

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

**FRANCIELE ANTONIETA BIANCHI LEIDENZ**

Síndrome de Paraganglioma Familiar

Análise clínico-molecular de uma família mineira

Belo Horizonte

Fevereiro 2014

FRANCIELE ANTONIETA BIANCHI LEIDENZ

Síndrome de Paraganglioma Familiar

Análise clínico-molecular de uma família mineira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Luiz Armando Cunha De Marco

Co-orientador: Prof. Marcelo Magaldi

Belo Horizonte

Fevereiro 2014

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar ao meu orientador, Prof. Luiz Armando, o melhor exemplo de Mestre. Obrigada pelas oportunidades de aprendizado, por me ajudar na minha realização profissional, pelos ensinamentos na Medicina e na vida.

Aos queridos pacientes participantes do estudo, que me receberam muito bem, por entenderem a relevância das pesquisas e por doarem mais do que seu tempo para a concretização desse trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcelo Magaldi, de quem partiu a idéia inicial deste estudo.

Ao Professor Dr. Marcelo Mamede, responsável pelas imagens obtidas com o PET.

À Professora Dra. Paula Vidigal, que me ajudou na caracterização das peças e na seleção de lâminas para o estudo de LOH.

Aos professores, Dr. Eitan Friedman, Dr. Allen Bale, Dra. Luciana Bastos Rodrigues e Dra. Marta Sarquis, que nos auxiliaram nas várias discussões dos resultados.

Aos amigos e colegas do laboratório, que tornam as horas na bancada mais prazerosas, me ensinam a cada dia e me orgulham das pesquisas no Brasil.

À minha família, mamãe, Mauro e Dudu, que me incentivaram e compreenderam meus inúmeros momentos de ausência.

À Prof. Dra. Wolfanga, que me ensinou e transmitiu, desde o primeiro período da faculdade, todo o seu entusiasmo pela pesquisa médica.

À FAPEMIG, pelo custeio de parte dos gastos no desenvolvimento desse trabalho.

À Deus, por todas as inúmeras bênçãos a mim concedidas ao longo da minha vida.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATP – Adenosina Tri-Fosfato

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTPs – “Deoxyribonucleotide triphosphate”; termo genérico que define os quatro deoxiribonucleotídeos (dATP, dGTP,DTTP, dCTP)

EDTA – Ácido etileno di-amino tetra-acético (ethylenediaminetetraacetic acid)

HC – Hospital das Clínicas

HNPGL – “Head and neck paraganglioma”

kDa – KiloDaltons

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio

mg – Miligrama

ml – Mililitro

MM – Milimolar

mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro

NaCl – Cloreto de Sódio

NAD – Dinucleotideo de Nicotinamida e Adenina

pb – Pares de base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PCC – Feocromocitoma

PGL – Paraganglioma

PGL1 – Síndrome de Paraganglioma Familiar do Tipo 1

PGL2 - Síndrome de Paraganglioma Familiar do Tipo 2

PGL3 - Síndrome de Paraganglioma Familiar do Tipo 3

PGL4 - Síndrome de Paraganglioma Familiar do Tipo 4

SNP – Polimorfismo único de nucleotídeos

TC – Tomografia Computadorizada

PET – Tomografia por Emissão de Pósitrons

<sup>18</sup>F-FDG-PET – PET com glicose marcada com flúor 18

OMS – Organização Mundial de Saúde

TBE – Tris Base EDTA

TE – Tampão Tris-EDTA

TGF $\alpha$  – Fator transformador de crescimento alfa

TM – Annealing temperature

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor

$\mu$ l – Microlitro

$\mu$ m – Micromolar

## RESUMO

Feocromocitomas (PCC) e paragangliomas (PGL) são raros tumores neuroendócrinos provenientes das células cromafins, respectivamente, da medula da supra-renal e de paragânglios simpáticos ou parassimpáticos. A apresentação clínica desses tumores é variada e depende da localização, do perfil secretório e do potencial de malignidade. Paragangliomas simpáticos, assim como feocromocitomas, geralmente secretam catecolaminas ou metanefrinas, sendo clinicamente funcionantes e causando sintomas principalmente cardiovasculares. Paragangliomas parassimpáticos, localizados ao longo do eixo para-vertebral, em sua maioria em cabeça e pescoço, geralmente não são secretores, podem ser assintomáticos ou se apresentarem como tumores de crescimento insidioso, responsáveis por dor e efeitos de massa, como disfagia, disfonia e dispnéia, dependendo de sua localização.

PCC e PGL são usualmente tumores esporádicos, mas cerca de 30% são causados por mutações germinativas que originam, até o momento, quatro síndromes distintas, chamadas de Síndromes de Paragangliomas do tipo 1 ao tipo 4 (PGL 1 a PGL 4), as quais são associadas a mutações nos genes da succinil desidrogenase (SDH), um complexo enzimático mitocondrial envolvido na cadeia transportadora de elétrons e no Ciclo de Krebs.

Uma dessas síndromes, causada por mutações no gene SDHD é descrita detalhadamente nesse trabalho. Trata-se de uma família mineira composta por 10 membros, entre os quais, 2 eram clinicamente afetados, mas faleceram previamente à realização desse estudo, 5 são afetados clinicamente e 2 são crianças ainda assintomáticas.

Os indivíduos foram submetidos a exame clínico completo, com revisão laboratorial, dosagem de catecolaminas plasmáticas e urinárias, estudo de imagem através de TC e  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET, além de estudo molecular dos principais genes associados à essa doença. Todos os indivíduos vivos da família foram analisados e possuem as mesmas alterações genéticas. Uma mutação missense no exon 1, Trp5X, que leva à transcrição de um stop códon, responsável pelo fenótipo. Além disso, todos os indivíduos afetados possuem também uma segunda mutação, no exon 2, Pro53Leu, de significado ainda incerto. Entre esses indivíduos portadores das mutações, quatro são clinicamente sintomáticos, um é assintomático, mas possui um feocromocitoma diagnosticado por estudo de imagem e dois são crianças assintomáticas e ainda não submetidas a estudos de imagem por serem muito novas em relação à idade habitual de surgimentos dos tumores. Apesar de serem tumores geralmente benignos, através do PET evidenciamos a presença de múltiplas metástases locais em alguns dos membros acometidos.

Nesse trabalho pudemos descrever de maneira mais completa o comportamento de uma síndrome de paraganglioma familiar, entidade bastante rara e, por isso, até então, cercada de várias questões ainda não completamente elucidadas. Propomos abordagem cirúrgica para os membros da família que apresentavam manifestações clínicas mais significativas e terapêutica conservadora para os indivíduos que apresentavam doença leve, comorbidades graves ou preferência pessoal. Acompanhamento clínico e imaginológico detalhado dos indivíduos deve ser realizado para percebermos como é o comportamento da doença a longo prazo. As crianças portadoras das mutações serão acompanhadas no Hospital das Clínicas por pediatra experiente e serão submetidas periodicamente a exames de imagem, na tentativa de se surpreender tumores incipientes e, com isso, diminuir a morbimortalidade da doença.

**Palavras-chave:** Feocromocitoma; paraganglioma; paraganglioma extrassuprarrenal; tumor de corpo carotídeo; succinato desidrogenase; tomografia por emissão de pósitrons.



## ABSTRACT

Pheochromocytomas (PCC) and paragangliomas (PGL) are rare neuroendocrine tumors arising from chromaffin cells of the adrenal medulla or extra-adrenal paraganglia, sympathetic or parasympathetic, respectively. These tumors have a wide variety of clinical presentation; it depends on their localization, secretory profile and malignant potential. Sympathetic paragangliomas as well as pheochromocytomas usually secrete catecholamines or metanephrines, being clinically functional and causing mostly cardiovascular symptoms. Parasympathetic paragangliomas, which extend along the paravertebral axis, mainly in the head and neck, are usually nonfunctioning tumors; they can be asymptomatic or behave as slow-growing masses, responsible for pain, mass effect, such as dysphagia, dysphonia and dyspnea, depending on their localization.

Although PCC and PGL are commonly sporadic tumors, about 30% of them are caused by germline mutations that lead to, up to now, four distinct syndromes, named Paraganglioma Syndromes Types 1 to 4 (PGL 1 to PGL 4), which are associated with mutations in the Succinate Dehydrogenase genes (*SDH*), a mitochondrial enzymatic complex that plays a role in the electron transport chain and Krebs cycle.

One of these syndromes, caused by mutations in the *SDHD* gene is described in detail in this study. The family from Minas Gerais consists of 10 members, among whom, two were clinically affected, but died prior to the beginning of this study, five are clinically affected and two are children still asymptomatic.

The individuals were submitted to a complete clinical examination, including laboratory exams, dosage of catecholamines and metanephrines (both serum and urine), imaging study with Computed Tomography (CT) and fluorine-18 (<sup>18</sup>F)-fluorodeoxyglucose (FDG)-positron emission tomography (PET/CT) scan, in addition to molecular study of the most disease-related genes. All living individuals of the family were analyzed and presented the same genetic alterations. A missense mutation in exon 1, Trp5X, leads to the transcription of a stop codon, responsible for the phenotype.

In addition to this mutation, all affected individuals also showed a second mutation in exon 2 (Pro53Leu) of still uncertain significance. Among these mutations carriers, four are clinically symptomatic, one of them is asymptomatic and has a pheochromocytoma diagnosed by image study. Another two are asymptomatic children not yet submitted to imaging studies due to their young ages and mean age of phenotype presentation.

Even though these tumors are usually benign, we demonstrated, using PET imaging, the presence of multiple local metastasis in some members of the family.

In this work we were able to completely describe the behavior of a rare disease, familial paraganglioma syndrome, a condition that is yet not entirely understood. We suggested a surgical approach to the family members that were clinically more symptomatic and a conservative approach to the ones presenting mild illness, severe co-morbidities or showed personal preference. Careful clinical and imaging follow-up of the subjects must be done in order to evaluate the disease behavior in the long run. The children carrying the mutations will be followed up at Hospital das Clínicas by an experienced pediatrician and will be submitted

periodically to imaging exams to diagnose early tumors and, therefore, decrease the morbidity of this disease.

**Keywords:** Pheochromocytoma; paraganglioma; extra-adrenal paragangliomas; carotid body tumor; succinate dehydrogenase; positron-emission tomography.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição anatômica dos paragânglios .....	20
Figura 2. Frequências relativas de mutações gênicas germinativas (azul) ou somáticas (verde) em feocromocitomas e paraganglioma .....	21
Figura 3. Complexo enzimático SDHx .....	23
Figura 4. Regulação de HIF- $\alpha$ .....	25
Figura 5. Gene SDHB .....	29
Figura 6. Gene SDHD .....	30
Figura 7. Protocolo para testes genéticos.....	36
Figura 8. Heredograma Fenotípico .....	51
Figura 9. Imagens de 18F-FDG PET/CT do indivíduo I.1.....	55
Figura 10. Imagens de 18F-FDG PET/CT do indivíduo II.4.....	56
Figura 11. Imagens de <sup>18</sup> F-FDG PET/CT do indivíduo II.5 .....	57
Figura 12. Imagens de <sup>18</sup> F-FDG PET/CT do indivíduo II.6 .....	58
Figura 13. Genealogia da família portadora de mutações em <i>SDHD</i> .....	60
Figura 14. Eletroferogramas representativos do indivíduo I.2 .....	60
Figura 15. Eletroferogramas de indivíduo controle para as mutações Trp5X (a) e Pro53Leu (b). .....	61
Figura 16. Eletroferogramas representativos de todos os indivíduos afetados da família .....	62
Figura 17. Eletroferogramas representativos de todos os indivíduos afetados da família .....	63
Figura 18. Predição de dano à proteína causada pela mutação Trp5X em ensembl.com.....	64
Figura 19. Imagem do servidor PolyPhen-2 .....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais características das síndromes de paraganglioma do tipo 1 a 4 (PGL1 a PGL4). .....	29
Tabela 2. Características de amplificação por PCR dos genes estudados. ....	46
Tabela 3. Resultados da análise genética e fenotípica de síndrome familiar de PGL1 em Belo Horizonte, Minas Gerais, 2013 .....	66

## SUMARIO

INTRODUÇÃO .....	16
1. INTRODUÇÃO .....	17
1.1 Caracterização Clínica: Feocromocitomas e Paragangliomas .....	17
1.2 Aspectos Moleculares .....	20
1.3 Diagnóstico.....	32
1.4 Tratamento .....	34
1.5 Rastreamento.....	35
OBJETIVOS.....	38
2. OBJETIVOS.....	39
MATERIAIS E MÉTODOS .....	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	41
3.1 Pacientes e controles .....	41
3.2 Coleta dos dados clínicos .....	42
3.3 Coleta do material biológico .....	42
3.4 Extração de DNA do sangue.....	42
3.5 Extração de DNA do tumor .....	43
3.6 Amplificação e seqüenciamento das amostras.....	44
3.7 Análise das mutações.....	45
3.8 Exames Complementares .....	47
RESULTADOS .....	50
4. RESULTADOS .....	51
4.1 Caracterização Clínica .....	51

4.2	Caracterização Molecular .....	59
	DISCUSSÃO .....	67
5.	DISCUSSÃO .....	68
	CONCLUSÃO .....	71
6.	CONCLUSÃO .....	72
	REFERÊNCIAS.....	73
7.	REFERÊNCIAS.....	74
	ANEXOS .....	80
8.	ANEXOS .....	81
8.1	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	81
8.2	AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE ESTUDO DE CASO EM PERIÓDICO .....	84
8.3	QUESTIONÁRIO .....	86

# **INTRODUÇÃO**



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Caracterização Clínica: Feocromocitomas e Paragangliomas

Feocromocitomas e paragangliomas são tumores do sistema nervoso autônomo simpático ou parassimpático que se desenvolvem, respectivamente, a partir da medula da glândula adrenal ou dos paragânglios extra-adrenais. Paragânglios são órgãos formados por células neuroendócrinas derivadas da crista neural embrionária, capazes de sintetizar e secretar catecolaminas. Eles desempenham papel importante na homeostase do organismo, principalmente monitorando as condições de hipóxia, hemorragia, temperatura e hipoglicemia, atuando como sensores químicos, ou secretando catecolaminas em resposta ao stress (Barbara e Stratakis, 2009).

Existem divergências de nomenclatura, mas conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS), em sua classificação de 2004 de tumores de órgãos endócrinos, feocromocitoma é um paraganglioma intra-adrenal que surge das células cromafins da medula adrenal, enquanto paragangliomas são tumores localizados fora desse órgão (Barbara e Stratakis, 2009). Os paragangliomas podem ser simpáticos ou parassimpáticos. Os primeiros se originam de cadeias simpáticas usualmente localizadas em tórax, abdome e pelve. Os últimos se originam de nervos parassimpáticos localizados principalmente na região da cabeça, pescoço e mediastino superior, sendo chamados de Paragangliomas de cabeça e pescoço (“head and neck paragangliomas” ou HNPGL) e funcionam principalmente como quimiorreceptores, podendo ser chamados de quemodectomas ou tumores glômicos (figura 1). Os HNPGL podem estar localizados em mais de 20 sítios diferentes, incluindo os paragânglios jugular, vagal, timpânico,

sendo os de corpo carotídeo os mais comuns. Fatores de risco para esse tipo de paraganglioma incluem condições associadas à hipóxia crônica, como viver em elevadas altitudes, doenças cardíacas ou respiratórias com hipoxemia arterial crônica e circunstâncias similares (Lefebvre e Foulkes, 2014). Entretanto, entre 10 e 50% dos casos uma condição genética é suspeitada.

A incidência anual combinada de feocromocitomas e de paragangliomas em qualquer local do organismo é estimada em 1 caso por 300.000 por ano na população geral, havendo uma frequência maior em indivíduos submetidos à hipóxia crônica, como habitantes de regiões com elevada altitude ou portadores de doenças cardíacas ou pulmonares (Lefebvre e Foulkes, 2014). Kantorovich *et al.* (2010) estimam a incidência anual desses tumores como algo em torno de 3 a 8 casos por milhão por ano na população geral. Feocromocitoma é o tumor mais comumente encontrado, apresenta incidência anual de 2 a 8 casos por milhão, enquanto paragangliomas são bem mais raros (0,5 caso por milhão) (Lefebvre e Foulkes, 2014).

