de fatores, incluindo falta de informação familiar, sobreposição na distribuição etária entre casos hereditários e esporádicos, mutações “de novo”, penetrância incompleta (SDHB), herança paterna (SDHD), heterogeneidade fenotípica da doença, limitações e pouca disponibilidade de métodos diagnósticos, além do limitado conhecimento das equipes assistenciais sobre o assunto.

No que tange ao diagnóstico molecular, ainda há controvérsia quanto à fazer o teste genético para os genes *RET*, *VHL*, *SDHB*, *SDHD*, *SDHC* e outros menos comuns em todos os pacientes com feocromocitoma e paraganglioma. Alguns especialistas alegam que esses testes devem ser feitos com base em critérios clínicos elegíveis. No entanto, indicadores clínicos para a presença de mutações nos genes que codificam a enzima SDH podem estar ausentes ou de difícil percepção (49).

A detecção de síndromes hereditárias relacionadas ao FEO/PGL é de grande relevância para os pacientes e suas famílias, já que estes têm uma chance maior de desenvolver tumores múltiplos e malignos (49).

A detecção precoce de mutações nos genes da SDH por meio da imunohistoquímica foi proposta como um método efetivo que pode diminuir os custos de testes genéticos para todos os genes que compõem a enzima. (49, 50).

A imunohistoquímica com o anticorpo anti-SDHB realizada neste estudo não se demonstrou capaz de diferenciar os casos com mutação em alguma das subunidades da enzima SDH. Dentre os quatro pacientes com grande deleção no exon 1 do *SDHB* analisados, a imunohistoquímica para a SDH foi realizada para dois, já que foram os únicos com blocos de parafina disponibilizados. Os dois casos apresentaram imunohistoquímica positiva, resultado contrário aos

achados de van Neverdeen⁴⁹ e colaboradores (2009), bem como de Castellblanco⁵⁰ e colaboradores (2013), que encontraram imunohistoquímica negativa em pacientes com mutações no *SDHB* (49, 50). Ainda, Martins e colaboradores (2013), encontraram imunohistoquímica negativa para pacientes com grande deleção no exon 1 (55).

A positividade na reação imunohistoquímica para a SDH pode se dar por uma série de fatores. O primeiro deles seria a diluição do anticorpo primário, que foi de 1:250 neste estudo, e de 1:500 nos estudos anteriores (49, 50). A relativamente baixa diluição realizada no presente estudo pode ter interferido na identificação da expressão da enzima, havendo saturação ou marcação inespecífica quando há excesso de anticorpo, e conseqüente resultado falso-positivo.

A respeito da imunohistoquímica convencional, para confirmar o diagnóstico de feocromocitoma com marcadores epiteliais e neuroendócrinos, esta se mostrou satisfatória, confirmando a origem neuroendócrina dos tumores. A imunohistoquímica da caso 13, no entanto, foi negativa para os marcadores neuroendócrinos (cromogranina e sinaptofisina), porém essa também foi negativa para os outros marcadores, o que leva a crer que o corte selecionado para a confecção das lâminas pode ter sido de uma área com baixa quantidade de células neoplásicas.

2. CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ASPECTOS CLÍNICOS E MOLECULARES

Durante os últimos anos uma quantidade considerável de dados novos com relação aos FEO/PGL tem sido descobertos e mudado a condução da doença. Na revisão recente de Dahia³⁹ (2014), é reportado que cerca de 40% dos pacientes com feocromocitoma e paraganglioma tem uma mutação germinativa em um dos 12 genes descritos até o momento (39). Em nossa casuística a frequência de mutações encontradas nos pacientes com FEO/PGL foi de 35.3%. Deve-se considerar, no entanto, que apenas 5 genes foram estudados. Assim, essa frequência poderia apresentar-se maior, caso todos os genes fossem analisados. É necessário considerar que há genes que até o momento da conclusão dessa dissertação ainda não tinham sua sequência

codante completamente determinada, principalmente os genes *SDHC* e *MAX* (apêndice B).

No estudo retrospectivo de Muth⁵⁶, e colaboradores (2012), de 256 pacientes atendidos de 1958 à 2009 com FEO/PGL na Suíça, foi encontrada uma frequência de 5.6%, a metodologia utilizada foi sequenciamento direto para os genes *VHL*, *RET*, *SDHB*, *SHDC* e *SDHD* e MLPA para *SDH* e *VHL* (56).

Em outros dois estudos com metodologia similar Erlic⁵⁷ e colaboradores (2009), encontraram uma frequência de 30.1%, em uma casuística de 1149 pacientes com FEO/PGL cadastrados no registro Europeu-Americano de Feocromocitoma (57). E Kopetschke¹² e colaboradores (2009), em uma série de 73 pacientes alemães com FEO/PGL encontrou uma frequência de 27.4% (12).