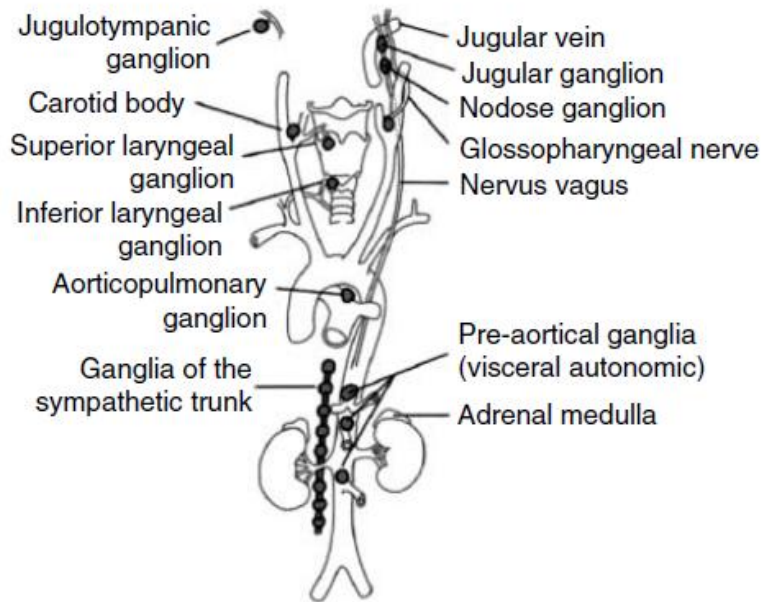
Essa incidência provavelmente é maior, pois existe alto índice de subdiagnósticos (Lefebvre e Foulkes, 2014). Os tumores ocorrem igualmente em ambos os sexos e em todas as idades, mas a maior incidência é entre 40 e 50 anos de idade.

PCC e PGL simpáticos são muito similares tanto histológica quanto funcionalmente, geralmente produzindo grandes quantidades de catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e menos frequentemente, dopamina), levando à hipertensão, paroxística ou sustentada, episódios recorrentes de cefaléia, sudorese, palpitações, dor abdominal ou torácica, falência cardíaca, convulsões e acidentes vasculares. Podem causar efeitos metabólicos como hiperglicemia, acidose láctica e perda ponderal. Paragangliomas produtores de dopamina podem cursar com pressão arterial normal ou até mesmo hipotensão. Até 10% dos pacientes

apresentam apenas sintomas discretos ou são assintomáticos. Até 25% dos feocromocitomas e paragangliomas são descobertos incidentalmente durante exames de imagens realizados por outros propósitos, os chamados incidentalomas ou feocromocitomas/paragangliomas silenciosos (Lefebvre e Foulkes, 2014). Tais tumores são frequentemente encontrados em pacientes portadores de mutações germinativas dos genes *RET*, *VHL*, *SDHB* e *SDHD*.

Os paragangliomas parassimpáticos, entretanto, são usualmente tumores não funcionantes, produzindo pouca ou nenhuma quantidade de catecolaminas. Comportam-se como tumores de crescimento indolente que podem, dependendo do local, causar sintomas como dor, distúrbios auditivos (PGL jugulo-timpânico), déficits em pares cranianos (PGL vagal), disfagia e dispnéia (PGL de corpo carotídeo).

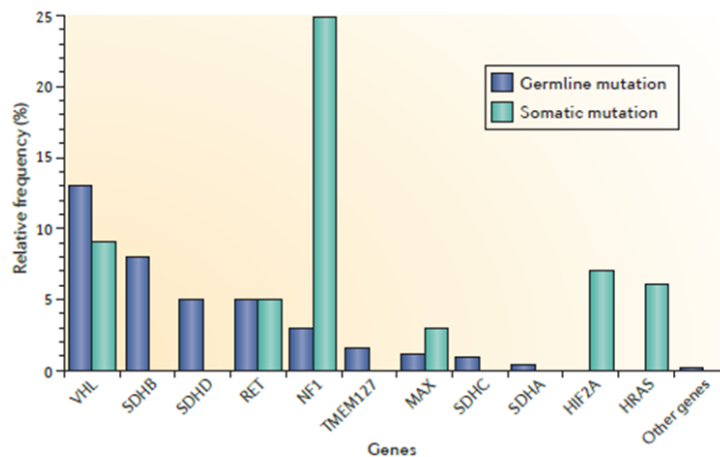
A maioria dos feocromocitomas e paragangliomas é benigna. Critérios histológicos isoladamente não se correlacionam fidedignamente com o comportamento clínico desses tumores. A definição de malignidade é controversa, alguns autores a definem como a presença de metástases à distância, principalmente em ossos, fígado e pulmão. Outros autores definem a malignidade tumoral pela presença de lesões metastáticas em locais onde tecido cromafim não é normalmente encontrado, incluindo linfonodos locais (Dahia PLM, 2014). Metástases de paragangliomas de cabeça e pescoço já foram detectadas até 30 anos após o diagnóstico inicial (Samji *et al.*, 2012). A taxa de malignidade desses tumores é por volta de 5 a 13% em feocromocitomas, 15-23% em PGL simpáticos e 2-20% em PGL parassimpáticos. Tais tumores quando malignos têm prognóstico ruim, sendo a taxa de mortalidade em 5 anos maior que 50% (Welender *et al.*, 2011). Até o momento, não há tratamento curativo ou completamente efetivo para esses casos.



**Figura 1. Distribuição anatômica dos paragânglios.** Feocromocitomas se originam na medula da glândula adrenal, enquanto paragangliomas simpáticos surgem ao longo das cadeias simpáticas na pelve, abdome e tórax. Paragangliomas parassimpáticos, por sua vez, se originam de nervos parassimpáticos localizados na cabeça, no pescoço e no mediastino, sendo o principal sítio os corpos carotídeos (Welander *et al.*, 2011).

## 1.2 Aspectos Moleculares

Cerca de 40% dos PCCs e PGLc são causados por mutações hereditárias. Existem várias síndromes hereditárias nas quais esses tumores podem ocorrer, como a síndrome de neoplasia endócrina múltipla do Tipo 2 (MEN2), Von-Hippel-Lindau (VHL) e neurofibromatose do Tipo 1 (NF1). Nos últimos anos, outros genes de susceptibilidade foram descobertos e associados a casos familiares, como os genes das subunidades do complexo succinil desidrogenase (SDH), proteína transmembrana 127 (TMEM127), fator X associado a MYC (MAX), entre outros, totalizando pelo menos 12 genes envolvidos (Dahia, 2014).



**Figura 2. Frequências relativas de mutações gênicas germinativas (azul) ou somáticas (verde) em feocromocitomas e paragangliomas (Dahia, 2014).**

### 1.2.1 Genes Supressores de Tumor

Supressores de tumor são genes que regulam negativamente o ciclo celular, desacelerando a mitose. Quando íntegros, os genes supressores de tumor reduzem a chance de uma célula se tornar um tumor (Berger *et al.*, 2011). Dessa maneira, mutações ou deleções envolvendo mecanismos genéticos ou epigenéticos podem levar a inativações de tais genes com a consequente progressão tumoral.

Em 1971, Knudson elaborou uma teoria para explicar o papel desses genes no desenvolvimento das neoplasias familiares, também conhecida como teoria *two hit*, ou dos dois eventos mutacionais (Knudson, 1971). O primeiro evento é uma mutação germinativa em heterozigose em determinado gene. O segundo evento consiste na perda somática do alelo normal restante do mesmo gene, chamada de perda de heterozigose (*Loss of heterozygosity*, LOH). A ocorrência desses dois eventos leva à inativação completa da proteína supressora de tumor, o que resulta no descontrole do ciclo celular e, por fim, no desenvolvimento de

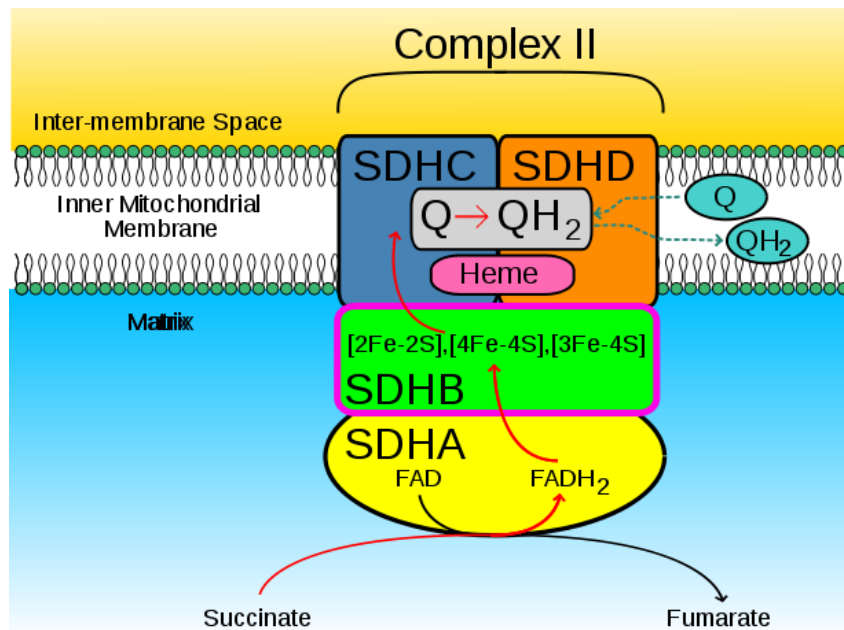
neoplasias. De acordo com a teoria, uma mutação em heterozigose em um gene supressor de tumor predispõe o paciente à doença, mas esta desenvolve-se somente após a inativação do segundo alelo nas células dos tecidos-alvo.

Knudson elaborou sua teoria a partir da observação de famílias portadoras de retinoblastoma, uma doença tumoral com apresentação clínica esporádica ou familiar. Tais pacientes, além de manifestações clínicas, possuíam mutações no gene *RB1*, o primeiro supressor de tumor a ser clonado (Friend *et al.*, 1986). Esse gene codifica a proteína retinoblastoma que inibe a transcrição de genes essenciais da passagem da fase G1 para a fase S do ciclo celular (Wu *et al.*, 1995). O mecanismo para o desenvolvimento de retinoblastoma sugerido por Knudson é compatível com um padrão de herança dominante, assim como o que ocorre em paragangliomas familiares.

### 1.2.2 Complexo SDH (SDHx)

SDH ou Succinato-Ubiquinona Redutase ou Succinato Desidrogenase é o Complexo Mitocondrial II da cadeia respiratória mitocondrial, localizado na matriz mitocondrial, que cataliza a oxidação de succinato a fumarato no Ciclo de Krebs e participa da Cadeia Transportadora de Elétrons, resultando em síntese de ATP e distribuição de energia às células, além de prevenir a formação de espécies reativas do oxigênio potencialmente danosas (Barbara e Stratakis, 2009). Tal complexo enzimático é composto por quatro subunidades (A, B, C e D) traduzidas por quatro genes nucleares (SDHA, SDHB, SDHC e SDHD). As quatro subunidades do SDH tetramérico consistem em uma flavoproteína de 70-kDa (SDHA), uma proteína ferro-sulfúrica de 30-kDa (SDHB), uma subunidade de 15 kDa do citocromo b (SDHD) e uma

subunidade de 12 kDa do citocromo b (SDHC). Os componentes SDHC e SDHD são subunidades hidrofóbicas integradas das membranas mitocondriais que ancoram as subunidades catalíticas hidrofílicas SDHA e SDHB, envolvidas com a cadeia de transporte de elétrons, transferindo um elétron para a coenzima Q (ubiquinona) (figura 3) (Badenhop *et al.*, 2004; Gardner e Shoback, 2013).



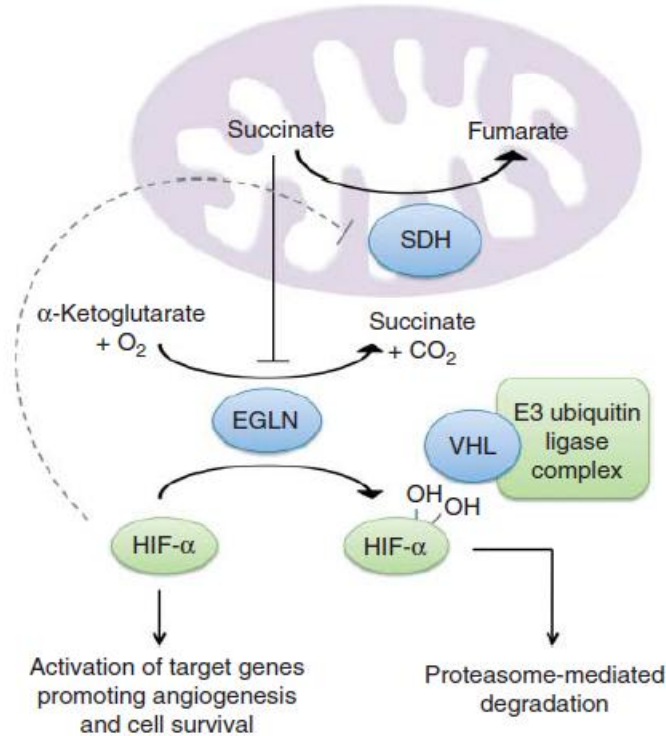
**Figura 3. Complexo enzimático SDHx.** As subunidades C (SDHC) e D (SDHD) são hidrofóbicas e constituintes da membrana mitocondrial. Elas ancoram as demais subunidades B e A (SDHB e SDHA, respectivamente) (Samji *et al.*, 2012).

Mutações germinativas com perda de função das subunidades de SDH resultam em ativação de vias de hipóxia-angiogênese e estão ligadas a síndromes de paraganglioma e/ou feocromictoma hereditários e, também, menos frequentemente, a carcinomas de células renais (CCR), tumores estromais gastrointestinais (*gastrointestinal stromal tumours* - GISTs) e, mais recentemente, a adenomas hipofisários (Dahia, 2014).

O mecanismo tumoral mais provável sugere que mutações nesses genes causem perda ou diminuição da atividade enzimática do complexo SDHx, diminuindo a oxidação de succinato a fumarato e, portanto, gerando acúmulo de succinato dentro das células. Esse excesso causa uma ativação dos fatores induzidos por hipóxia (*Hypoxia-inducible factor* - HIF), fatores de transcrição que são fisiologicamente induzidos em resposta a baixos níveis de oxigênio celular. Essa condição em que as vias dependentes de HIF são permanentemente ativadas independentemente dos níveis de oxigenação é chamada de pseudohipóxia. Com a via HIF ativada, ocorre estabilização dos fatores de transcrição de diversos genes que auxiliam na adaptação e na sobrevivência das células sob condições de hipóxia, resultando em angiogênese acelerada, através do aumento da produção de Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF), e diminuição da apoptose, propiciando o crescimento tumoral (figura 4).

O excesso de succinato exerce regulação pós-transcricional nas subunidades HIF $\alpha$ , etapa essencial ao reconhecimento de HIF para degradação proteossômica. Estabilidade das subunidades HIF $\alpha$  depende da hidroxilação de resíduos de prolina específicos por dioxigenases, as prolil hidroxilases (*prolyl hydroxylases* - PHDs) do tipo 1 (PHD1 ou EGLN2), do tipo 2 (PHD2 ou EGLN1) e do tipo 3 (PHD3 ou EGLN3). A atividade das PHDs é regulada por oxigênio, ferro, ascorbato e  $\alpha$ -cetogluturato ( *$\alpha$ -ketoglutarate* –  $\alpha$ KG), o qual é convertido pelas PHDs em succinato. Na deficiência de SDH há acúmulo de succinato e, devido a sua semelhança estrutural com  $\alpha$ KG, inibe competitivamente a atividade de PHDs no citosol.





**Figura 4. Regulação de HIF- $\alpha$ .** Proteínas que foram encontradas inativadas por mutações germinativas em feocromocitomas e paragangliomas são indicadas em azul. Inativação de SDH, VHL ou EGLN1 provavelmente causa uma resposta pseudo-hipóxica em que HIF-1 $\alpha$  e/ou HIF-2 $\alpha$  escapam da ubiquitinação e se acumulam. Downregulation de SDHB pelos níveis de HIF-1 $\alpha$  (linha tracejada), pode aumentar ainda mais essa resposta (Dahia et al., 2005).

A deleção do alelo selvagem é essencial para a tumorigênese, evento comum entre genes supressores de tumor, conhecido como Perda de Heterozigose (“Loss of Heterozygosity” ou LOH).

Mutações germinativas nos genes *SDH* são responsáveis por 6% de todos os paragangliomas esporádicos, 9% dos feocromocitomas esporádicos, 29% dos casos pediátricos, 38% dos tumores malignos e mais de 80% das agregações familiares de PGLs e PCCs.

### 1.2.3 As síndromes de Paragangliomas Familiais

A análise de mutações nos genes *SDHx* evidencia uma correlação entre genótipo e fenótipo. O padrão de transmissão é autossômico dominante.

Mutações na subunidade A do complexo SDH (*SDHA*) estão associadas a uma desordem neurodegenerativa rara e de início precoce conhecida como Síndrome de Leigh. Recentemente, estudos (Burnichon *et al.*, 2010; Korpershoek *et al.*, 2011) demonstraram associação entre mutações de *SDHA* e PGLs e/ou PCC. O surgimento nestes casos ocorre em média aos 40 anos e, até o momento, não foram descritos casos de tumores malignos ou múltiplos.

Mutações em *SDHB* (figura 3), gene composto por oito exons, localizado em 1p36.13, originam a Síndrome de Paraganglioma do Tipo 4 (PGL4), a síndrome associada com maior morbidade e mortalidade entre os quatro tipos. PGL4 apresenta feocromocitomas benignos ou malignos, paragangliomas parassimpáticos ou, mais frequentemente, simpáticos com elevado risco de malignidade. O risco de carreadores de mutações em *SDHB* desenvolverem câncer ao longo da vida é de 76%, a idade média de surgimento dos tumores é 33 anos e a penetrância é estimada em 50% aos 35 anos e 77% aos 50 anos de idade (Barbara e Stratakis, 2009).

PGL3, a síndrome mais rara, é caracterizada por mutações em *SDHC*, paragangliomas parassimpáticos, menos frequentemente paragangliomas simpáticos e, raramente, feocromocitomas. Malignidade é bastante rara, a idade média de apresentação é 43 anos e história familiar está presente em 20 a 25% dos casos, sugerindo uma penetrância incompleta.

Mutações no gene *SDHD* (figura 4), locus 11q23.1, composto por quatro exons que codificam uma proteína de 103 aminoácidos, causam a Síndrome de Paraganglioma do Tipo 1 (PGL1) (MIM 168000), a qual é caracterizada por paragangliomas parassimpáticos de cabeça e

pescoço multifocais, associados ou não a PGLs simpáticos e PCCs benignos. Mutações em *SDHD* apresentam o efeito de *imprinting* materno (*parent-of-origin effect*), que significa que a doença somente se manifesta no indivíduo cuja mutação foi herdada do pai, com algumas raras exceções descritas (Neumann e Erlic, 2008; Pigny *et al.*, 2008). O risco de um indivíduo carreador de mutação herdada do pai desenvolver câncer ao longo da vida é de 100%, sendo a idade média de surgimento dos sintomas por volta dos 31 anos e a penetrância estimada em 50% aos 31 anos e em 86% aos 50 anos (Barbara e Stratakis, 2009).

PGL2 é causada por mutações no gene supressor de tumor *SDHAF2*, localizado no locus 11q12.2, que origina uma proteína responsável pelo acoplamento do cofator FAD ao complexo enzimático SDH. Existem apenas alguns casos descritos de mutações em *SDHAF2*, sendo os mesmos caracterizados por PGLs parassimpáticos sem metástases e com elevada penetrância (próxima a 100% aos 45 anos de idade).

Paragangliomas associados às mutações em *SDHC* e *SDHD* são geralmente encontrados na região da cabeça e pescoço (origem parassimpática), tumores associados a mutações em *SDHB* geralmente são localizados em abdome e também em tórax e cabeça e pescoço.

Cerca de 30% dos pacientes com tumores metastáticos possuem uma mutação no gene *SDHB* e, se o tumor primário estiver localizado no abdome, essa porcentagem sobe para 50%. Paragangliomas simpáticos associados a *SDHB* usualmente são mais agressivos, apresentam doença metastática mais precoce e levam à morte por falência orgânica ou dano cardiovascular relacionados ao excesso de catecolaminas circulantes. Taxas de malignidade em pacientes com PGL associados a *SDHB* variam de 34 a 97%. Apresentação clínica em idade jovem, tamanho

tumoral maior que 5 cm, metástases à apresentação inicial e hipersecreção de dopamina são fatores associados à agressividade tumoral.

Todos os pacientes com feocromocitomas e paragangliomas devem ser testados para mutações nas células germinativas de SDH, sendo altamente recomendado esse estudo em pacientes com HNPGL (mais de 15% tem mutações nas células germinativas), outros paragangliomas (particularmente multifocais ou feocromocitomas), história familiar de PGL ou PCC e paragangliomas em pacientes com ascendência holandesa (Gardner e Shoback, 2013).

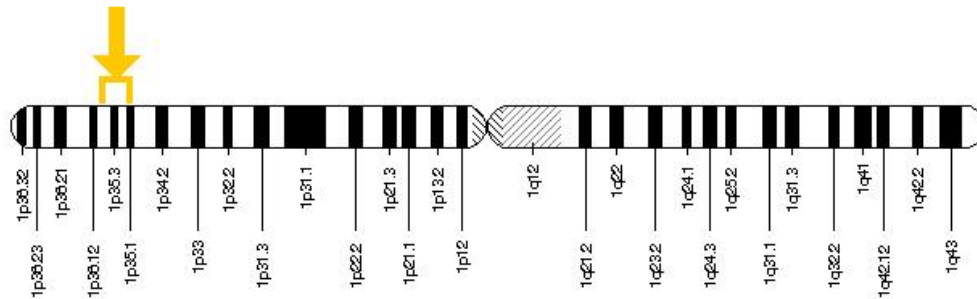
Alguns pacientes com mutações que ocasionam perda de função nos genes *SDHB*, *SDHC* ou *SDHD* podem desenvolver a díade que ocasiona PGL e sarcomas estromais gástricos (GISTs), conhecida como Síndrome de Carney-Stratakis. Os tumores são diagnosticados por volta dos 24 anos de idade e homens e mulheres são igualmente acometidos. Os PGL são geralmente funcionantes e localizados no abdome. Casos em que há também a presença de condromas pulmonares associados aos outros dois tipos de tumores são conhecidos como Tríade de Carney (CT), uma nova forma de Neoplasia Endócrina Múltipla (NEM) (Stratakis e Carney, 2009).

**Tabela 1.** Principais características das síndromes de paraganglioma do tipo 1 a 4 (PGL1 a PGL4).

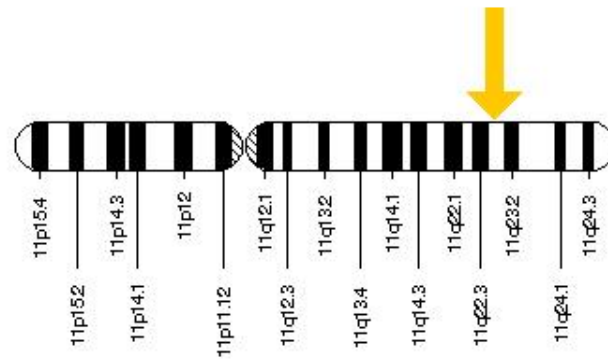
Gene com mutação germinativa	Síndrome	Sítio tumoral predominante	Idade média de apresentação (anos)	Penetrância de PCC/PGL (%)	Freq. de PGLs múltiplos (%)	Frequência de malignidade (%)	Condições associadas
SDHA	-	Paraganglioma	40	Incerta	0	Dados insuficientes	GISTs
SDHB	PGL4	Paraganglioma > Feocromocitoma	32,7	77	20,8	30,7	GISTs e CCR
SDHC	PGL3	Paraganglioma	42,7	Incerta	16,7	~0	GISTs
SDHD	PGL1	Paraganglioma > Feocromocitoma	35	86 <sup>a</sup>	56,4	3,5	GISTs e adenomas pituitários
SDHAF2	PGL2	Paraganglioma	32,2	~100 <sup>a</sup>	86,7	0	Não há relatos

<sup>a</sup> Dados válidos apenas para mutações herdadas do pai, penetrância após transmissão materna é próxima a zero, provavelmente devido ao *imprinting* materno.

(Modificado de Welander *et al.*, 2011 e Dahia, 2014).



**Figura 5. Gene SDHB.** Localizado no braço curto do cromossoma 1, entre as posições 35 e 36.1 (1p36.13). Mutações nesse gene são responsáveis pela síndrome de paraganglioma do tipo 4, a de maior morbimortalidade entre os quatro tipos.



**Figura 6. Gene SDHD.** Localizado no braço longo do cromossoma 11, na posição 23.1 (11q23.1). Mutações nesse gene originam a síndrome de paraganglioma familiar do tipo 1.

#### 1.2.4 *Imprinting* Materno

A transmissão das síndromes de paragangliomas familiares ocorre de maneira autossômica dominante em todos os casos de PGL3 e PGL4, afetando ambos os gêneros igualmente. Nos casos de PGL1 e PGL2, entretanto, os tumores parecem ocorrer apenas em portadores de mutações que herdaram a mutação do pai, não havendo alteração fenotípica quando a mutação é herdada da mãe. Até 2008, não se tinha registro de casos que desrespeitassem essa regra e, conseqüentemente, assumiu-se que ocorresse *imprinting* materno nesses genes. *Imprinting* é um processo epigenético de regulação da expressão gênica que ocorre com alguns poucos genes autossômicos (menos de 1%, acredita-se) em que sua expressão ocorre a partir de apenas um alelo. O alelo expressado pode ser o materno ou o paterno, dependendo do gene.

*Imprinting* materno significa que o gene herdado da mãe sofre um *imprinting* e não é expresso no herdeiro. O *imprinting* é uma inativação geralmente devido à metilação do gene ou

do seu promotor, o que não foi demonstrado no caso do gene *SDHD*, permanecendo obscuro o mecanismo molecular/genético da transmissão em PGL1.

Isso significa que para o correto funcionamento da proteína, apenas a expressão de um dos alelos é necessária. Se o alelo mutado do gene *SDHD* é herdado da mãe, ele pode não desempenhar papel algum na patogênese tumoral e o herdeiro poderia ser considerado fora de risco de desenvolvimento da doença.

Pigny *et al.*, (2008) descreveram pela primeira vez um caso de uma família que não obedeceu essa regra de transmissão genética. Uma criança de 11 anos do sexo masculino apresentou a síndrome de Paraganglioma do Tipo 1 tendo herdado a mutação de sua mãe, também acometida pela doença. Ambos apresentavam paragangliomas de cabeça e pescoço e compartilhavam a mesma mutação germinativa, *SDHD* c.129G>A, a qual causa uma proteína truncada, pois gera um códon de parada (Trp43X).

Atualmente, o exato mecanismo no gene *SDHD* não é completamente conhecido. Acredita-se na hipótese dos “três eventos” para o desenvolvimento tumoral, já que expressão bialélica já foi demonstrada em vários tecidos não-paragangliônicos. Por essa teoria, ocorrem três eventos:

1° passo: Mutação germinativa em *SDHD* (alelo paterno)

2° passo: Perda ou mutação do alelo selvagem

3° passo: Perda de outro gene supressor de tumor do cromossoma 11 que sofre *imprinting* (paternalmente silencioso e maternalmente ativo), o qual deva ser o gene *H19*, localizado em 11p15.

Por essa hipótese, o segundo e o terceiro passos seriam explicados apenas pela perda obrigatória da cópia materna do cromossoma 11. Então, na realidade, apenas dois eventos diferentes estariam causando a teoria dos três eventos.

Outra hipótese mais recente é de um modelo de *imprinting* quantitativo com superexpressão do alelo paterno de *SDHD* em relação ao materno nos tecidos paragangliônicos. Esse modelo é corroborado pela descoberta de uma ilha de CpG diferencialmente metilada em tecidos específicos, a qual atuaria como um promotor alternativo para um grande RNA não-codificante intergênico localizado a 200 kb do *SDHD*. Apenas a mutação transmitida pelo pai poderia depletar o produto gênico a ponto de desencadear estimulação hipóxica e formação tumoral.

Modelos animais de paraganglioma são difíceis de criar, pois comundongos knockout para *SDHD* não desenvolvem PCC/PGL, apesar de ser um reconhecido gene de susceptibilidade para a doença. Esse fato sugere que outros genes ou loci próximos mutados são necessários para a tumorigênese (Fishbein e Nathanson, 2012).

### 1.3 Diagnóstico

Catecolaminas são metabolizadas nas células cromafins a metanefrinas (norepinefrina a normetanefrina e epinefrina a metanefrina) e esse processo intra-tumoral ocorre independentemente da liberação de catecolaminas.

Mensuração de metanefrinas fracionadas na urina ou no plasma proporciona elevada sensibilidade em relação à mensuração das próprias catecolaminas (Lenders *et al.*, 2005; Pacak e Brown, 2009). Cromogranina A tem sensibilidade e especificidade insuficientes, não



apresentando benefício adicional sobre o uso de catecolaminas ou seus metabólitos. Testes iniciais para detecção de PCC e PGL devem incluir mensuração de metanefrinas fracionadas no plasma, na urina ou em ambos. A elevação das metanefrinas plasmáticas acima de quatro vezes o limite superior tem uma probabilidade próxima a 100% de existência de um tumor. O nível deve, portanto, determinar a necessidade de localização imediata do tumor ou investigações bioquímicas adicionais (Pacak e Brown, 2009).

A localização dos tumores pode ser obtida através de exames de imagem, como tomografia computadorizada (TC) e ressonância nuclear magnética (RNM), ambos apresentando sensibilidades (90 a 100%) e especificidades (70 a 80%) semelhantes, embora tais métodos sejam incapazes de identificar inequivocamente uma massa como paraganglioma ou feocromocitoma. Para aumentar a especificidade para 95 a 100%, existem métodos de imagem funcional utilizando mapeamento com iodo 123 ou iodo 131, sendo eles: 123-iodo-metaiodobenzilguanidina ( $^{123}\text{I}$ -MIBG) ou  $^{131}\text{I}$ -MIBG, ambos altamente específicos para a identificação de tecido neuroendócrino ectópico.  $^{123}\text{I}$ -MIBG tem se mostrado muito eficaz em síndromes familiares, doença metastática ou multifocal.

Mais recentemente, o uso de PET (*Positron Emitting Tomography*) com novos compostos, como [ $^{18}\text{F}$ ] – flúor dopamina ([ $^{18}\text{F}$ ]-FDA), [ $^{18}\text{F}$ ]-fluor diidroxifenilalanina ([ $^{18}\text{F}$ ]-DOPA) e [ $^{18}\text{F}$ ]-fluor deoxiglicose ([ $^{18}\text{F}$ ]-FDG) tem mostrado superioridade na detecção de tumores extra-adrenais, metastáticos ou hereditários em relação ao padrão-ouro do passado, a cintilografia com  $^{123}\text{I}$ -metaiodobenzilguanidina (Kim *et al.*, 2014). O [ $^{18}\text{F}$ ]-DOPA parece suplantar a cintilografia com  $^{123}\text{I}$ -MIBG na detecção de feocromocitomas adrenais, mas sua sensibilidade para paragangliomas metastáticos é limitada. [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG, apesar de não ser específico para

PCCs/PGLs, já demonstrou ser uma ferramenta superior na avaliação de tumores metastáticos associados a mutações em *SDHB* (Pacak e Brown, 2009 e Kim *et al.*, 2014). [<sup>18</sup>F]-FDG também mostrou-se altamente acurado na localização de PCC e PGL recorrentes, sendo a avidéz tumoral um potencial preditor de controle local da doença (Samji *et al.*, 2012).

#### 1.4 Tratamento

O tratamento de escolha para paragangliomas não-metastáticos é a ressecção cirúrgica por via laparoscópica. Não existe, até o momento, tratamento curativo para PGL malignos. Nesses casos, a terapêutica preferida tem sido o uso de doses terapêuticas de <sup>123</sup>I-MIBG. Nos casos de doença metastática rapidamente progressiva, quimioterapia pode ser utilizada.

No caso de tumores encontrados acidentalmente durante a realização de exames de imagens para outros fins, os chamados incidentalomas, a abordagem de feocromocitomas assintomáticos é controversa. É unânime que esses pacientes devam ser seguidos de forma minuciosa. Deve-se constantemente monitorar a pressão arterial, seja através de medidas seriadas, seja através do MAPA (Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial), o qual deve ser realizado sempre que possível. Deve-se levar em consideração nesses casos:

1. Em mulheres jovens, recomenda-se a remoção do tumor, visto que durante a gestação o aumento da pressão abdominal causado pelo útero em crescimento, somado aos movimentos fetais, pode ocasionar sintomas ou mesmo deflagrar uma crise adrenérgica. Isto se aplica aos tumores da cavidade abdominal.
2. Mutações germinativas específicas podem favorecer ou adiar a cirurgia. Mutações do *RET* e *SDHD* estão raramente associadas à malignidade, favorecendo a

conduta expectante. No caso do *VHL*, embora a frequência de malignidade seja um pouco maior, não há dados suficientes para indicar ou adiar a cirurgia. Já as mutações do *SDHB* estão associadas à malignidade em cerca de um terço dos pacientes. Neste caso, a ressecção cirúrgica é favorecida.

3. As catecolaminas e/ou metanefrinas podem estar normais ou elevadas. No segundo caso (catecolaminas/metanefrinas elevadas), a maioria dos médicos é favorável à cirurgia, embora não existam dados na literatura que suportem esta conduta.

### 1.5 Rastreamento

A *American Society of Clinical Oncology* recomenda oferecer análise genética para todos os pacientes com PGLs, pois o risco de mutações hereditárias excede 10% (Kim *et al.*, 2014). Entretanto, devido a limitações práticas, como os elevados custos, muitas vezes isso não é possível e outros critérios tem sido utilizados para essa pesquisa.

Indivíduos com PGL/PCC antes dos 45 anos de idade, tumores múltiplos, tumores extra-adrenais, tumores de cabeça e pescoço, história familiar positiva ou malignidade devem ser submetidos à pesquisa de mutações nos genes de susceptibilidade conhecidos. Um protocolo para orientar o início da testagem foi proposto por Lefebvre e Foulkes, 2014 (figura 7).