A frequência de mutações germinativas no presente estudo pode ser considerada alta devido ao fato de que esses pacientes pertencem à uma única região metropolitana, e que o número de amostragem é significativamente menor do que o dos outros estudos citados. Foi estudada amostra de conveniência, procedente de um centro universitário de referência que tende a receber os casos mais graves. Ainda assim, a alta frequência de mutações encontradas nesse estudo enfatiza a importância do diagnóstico molecular dos feocromocitomas e paragangliomas e aponta para a formação de um centro brasileiro que reúna as informações clínicas e moleculares desses pacientes como já existe nos Estados Unidos e na Europa.

Com relação às características clínicas, este estudo encontrou maior prevalência de feocromocitomas do que paragangliomas, e maior prevalência de casos esporádicos, que familiares, achados esses que são corroborados pela literatura (12, 56, 57). 23,5% (n=4) dos casos apresentaram malignidade, no entanto, apenas metade deles cursou com mutação germinativa. Esse dado é curioso, pois a análise do gene *SDHB* está associada a maior risco de malignidade (39) e foi completa para ambos os casos. É possível que outros genes, ainda não conhecidos, possam estar envolvidos nos casos de feocromocitoma maligno.

Neste estudo foram estudados 4 casos familiares (casos 3 e 4; 7; 8; 10), e foram encontradas mutações germinativas em 3 deles. No entanto o estudo molecular do caso 7 ainda encontra-se em andamento, pois há alguns exons remanescentes dos genes *SDHC* e *MAX*. Contudo, é sabido que, de fato, há

alguns casos familiares que não apresentam mutações germinativas nos genes conhecidos (58).

Em relação aos casos familiares, dois deles apresentaram-se com características clínicas típicas de síndromes relacionadas ao FEO/PGL. A paciente 8 apresentou uma mutação no gene *VHL* já descrita nas bases de dados e um quadro clínico bem característico da síndrome de Von-Hippel Lindau. A Paciente 10 tinha NEM2A o que levou à análise do gene *RET* e ao diagnóstico da mutação (C618R), que é comum na doença. Ainda, dois casos (no. 5 e 6) aparentemente esporádicos apresentaram mutação germinativa (deleção exon 1 *SDHB*). Nesse casos, seria recomendável realizar o rastreamento da mutação nos pais dos pacientes afetados, a fim de verificar se há padrão de segregação familiar, podendo verificar se são mutações “de novo”.

3.DELEÇÃO DO EXON 1 DO GENE *SDHB*

A contribuição de mutações de ponto nos genes que codificam a enzima succinato desidrogenase para a patogênese molecular dos feocromocitomas e paragangliomas já é bem documentada, no entanto ainda não está bem elucidado qual o papel das grandes deleções na patologia desses tumores. Ainda não se sabe bem qual a frequência nem as manifestações clínicas de grandes deleções no *SDHB* (58, 59). Isso se deve ao fato de que grandes deleções são raras e não são possíveis de detectar usando métodos de sequenciamento convencionais. O implemento de novas técnicas de diagnóstico molecular como o MLPA e o QMPSF (*Quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments*) tem contribuído para novos relatos de grandes deleções (59).

Neste estudo foi realizada a técnica de MLPA complementar ao sequenciamento direto com intuito de buscar tanto por mutações de ponto como por grandes deleções. Foi encontrada uma grande deleção no exon 1 do gene *SDHB* em 4 pacientes (23,52%) (casos 3, 4, 5 e 6). Dois desses pacientes eram aparentemente esporádicos (casos 5 e 6) e duas pacientes eram irmãs (casos 3 e 4).

Todos os pacientes com essa deleção apresentavam paraganglioma, e 3 apresentaram manifestações da doença em idade juvenil. Estudos com grandes deleções ainda são recentes e as manifestações clínicas se mostraram variadas, como ilustrado na tabela 13. No presente estudo, um paciente com a deleção do exon 1 do *SDHB* apresentou paraganglioma com características malignas e aparentemente originado no tórax, o que é um achado raro e intrigante. As descrições mais recentes de Martins⁵⁵ e colaboradores (2013), Cascón⁶⁰ e colaboradores (2006) e Cilliers⁶¹ e colaboradores (2013), que também constituíram-se de casuísticas predominantemente jovens, mostraram maior frequência de tumores abdominais. A ocorrência de doença originada no tórax ainda é considerada rara (55, 60, 61). Ressalte-se também que Martins⁵⁵ e colaboradores (2013), Martins⁵⁵ e colaboradores (2014), reportaram baixa frequência de secreção de epinefrina, o que também foi encontrado nesta casuística.

Por outro lado, estudos recentes tem demonstrado que a deleção do exon 1 é a deleção mais comum do gene *SDHB*, e já foi encontrada em diversos países como mostra a tabela 13. As deleções no exon 1 foram relatadas como patogênicas, e um efeito fundador foi proposto por Cáscon e colaboradres, 2006 (60) na Península Ibérica. Deleções do exon 1 de vários tamanhos já foram descritas e todas elas parecem ter efeito patogênico (55, 60).