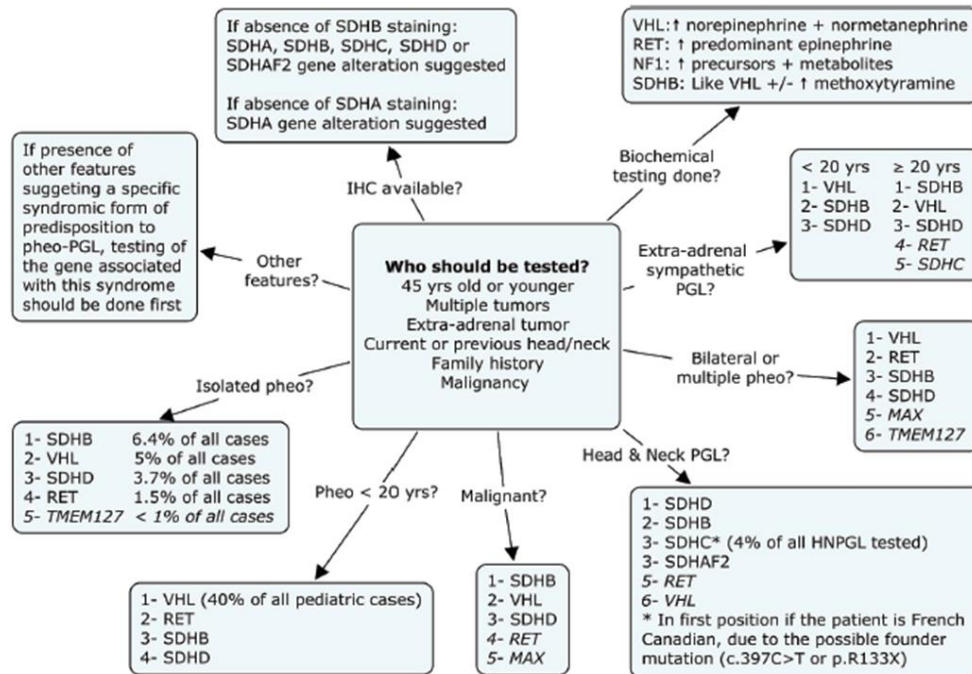


FIGURE 3 Referral and testing protocol (based on Fishbein and Nathanson<sup>6</sup>, Jimenez et al.<sup>7</sup>, Gimenez-Roqueplo et al.<sup>14</sup>, Jafri and Maher<sup>8</sup>, and Erlic et al.<sup>15</sup>). The numbering system in the boxes refers to the likelihood of identifying mutations, with 1 being most likely. Criteria in the middle should trigger a referral to oncogenetics. Pheo = pheochromocytoma; Pgl = paraganglioma; IHC = immunohistochemistry.

**Figura 7. Protocolo para testes genéticos. Pacientes com critérios no centro da figura devem ser encaminhados à Oncogenética. Os números dentro dos quadros se referem à probabilidade de identificação de mutações, sendo o número 1 o mais provável. Abreviaturas: Pheo= feocromocitoma; Pgl= paraganglioma; IHC= imunohistoquímica. (Modificado de Lefebvre e Foulkes, 2014).**

Recomenda-se oferecer testes genéticos para todos os parentes de primeiro grau de pacientes com PCC ou PGL associados a mutações em algum gene do complexo SHDx.

Entre os indivíduos portadores de mutações é, então, recomendado um rastreamento tumoral através de exames clínicos, bioquímicos e radiológicos. A exceção seriam os portadores de mutações no gene *SDHD* que herdaram a mutação da mãe, os quais não necessitam de vigilância rigorosa devido ao fenômeno do *imprinting* materno, embora algumas exceções já tenham sido descritas, como exemplificado anteriormente (Neumann e Erlic, 2008; Pacak e Brown, 2009). Mais estudos acerca do mecanismo de transmissão genética de *SDHD* são

necessários para estabelecer o seguimento médico apropriado de portadores de mutações de origem materna.

Protocolo de seguimento clínico sugerido: Consulta médica com exame físico semestral ou anual a partir dos 5 anos, exames bioquímicos anuais (catecolaminas e metanefrinas fracionadas na urina e/ou no sangue, conforme disponibilidade) e, a partir dos 7 anos, TC ou RNM da cabeça, pescoço, abdome e pelve anual ou bianual (Pacak e Brown, 2009). Se disponível, cintilografia com  $^{123}\text{I}$ -MIBG a cada 3 a 5 anos (Samji *et al.*, 2012). Em caso de sintomas gastrintestinais ou anemia, rastrear para GIST. Orientar portadores a evitar tabagismo e elevadas altitudes.

Conforme recomendações vigentes em que casos familiares ou até mesmo isolados de paragangliomas de cabeça e pescoço devam ser estudados para mutações no gene *SDH* (Gardner e Shoback, 2013), neste trabalho estudou-se detalhadamente uma família com vários membros clinicamente afetados. Uma vez encontradas mutações em *SDH*, inclusive em indivíduos sem o fenótipo, podemos atuar precocemente no diagnóstico e na terapêutica, além de caracterizar feno e genotipicamente essa rara patologia, oferecendo melhor qualidade de vida aos acometidos e mais dados à comunidade científica.

# **OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

1. Caracterizar clinicamente, através de exame físico, exames bioquímicos e exames de imagem, os fenótipos dos membros da família;
2. Analisar os principais genes envolvidos de acordo com os achados clínicos e verificar se trata-se de uma das quatro síndromes familiares conhecidas até o momento;
3. Estabelecer um protocolo de seguimento para os membros acometidos, para que possamos verificar o comportamento da doença nessa família a longo prazo;

# **MATERIAIS E MÉTODOS**



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Pacientes e controles

JLS, 39 anos, negro, casado, procurou serviço médico em 2011 queixando-se de massa cervical bilateral dolorosa que vinha crescendo ao longo dos últimos sete anos. Negava hipertensão, palpitações, ansiedade ou outras queixas relacionadas à secreção excessiva de catecolaminas. Realizadas TC de pescoço e biópsia da lesão, evidenciando tratar-se de paraganglioma de corpo carotídeo. O paciente optou pela exérese dos tumores, realizada sem intercorrências.

A irmã mais velha deste indivíduo também apresentava massa cervical bilateral e, após exames complementares, também optou pela ressecção dos tumores. Ambos estavam sendo acompanhados pelo Prof. Dr. Marcelo Magaldi, do departamento de Neurocirurgia do HC (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil). Devido à elevada prevalência dos raros tumores entre os familiares, percebida através de anamnese, todos os oito membros foram convocados e convidados a participar do estudo.

Todos os indivíduos da família concordaram com o estudo e assinaram um Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1).

Um total de 34 amostras de pacientes sabidamente não portadores de feocromocitomas ou paragangliomas foi selecionado para controle. Entre esses pacientes, vinte são portadores de câncer de pulmão, quatro portadores de adenoma de hipófise, quatro portadores de câncer de pâncreas e seis indivíduos saudáveis. Essas amostras fazem parte do banco de dados do Laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG.

### 3.2 Coleta dos dados clínicos

Os indivíduos foram entrevistados e submetidos à avaliação clínica por um médico da equipe, que aplicou um questionário clínico de formulação própria (Anexo 2).

### 3.3 Coleta do material biológico

Amostras de sangue periférico, cerca de 10 mL, de todos os oito indivíduos e dos controles, foram coletadas em tubos à vácuo contendo solução de EDTA.

Amostras tumorais de dois indivíduos submetidos à ressecção cirúrgica foram obtidas e o material foi armazenado em um tubo de 1,5 ml com solução RNA $latter$ ® e mantido a -80°C. As amostras foram analisadas por anátomo-patologista e o diagnóstico histológico de paraganglioma foi confirmado (ambas tratavam-se de PGL de corpo carotídeo).

Considerando os aspectos clínicos apresentados por esta família e a correlação genotípica-fenotípica das síndromes de paragangliomas familiares, os genes mais provavelmente associados à doença seriam *SDHB* e *SDHD*, os quais foram seqüenciados.

### 3.4 Extração de DNA do sangue

DNA genômico foi isolado das amostras de sangue total utilizando-se o método de Lahiri e Nurnberger (Lahiri e Nurnberger, 1991) com algumas modificações.

As amostras de sangue foram transferidas para tubos de 50 mL aos quais a solução TKM1 (TrisHCl 10mM; KCl 10mM; MgCl<sub>2</sub> 10mM; EDTA 4mM) foi adicionada. Em seguida, 500µL de Triton X-100 foram acrescentados à solução com a finalidade de promover hemólise. Após

agitação vigorosa da mistura contida no tubo de 50 mL, a mesma foi centrifugada a 1.255 x g por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante repleto de restos de hemácias foi removido e o precipitado contendo leucócitos foi lavado com a solução TKM1. Neste passo, uma centrifugação a 475 x g por 10 minutos a 4°C foi realizada. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo leucócitos foi mantido no tubo. Nesta etapa, 1600µL de TKM2 (TrisHCl 10mM; KCl 10mM; MgCl<sub>2</sub> 10mM; EDTA 4mM; NaCl 400mM) foi adicionado ao precipitado juntamente com 100µL de SDS 10%, este utilizado para promover a lise de leucócitos. Em seguida, o tubo foi mantido a 55°C em banho-maria por 20 minutos. Após o período de incubação, 900µL de NaCl (6M) foram adicionados com a função de promover a precipitação de proteínas. Uma última centrifugação de 15 minutos a 21.800 x g a 4°C foi realizada. Desta vez, o sobrenadante, contendo DNA, foi transferido para novo tubo com 5mL de álcool a 100%. Neste momento houve a visualização do DNA e o mesmo foi lavado em álcool 70%, secado e transferido para outro tubo contendo o tampão de eluição TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM, pH 7.0-8.0). As amostras permaneceram armazenadas a 80°C negativos durante todo período da pesquisa.

### 3.5 Extração de DNA do tumor

O DNA genômico dos pacientes com paraganglioma foi isolado das amostras de tecido de acordo com protocolo de proteinase K (Miller *et al.*, 1988).

Para o estudo da LOH foi feita a microdissecção cuidadosa da peça tumoral por patologista experiente para evitar ao máximo a contaminação por células não tumorais.

A amostra foi brevemente macerada e posicionada em um tubo de 1,5 mL juntamente a 200µL de tampão de lise (Tris HCl 50mM, pH 8; EDTA 10 Mm, pH 8; SDS 0,5%; q.s.p 200 mL H<sub>2</sub>O) e proteinase K (20 mg/mL). Em seguida, o tubo foi mantido em banho-maria a 65°C durante 1 hora. Após esse período, 200µL de tampão de lise foram adicionados à mistura. A amostra foi então mantida à temperatura ambiente por 15 minutos e posteriormente centrifugada por 20 minutos a 11.000 x g.

O sobrenadante resultante foi coletado e a ele foram adicionados dois volumes de etanol 100%, além de 10% do volume de sobrenadante de acetato de sódio (3M, pH 8). A amostra foi então homogeneizada até que o DNA pudesse ser visualizado. O DNA resultante foi lavado em etanol 70% e, após a secagem, eluído em TE e armazenado a 80°C negativos.

### 3.6 Amplificação e seqüenciamento das amostras

Um conjunto de iniciadores específicos para a amplificação dos diferentes exons dos genes *SDHD* e *SDHB* foram desenhados utilizando o programa Primer3 v.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (tabela 2). Todos foram conferidos manualmente através da análise da sequência disponível no banco de dados do *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>). O DNA extraído foi quantificado através de espectrofotometria. Para as reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas diluições de 50ng/µL das amostras extraídas.

A reação padrão de PCR utilizada seguiu os parâmetros: 100ng de DNA, 2.5µL de Tampão IIB 10x (NaCl 40mM; Tris-HCl 10mM, pH 8; Triton X-100 0.1%; MgCl<sub>2</sub> 1.5mM), 2.5µL de dNTPs (0.2mM), 0.5µL de cada par de iniciadores (10 pmol/mL) e 0.5µL de Taq DNA polimerase (0.625U). Os produtos foram amplificados em termociclador, utilizando as seguintes etapas:

desnaturação a 94°C por 3 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento com temperatura entre 58°C e 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Ao término dos ciclos, as reações passaram por uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram purificados com o kit de purificação *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega Corporation, Madison, WI). A visualização dos produtos da PCR e seus purificados foi realizada em gel de poliacrilamida 6.5%. O protocolo de coloração envolveu uma etapa de fixação em ácido acético 10%, lavagem em água destilada por 3 minutos, impregnação em solução de nitrato de prata (10.5g AgNO<sub>3</sub>, q.s.p 100mL H<sub>2</sub>O, formaldeído 37%, q.s.p 50mL de água destilada), lavagem em água destilada e a etapa de revelação em solução de carbonato de sódio (3g de NaCO<sub>3</sub>, q.s.p 100mL H<sub>2</sub>O, 75mL de formaldeído 100% e 20mL de tiosulfato de sódio 10mg/mL).

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando *BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit*, seguindo as instruções do fabricante (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). As sequências foram obtidas em sequenciador *ABI 3130 Genetic Analyzer 4 capillaries* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) e analisadas utilizando-se o programa *Sequencher v.4.9*.

### 3.7 Análise das mutações

Variações genéticas encontradas nos cromatogramas foram pesquisadas em bancos de dados públicos, como Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC), Single Nucleotide

Polymorphism database (dbSNP), Human Genome Mutation Database (HGMD) e Leiden Open source Variation Database (LOVD).

Análise *in silico* foi realizada utilizando os softwares online Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) e Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2).

**Tabela 2.** Características de amplificação por PCR dos genes estudados.

Gene	Iniciadores		Fragmento amplificado (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
<i>SDHD</i>	Exon 1	Forward 5'gctgcaactccgcttcat 3' Reverse 5'aggctacgctaagcacctca 3'	315	60
	Exon 2	Forward 5'tttacaataagatgttatcccctat 3' Reverse 5' cccctacaggtaggaagtc 3'	334	60
	Exon 3	Forward 5' tgtacactgcctgtcagtttgg 3' Reverse 5' gggcatttcaatcaacttctc 3'	343	60
	Exon 4	Forward 5'ggcaaatggagacattgcat 3' Reverse 5' aagaaggctgtccaccaatg 3'	343	60
<i>SDHB</i>	Exon 1	Forward 5' cccttctgagaaggtcacg 3' Reverse 5' cttgcctatgcttcctcag 3'	418	60
	Exon 2	Forward 5' tctgttgccagcaaatg 3' Reverse 5' gcctccaaggatgtgaaaa 3'	287	58 e 60
	Exon 3	Forward 5' attccgaaggtgacctgaga 3' Reverse 5' aagttcaccagcagagagc 3'	330	60

Gene	Iniciadores		Fragmento amplificado (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
SDHB	Exon 4	Forward 5' cagcaaggaggatccagaag 3' Reverse 5' aactgtggtcctcctcctg 3'	400	60
	Exon 5	Forward 5' cctggcatagagtgacgag 3' Reverse 5' tgccagttcctcctcagaat 3'	359	60
	Exon 6	Forward 5' atgcactgaccccaaaggta 3' Reverse 5' cctcttgacttctggatgc 3'	257	60
	Exon 7	Forward 5' ccagagctttgagttgagc 3' Reverse 5' atgctggtcccttctctt 3'	324	60
	Exon 8	Forward 5' caccttgcttgacactgaa 3' Reverse 5' cggcaagtaaaggaacaggt 3'	370	60

### 3.8 Exames Complementares

Exames de imagem utilizando TC de corpo inteiro e PET foram oferecidos a todos os membros da família na tentativa de melhor caracterizar a síndrome, avaliar a presença de tumores abdominais e torácicos incipientes ou assintomáticos, assim como a possibilidade de metástases, outras condições associadas ou complicações. O marcador molecular utilizado foi a glicose marcada com flúor 18 ( $^{18}\text{F}$ -FDG), exame denominado  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT.

Os estudos de  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT de corpo inteiro foram adquiridos da base do crânio até a raiz da coxa, entre Abril de 2013 e Agosto de 2013, em sistema Discovery 690 (GE Healthcare, Millwalke, EUA), instalado no Centro de Imagem Molecular do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Medicina Molecular, localizado no campus saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

No momento do agendamento do exame, o paciente foi orientado a realizar jejum de pelo menos seis horas.

Imediatamente antes do início do exame, foram medidas a massa corpórea e a altura do paciente e dosada a glicose sanguínea. Em seguida, o paciente foi mantido confortavelmente deitado e relaxado em uma sala individual com baixa luminosidade, mínimo ruído e pouca estimulação. A punção venosa foi realizada no mínimo 20 minutos antes da administração do  $^{18}\text{F}$ -FDG, com atividade radioativa ajustada à massa corporal (0,10 mCi/Kg). A atividade média injetada foi de  $9,13 \pm 1,44$  mCi. Após um período de captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG de pelo menos 50 minutos, no qual o paciente permaneceu em repouso e com mínimos estímulos, o mesmo foi orientado a urinar e em seguida iniciou-se a aquisição das imagens de PET/CT em posição supina. A aquisição do PET foi realizada com duração média de 30 minutos, através do modo tridimensional. As imagens do PET foram reconstruídas em matriz 192 x 192, utilizando o algoritmo OSEM (*OrderedSubsetsExpectationMaximization*), com 2 iterações e 20 subsets. Análise semi-quantitativa foi realizada através do SUVlbm (valor padronizado de captação corrigido pela massa corpórea).

Imagens de TC foram obtidas para a mesma região do corpo com propósito de correção de atenuação e de localização anatômica.



Após análise por médico nuclear e radiologista, todos os pacientes receberam os laudos dos exames de  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT realizados, bem como as imagens correspondentes em DVD.

Análises bioquímicas foram realizadas nos indivíduos ainda virgens de tratamento que concordaram com as mesmas, através das dosagens de catecolaminas e metanefrinas urinárias (em urina de 24 horas) e metanefrinas plasmáticas.

# RESULTADOS

## 4. RESULTADOS

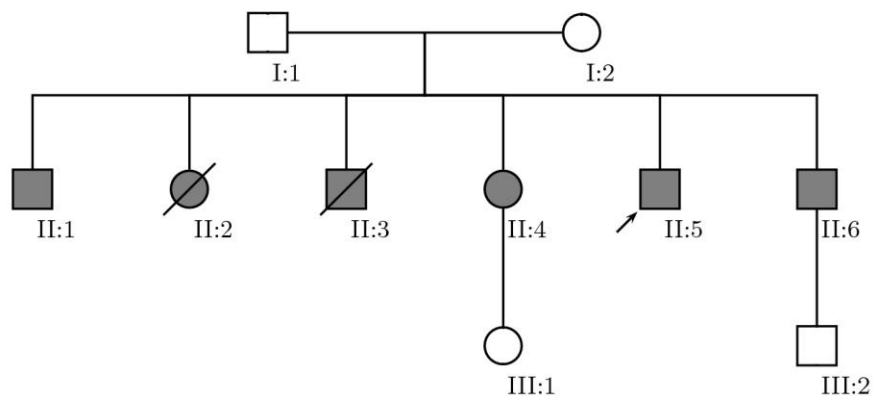
### 4.1 Caracterização Clínica

#### 4.1.1 Probando

JLS, 39 anos, paraganglioma de corpo carotídeo bilateral, sem outros sintomas.

#### 4.1.2 Membros da família

Todos os irmãos vivos do probando apresentam massas cervicais bilaterais, sem outros sinais ou sintomas de hipersecreção catecolaminérgica. Confirmação histológica de paragangliomas de corpo carotídeo em um desses irmãos. Sobrinhos do probando, ainda criança, hígidos e assintomáticos até o momento. Ausência de alterações clínicas que configurem quaisquer fenótipos sindrômicos nos pacientes analisados.



**Figura 8. Heredograma Fenotípico.** Os fenótipos dos pacientes membros da família foram caracterizados apenas através de história clínica e exame físico. Todos os indivíduos marcados em preto apresentavam tumores cervicais volumosos clinicamente visíveis. Indivíduos II.2 e II.3 faleceram antes do início do estudo, mas apresentavam massas cervicais conforme relatado pelos familiares (vide texto). Indivíduos marcados com um traço são clinicamente assintomáticos. Através de exame de imagem, indivíduo I.1 também é acometido

(feocromocitoma), porém não apresenta sintomas. Indivíduo I.2 não é afetada. Indivíduos III.1 e III.2 são crianças que ainda não atingiram a idade média de início dos sintomas.

Os pais (I.1 e I.2 na figura 5), estão vivos e são portadores de hipertensão arterial sistêmica assintomática, precariamente controlada, devido principalmente à má adesão ao tratamento.

Dois irmãos faleceram em idades jovens, há cerca de 15 anos, levando à suspeição pela equipe de que tivessem tumores secretores de catecolaminas, embora não apresentassem sintomas típicos dos paroxismos. Apresentavam as massas cervicais bilaterais, segundo relato dos familiares.

ALS (II.2), faleceu aos 32 anos, durante a 39ª semana de gestação de seu primeiro filho, devido à eclâmpsia, conforme consta nos registros médicos revisados pela equipe deste estudo. Segundo os documentos consultados, a paciente apresentou níveis pressóricos extremamente elevados (atingindo 230x160 mmHg) e, apesar do esforço da equipe médica, veio a falecer juntamente com o recém-nascido. A paciente era portadora de Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) leve, sem outras comorbidades.

MSL (II.3) faleceu aos 25 anos de idade devido a um quadro de insuficiência respiratória aguda, presenciado por familiares. Levado à emergência médica, faleceu pouco tempo depois do início dos sintomas. A causa da morte foi indeterminada e não foi feita necrópsia pelo Instituto Médico Legal na ocasião. Ele não apresentava comorbidades conhecidas, não fazia uso de drogas ilícitas e não estava em uso de medicação, segundo os familiares. A hipótese, retrospectivamente, é a de que o jovem tenha sofrido uma descarga catecolaminérgica aguda e

falecido devido a complicações, como edema agudo de pulmão (EAP), infarto agudo do miocárdio (IAM) ou acidente vascular encefálico (AVE).

#### 4.1.3 Análise clínica e bioquímica

Os três irmãos vivos do probando foram clinicamente avaliados. Dois deles, paciente II.1, 50 anos de idade, e paciente II.4, 44 anos, apresentavam tumores cervicais bilaterais e o outro, paciente II.6, 36 anos, apresentava tumor cervical unilateral ao exame físico. Todos notaram o início do crescimento tumoral por volta de 25 anos de idade.

O paciente II.1, sexo masculino, declarou que a massa cervical não lhe causava desconforto, não concordou com os exames de imagem ou bioquímicos, optando por não participar dos estudos.

Paciente II.4, sexo feminino, queixava-se de enorme desconforto estético e dor recorrente, tendo removido cirurgicamente os tumores cervicais anteriormente ao início deste estudo. Laudo histopatológico revelou tratar-se de paragangliomas de corpo carotídeo.

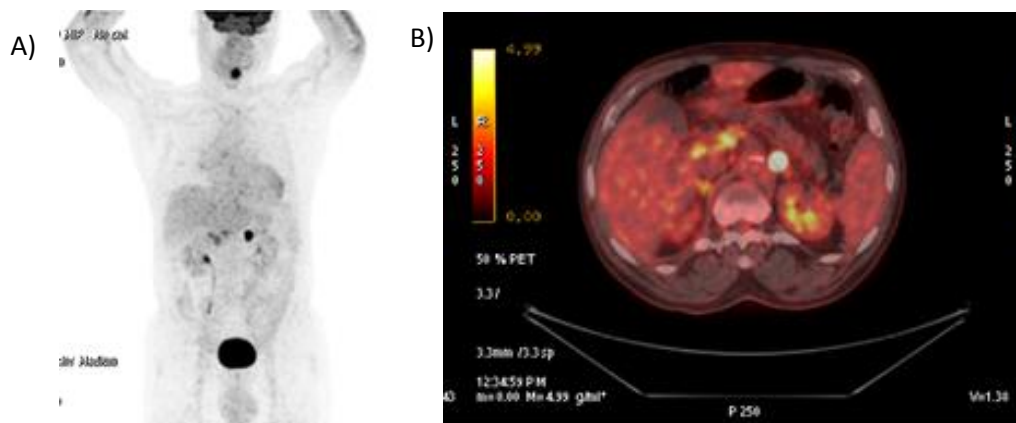
O paciente II.6, ao exame clínico, apresentava tumor à esquerda causando-lhe disfagia e dor local, mas optou pela não remoção cirúrgica. A dosagem de catecolaminas plasmáticas mostrou-se elevada (noradrenalina 520 pg/ml, valor de referência até 370 pg/ml; dopamina e adrenalina dentro dos valores de referência). Dosagem de catecolaminas, metanefrinas e ácido vanilmandélico na urina de 24 horas dentro dos valores de referência.

Paciente II.4 possui uma filha de oito anos e o paciente II.6 um filho de quatro anos. Ambas as crianças são saudáveis e assintomáticas. Amostras de sangue foram coletadas para fins de testes moleculares.

#### 4.1.4 <sup>18</sup>F-FDG PET/CT

Os pacientes I.1, I.2, II.4, II.5 e II.6 foram submetidos ao <sup>18</sup>F-FDG-PET de corpo inteiro. Paciente II.1 não concordou em realizar o exame.

No pai do probando, indivíduo I.1, 83 anos, foi evidenciado um feocromocitoma na glândula adrenal esquerda, acompanhado por metástases locais, incluindo linfonodos perinêfricos e mesentéricos (figura 8). A dosagem de metanefrinas urinárias mostrou-se próxima ao limite superior da normalidade (normetanefrina 656 µg/24h, sendo a normalidade até 800 µg/24h; metanefrina 78 µg/24h, sendo a normalidade até 400 µg/24h) e a dosagem de catecolaminas urinárias não apresentou alterações (adrenalina 5,28 mcg/24h, valor de referência é inferior a 27 mcg/24h; noradrenalina 62,9 mcg/24h, sendo a referência inferior a 97 mcg/24h; e dopamina 349,6 mcg/24h, valor de referência inferior a 500 mcg/24h). Não foi possível avaliar o nível de catecolaminas plasmáticas. Devido à idade avançada e ao fato de ser um paciente oligossintomático, optou-se por tratamento conservador, com acompanhamento clínico seriado, após as devidas orientações médicas.

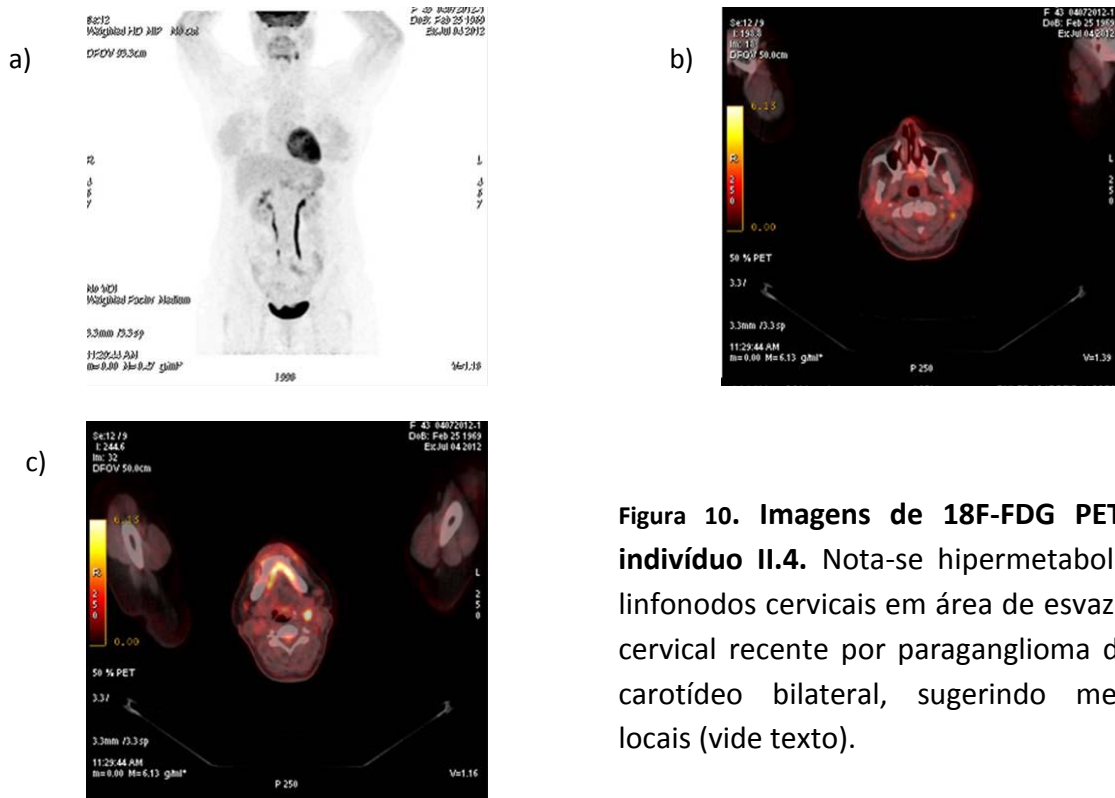


**Figura 9.** Imagens de  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT do indivíduo I.1.

As imagens tomográficas do estudo metabólico glicolítico de corpo inteiro com  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT evidenciaram captação normal do marcador em tireóide, ureter e bexiga, intenso (SUVIbm=19.6) hipermetabolismo em nódulo (1,8 cm) de glândula supra-renal esquerda e moderado (SUVIbm=5.5) em linfonodos localizados no espaço porta-caval (figura 9a). Na figura 9b, corte transversal, percebe-se o feocromocitoma, além de diversos pontos hipercaptantes, correspondentes a linfonodos abdominais sugestivos de acometimento neoplásico. Há, ainda, moderado hipermetabolismo (SUVIbm=9.7) em região mentoniana onde se evidencia densificação de gordura subcutânea e em linfonodos subcarinal (SUVIbm=4.4) e paratraqueal superior esquerdo (SUVIbm=4.2), além de derrame pleural bilateral. Esses achados podem apresentar correlação clínica com a patologia de base em questão, embora mais estudos são necessários para confirmação.

O paciente II.4 havia ressecado os tumores cervicais previamente às imagens, as quais revelaram hipermetabolismo em linfonodomegalia na cadeia jugular interna esquerda e discreto hipermetabolismo em linfonodo na região cervical posterior esquerda (SUVIbm=1.9).

As áreas hipermetabólicas são sugestivas de acometimento neoplásico remanescente, metástases locais. Não há feocromocitomas, outros tumores primários ou metástases à distância (figura 10).

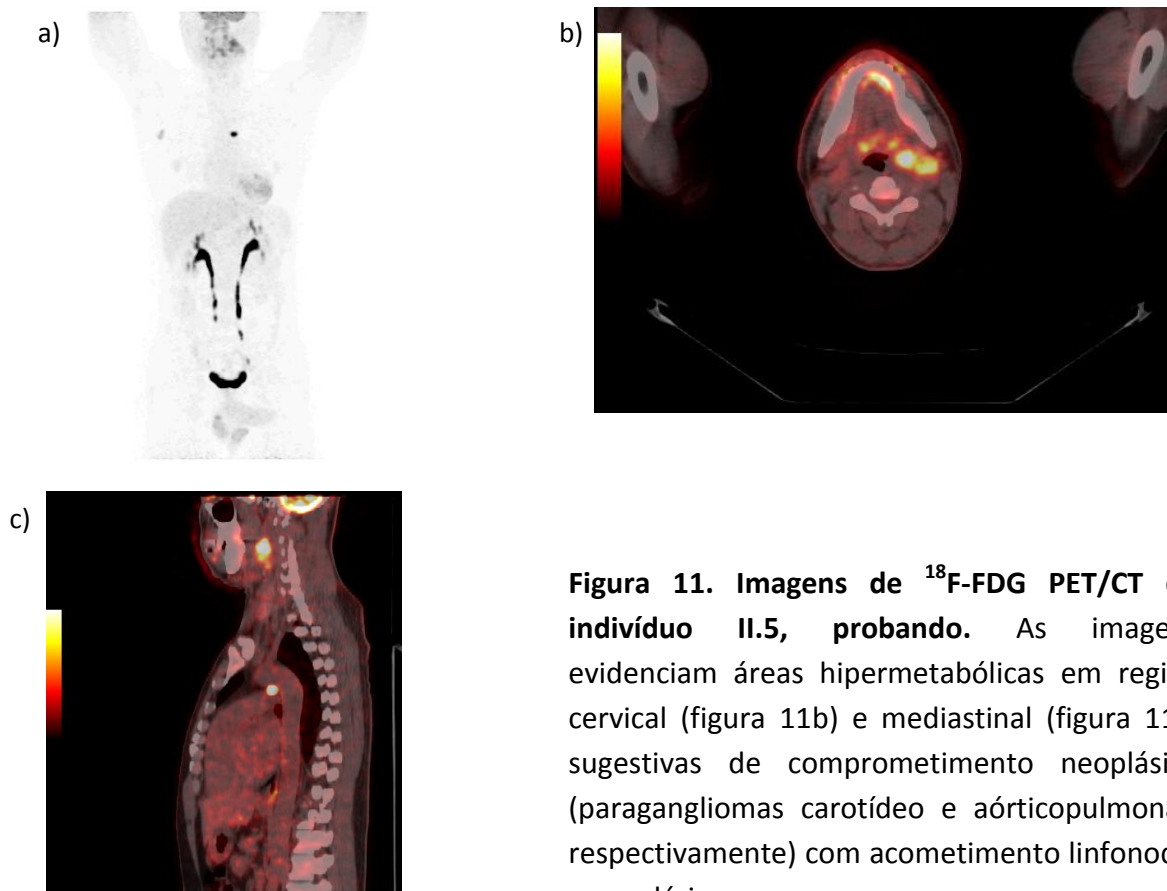


**Figura 10. Imagens de 18F-FDG PET/CT do indivíduo II.4.** Nota-se hipermetabolismo de linfonodos cervicais em área de esvaziamento cervical recente por paraganglioma de corpo carotídeo bilateral, sugerindo metástases locais (vide texto).