Em 2005 foi proposta pelo grupo de Bayley⁴⁷ e colaboradores uma base de dados *online* para pesquisadores registrarem a ocorrência de mutações nos genes que codificam a enzima succinato desidrogenase. Esta base de dados pode ser acessada gratuitamente através do site: http://chromium.liacs.nl/lovd_sdh/ (47).

Por meio do levantamento nessa base e em artigos publicados sobre o tema, foi possível identificar os registros de deleção do exon 1 do gene *SDHB* até o momento publicados, os quais estão sumarizados na tabela 13.

Tabela 13. Registros internacionais incluindo pacientes com FEO/PGL associadas à deleção do exon 1 do gene SDHB

Autor	Ano	Origem	Tipo de tumor
McWhinney ⁵³ e col.	2004	Brasil	PGL abdominal + PGL de carótida + PGL torácico
Cascón ⁶⁰ e col.	2006	Espanha	PGL retroperitoneal
Amar ²⁶ e col.	2007	França	FEO ou PGL?? Maligno
Cascon ⁵⁸ e col.	2009	Espanha	PGL retroperitoneal maligno + PGL abdominal maligno + FEO maligno
Solis ⁶² e col.	2009	EUA + França	Praganglioma + Feocromocitoma
Neumann ⁶³ e col.	2009	Europa + EUA	Paraganglioma de cabeça e pescoço
Burnichon ⁵ e col.	2009	França	Paraganglioma

Ref: (5, 26, 53, 58, 60, 62, 63)

Embora o tamanho da deleção, e os exatos pontos de quebra não tenham sido definidos neste estudo, o presente achado nos pacientes desse estudo corroboram a hipótese de que esta deleção confere um “hot spot” para mutações relacionadas ao FEO/PGL. Além disso, foi demonstrado seu efeito fundador em pacientes da Península Ibérica, e mais recentemente em um estudo Português de Martins⁵⁵ e colaboradores, 2013. Essa observação está em consonância com a contribuição portuguesa para a população brasileira, que tem provavelmente origens genéticas semelhantes.

As mutações encontradas neste estudo foram todas em heterozigose. De acordo com a teoria de “*second hit*” de Knudson⁶² e colaboradores (1971), a inativação dos dois alelos de um gene de susceptibilidade é necessária para o desenvolvimento de um tumor hereditário (64). A primeira inativação seria a germinativa, e a segunda inativação seria somática em algum momento da vida do indivíduo. Em relação aos feocromocitomas e paragangliomas hereditários, poucos estudos haviam sido realizados considerando inativações somáticas em

genes de susceptibilidade. O estudo de Weber³¹ e colaboradores (2012), encontrou inativações do segundo alelo em feocromocitomas. Nesse trabalho, 83% das amostras com mutação germinativa no gene *VHL* apresentaram inativação do segundo alelo, sendo 80% no *SDHB* e 50% no *SDHD* (31). No entanto estudos ainda devem ser realizados para melhor caracterizar o fenômeno de “*second hit*” nos FEO/PGL.

Os resultados do presente estudo apontam que grandes deleções no gene *SDHB* representam uma importante porção das mutações conhecidas por causar feocromocitoma e paraganglioma. A análise genética deve ser oferecida a todos os pacientes diagnosticados com a doença, especialmente aqueles de baixa idade, todos os paragangliomas e os tumores com comportamento maligno. A estratégia do sequenciamento direto juntamente com o MLPA mostrou-se uma ferramenta diagnóstica efetiva no atendimento de pacientes com FEO/PGL. Esse tipo de análise molecular feita em conjunto tem uma maior sensibilidade e pode facilitar o acompanhamento e aconselhamento genético dos pacientes e seus familiares.

CONCLUSÕES

O estudo da patogênese molecular dos FEO/PGL é importante para a compreensão dos aspectos clínicos dos pacientes e para o devido acompanhamento e aconselhamento genético dos mesmos.

Os resultados obtidos pela análise dos aspectos clínicos, bioquímicos, imunohistoquímicos e genético-moleculares de uma série de casos de feocromocitomas e paragangliomas atendidos no ambulatório de Endocrinologia das Gônadas e Adrenais do Hospital Universitário de Brasília (HUB) nos permitiram concluir que:

- Os pacientes apresentaram idade variada (de 12 anos à 68 anos); a maioria dos tumores foi de localização adrenal; a média de tamanho dos tumores foi de 6.58cm; 23.5% da casuística apresentou malignidade, sendo os linfonodos o sítio mais frequente.
- A maioria dos pacientes apresentou normetanefrina urinária elevada, sendo a catecolamina mais predominante a norepinefrina.
- A análise imunohistoquímica convencional dos tumores, com intuito de diagnosticar tumores neuroendócrinos se mostrou satisfatória, confirmando o diagnóstico de todos os pacientes. No entanto, a imunohistoquímica para a enzima SDH não demonstrou correlação com o diagnóstico molecular
- Foi encontrada uma frequência de 35.3% (n=6) de casos portadores de mutações germinativas, sendo 1 *missense* no gene *VHL*, 1 *missense* no *RET* e 4 grandes deleções no gene *SDHB*.
- A deleção completa do exon 1 do gene *SDHB* foi a mutação mais frequente, associada a idade precoce de início da doença (3 casos, de 4) e a ocorrência apenas em paragangliomas nessa série.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DeLellis RA. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs: World Health Organization; 2004.
2. Benn DE, Gimenez-Roqueplo A-P, Reilly JR, Bertherat J, Burgess J, Byth K, et al. Clinical presentation and penetrance of pheochromocytoma/paraganglioma syndromes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006;91(3):827-36.
3. Holton P. Noradrenaline in tumours of the adrenal medulla. *The Journal of Physiology*. 1949;108(4):525-9.
4. Pacak K. PHEOCHROMOCYTOMA: A CATECHOLAMINE AND OXIDATIVE STRESS DISORDER. *Endocrine regulations*. 2011;45(2):65.
5. Burnichon N, Rohmer V, Amar L, Herman P, Leboulleux S, Darrouzet V, et al. The succinate dehydrogenase genetic testing in a large prospective series of patients with paragangliomas. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009;94(8):2817-27.
6. Komminoth P, Perren A, van Nederveen FH, de Krijger RR. Familial endocrine tumours: phaeochromocytomas and extra-adrenal paragangliomas. *Diagnostic Histopathology*. 2009;15(2):61-8.
7. BAUSCH B, BOEDEKER CC, BERLIS A, BRINK I, CYBULLA M, WALZ MK, et al. Genetic and Clinical Investigation of Pheochromocytoma. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1073(1):122-37.
8. Welander J, Söderkvist P, Gimm O. Genetics and clinical characteristics of hereditary pheochromocytomas and paragangliomas. *Endocrine-related cancer*. 2011;18(6):R253-R76.
9. Kantorovich V, King KS, Pacak K. SDH-related pheochromocytoma and paraganglioma. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010;24(3):415-24.
10. Cascon A, Lopez-Jimenez E, Landa I, Leskelä S, Leandro-Garcia L, Maliszewska A, et al. Rationalization of genetic testing in patients with apparently sporadic pheochromocytoma/paraganglioma. *Hormone and metabolic research*. 2009;41(09):672-5.
11. Karagiannis A, Mikhailidis DP, Athyros VG, Harsoulis F. Pheochromocytoma: an update on genetics and management. *Endocrine-related cancer*. 2007;14(4):935-56.
12. Kopetschke R, Slisko M, Kilisli A, Tuschy U, Wallaschofski H, Fassnacht M, et al. Frequent incidental discovery of phaeochromocytoma: data from a German cohort of 201 phaeochromocytoma. *European Journal of Endocrinology*. 2009;161(2):355-61.

13. Chen H, Sippel RS, O'Dorisio MS, Vinik AI, Lloyd RV, Pacak K. The North American Neuroendocrine Tumor Society consensus guideline for the diagnosis and management of neuroendocrine tumors: pheochromocytoma, paraganglioma, and medullary thyroid cancer. *Pancreas*. 2010;39(6):775-83.
14. Parenti G, Zampetti B, Rapizzi E, Ercolino T, Giachè V, Mannelli M. Updated and new perspectives on diagnosis, prognosis, and therapy of malignant pheochromocytoma/paraganglioma. *Journal of oncology*. 2012;2012.
15. Pacak K. Preoperative management of the pheochromocytoma patient. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007;92(11):4069-79.
16. Lloyd RV. Adrenal cortical tumors, pheochromocytomas and paragangliomas. *Modern Pathology*. 2011;24:S58-S65.
17. Falcão P, Silva E, Molina O, Cury S. Sporadic Pheochromocytoma: Anapathologic, Immunohistochemical And Cytogenetic Aspects Associated With The Occurrence Of Metastasis: A Literature Review. 2012.
18. Wiedenmann B, Franke WW, Kuhn C, Moll R, Gould VE. Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1986;83(10):3500-4.
19. Kimura N, Sasano N, Yamada R, Satoh J. Immunohistochemical study of chromogranin in 100 cases of pheochromocytoma, carotid body tumour, medullary thyroid carcinoma and carcinoid tumour. *Virchows Archiv A*. 1988;413(1):33-8.
20. Movahedi-Lankarani S, Kurman RJ. Calretinin, a more sensitive but less specific marker than [alpha]-inhibin for ovarian sex cord-stromal neoplasms: an immunohistochemical study of 215 cases. *The American journal of surgical pathology*. 2002;26(11):1477-83.
21. Eisenhofer G, Tischler AS, de Krijger RR. Diagnostic tests and biomarkers for pheochromocytoma and extra-adrenal paraganglioma: from routine laboratory methods to disease stratification. *Endocrine pathology*. 2012;23(1):4-14.
22. Gimenez-Roqueplo A-P, Favier J, Rustin P, Rieubland C, Crespin M, Nau V, et al. Mutations in the SDHB gene are associated with extra-adrenal and/or malignant phaeochromocytomas. *Cancer research*. 2003;63(17):5615-21.
23. Gimenez-Roqueplo A-P, Favier J, Rustin P, Rieubland C, Kerlan Vr, Plouin P-F, et al. Functional consequences of a SDHB gene mutation in an apparently sporadic pheochromocytoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002;87(10):4771-4.
24. Jimenez C, Rohren E, Habra MA, Rich T, Jimenez P, Ayala-Ramirez M, et al. Current and future treatments for malignant pheochromocytoma and sympathetic paraganglioma. *Current oncology reports*. 2013;15(4):356-71.

25. Persu A, Lannoy N, Maiter D, Mendola A, Montigny P, Oriot P, et al. Prevalence and spectrum of SDHx mutations in pheochromocytoma and paraganglioma in patients from Belgium: An update. *Hormone and metabolic research*. 2012;44(5):349.
26. Amar L, Baudin E, Burnichon N, Peyrard Sv, Silvera S, Bertherat Jm, et al. Succinate dehydrogenase B gene mutations predict survival in patients with malignant pheochromocytomas or paragangliomas. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007;92(10):3822-8.
27. Chrisoulidou A, Kaltsas G, Ilias I, Grossman AB. The diagnosis and management of malignant pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocrine-related cancer*. 2007;14(3):569-85.
28. Thompson LD. Pheochromocytoma of the Adrenal gland Scaled Score (PASS) to separate benign from malignant neoplasms: a clinicopathologic and immunophenotypic study of 100 cases. *The American journal of surgical pathology*. 2002;26(5):551-66.
29. Ayala-Ramirez M, Palmer JL, Hofmann M-C, de la Cruz M, Moon BS, Waguespack SG, et al. Bone metastases and skeletal-related events in patients with malignant pheochromocytoma and sympathetic paraganglioma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013;98(4):1492-7.
30. Pacak K, Eisenhofer G, Ahlman H, Bornstein SR, Gimenez-Roqueplo A-P, Grossman AB, et al. Pheochromocytoma: recommendations for clinical practice from the First International Symposium. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*. 2007;3(2):92-102.
31. Weber A, Hoffmann MM, Neumann HP, Erlic Z. Somatic mutation analysis of the SDHB, SDHC, SDHD, and RET genes in the clinical assessment of sporadic and hereditary pheochromocytoma. *Hormones and Cancer*. 2012;3(4):187-92.
32. Welsh S, Williams R, Kirkpatrick L, Paine-Murrieta G, Powis G. Antitumor activity and pharmacodynamic properties of PX-478, an inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 α . *Molecular cancer therapeutics*. 2004;3(3):233-44.
33. Oh DY, Kim TW, Park YS, Shin SJ, Shin SH, Song EK, et al. Phase 2 study of everolimus monotherapy in patients with nonfunctioning neuroendocrine tumors or pheochromocytomas/paragangliomas. *Cancer*. 2012;118(24):6162-70.
34. Park K-S, Lee J-L, Ahn H, Koh J-M, Park I, Choi J-S, et al. Sunitinib, a novel therapy for anthracycline- and cisplatin-refractory malignant pheochromocytoma. *Japanese journal of clinical oncology*. 2009;39(5):327-31.
35. Saito Y, Tanaka Y, Aita Y, Ishii K-a, Ikeda T, Isobe K, et al. Sunitinib induces apoptosis in pheochromocytoma tumor cells by inhibiting VEGFR2/Akt/mTOR/S6K1

pathways through modulation of Bcl-2 and BAD. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2012;302(6):E615-E25.

36. Vicha A, Musil Z, Pacak K. Genetics of pheochromocytoma and paraganglioma syndromes: new advances and future treatment options. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. 2013;20(3):186-91.

37. Dahia PL. Novel Hereditary Forms of Pheochromocytomas and Paragangliomas. 2013.

38. Jafri M, Maher ER. GENETICS IN ENDOCRINOLOGY: The genetics of phaeochromocytoma: using clinical features to guide genetic testing. *European Journal of Endocrinology*. 2012;166(2):151-8.

39. Dahia PL. Pheochromocytoma and paraganglioma pathogenesis: learning from genetic heterogeneity. *Nature Reviews Cancer*. 2014;14(2):108-19.

40. Nölting S, Grossman AB. Signaling pathways in pheochromocytomas and paragangliomas: prospects for future therapies. *Endocrine pathology*. 2012;23(1):21-33.

41. Marx SJ. Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Nature Reviews Cancer*. 2005;5(5):367-75.

42. Smith-Hicks CL, Sizer KC, Powers JF, Tischler AS, Costantini F. C-cell hyperplasia, pheochromocytoma and sympathoadrenal malformation in a mouse model of multiple endocrine neoplasia type 2B. *The EMBO journal*. 2000;19(4):612-22.

43. Barontini M, Dahia PL. VHL disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010;24(3):401-13.

44. Woodward ER, Maher ER. Von Hippel-Lindau disease and endocrine tumour susceptibility. *Endocrine-related cancer*. 2006;13(2):415-25.

45. Comino-Méndez I, Gracia-Aznárez FJ, Schiavi F, Landa I, Leandro-García LJ, Letón R, et al. Exome sequencing identifies MAX mutations as a cause of hereditary pheochromocytoma. *Nature genetics*. 2011;43(7):663-7.

46. Burnichon N, Cascón A, Schiavi F, Morales NP, Comino-Méndez I, Abermil N, et al. MAX mutations cause hereditary and sporadic pheochromocytoma and paraganglioma. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(10):2828-37.

47. Bayley J-P, Devilee P, Taschner PE. The SDH mutation database: an online resource for succinate dehydrogenase sequence variants involved in pheochromocytoma, paraganglioma and mitochondrial complex II deficiency. *BMC medical genetics*. 2005;6(1):39.

48. Hensen EF, Bayley J-P. Recent advances in the genetics of SDH-related paraganglioma and pheochromocytoma. *Familial cancer*. 2011;10(2):355-63.

49. van Nederveen FH, Gaal J, Favier J, Korpershoek E, Oldenburg RA, de Bruyn EM, et al. An immunohistochemical procedure to detect patients with paraganglioma and

phaeochromocytoma with germline SDHB, SDHC, or SDHD gene mutations: a retrospective and prospective analysis. *The lancet oncology*. 2009;10(8):764-71.

50. Castelblanco E, Santacana M, Valls J, de Cubas A, Cascón A, Robledo M, et al. Usefulness of Negative and Weak-Diffuse Pattern of SDHB Immunostaining in Assessment of SDH Mutations in Paragangliomas and Pheochromocytomas. *Endocrine pathology*. 2013;24(4):199-205.

51. Eisenhofer G, Bornstein SR, Brouwers FM, Cheung N-KV, Dahia PL, de Krijger RR, et al. Malignant pheochromocytoma: current status and initiatives for future progress. *Endocrine-related cancer*. 2004;11(3):423-36.

52. Gimenez-Roqueplo AP, Lehnert H, Mannelli M, Neumann H, Opocher G, Maher ER, et al. Pheochromocytoma, new genes and screening strategies. *Clinical Endocrinology*. 2006;65(6):699-705.

53. McWhinney SR, Pilarski RT, Forrester SR, Schneider MC, Sarquis MM, Dias EP, et al. Large germline deletions of mitochondrial complex II subunits SDHB and SDHD in hereditary paraganglioma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(11):5694-9.

54. John S, Weitzner G, Rozen R, Scriver C. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Research*. 1991;19(2):408.

55. Martins RG, Nunes JB, Máximo V, Soares P, Peixoto J, Catarino T, et al. A founder SDHB mutation in Portuguese paraganglioma patients. *Endocrine-related cancer*. 2013;20(6):L23-L6.

56. Muth A, Abel F, Jansson S, Nilsson O, Ahlman H, Wängberg B. Prevalence of germline mutations in patients with pheochromocytoma or abdominal paraganglioma and sporadic presentation: a population-based study in Western sweden. *World journal of surgery*. 2012;36(6):1389-94.

57. Erlic Z, Rybicki L, Peczkowska M, Golcher H, Kann PH, Brauckhoff M, et al. Clinical predictors and algorithm for the genetic diagnosis of pheochromocytoma patients. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(20):6378-85.

58. Cascón A, Pita G, Burnichon N, Landa I, López-Jiménez E, Montero-Conde C, et al. Genetics of pheochromocytoma and paraganglioma in Spanish patients. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009;94(5):1701-5.

59. Kodama H, Iihara M, Nissato S, Isobe K, Kawakami Y, Okamoto T, et al. A large deletion in the succinate dehydrogenase B gene (SDHB) in a Japanese patient with abdominal paraganglioma and concomitant metastasis. *Endocrine journal*. 2010;57(4):351.

60. Cascón A, Montero-Conde C, Ruiz-Llorente S, Mercadillo F, Letón R, Rodríguez-Antona C, et al. Gross SDHB deletions in patients with paraganglioma detected by multiplex PCR: a possible hot spot? *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2006;45(3):213-9.
61. Cilliers D, Park S-M, Sarson K, Kenwick S, Simpson H, Bradley L, et al. A Family with Co-existing SDHB and SDHD Mutations Causing Hereditary Paraganglioma Syndrome. *American Journal of Cancer Case Reports*. 2013;1(1):21-7.
62. Solis D, Burnichon N, Timmers H, Raygada M, Kozupa A, Merino M, et al. Penetrance and clinical consequences of a gross SDHB deletion in a large family. *Clinical genetics*. 2009;75(4):354-63.
63. Neumann HP, Erlic Z, Boedeker CC, Rybicki LA, Robledo M, Hermsen M, et al. Clinical predictors for germline mutations in head and neck paraganglioma patients: cost reduction strategy in genetic diagnostic process as fall-out. *Cancer research*. 2009;69(8):3650-6.
64. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1971;68(4):820-3.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa clínica intitulada **“Patogênese molecular dos tumores adrenais: Feocromocitomas e carcinomas adrenocorticais”**, realizada no Hospital Universitário de Brasília-HUB, Setor de Endocrinologia e Metabologia.

Sua participação neste estudo é voluntária. Trata-se de uma pesquisa a respeito da doença de que você é portador (ou alguns de seus parentes), isto é, Feocromocitoma, Paraganglioma, ou carcinoma adrenocortical. O Feocromocitoma e o Paraganglioma são tumores que produzem hormônios (catecolaminas) e que surgem geralmente na glândula adrenal ou podem surgir em outras regiões do corpo. O carcinoma adrenocortical é um tumor raro, que surge na glândula adrenal. Sabe-se que essas doenças podem ser causadas por problemas genéticos que podem ser herdados em pessoas da mesma família, isto é, possivelmente por uma mutação genética. Os médicos responsáveis por esta pesquisa estão tentando descobrir o tipo de alteração genética que causa essa doença.

A sua participação nesta pesquisa é importante para os avanços dos conhecimentos da Medicina, que ocorrem através de estudos como este. Neste caso, este estudo poderá contribuir para melhor entendimento das causas desses tumores.

Será solicitado, após a leitura, que assine o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), em duas vias, ficando uma com você e outra com o pesquisador. Em seguida, será coletada uma amostra de sangue que ficará armazenada no Laboratório de Farmacologia Molecular da UnB, para realização do exame molecular. Esses procedimentos serão realizados durante sua consulta ambulatorial de rotina, onde também serão verificados seus dados e de sua história médica. Você poderá se recusar a responder qualquer pergunta que lhe cause constrangimento. O seu acompanhamento clínico continuará seguindo normalmente conforme a rotina do Ambulatório.

A amostra de sangue (de 10 a 20 mL em adultos e em crianças maiores de dez anos, e de 2 a 10 mL de sangue em crianças até dez anos) será coletada de uma veia do antebraço, utilizando uma agulha e seringa (descartáveis). As complicações que podem ocorrer devido a este procedimento são: leve dor, inchaço (inflamação), infecção ou uma marca "preto-azulada" no local da picada (hematoma).

Em caso de ocorrência de uma desses eventos após a punção venosa, o Sr (a) deverá contactar a pesquisadora responsável por esse projeto, a qual irá lhe encaminhar à médica responsável pelo ambulatório de Endocrinologia das Gônadas e Adrenais do HUB e orientadora dessa pesquisa, Dra Adriana Lofrano Alves Porto.

A partir da coleta do sangue, serão cultivadas as células brancas do seu sangue para obter DNA (seu código ou identidade genética), para que nele sejam estudados alguns genes que possam estar alterados e causar doenças.

Além disso, os pesquisadores responsáveis por este estudo irão coletar e armazenar no laboratório de Farmacologia da UnB um pequeno fragmento de aproximadamente 0,5 cm do tumor que será retirado durante a cirurgia que você realizará para o tratamento da sua doença. O DNA desse pequeno fragmento do tumor será analisado para verificar se alguns genes do tumor possam estar alterados e se essas alterações se relacionam com o aparecimento desse tumor. Esse procedimento não lhe causará nenhum risco ou desconforto, pois o fragmento será coletado após o tumor ter sido retirado do seu corpo, o material coletado (DNA extraído do sangue ou material proveniente do tumor) será armazenado por 10 anos.

Os resultados desta pesquisa poderão esclarecer se existe causa genética para a sua doença. Isso poderá ou não contribuir para a sua saúde diretamente, pois, caso seja encontrada uma mutação no seu caso, isso poderá determinar como o tratamento deverá ser continuado. Caso a mutação encontrada não seja útil para a determinação do seu tratamento, poderá ser útil para o diagnóstico de outros membros da sua família, ou ainda, para o esclarecimento da doença de outras pessoas que tenham o mesmo problema.

Você poderá ter acesso a todas as informações e esclarecimentos que desejar a qualquer momento, antes ou durante a pesquisa. A decisão de não participar, ou de se retirar do estudo depois do mesmo já ter iniciado, não ocasionará nenhum problema no seu tratamento no HUB, bastando para isto comunicar o seu desejo ao pesquisador responsável.

Nenhum tipo de pagamento será feito pela sua participação como voluntário(a) nessa pesquisa, e todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade.

Todas as informações acerca dos dados obtidos, inclusive biológico (amostra de sangue), serão utilizados exclusivamente para fins do estudo. Por serem confidenciais, estarão restritas ao prontuário médico da instituição.

Os resultados do estudo poderão ser publicados em revistas médicas nacionais e ou internacionais, apresentados em congressos ou eventos científicos ou às autoridades sanitárias, sem que seu nome seja mencionado em parte alguma.

Assinando este consentimento você estará autorizando o acesso ao seu prontuário médico sem, no entanto, renunciar aos seus direitos.

Se durante o estudo houver necessidade de esclarecer alguma dúvida entre em contato com a Dra. Adriana Lofrano Alves Porto pelo telefone 3448-5255 ou pelo email adlofrano@unb.br.

Outras informações a respeito dos procedimentos ou questões éticas, você poderá obter com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília pelo telefone 3107-1947 ou no local.

DECLARAÇÃO DO PACIENTE

Eu, _____
_____, voluntariamente, concordo em participar do Estudo acima, a ser realizado no HUB/UNB. Declaro ter lido e compreendido este TCLE, fui informado de todos os dados, pude fazer perguntas e recebi respostas que me satisfizeram. Se eu não participar ou

se eu decidir suspender minha participação neste estudo, não serei penalizado e não renunciarei a quaisquer direitos legais. Eu recebi uma cópia deste TCLE.

Assinatura do paciente:

Assinatura do responsável legal:

Data: / /

Nome da pessoa que conduziu a discussão do consentimento:

Assinatura do Investigador:

Prof. Dra. Adriana Lofrano Alves Porto
Professora Adjunta do Curso de Ciências Farmacêuticas – UnB
Endocrinologista – Hospital Universitário de Brasília
Contato: ambulatório de Endocrinologia – HUB (quintas-feiras à tarde) – 3448-5255
Email: adlofrano@unb.br

APÊNDICE B – TABELA DE ANÁLISE MOLECULAR POR GENES INDIVIDUAIS.

No.	Sequenciamento					MLPA	
	<i>VHL</i>	<i>SDHB</i>	<i>SDHD</i>	<i>SDHC</i>	<i>MAX</i>	<i>SDH</i>	<i>VHL</i>
1	Completo	Completo	Completo	*Em andamento	*Em andamento	Completo	Completo
2	Não realizado	Não realizado	Completo	Completo	Não realizado	Não realizado	Não realizado
3	Completo	Completo	Completo	*Em andamento	*Em andamento	Completo	Completo
4	Completo	Completo	Completo	*Em andamento	*Em andamento	Completo	Completo
5	Completo	Completo	Completo	*Em andamento	*Em andamento	Completo	Completo
6	Completo	Completo	Completo	*Em andamento	*Em andamento	Completo	Completo
7	Completo	Completo	Completo	*Em andamento	*Em andamento	Completo	Completo
8	Completo	Completo	Completo	*Em andamento	*Em andamento	Completo	Completo
9	Completo	Completo	Completo	*Em andamento	*Em andamento	Completo	Completo
10	Completo	Completo	Completo	*Em andamento	*Em andamento	Completo	Completo
11	Completo	Completo	Completo	*Em andamento	*Em andamento	Completo	Completo
12	Completo	Completo	Completo	*Em andamento	*Em andamento	Completo	Completo
13	Completo	Completo	Completo	*Em andamento	*Em andamento	Completo	Completo
14	Em andamento	Em andamento	Em andamento	*Em andamento	*Em andamento	Completo	Completo
15	Completo	Completo	Completo	*Em andamento	*Em andamento	Completo	Completo
16	Completo	Completo	Completo	*Em andamento	*Em andamento	Completo	Completo
17	Completo	Completo	Completo	*Em andamento	*Em andamento	Completo	Completo

*Éxons remanescentes: *MAX*: exon 2; *SDHC*: exon 6.

ANEXO A - APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA 061/12 PELO
COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA COM SERES HUMANOS DA FACULDADE
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE.



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: **061/12**

Título do Projeto: “Patogênese molecular dos tumores adrenais feocromocitomas e carcinomas adrenocorticais.”.

Pesquisadora Responsável: Olivia Laquis de Moraes

Data de Entrada: 07/05/12

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** ao projeto **061/12** com o título: “Patogênese molecular dos tumores adrenais feocromocitomas e carcinomas adrenocorticais”, analisado na 10ª Reunião Ordinária, realizada no dia 13 de novembro de 2012.

A pesquisadora responsável fica, desde já, notificada da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 13 de novembro de 2012.

Prof. Nairi Monsore
Coordenador do CEP-FS/UnB