O probando (II.5) apresenta ao estudo metabólico glicolítico de corpo inteiro com <sup>18</sup>F-FDG PET/CT áreas de intenso hipermetabolismo localizadas em região cervical à esquerda (SUVIbm=7.2), na altura do ângulo mandibular, no espaço jugulo-carotídeo (medindo 3.6 x 3.2 cm) e em janela aorto-pulmonar (SUVIbm=32.0), além de linfonodomegalias axilar direita (SUVIbm=7.0), com hilo gorduroso preservado (figura 11).



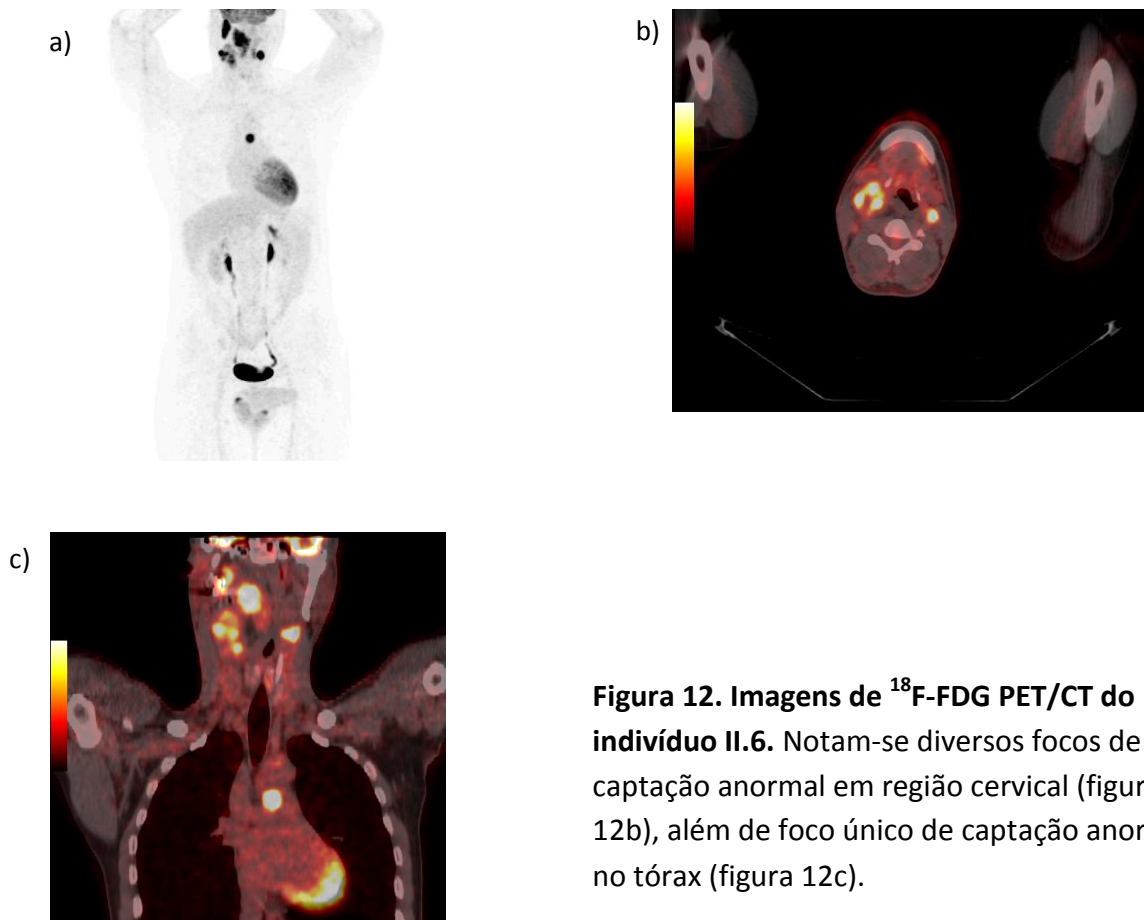
Paciente se negou a realizar a dosagem bioquímica na urina de 24 horas, pelo inconveniente da coleta do exame.



**Figura 11. Imagens de  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT do indivíduo II.5, probando.** As imagens evidenciam áreas hipermetabólicas em região cervical (figura 11b) e mediastinal (figura 11c) sugestivas de comprometimento neoplásico (paragangliomas carotídeo e aórticopulmonar, respectivamente) com acometimento linfonodal secundário.

Paciente II.6 apresentou no estudo áreas focais de hipermetabolismo em duas massas com densidade de partes moles localizadas no espaço carotídeo direito superior (SUVIbm=27.0) e inferiormente (SUVIbm=28.8), massa com densidade de partes moles na orofaringe (SUVIbm=21.2) e em linfonodomegalia em sítio IIa à esquerda (SUVIbm=33.1). Há, ainda, linfonodomegalia paratraqueal inferior à esquerda (SUVIbm=27.7) (figura 12).

O tumor à direita (paraganglioma carotídeo) causa efeito de massa sobre o esôfago, compatível com a queixa de disfagia. A tumoração mediastinal pode tratar-se também de acometimento linfonodal secundário, mas, provavelmente, trata-se de outro paraganglioma primário no gânglio aorticopulmonar e este, possivelmente, é o responsável pelos níveis elevados de catecolaminas.



**Figura 12. Imagens de  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT do indivíduo II.6. Notam-se diversos focos de captação anormal em região cervical (figura 12b), além de foco único de captação anormal no tórax (figura 12c).**

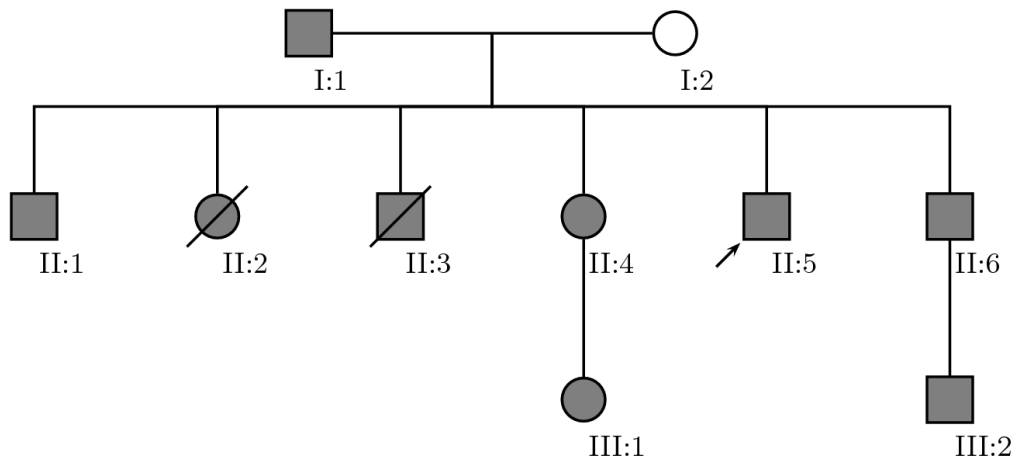
A figura 12a evidencia captação normal de contraste em músculo cardíaco, pelvis renais, ureteres e bexigas. Captação anômala é percebida na região cervical, em que se notam três tumorações mais evidentes, além de diversas pequenas áreas adjacentes também

captantes, compatível com lesão primária (paraganglioma cervical bilateral) associado a acometimento linfonodal (figura 12b). No ângulo aorticopulmonar nota-se hiper captação homogênea, correspondendo a paraganglioma aorticopulmonar (figura 12c).

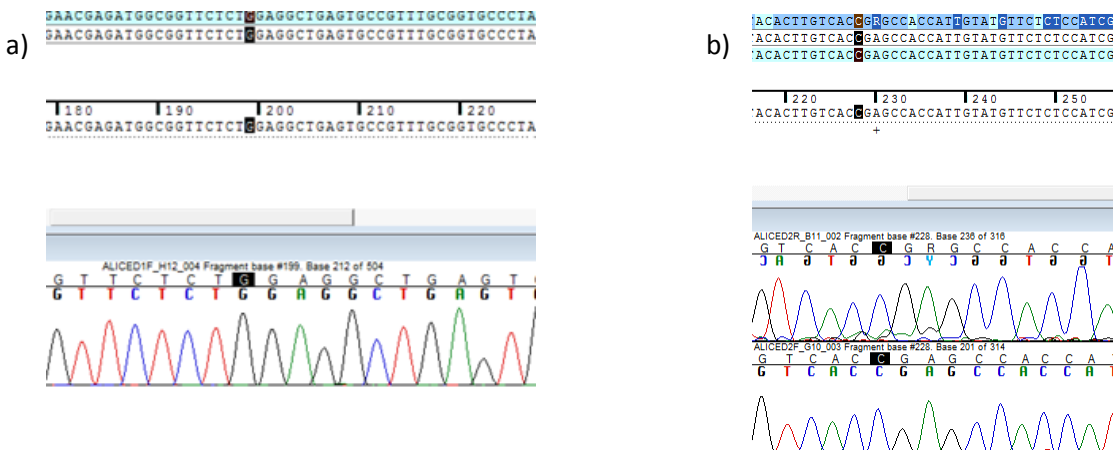
#### 4.2 Caracterização Molecular

Considerando que o  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET revelou metástases em alguns dos membros afetados e que doença maligna é mais comumente encontrada em portadores de mutações em *SDHB*, seqüenciamos os oito exons deste gene, mas nenhuma alteração relevante foi encontrada.

O seqüenciamento dos quatro exons do gene *SDHD* revelou uma mutação stop-codon nonsense no exon 1, c.14G>A, p. Trp5X (rs 104894310), em heterozigose, a qual foi descrita pela primeira vez por Neumann *et al.* (2004) em um paciente com feocromocitoma isolado. A análise do exon 2 revelou uma mutação missense, também em heterozigose, c.158C>T, p.Pro53Leu (rs 149516118). O pai, os quatro filhos e os dois descendentes apresentam ambas as mutações. A mãe mostrou-se portadora do alelo selvagem em homozigose para os quatro exons e não apresentava manifestação clínica da doença, confirmada pelo PET.



**Figura 13. Genealogia da família portadora de mutações em *SDHD*. Indivíduo II.5, probando.** Em preto, indivíduos portadores de ambas as mutações, em branco, indivíduo wild-type. Os indivíduos II.2 e II.3 faleceram previamente à realização desse estudo e não possuem descendentes, mas por características clínicas, eram possivelmente portadores de ambas as mutações.



**Figura 14. Eletroferogramas representativos do indivíduo I.2, wild-type para as mutações Trp5X (a) e Pro53Leu (b).**

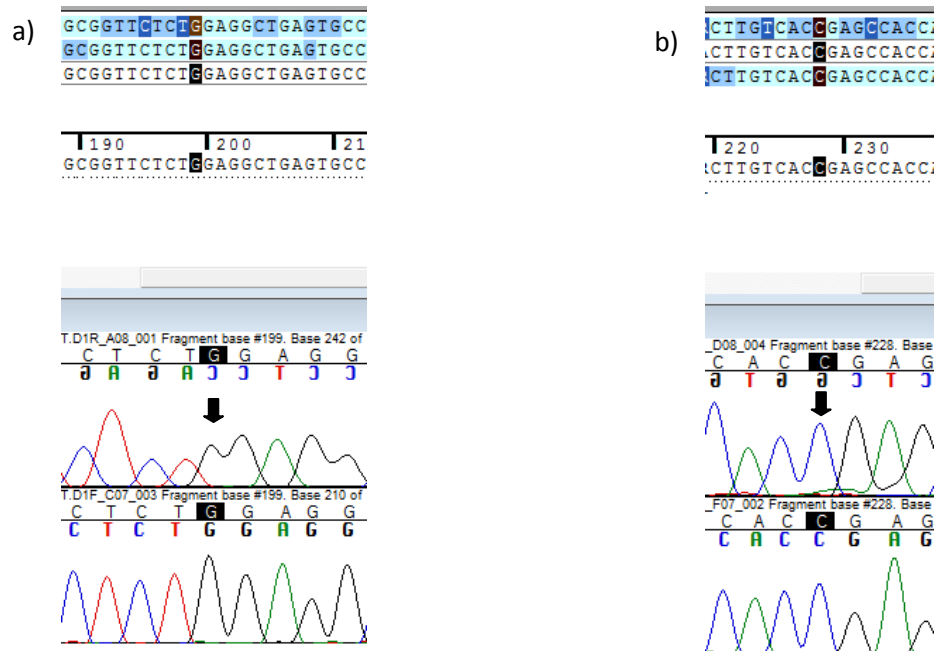
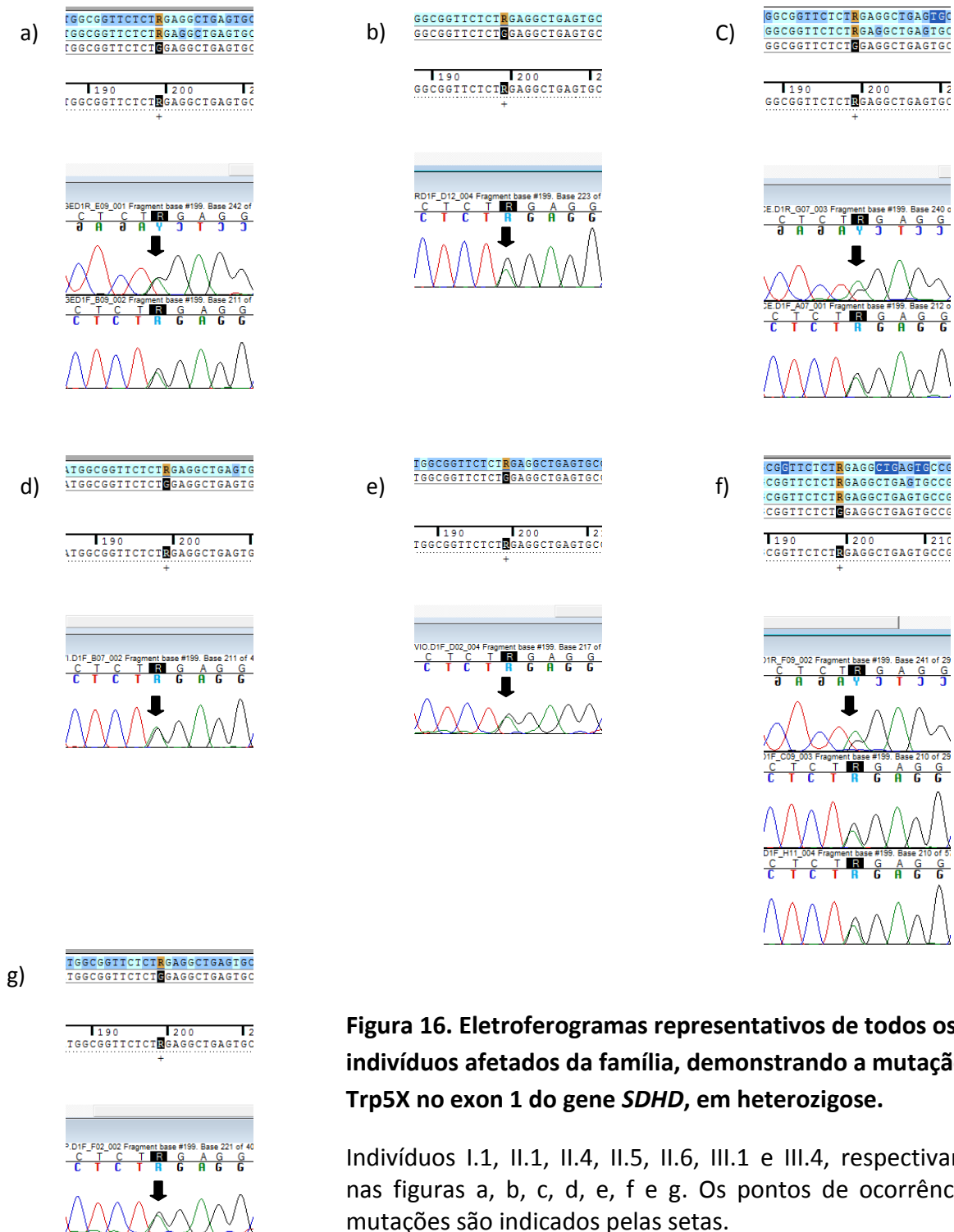
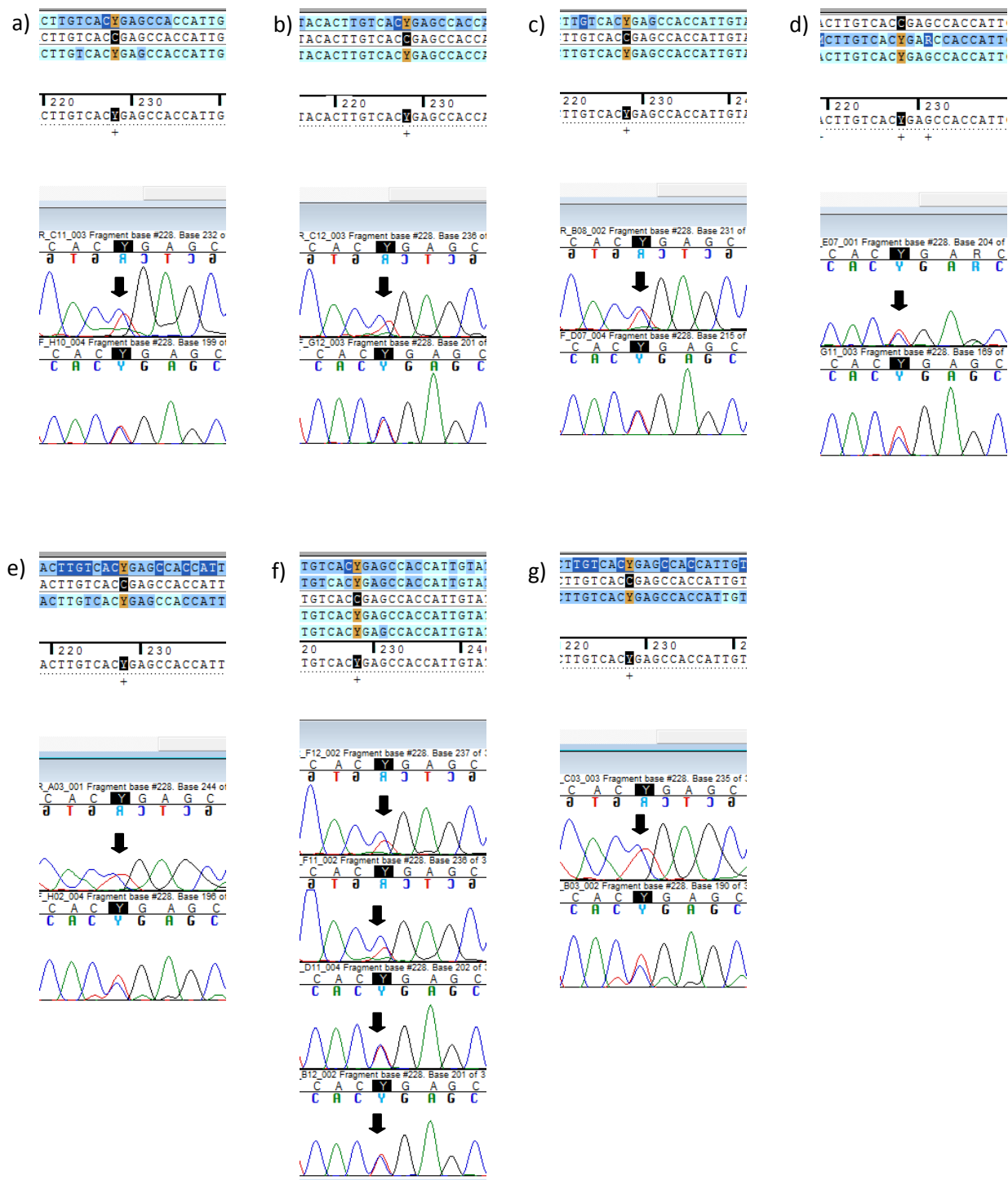


Figura 15. Eletroferogramas de indivíduo controle para as mutações Trp5X (a) e Pro53Leu (b).



**Figura 16. Eletroferogramas representativos de todos os indivíduos afetados da família, demonstrando a mutação Trp5X no exon 1 do gene *SDHD*, em heterozigose.**

Indivíduos I.1, II.1, II.4, II.5, II.6, III.1 e III.4, respectivamente nas figuras a, b, c, d, e, f e g. Os pontos de ocorrência das mutações são indicados pelas setas.



**Figura 17. Eletroferogramas representativos de todos os indivíduos afetados da família, demonstrando a mutação Pro53Leu no exon 2 do gene *SDHD*, em heterozigose.**

Indivíduos I.1, II.1, II.4, II.5, II.6, III.1 e III.4, respectivamente nas figuras a, b, c, d, e, f e g. Os pontos de ocorrência das mutações são indicados pelas setas.

Mutações nonsense que causam proteínas truncadas, como no caso da p.Trp5X, são sabidamente deletérias, pois causam modificações importantes na estrutura e na função da proteína. No caso da p.Trp5X ocorre uma parada logo no início da tradução protéica, causando provavelmente uma perda completa de função. Quando essa mutação foi descrita (Neumann *et al.*, 2004), 600 controles foram testados e nenhum deles apresentou tal alteração. Não foram encontrados relatos de doença maligna associada a esta alteração até o momento.

### rs104894310 SNP

Original source	Variants (including SNPs and indels) imported from dbSNP (release 138)   <a href="#">View in dbSNP</a>
Alleles	<b>G/A</b>   Ancestral: G   Ambiguity code: R
Location	Chromosome 11:111957645 (forward strand)   <a href="#">View in location tab</a>
Co-located	with HGMD-PUBLIC <a href="#">CM020972</a>
Most severe consequence	<b>Stop gained</b>   <a href="#">See all predicted consequences (Genes and regulation)</a>
Evidence status	
Clinical significance	
Synonyms	LSDB 2010_April_001_306_SDHD_602690_0026, 11393
HGVS names	This variation has 21 HGVS names - click the plus to show

### Phenotype Data

#### Significant association(s)

Show/hide columns		Filter					
Disease/Trait	Source(s)	Study	Clinical significance	Reported gene(s)	Associated variant(s)	Most associated allele	P value
PHEOCHROMOCYTOMA <a href="#">[View on Karyotype]</a>	<a href="#">[OMIM]</a>	<a href="#">MIM:602690</a>		<a href="#">SDHD</a>	<a href="#">rs104894310</a>	<a href="#">0026</a>	
PHEOCHROMOCYTOMA <a href="#">[View on Karyotype]</a>	<a href="#">[dbSNP_ClinVar]</a>				<a href="#">rs104894310</a>	A	

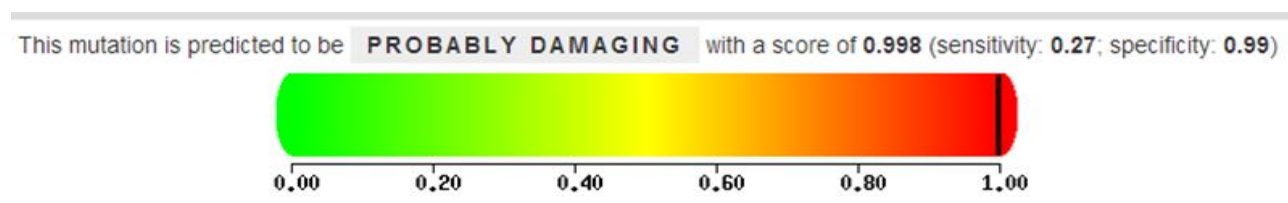
**Figura 18. Predição de dano à proteína causada pela mutação Trp5X em ensembl.com.** Percebe-se a associação já bem documentada entre esta mutação e o fenótipo de feocromocitomas e/ou paragangliomas.

A segunda mutação, p.Pro53Leu, encontrada no exon 2, causa uma mutação missense em um resíduo altamente conservado entre vertebrados, o que corrobora a teoria de elevada patogenicidade desta substituição.



De acordo com ferramentas eletrônicas de predição de possíveis impactos de uma substituição de aminoácidos à estrutura tridimensional e à função de uma proteína, como PolyPhen e SIFT, a alteração em questão é possivelmente danosa à proteína, respectivamente com pontuação 0,02 no SIFT e 0,998 no PolyPhen, considerando que quanto mais próximo de zero no SIFT e mais próximo de 1 no PolyPhen, mais danosa é aquela substituição (figura 19).

No “SDH mutation database” ([http://chromium.liacs.nl/lovd\\_sdh/home.php](http://chromium.liacs.nl/lovd_sdh/home.php)) esta mutação não é descrita, sendo a última atualização em 06 de Novembro de 2012. Não foram encontrados relatos de casos associados a esta mutação na literatura. Um trabalho experimental que analisou os possíveis impactos de mutações missense não-classificadas em modelo de leveduras encontrou que esta mutação não é patogênica às leveduras, mas tais resultados não podem ser extrapolados aos seres humanos devido ao baixo grau de conservação dessa região entre organismos vertebrados e eucariotos inferiores, como os fungos (Panizza *et al.*, 2013).



**Figura 19.** Imagem do servidor PolyPhen-2 para a substituição de Prolina por Leucina na posição 53 do exon 2 de SDHD. Tal alteração é considerada altamente danosa para o funcionamento desta proteína, pois quanto mais próxima de 1, maior é o dano estrutural previsto.

Tabela 3. Resultados da análise genética e fenotípica de síndrome familiar de PGL1 em Belo Horizonte, Minas Gerais, 2013

Indiv iduo	Idade (anos)	Fenótipo / Clínica	Idade Início (a)	18F-FDG PET/CT	Análise Genética	Dosagem Catecolaminas	Tratamento
I.1	84	Hipertensão	2	Feoprogmoma com metástases locais	5.14G>A 5.158C>T	Urina 24h: Normal Plasma: Indisponível	Acompanhamento clínico
I.2	76	Hipertensão	2	Normal	Normal	-	Acompanhamento clínico
II.1	32 <sup>a</sup>	Massa cervical bilateral Morte por eclâmpsia aos 32 anos	24	-	-	-	-
II.2	25 <sup>a</sup>	Massa cervical bilateral Morte súbita aos 25 anos	25	-	-	-	-
II.3	46	Massa cervical bilateral	26	Não realizado	5.14G>A 5.158C>T	-	Acompanhamento clínico
II.4	42	Massa cervical bilateral	24	Metástases locais remanescentes	5.14G>A 5.158C>T	-	Ressecção bilateral
II.5	38	Massa cervical bilateral	28	PGL de corpo carotídeo à esquerda com linfonodos locais e PGL aórtico pulmonar	5.14G>A 5.158C>T	-	Ressecção unilateral
II.6	36	Massa cervical bilateral	25	PGL de corpo carotídeo bilateral com linfonodos locais e PGL aórtico pulmonar	5.14G>A 5.158C>T	Urina 24h: Normal Plasma: Noradrenalina ↑	Acompanhamento clínico
III.1	11	Assintomático	-	Não realizado	5.14G>A 5.158C>T	-	TC ou RNM da cabeça, pescoço, abdome e pelve aos 20 anos Acompanhamento clínico com testes bioquímicos anualmente
III.2	4	Assintomático	-	Não realizado	5.14G>A 5.158C>T	-	TC 2/2 anos e/ou 1 <sup>231</sup> I-MIBG 5/5 anos a partir de 7 anos Acompanhamento clínico com testes bioquímicos anualmente a partir dos 5 anos

Fonte: dados próprios

Legenda: <sup>a</sup>idade do falecimento;Siglas: PGL: paraganglioma; TC: tomografia computadorizada; <sup>18F</sup>-MIBG: 123I metáiodo benzil guanidina cintilografia.

# DISCUSSÃO

## 5. DISCUSSÃO

A presença de mais de um membro de uma família acometido por massas cervicais, como na família objeto deste estudo, deve levantar a suspeita de síndrome de paraganglioma familiar. A confirmação através de métodos de imagens e histopatológicos requer a investigação molecular de toda a família, conforme estabelecido na literatura científica, onde se encontra sugestões de vários protocolos para o início da testagem molecular (Lefebvre e Foulkes, 2014).

Todos os membros fenotipicamente afetados da família possuem as duas mutações no gene *SDHD*, incluindo os dois descendentes, ainda crianças. Como a idade média de surgimento dos sintomas na literatura é 31 anos e nesta família é 25,3 anos, os descendentes herdaram a alteração genética e podem ainda não ser clinicamente afetados por serem muito jovens.

Apesar de a maioria das mutações em *SDHD* apresentarem *imprinting* materno, alguns casos com transmissão materna já foram relatados (Neumann e Erlic, 2008; Pigny *et al.*, 2008), sendo um deles justamente a mutação p.Trp5X. Assim, propomos que o portador que herdou da mãe essa mutação tenha um acompanhamento clínico regular com pediatra e pelo menos um exame de imagem da região da cabeça e pescoço aos 20 anos. O pediatra deve dar atenção especial aos níveis pressóricos, à função renal e aos sintomas compatíveis com a presença de PCC/PGL. Para a criança que herdou a alteração molecular do pai, sugerimos um acompanhamento mais freqüente e mais rigoroso, principalmente pelo alto grau de penetrância dessas mutações.

É a primeira vez que a síndrome de paraganglioma do tipo 1 se apresenta com duas mutações germinativas diferentes. Neumann *et al.* (2004) no estudo envolvendo 417 casos de feo/paraganglioma, excluindo pacientes síndrômicos, demonstrou que nenhum paciente apresentava mais de uma mutação germinativa.

A mutação no exon 1 causa uma parada na tradução protéica, logo, a segunda mutação provavelmente não está sendo traduzida *in vivo* e, portanto, deve ser irrelevante no desenvolvimento dos sintomas. Ambas as mutações estão localizadas no mesmo alelo, pois estão sendo transmitidas juntas ao longo das três gerações. É impossível afirmar se a mutação no exon 2, isoladamente, causaria o fenótipo, embora seja possível. Acreditamos nessa possibilidade considerando o grau de predição de quão danosa é essa alteração para a estrutura protéica. Panizza *et al.*, 2013 afirma que esta mutação é reconhecidamente patogênica *in vivo*, tanto por análise *in silico* como por análise da elevada conservação evolutiva da prolina 53 nos vertebrados.

É interessante notar que talvez essa família ainda possa ser afetada se caso algum *splicing* alternativo causasse o desaparecimento da primeira mutação, mas a severidade desse fenótipo permanece incerta.

O fato de a doença nesses indivíduos apresentar-se mais agressiva do que habitualmente relatada na literatura (presença de metástases locais em vários membros, início dos sintomas mais precocemente (média 25,3 anos *versus* 31 anos na literatura)) nos faz questionar se de algum modo a presença das duas mutações está agravando o fenótipo dos acometidos.

A penetrância da doença entre os carreadores de mutações é, até o momento, 71,42% (sete carreadores, cinco clinicamente afetados), mas deve ser ainda mais elevada se levarmos em consideração que dois desses carreadores são crianças e a idade de aparecimento dos sintomas nos demais membros afetados foi em torno de 25 anos. Um dos carreadores herdou a mutação da mãe, então, devido ao *imprinting* materno, provavelmente não desenvolva os sintomas, como discutido previamente.

Genes do complexo *SDHx* funcionam como clássicos genes supressores de tumores, geralmente apresentando a perda de heterozigose (LOH) do alelo não-mutado (Welender *et al.*, 2011). Na tentativa de melhor avaliar a ocorrência de LOH nos sítios tumorais, nós seqüenciamos também o DNA extraído diretamente dos tumores ressecados do probando e de uma irmã (indivíduos II.4 e II.5). Um patologista experiente analisou o tecido embebido em parafina para assegurar que a parte utilizada para extração tratava-se de paraganglioma e não de tecidos adjacentes. O seqüenciamento do DNA tumoral revelou ambas as mutações presentes em heterozigose. Tentamos, então, sequenciar cortes tumorais com 5 nm de espessura selecionados por patologista através de microscopia, mas ainda assim não conseguimos demonstrar a perda de heterozigose nos tumores. A hipótese é de que não foi possível excluir completamente algumas células normais entre as células tumorais, mesmo tratando-se de um tumor bem delimitado. Casos semelhantes em que a perda de heterozigose não foi passível de demonstração ocorreram em outros trabalhos (Crona *et al.*, 2014).

# CONCLUSÃO

## 6. CONCLUSÃO

Nesse trabalho estudou-se uma família brasileira com diversos membros acometidos, ao longo de três gerações, por raros tumores neuroendócrinos conhecidos como paragangliomas. O genótipo tumoral desses cânceres tem implicações prognósticas e está relacionado a futuras possibilidades terapêuticas (Crona *et al.*, 2014).

Pesquisou-se a ocorrência de mutações em dois genes supressores de tumor comumente envolvidos em síndromes de paragangliomas familiares e encontrou-se, pela primeira vez na literatura, a ocorrência simultânea de duas mutações diferentes, ambas já descritas, em todos os membros acometidos.

Clinicamente, verificou-se uma discordância em relação aos atuais dados disponíveis na literatura científica sobre o comportamento clínico dos portadores de mutações em SDHD. Na família estudada, os tumores mostraram-se mais agressivos, causando metástases locais, com surgimento mais precoce e rápido crescimento com compressão de estruturas nobres, além de elevada transmissibilidade genética.

Os descendentes portadores das mutações poderão ser afetados em um futuro próximo, o que propiciará acompanhamento médico regular com o conseqüente diagnóstico precoce e abordagem terapêutica eficaz, diminuindo-se, assim, a morbimortalidade da doença para esses indivíduos e todos os demais futuros descendentes dos portadores de mutações. O acompanhamento dessa família a longo prazo poderá aumentar o conhecimento acerca dessa entidade nosológica.

Demais estudos são necessários para elucidação do exato mecanismo de transmissão genética dessas mutações e seu comportamento *in vivo*.



## **REFERÊNCIAS**

## 7. REFERÊNCIAS

- Barbara P, Stratakis CA. SDH mutations in tumourigenesis and inherited endocrine tumors. *J Intern Med* 2009; 266: 19-42.
- Badenhop RF, Cherian S, Lord RS, Baysal BE, Taschner PE, Schofield PR. Novel mutations in the SDHD gene in pedigrees with familial carotid body paraganglioma and sensorineural hearing loss. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 31(3): 255-63.
- Badenhop RF, Jansen JC, Fagan PA, Lord RSA, Wang ZG, Foster WJ, Schofield PR. The prevalence of SDHB, SDHC, and SDHD mutations in patients with head and neck paraganglioma and association of mutations with clinical features. *J Med Genet* 2004; 41: 1-5.
- Bayley JP, 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 Med Genet.* 2005; 6:39.
- Berger AH, Knudson AG, Pandolfi PP. A continuum model for Tumor Suppression. *Nature* 2011; 476: 163-169.
- Blanchet EM, Martucci V, Pacak K. Pheochromocytoma and paraganglioma: current functional and future molecular imaging. *Frontiers in oncology* 2012; 1:58.
- Crona J, Nordling M, Maharjan R, Granberg D, Stalberg P, Hellman P, Bjorklund P. Integrative Genetic Characterization and Phenotype Correlations in Pheochromocytoma and Paraganglioma Tumors. *Plos One* 2014; 9: 1-11.
- Dahia PLM. Pheochromocytoma and paraganglioma pathogenesis: learning from genetic heterogeneity. *Nature Reviews* 2014; 14: 108-119.

- Dahia PL, Ross KN, Wright ME, Hayashida CY, Santagata S, Barontini M, Kung AL, Sanso G, Powers JF, Tischler AS et al. A HIF1 $\alpha$  regulatory loop links hypoxia and mitochondrial signals in pheochromocytomas. *PLoS Genetics* 2005; 1: 72-80.
- De Lellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C (Eds.): World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs. IARC Press 2004; 147-166.
- Fernández JMT, Colunga R, Valdez LGG. Paraganglioma de cuerpo carotídeo: reporte de un caso clínico com correlación familiar. *Rev Esp Cir Oral Maxilofac* 2011; 33: 79-83.
- Fishbein L, Nathanson KL. Pheochromocytoma and Paraganglioma: Understanding the Complexities of the Genetic Background. *Cancer Genet* 2012; 205 (1-2):1-11.
- Fonte JS, Robles JF, Chen CC, Reynolds J, Whatley M, Ling A, Mercado-Asis LB, Adams KT, Martucci V, Fojo T, Pacak K. False-negative 123I-MIBG SPECT is most commonly found in SDHB-related pheochromocytoma or paraganglioma with high frequency to develop metastatic disease. *Endoc Relat Cancer* 2012; 19: 83-93.
- Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986; 323: 643-646.
- Gardner David G, Shoback Dolores. Endocrinología básica e clinica de Greenspan. 9ª edição. São Paulo: Artmed, 2013. 896 páginas.
- Hensen EF, Bayley JP. Recent advances in the genetics of SDH-related paraganglioma and pheochromocytoma. *Familial Cancer* 2011; 10: 355-363.

Jiang S, Dahia PLM. Minireview: The Busy Road to Pheochromocytomas and Paragangliomas Has a New Member, TMEM127. *Endocrinology* 2011; 152(6): 2133–2140.

Kantorovich V, King KS, Pacak K. SDH-related Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010; 24: 415-424.

Kim ES, Kim SY, Mo EY, Jang DK, Moon SD, Han JH. Novel germline SDHD mutation in a patient with recurrent familial carotid body tumor and concomitant pheochromocytoma. *Head and Neck* 2014; doi: 10.1002/hed.23670 (no prelo)

Kirmani S, Young WF. Hereditary Paraganglioma-Pheochromocytoma Syndromes. GeneReviews™. NCBI Bookshelf. University of Washington, Seattle; 2012.

Knudson AG. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci* 1971; 68: 820-823.

Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 5444.

Lai EW, Joshi BH, Martiniova L, Dogra R, Fujisawa T, Leland P, Krijger RR, Lubensky IA, Elkahloun AG, Morris JC, Puri RK, Pacak K. Overexpression of Interleukin-13 receptor-2 in neuroendocrine malignant pheochromocytoma: A novel target for receptor directed anti-cancer therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 2952-2957.

Lee HJ, Lee J. Differential Diagnosis of Adrenal Mass Using Imaging Modality: Special emphasis on F-18 Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose Positron Emission Tomography/ Computed Tomography. *Endocrinol Metab* 2014; 29: 5-11.

Lefebvre M, Foulkes WD. Pheochromocytoma and paraganglioma syndromes: genetics and management update. *Current Oncology* 2014; 21: e8-e17.

- Lenders JWM, Eisenhofer G, Manelli M, Pacak K. Pheochromocytoma. *Lancet* 2005; 366: 665-675.
- Martin R, Bugalho MJ. Paragangliomas/Pheochromocytomas: Clinically Oriented Genetic Testing. *International Journal of Endocrinology* 2014; 1-15.
- Miller SA, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
- Neumann HPH, Erlic Z. Maternal transmission of symptomatic disease with SDHD mutation: Fact or Fiction? *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 1573-1575.
- Neumann HPH, Pawlu C, Peczkowska M, Bausch B, McWhinney SR, Muresan M, Buchta M, Franke G, Klisch J, Bley TA, Hoegerle S, Boedeker CC, Opocher G, Schipper J, Januszewicz A, Eng C. Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *JAMA* 2004; 292: 943-951.
- Neumann HPH, Baush B, McWhinney SR, Bender BU, Gimm O, Franke G, Schipper J, Klisch J, Althoefer C, Zerres K, Januszewicz A, Eng C. Germ-Line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *New England Journal of Medicine* 2002; 346: 1459-1466.
- Offergelf C, Brase C, Yaremchuk S, Mader I, Rischke HC, Glasker S, Schmid KW, Wiech T, Preuss SF, Suarez C, Kopec T, Patocs A, Wohllk N, Malekpour M, Boedeker CC, Neumann HPH. Head and neck paragangliomas: Clinical and molecular genetic classification. *Clinics* 2012; 67(S1): 19-28.
- Pacak K, Brown MJ. Paraganglioma Syndromes: What's New? Endo 09, Meet-the-professor and case management forum handouts 2009; 91<sup>st</sup> Annual meeting, 25-34.

- Panizza E, Ercolino T, Mori L, Rapizzi E, Castellano M, Opocher G, Ferrero I, Neumann HPH, Manelli M, Goffrini P. Yeast model for evaluating the pathogenic significance of SDHB, SDHC and SDHD mutations in PHEO-PGL syndrome. *Human Molecular Genetics* 2013; 22: 804-815.
- Pigny P, Vincent A, Bauters CC, Bertrand Monelle, Montpreville VT, Crepin M, Porchet N, Caron P. Paraganglioma after maternal transmission of a succinate dehydrogenase gene mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 1609-1615.
- Ramondo V, Ercolino T, Faggiano A, Giachè V, Ragghianti B, Rapizzi E, Colao A, Mannelli M. Genetic-clinical profile of subjects with apparently sporadic extra-adrenal paragangliomas. *Frontiers in Endocrinology* 2012; 3: 1-5.
- Rich BS, Moo TA, Mark S, Scognamiglio T, Pecker MS, Sobol I, LaRocca GM, Fahey TJ. Sympathetic Paraganglioma in a patient with unrepaired Tetralogy of Fallot: A case report and review of literature. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 7-12.
- Samji KB, Crown AL, Buxton-Thomas MS, Aylwin SJB, Schulte KMH, Dizdarevic S. Necessity for long-term follow-up of patients with head and neck paraganglioma and mutation in the succinate dehydrogenase genes: An index case report and literature review. *Endocrine Practice* 2012; 18: e130-e136.
- Stratakis CA, Carney JA. The triad of paragangliomas, gastric stromal tumours and pulmonary chondromas (Carney triad), and the dyad of paragangliomas and gastric stromal sarcomas (Carney-Stratakis syndrome): molecular genetics and clinical implications. *J Intern Med* 2009; 266: 43-52.

Van Hulsteijn LT, Dekkers OM, Hes FJ, Smit JWA, Corssmit EPM. Risk of malignant paraganglioma in SDHB-mutation and SDHD-mutation carriers: a systematic review and meta-analysis. *J Med Genet* 2012; 49: 768-776.

Welender J, Soderkvist P, Gimm O. Genetics and clinical characteristics of hereditary pheochromocytomas and paragangliomas. *Endocrine-Related Cancer* 2011; 18: R253-R276.

Wu CL, Zukerberg LR, Ngwu C, Harlow E, Lees JA. In vivo association of E2F and DP family proteins. *Molecular Cellular Biology* 1995; 15: 2536-2546.

<http://www.ensembl.org>

<http://ghr.nlm.nih.gov>

<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/pheochromocytoma/HealthProfessional#>

Section\_71

# **ANEXOS**



## 8. ANEXOS

### 8.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº Registro COEP: CAAE - 09135912.6.0000.5149

**Título do Projeto:** “Caracterização molecular e clínica de pacientes com câncer do trato gastrointestinal”

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), em uma pesquisa intitulada: “Caracterização molecular e clínica de pacientes com câncer do trato gastrointestinal”. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que está sendo realizada. Sua colaboração neste estudo é muito importante, mas a decisão de participar deve ser sua. Para tanto, leia com cuidado as informações abaixo e não se apresse em decidir. Se você não concordar em participar ou quiser desistir em qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você. Se você concordar em participar, basta preencher os seus dados e assinar a declaração concordando com a pesquisa. Se você tiver alguma dúvida pode esclarecê-la com o responsável da pesquisa. Obrigada.

#### Objetivo do estudo

Este subprojeto está sendo proposto porque há pouco conhecimento acerca dos aspectos moleculares dos raros tumores conhecidos como paragangliomas, principalmente no Brasil. O encontro de uma família mineira com diversos membros afetados provavelmente significa que há uma mutação no DNA desses indivíduos e essa alteração poderá passar de geração em geração, causando elevada morbidade nos acometidos. Identificando tal alteração, esperamos contribuir para um melhor entendimento da doença e adequado acompanhamento e abordagem dos acometidos. O objetivo desse trabalho é estudar, tendo como base os indivíduos da família, os aspectos genéticos (moleculares) envolvidos no surgimento dos tumores nessa população. Pretendemos também, através do estudo clínico e do acompanhamento, observar o comportamento de tais tumores conforme a mutação apresentada e propiciar um adequado aconselhamento genético para todos os indivíduos da família.

#### Procedimentos

Serão incluídos nesta pesquisa tanto indivíduos portadores de paragangliomas, quanto os demais membros da família que podem carrear as alterações moleculares, mesmo que não acometidos pela doença, desde que concordem e assinem o termo de consentimento livre e esclarecido. Não serão administrados aos pacientes quaisquer medicamentos. O principal

inconveniente aos quais os pacientes serão submetidos será a coleta de sangue total (10 ml) e a eventual realização de exames de sangue de bioquímica. O desconforto associado à coleta de sangue é o habitual de um exame de sangue de rotina. A coleta será realizada com material estéril, descartável e por pessoas treinadas. O material colhido será devidamente etiquetado e utilizado somente para os propósitos dessa pesquisa, não havendo quaisquer custos para o paciente. As informações obtidas serão objeto de estrita confidencialidade e não envolvem custos ou pagamento de qualquer espécie. Os pacientes que desejarem, também poderão ser submetidos à Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET), para melhor caracterização topográfica dos tumores. Quanto a esse procedimento diagnóstico, o risco envolvido se deve à exposição corpórea à radiação ionizante e também à punção de veia periférica para a administração do radioisótopo. A participação neste exame requer a concordância com um termo de consentimento próprio (em anexo).

### Pesquisadores

A equipe de pesquisadores é composta pelos seguintes profissionais: Dr. Luiz Armando Cunha De Marco (coordenador da pesquisa), Dra. Franciele Antonieta Bianchi Leidenz, Dra. Luciana Bastos Rodrigues e Dr. Marcelo Magaldi.

### Confidencialidade

Todos os dados dessa pesquisa serão mantidos em sigilo e apenas a equipe de pesquisadores terá acesso a eles. Cada participante receberá um código garantindo confidencialidade de sua identidade. Caso o(a) senhor(a) queira, terá acesso aos resultados individuais.

### Benefícios e riscos

Esta pesquisa não oferece qualquer risco adicional ao participante, exceto aqueles inerentes à própria coleta de sangue total. As informações obtidas nos auxiliarão a compreender os mecanismos genéticos envolvidos no surgimento e nas manifestações clínicas dos paragangliomas familiares.

Não haverá qualquer tipo de despesa ao participante, no que tange a materiais ou testes. Ao assinar esse termo de consentimento o senhor (a) não está abrindo mão de seus direitos legais.

Através deste documento fica assegurado o direito ao Sr(a) \_\_\_\_\_ que terá todos os esclarecimentos relativos à pesquisa garantidos, incluindo os métodos utilizados. A partir do momento que o paciente participante da pesquisa não desejar mais fazer parte da pesquisa, é reservado o direito de se retirar, estando livre de sofrer quaisquer penalidades ou danos. Se no transcorrer da pesquisa surgir alguma dúvida, poderá o participante procurar um dos

pesquisadores: Dr. Luiz Armando Cunha De Marco, Dra. Luciana Bastos Rodrigues e Dra. Franciele Antonieta Bianchi Leidenz, no tel. 3409-9134 (UFMG) ou no tel. (031) 96351770.

Eu, \_\_\_\_\_, paciente voluntário, dou consentimento livre e esclarecido, para que se façam os testes necessários a esta pesquisa e posterior uso e publicação dos dados nos relatórios finais e conclusivos, a fim de que estes sirvam para beneficiar a ciência e a humanidade.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

Assinatura do participante ou responsável legal

\_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador

\_\_\_\_\_

Franciele Antonieta Bianchi Leidenz

Caso o (a) Sr.(a) queira se informar sobre o projeto, independentemente da equipe do Coordenador, favor contatar:

COEP (Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG)

Universidade Federal de Minas Gerais

Campus da Pampulha

Unidade Administrativa II, 2º andar – sala 2005

Av. Antonio Carlos, 6627

Telefax: 3409-4027

## 8.2 AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE ESTUDO DE CASO EM PERIÓDICO

\_\_\_\_\_, paciente, registro  
\_\_\_\_\_, submetido a diagnóstico no Exame de  
\_\_\_\_\_ do Centro de Imagem Molecular da

Faculdade de Medicina da UFMG, declaro estar de acordo com a publicação do estudo de meu caso em periódico de reconhecido padrão científico e ético. Para tal, torna-se indispensável que sejam garantidos o meu anonimato e, em caso de fotografias, colocada tarja negra para não identificação. Estou de acordo que o material que estou liberando no presente seja utilizado exclusivamente para esta oportunidade; caso haja necessidade de participação em novo estudo, deverei ser comunicado (a) de declarar, como faço agora, a minha autorização.

Esta autorização é voluntária, portanto, não implica em qualquer dano material, físico ou moral, assim como também não resulta em qualquer benefício material. Assim como não haverá nenhuma despesa, sendo de responsabilidade da equipe os gastos com impressão, cópias ou com qualquer outra eventualidade.

A equipe fica disponível para prestar esclarecimentos.

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura do paciente: \_\_\_\_\_

Nome do responsável pela publicação: \_\_\_\_\_

Assinatura do responsável pela publicação: \_\_\_\_\_

### 8.3 QUESTIONÁRIO

Universidade Federal de Minas Gerais

Laboratório de Medicina Molecular

## Questionário

Estudo genético sobre paragangliomas

1) Nome (Sigla):
2) Data de nascimento/Idade:    /    /    -
3) Sexo: (    ) Feminino    (    ) Masculino
4) Filhos: (    ) Não    (    ) Sim – Quantos:
5) Queixas/sintomas:
6) Idade de início e duração das queixas:
7) Como se deu o diagnóstico (Exames realizados): (    )RNM    (    )TC    (    )Metanefrinas/catecolaminas urina e/ou sangue Outros:
8) Idade ao diagnóstico:
9) Tumor único ou múltiplo: (    ) Único    (    )Múltiplo
10) Localização do(s) tumor (es):
11) Presença de outros tumores ou síndromes associados? (    )Não    (    )Sim – Especificar:
12) Ressecção tumoral: (    ) Sim    (    )Não

13) Tamanho do tumor (> ou < 5 cm):
14) Laudo histopatológico:
15) Presença de metástases: ( ) Não ( ) Sim Onde? Como Diagnosticou?
16) Tratamento realizado/ proposto: ( ) Ressecção simples ( ) Acompanhamento clínico ( ) Radioterapia Outros:
17) Comorbidades: ( ) Não Quais:
18) Antecedentes patológicos:
19) Uso de medicamentos: ( ) Não Quais:
20) Hábitos: ( ) Tabagismo ( ) Etilismo ( ) Drogas ilícitas ( ) Altitudes elevadas
21) História familiar de paragangliomas: ( ) Não ( ) Sim – Especificar:
22) História Familiar significativa:

Assinatura: