

Universidade da Beira Interior

Faculdade de Ciências da Saúde



**GENÉTICA DOS
FEOCROMOCITOMAS E
PARAGANGLIOMAS FAMILIARES**

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina

 Davide José da Silva Severino

Maio de 2009

Universidade da Beira Interior

Faculdade de Ciências da Saúde



GENÉTICA DOS FEOCROMOCITOMAS E PARAGANGLIOMAS FAMILIARES

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina

Por:

Davide José da Silva Severino

Orientado por:

Professor Doutor Manuel Carlos Lemos

RESUMO

Os feocromocitomas/paragangliomas são neoplasias raras com origem nas células cromafins presentes na medula adrenal e na paragânglia simpática e parassimpática. Apesar de a grande maioria ser esporádica, uma percentagem significativa, aproximadamente 25%, pode ocorrer em indivíduos portadores de mutações germinais que favorecem o seu desenvolvimento. As formas síndromicas mais comuns associadas a feocromocitomas/paragangliomas familiares englobam as síndromes de von Hippel-Lindau, a Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2, e as Síndromes de Paragangliomas Familiares. Este trabalho visa discutir as bases genéticas destas síndromes e elaborar uma lista das principais mutações associadas a feocromocitomas/paragangliomas, salientando a relação genótipo/fenótipo presente em cada uma destas doenças.

Palavras-chave: feocromocitomas, paragangliomas, VHL, MEN 2, SDH, mutações

ABSTRACT

The pheochromocytomas/paragangliomas are rare neoplasias that originate in the cromafin cells present in the adrenal medulla and the sympathetic and parasympathetic paraganglia. Although the vast majority are sporadic, a significant percentage, approximately 25%, can occur in individuals with germline mutations that favor their development. The most common syndromic forms associated with familial pheochromocytoma/paraganglioma syndromes include the von Hippel-Lindau, Multiple Endocrine Neoplasia type 2, and Familial Paraganglioma Syndromes. This review aims to discuss the genetic basis of these syndromes and to establish a list of key mutations associated with pheochromocytomas/paragangliomas, emphasizing the genotype/phenotype relationship in each of these diseases.

Key words: pheochromocytomas, paragangliomas, VHL, MEN 2, SDH, mutations

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Doutor Manuel Carlos Lemos, professor na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior e especialista em Endocrinologia, pela grande honra ter aceite ser o orientador desta tese e por toda a disponibilidade, auxílio, tempo dispendido e simpatia.

Ao amor da vida, Anne Carvalho, pelo permanente apoio e colaboração na execução desta tese, ajudando a superar os obstáculos e dificuldades com toda a paciência e disponibilidade.

Aos meus pais, pelo permanente apoio e estimulação ao longo do meu percurso académico e por sempre proporcionarem condições de vida compatíveis com a realização desta tese.

A todos os tutores, professores, técnicos, colegas e funcionários que comigo se cruzaram e que, de uma forma mais ou menos activa, possibilitaram o desenvolvimento de atitudes e aptidões, não só profissionais, mas também, e mais importantes, pessoais e sociais no crescimento da minha pessoa.

ÍNDICE

RESUMO	I
ABSTRACT	II
AGRADECIMENTOS	III
ÍNDICE	IV
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
1 - INTRODUÇÃO	1
A) ENQUADRAMENTO DO TEMA	1
B) OBJECTIVOS	2
2 - MÉTODOS	4
3 - SÍNDROME DE VHL	6
A) GENE <i>VHL</i>	8
B) PROTEÍNA VHL	9
(i) <i>A pVHL como reguladora dos genes induzíveis pela hipóxia</i>	9
(ii) <i>O complexo pVHL-ubiquitina ligase</i>	10
(iii) <i>Ubiquitinação do HIF pela pVHL</i>	10
(iv) <i>Hidroxilação do HIF</i>	11
(v) <i>Funções alternativas da pVHL</i>	11
C) MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA SÍNDROME DE VHL	12
D) MODELOS ANIMAIS PARA A SÍNDROME DE VHL	13
E) CORRELAÇÕES GENÓTIPO-FENÓTIPO NA SÍNDROME DE VHL	14
4- SÍNDROME MEN 2	18
A) MEN 2A	18
B) MEN 2B	19
C) GENE <i>RET</i>	20
D) PROTEÍNA DO GENE <i>RET</i>	20
(i) <i>Activação do receptor RET pelo GFL</i>	21

(ii) <i>Ativação do RET por outros factores de crescimento</i>	21
(iii) <i>Vias de sinalização intracelulares</i>	22
E) MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA SÍNDROME MEN 2	23
F) MODELOS ANIMAIS PARA A SÍNDROME MEN 2	23
G) CORRELAÇÕES GENÓTIPO – FENÓTIPO NA SÍNDROME MEN 2	24
5 – SÍNDROMES DE PARAGANGLIOMAS FAMILIARES	27
A) PGL 1	28
B) PGL 3	28
C) PGL 4	29
D) COMPLEXO SUCINATO-DESIDROGENASE	29
(i) <i>Genes SDH</i>	29
(ii) <i>Complexo Mitochondrial II</i>	30
E) MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DAS SÍNDROMES DE PARAGANGLIOMAS FAMILIARES	33
F) MODELOS ANIMAIS PARA AS SÍNDROMES DE PARAGANGLIOMAS FAMILIARES	33
G) CORRELAÇÕES GENÓTIPO-FENÓTIPO NAS SÍNDROMES DE PARAGANGLIOMAS FAMILIARES	34
6 - VIA TUMORIGÉNICA COMUM	38
7 - TESTES GENÉTICOS	42
8 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	45
BIBLIOGRAFIA	47
ANEXO 1 – MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NO GENE <i>VHL</i>	63
ANEXO 2 - MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NO GENE <i>RET</i>	72
ANEXO 3 - MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NO GENE <i>SDHB</i>	74
ANEXO 4 - MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NO GENE <i>SDHC</i>	77
ANEXO 5 - MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NO GENE <i>SDHD</i>	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do gene <i>VHL</i> e localização das principais mutações exónicas identificadas.. .	15
Figura 2 - Estrutura do gene <i>RET</i> e localização das principais mutações exónicas identificadas....	25
Figura 3 - Estrutura do gene <i>SDHB</i> e localização das mutações exónicas identificadas..	35
Figura 4 - Estrutura do gene <i>SDHC</i> e localização das mutações exónicas identificadas.	35
Figura 5 - Estrutura do gene <i>SDHD</i> e localização das mutações exónicas identificadas.....	36
Figura 6 - Modelo unificador dos genes envolvidos na génese das síndromes de feocromocitomas/paragangliomas familiares.	39
Figura 7 - Algoritmo para o diagnóstico genético dos feocromocitomas/paragangliomas.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico	GAB 2: Growth factor receptor-bound protein 2-Associated Binding protein
Ala: alanina	GDNF: Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor
AP 2: Activating Protein 2	GFL: Glial cell line-derived neurotrophic factor - Family of Ligands
aPKC: proteína cinase C	GFR α : GDNF Family Receptors alpha
Arg: arginina	Gln: glutamina
ARNm: ácido ribonucleico mensageiro	Glu: glutamato
ARTN: artemin	Gly: glicina
Asn: asparagina	GRB7/10: Growth factor Receptor-Bound protein docking proteins 7/10
Asp: aspartato	GTP: guanosina trifosfato
ATP: adenosina trifosfato	HIF α : subunidade alfa do factor induzível pela hipóxia
Ca ²⁺ : íão cálcio	HIF: factor induzível pela hipóxia
c-Jun: factor de transcrição c-jun	HIF-1 α : subdomínio 1 do HIF α
CoA : coenzima A	His: histidina
CRG: Clinical Research Group	Ile: isoleucina
Cul 2: cullina 2	IP 3: inositol-1,4,5-trifosfato
Cys: cisteína	junB: factor de transcrição junB
DAG: diacilglicerol	Kb: kilopares de bases nucleotídicas
Egl-9: Egg Laying defective nine	
EgLN 1, 2 e 3: Egg Laying defective Nine type 1, 2 and 3	
FAD: Flavin Adenine Dinucleotide	
Feo: feocromocitoma	

kDa: kilodalton	PSPN: persephin
Leu: leucina	pVHL 19: forma curta da proteína de VHL
Lys: lisina	pVHL 30: forma longa da proteína de VHL
MEN 2A: neoplasia endócrina múltipla tipo 2 A	pVHL: proteína de von Hippel-Lindau
MEN 2B: neoplasia endócrina múltipla tipo 2 B	Rbx 1: ring-box type 1
MEN: neoplasia endócrina múltipla	RET 150: forma imatura do receptor RET com 150 kDa de peso molecular
Met: metionina	RET 170: forma madura do receptor RET com 170 kDa de peso molecular
MLTP: Mutations Leading to Truncated Protein	RET: rearranged during transfection
NADH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide	SDH: complexo succinato desidrogenase
NRF 1 e 2: Nuclear Respiratory Factor 1 e 2	SDHA: subunidade A do complexo succinato- desidrogenase
NRTN: neurturin	SDHB: subunidade B do complexo succinato- desidrogenase
Para: paraganglioma	SDHC: subunidade C do complexo succinato- desidrogenase
Pb: pares de bases	SDHD: subunidade D do complexo succinato- desidrogenase
PDGF β : Platelet-Derived Growth Factor beta	SDHD: subunidade D do complexo succinato- desidrogenase
PGL 1: paragangliomas familiares tipo 1	Ser: serina
PGL 2: paragangliomas familiares tipo 2	SHANK 3: multiple ankyrin repeat domains
PGL 3: paragangliomas familiares tipo 3	3
PGL 4: paragangliomas familiares tipo 4	Shc: Src-homology collagen
Phe: fenilalanina	SNC: sistema nervoso central
PLC: fosfolípase C	Sp1: Specificity Protein 1
Pro: prolina	

Tyr: tirosina

UTR: untranslated region

TGF α : Transforming Growth Factor alpha

Val: valina

Thr: treonina

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

TNF α : factor de necrose tumoral alfa

VHL: von Hippel-Lindau

Trp: triptofano

1- INTRODUÇÃO

A) ENQUADRAMENTO DO TEMA

Os feocromocitomas e os paragangliomas são tumores derivados das células endócrinas provenientes da crista neural. Os primeiros surgem na medula supra-renal a partir das células cromafins aí presentes, enquanto que os segundos são provenientes das células cromafins localizadas na paragânglia simpática e parassimpática distribuída ao longo do eixo para-aórtico e para-vertebral, desde a base do crânio até ao pavimento pélvico, sendo, na sua grande maioria, intra-abdominais e adjacentes às glândulas supra-renais (85%).^{1,2}

A sua incidência mundial ronda os 2 a 8 milhões de casos por ano, sendo a sua prevalência de 0,2 a 4% entre a população hipertensa e de aproximadamente 4% entre a população com incidentalomas adrenais.²

Esta neoplasia é muitas vezes conhecida como estando associada à regra dos 10%, de acordo com a qual 10% são extra adrenais; 10% são encontradas em indivíduos sem hipertensão; 10% são malignas; 10% são bilaterais; 10% ocorrem em idade pediátrica e 10% são hereditárias. No entanto, um estudo longitudinal realizado por *Neumann et al*³ colocou em dúvida esta suposição. Este estudo envolveu 241 indivíduos portadores de feocromocitoma e após a realização do estudo genético, constatou-se a existência de mutações germinais num dos quatro genes associados a feocromocitomas e paragangliomas em quase 25% dos casos. Assim, 30 pessoas apresentavam mutações no gene *VHL* (45%), 13 no gene *RET* (20%), 12 no *SDHB* (18%) e 11 no gene *SDHD* (17%).^{2,3}

A grande maioria dos feocromocitomas e paragangliomas são esporádicos, mas existem síndromes caracterizadas pela existência de uma predisposição familiar para o seu desenvolvimento. De acordo com a referida regra, estas representariam 10% de todos os casos,

mas o estudo, atrás referido, apontou para a possibilidade desta percentagem ser maior. De facto, alguns estudos mais recentes prevêem uma prevalência, para este tipo de neoplasias, que ronda os 21 a 30%.^{4,5} Estas formas hereditárias podem diferir, entre si, quanto à frequência de desenvolvimento da neoplasia, no seu potencial maligno e no fenótipo bioquímico associado. Desta forma, a identificação dos genes associados a estas síndromes pode não só permitir o diagnóstico genético, mas também contribuir para os conhecimentos dos mecanismos tumorigénicos e identificação de novos alvos terapêuticos.^{4,5}

A necessidade de melhor compreender estas síndromes e as especificidades a elas associadas motivaram-me para a elaboração desta tese de mestrado.

B) OBJECTIVOS

O conhecimento das influências genéticas nos feocromocitomas e paragangliomas tem adquirido uma importância cada vez maior. Neste sentido, proponho-me rever a literatura científica mais relevante e analisá-la, de forma a avaliar o “estado-da-arte” sobre este tema.

Como objectivos principais, destaco os seguintes:

1. Realizar uma revisão sobre as principais síndromes associadas a feocromocitomas/paragangliomas familiares, nomeadamente: Síndrome de von Hippel-Lindau, Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2 e Síndromes de Paragangliomas Familiares;
2. Rever os principais aspectos associados aos vários genes envolvidos nestas síndromes, nomeadamente *VHL*, *RET*, *SDHB*, *SDHC* e *SDHD*;
3. Descrever as principais correlações genótipo-fenótipo associadas às várias síndromes e a sua importância clínica;
4. Descrever o modo como os vários genes se inter-relacionam numa via tumorigénica comum;

5. Elaborar uma lista das mutações descritas na literatura para os vários genes envolvidos nestas síndromes.

2 - MÉTODOS

Para a realização desta tese foram usadas as seguintes bases de dados: PubMed, Medscape, Google Scholar e OMIM.

A estratégia de pesquisa, nestas bases, teve quatro grupos de itens:

- (i) Revisões das principais síndromes abordadas - para este tópico optaram-se pelas seguintes palavras-chaves: "*familial pheochromocytoma*"; "*MEN 2*"; "*Paragangliomas*"; "*von Hippel-Lindau*".
- (ii) Para abordar todos os aspectos clínicos e genéticos da síndrome de VHL utilizei como palavras-chaves: "*mutations VHL*"; "*genotype correlations VHL*", "*animal models*".
- (iii) Relativamente à síndrome MEN 2, optei por usar como palavras-chaves as seguintes: "*MEN 2A*"; "*MEN 2B*"; "*mutations RET*"; "*genotype correlations MEN2*"; "*animal models*".
- (iv) Para as Síndromes de Paragangliomas Familiares recorri às palavras-chaves: "*succinate dehydrogenase complex II*"; "*SDHB*"; "*SDHB mutations*"; "*SDHC*"; "*SDHC mutations*"; "*SDHD*"; "*SDHD mutations*"; "*PGL 1*"; "*PGL 3*"; "*PGL 4*".

Utilizei a base de dados OMIM para efectuar uma pesquisa mais específica e direccionada para alguns temas relacionados com a componente genética do trabalho, nomeadamente modelos animais e correlações genótipo-fenótipo.

Foram ainda objecto de pesquisa alguns livros da área da Medicina Interna e Endocrinologia.

Devido à natureza do trabalho, não foram colocadas restrições na data de pesquisa, excepto quando se procuraram artigos mais generalistas (campo i), onde se optou por obter os artigos mais recentes possíveis.

Houve restrição de idiomas tendo-se privilegiado artigos escritos em inglês, português, espanhol e francês.

Decidi excluir os casos de feocromocitomas que ocorrem no contexto da MEN tipo 1 e da Neurofibromatose tipo 1 devido à sua baixa incidência nestas síndromes (0,1% a 5,7% na Neurofibromatose e ainda mais baixa na MEN 1).⁵

3 - SÍNDROME DE VHL

A síndrome de VHL é caracterizada por hemangioblastomas cerebrais, medulares e retinianos, por quistos e carcinomas das células renais, por feocromocitomas e tumores do saco endolinfático, sendo as suas manifestações e severidade muito variáveis.^{1,4}

Os hemangioblastomas do SNC são a lesão característica desta síndrome. Aproximadamente 80% desenvolvem-se no cérebro, enquanto que os restantes 20% se localizam na medula espinhal. Dentro do cérebro, a grande maioria apresenta uma localização infratentorial com preferência pelos hemisférios cerebelares. As neoplasias multifocais, quer sincrónicas quer metacrónicas, são frequentes no SNC. Os hemangioblastomas medulares são intradurais ocorrendo, principalmente, nas regiões cervicais e torácicas, mas podem, em situações raras, envolver toda a medula ou afectar os nervos periféricos.^{6,7}

Os sintomas clínicos dependem principalmente da localização do tumor. Se infratentoriais, as cefaleias, emese e alterações da marcha predominam no quadro clínico, ao passo que se a sua localização for supratentorial, o modo de apresentação depende da sua localização específica. Como características globais, estes tumores apresentam um crescimento lento mas a presença de formações quísticas, que podem apresentar um desenvolvimento mais rápido que a restante neoplasia, pode ocasionar uma hidrocefalia com papiledema. Os hemangioblastomas medulares manifestam-se por dor, mas à medida que a doença evoluiu é comum desenvolverem-se défices sensitivos e motores por compressão da medula espinhal.^{7,8}

Os hemangioblastomas retinianos são, histologicamente, em tudo idênticos aos hemangioblastomas presentes no SNC. Cerca de 70% dos indivíduos afectados por esta síndrome são portadores de hemangioblastomas retinianos pela idade dos 25 anos. Estes localizam-se com frequência nas regiões temporal e periférica da retina, mas situam-se no pólo posterior e no disco óptico em 1 e 8% dos casos, respectivamente. Podem ser assintomáticos, sendo detectados

durante o decorrer de um exame oftalmológico de rotina ou podem cursar com defeitos do campo visual ou diminuição da acuidade visual devido ao descolamento da retina, exsudação ou hemorragia. O número de angiomas não parece aumentar com a idade mas a probabilidade de perda de visão aumenta com esta.^{9,10}

Os quistos renais na síndrome de VHL são frequentemente múltiplos. O carcinoma renal, principalmente o tipo de células claras, pode desenvolver-se quer dentro do quisto, quer a partir do parênquima envolvente e ocorre em 40% dos indivíduos afectados, sendo a principal causa de mortalidade associada a esta patologia.⁷

Os feocromocitomas ocorrem em 10 a 20% dos indivíduos. A idade de apresentação varia entre os 10 e os 40 anos, com uma idade média de cerca de 20 anos. Podem manifestar-se como uma hipertensão arterial mantida ou episódica ou podem ser totalmente assintomáticos. Estão, por norma, localizados a uma ou a ambas as glândulas adrenais, podendo, também, situar-se ao longo de todo o trajecto simpático localizado no tórax e abdómen (paragangliomas) ou na cabeça e pescoço (quemodectomas - 10% do total de casos). Possuem um diâmetro superior a 2 cm e, por norma, são de natureza benigna apesar de poderem sofrer, em casos raros, uma degeneração maligna (< 5%).^{4,11}

As lesões pancreáticas são, na sua grande maioria, quistos simples. Apesar de serem com frequência múltiplas, raramente causam insuficiência endócrina ou exócrina a não ser que sejam extensas. Ocasionalmente, se localizadas na cabeça do pâncreas, podem causar obstrução biliar e um quadro clínico de icterícia colestática. Os tumores neuroendócrinos podem desenvolver-se mas não são hormonalmente activos. Estes têm um crescimento lento, mas um comportamento maligno, mais notório naqueles com um diâmetro superior a 3 cm.⁷

Os tumores do saco endolinfático podem manifestar-se como uma hipoacúsia de gravidade variável, muitas vezes severa, profunda e de início súbito. Outras formas de apresentação incluem vertigens e acufenos. As neoplasias de grandes dimensões podem envolver

outros nervos cranianos e ocasionar défices isolados dos mesmos. Este tipo de neoplasias é observado em 10% dos indivíduos portadores desta patologia. Em raros casos podem ser malignos.¹²

Os cistadenomas epididimários e papilares são relativamente comuns nos homens portadores desta síndrome. Raramente causam problemas, mas alguns casos bilaterais encontram-se descritos como causa de esterilidade. A lesão equivalente nas mulheres é o cistadenoma papilar do ligamento largo, que no entanto é menos comum.⁷

Como foi possível constatar, a variabilidade fenotípica associada à doença de von Hippel-Lindau é grande, mas as características dos quadros clínicos possibilitam a sua divisão em vários tipos e subtipos. Desta forma, é possível classificar esta doença em tipo I, quando o feocromocitoma não faz parte do quadro clínico, e em tipo II quando o mesmo compõe o referido quadro. Além desta divisão, a variante II pode, ainda, ser subclassificada nos tipos IIA, IIB e IIC. O subtipo IIA caracteriza-se pela presença de feocromocitomas e hemangioblastomas do SNC e pela ausência de carcinoma das células renais. O subtipo IIB engloba feocromocitomas, carcinoma das células renais e outros tumores do sistema nervoso central, enquanto que o subtipo IIC apresenta unicamente feocromocitomas.^{1,3}

Esta síndrome autossómica dominante resulta de mutações no gene de supressão tumoral *VHL*, localizado no cromossoma 3p25-26. Tem uma incidência aproximada de 1 caso por cada 36.000 nascimentos/ano, dos quais 20% resultam de mutações *de novo*, não existindo, portanto, história familiar da doença.²

A) GENE *VHL*

O gene *VHL* apresenta 10.444 pb de ADN genómico, tendo a molécula de ARNm, por ele codificada, um total de 4.700 pb. Apresenta dois codões iniciadores (metionina 1 e metionina 54) e a região codificadora da proteína proveniente do primeiro codão iniciador possui 639 pb que se encontram distribuídos por 3 exões de 340, 123 e 179 pb.¹³

A região promotora apresenta vários locais de ligação para numerosos factores de transcrição, entre os quais se encontra o Sp 1, importante para o controlo da transcrição deste gene.¹⁴

B) PROTEÍNA VHL

O gene *VHL* apresenta dois produtos conhecidos que parecem reflectir o uso de codões iniciadores alternativos. O produto mais longo, denominado de pVHL 30, é constituído por 213 aminoácidos e tem um peso aproximado de 24 a 30 kDa, ao passo que o segundo, denominado de pVHL 19, é composto pelos aminoácidos 54 a 213 da pVHL 30 e tem um peso, aproximado, de 19 kDa.¹⁵

A pVHL apresenta um movimento contínuo entre o núcleo e o citoplasma que se revela fundamental para a sua função. Alguns dados apontam para a possibilidade da pVHL 30 se localizar preferencialmente no citoplasma, enquanto a pVHL 19 parece situar-se predominantemente no núcleo, o que sugere que as suas funções, apesar de sobrepostas, não são idênticas.¹⁵

(i) A pVHL como reguladora dos genes induzíveis pela hipóxia

Os tumores ligados à inactivação do gene *VHL* são muito vasculares e produzem factores angiogénicos como o VEGF. Para além disso, os carcinomas renais, hemangioblastomas e feocromocitomas têm sido associados à presença de eritrocitose paraneoplásica devida à hiperprodução de eritropoietina. Estes ARNm são prototípicos de moléculas de ARNm induzíveis pela hipóxia e pode-se dizer que a hiper-expressão destes ARNm é característica das células *VHL*^{-/-}. Este facto foi confirmado pela descoberta de que este tipo de células vê a hiper-expressão desses ARNm suprimida após a reposição da função da pVHL e na presença de oxigénio.^{16, 17}

(ii) *O complexo pVHL-ubiquitina ligase*

Estudos bioquímicos revelaram que as pVHL formam um complexo multi-proteico que engloba quatro componentes denominados de elongina B e C, Cul 2 e Rbx 1. A elongina C e a Cul 2 são similares a outros componentes individuais de complexos multi-proteicos presentes em leveduras, os quais marcam proteínas específicas para a degradação, através de fenómenos de ubiquitinação.¹⁸

A estrutura tridimensional do complexo multi-proteico pVHL sustenta a hipótese de que este complexo, tal como o presente nas leveduras, possa ter actividade de ubiquitina ligase. Com esta ideia em mente, alguns investigadores cedo mostraram que, de facto, os complexos pVHL são dotados da capacidade de ubiquitinação, regulando substratos específicos para a degradação.

18

(iii) *Ubiquitinação do HIF pela pVHL*

Muitos dos genes regulados pela hipóxia encontram-se sob o controlo de factores de transcrição referidos como HIF. Este é constituído por duas subunidades não idênticas (alfa e beta) e liga-se a sequências específicas de ADN, favorecendo o processo de transcrição génica. A subunidade beta do HIF é uma proteína estável, enquanto que a alfa se apresenta instável na presença de oxigénio, restringindo a formação do HIF activo a condições de hipóxia.¹⁹

Em 1999, Maxwell et al¹⁹, mostraram que as células *VHL*^{-/-} não evidenciavam degradação da subunidade α , na presença de oxigénio e que a pVHL e a subunidade HIF α podiam ligar-se uma à outra. No seguimento destas observações, foi estabelecido que o complexo VHL tem, de facto, capacidade ubiquitina ligase e que esta se encontra direccionada para a ubiquitinação e consequente destruição da subunidade alfa do HIF, constituindo o elo de ligação entre a inactivação da pVHL e a hiper-expressão de ARNm induzíveis pela hipóxia.

(iv) *Hidroxilação do HIF*

A estabilização do HIF α , que ocorre em condições de hipóxia, implica a sua ligação à pVHL. Os primeiros estudos identificaram um subdomínio presente nesta subunidade, denominado de HIF-1 α , que era determinante para a instabilidade da molécula na presença de oxigénio. Outros grupos mostraram que o HIF-1 α sofre uma modificação pós-translacional dependente de oxigénio para ser reconhecida pela pVHL. Este fenómeno parece relacionar-se com a hidroxilação de resíduos de prolina, bastante conservados, presentes no referido subdomínio. A análise da estrutura tridimensional do HIF α ligado à pVHL revelou que os grupos hidroxilo são críticos para esta associação ao interagir com domínios específicos presentes na pVHL.²⁰

Estudos em modelos animais conduziram à identificação do gene codificador das prolil-hidroxilases, acima referidas, denominado de *Egl-9*. As células dos mamíferos contêm três genes - *EgLN 1, 2 e 3* - ancestralmente relacionados com o *Egl-9*, e os seus produtos proteicos são capazes de hidroxilar o HIF α *in vitro*. A *EgLN 1* parece ser a prolil-hidroxilase principal, no entanto as isoformas 2 e 3 podem desempenhar um importante papel em condições de hipóxia prolongada.²¹

As prolil-hidroxilases apresentam, na sua constituição, um átomo de oxigénio e, como consequência, alterações na concentração de oxigénio afectam a actividade catalítica das várias isoenzimas e o processo de hidroxilação do HIF α .²¹

(v) *Funções alternativas da pVHL*

Para além de todas as funções atrás referidas, o gene *VHL* parece desempenhar um papel preponderante no processo de montagem de proteínas, pois verifica-se uma deposição anómala da fibronectina na matriz extracelular em carcinomas renais e em embriões de ratinhos *Vhl*^{-/-}. A pVHL participa na protecção, *in vivo*, dos microtúbulos contra a despolimerização, estando esta função relacionada com a pVHL 30. Além destas, este gene encontra-se envolvido na manutenção

ciliar e no processo embriogénico, onde parece exercer uma acção fulcral na diferenciação e proliferação neuronal.^{22,23}

C) MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA SÍNDROME DE VHL

A maioria das pessoas portadoras da síndrome de VHL herdou um alelo do gene *VHL* mutado de um familiar afectado pela doença e um alelo normal de um familiar não afectado. De acordo com a hipótese “two-hit” proposta por Knudson, o processo carcinogénico inicia-se quando ambos os alelos são inactivados. As mutações germinais estão presentes em todas as células individuais afectadas, no entanto, apenas aquelas células submetidas a eventos mutacionais no alelo normal desenvolvem o processo tumoral.^{4, 14}

Perante situações de pVHL ausentes ou disfuncionais, a sua capacidade de supressão tumoral encontra-se alterada. A referida função supressora depende, em larga medida, da capacidade de degradação do HIF α , pelo que a alteração da função da pVHL contribui para o processo carcinogénico. Quando a pVHL está ausente ou vê a sua função alterada, o HIF α pode estimular os processos angiogénicos por meio da expressão de VEGF e/ou PDGF β , os quais desempenham um importante papel na proliferação das células endoteliais e pericitos. Este facto pode explicar a natureza vascular dos tumores associados a esta síndrome, em particular os hemangioblastomas e carcinomas das células renais. Além do mais, a elevada permeabilidade vascular, resultante da hiper-expressão de VEGF, parece ser a base do edema peritumoral e quistos observados com frequência nesta patologia. Um outro processo que pode contribuir para o mecanismo carcinogénico prende-se com a hiper-produção de TGF α , que além de ser um potente factor neurotrófico, pode favorecer a expressão do receptor do factor de crescimento epidérmico. Outros efeitos independentes de HIF podem, também, estar envolvidos na génese tumoral. Estes englobam processos tão variados como: (1) alteração do ciclo celular, uma vez que se verifica que os indivíduos afectados apresentam uma diminuição do número de células que

entram na fase G0 do ciclo celular; (2) potenciação dos fenômenos angiogênicos através da hipersecreção de VEGF, como consequência de uma alteração do processo de transcrição; (3) alterações na matriz extracelular.^{4, 14, 23}

D) MODELOS ANIMAIS PARA A SÍNDROME DE VHL

Para analisar a importância do gene *VHL* durante o desenvolvimento embrionário, *Gnarra et al*²⁴ desenvolveram linhagens de ratinhos knockout para este gene. Desta forma, verificaram que os ratinhos heterozigóticos *Vhl*^{+/-} sobreviviam até aos 15 meses sem evidência de qualquer doença espontânea, mas que os ratinhos homozigóticos *Vhl*^{/-} desenvolviam lesões placentares entre os 9,5 e os 10,5 dias de gestação e morriam *in utero* entre os 10,5 e os 12,5 dias. O trofoblasto parece ser normal e viável até aos 9,5 dias de gestação mas não progride para o sinciotrofoblasto. Além do mais, entre os 11,5 e os 12,5 dias o labirinto vascular placentar mostra uma grande disrupção e perda de estrutura culminando no desenvolvimento de hemorragias e de enfartes placentares, sendo esta alteração a causa da elevada mortalidade *in utero* destes ratinhos. Associada a estes fenômenos, verifica-se uma diminuição da expressão do VEGF devido a uma menor estabilização do seu ARNm, cuja função é realizada pelo produto do gene *Vhl*.

A perda de um dos alelos do gene *Vhl* não parece estar associada a uma predisposição significativa para o desenvolvimento de neoplasias renais, pois os ratinhos *Vhl*^{+/-} não revelaram qualquer diferença, estatisticamente significativa, na frequência de neoplasias renais comparativamente aos ratinhos normais *Vhl*^{+/+} após a administração de 50 a 200 mg/kg de estreptozotocina, um conhecido agente carcinogênico renal. Apesar dos ratinhos *Vhl*^{+/-} não exibirem uma maior frequência de lesões renais, eles tendem a desenvolver lesões proliferativas vasculares no fígado, útero, ovário, baço e coração que variam entre angiectasias e hemangiosarcomas. Estas lesões ocorrem em múltiplos órgãos, mas as de origem hepática são claramente as de maior incidência. Este padrão de múltiplas neoplasias vasculares que ocorrem em ratinhos *Vhl*^{+/-} assemelha-se ao da síndrome de VHL no humano.²⁵

E) CORRELAÇÕES GENÓTIPO-FENÓTIPO NA SÍNDROME DE VHL

A síndrome de VHL apresenta uma grande variabilidade inter-individual, pelo que as correlações entre o genótipo e fenótipo têm, cada vez mais, maior importância. Durante a realização desta tese identifiquei 357 mutações diferentes para o gene *VHL* (ver anexo 1), as quais consistem em mutações do tipo missense (46,8%), frameshift (36,7%), nonsense (8,7%), in-frame (4,2%) e splice site (3,6%). Estas encontram-se distribuídas por toda a sequência codificadora deste gene existindo, no entanto, alguns locais onde, pelas mais variadas razões, estas assumem uma especial importância (ver figura 1).

As mutações que afectam o gene *VHL* podem impedir a sua expressão – mutações do tipo frameshift, nonsense ou splice site - ou podem conduzir à expressão de uma proteína funcional, embora com algumas alterações estruturais – mutações do tipo missense. Sabe-se que as mutações do tipo missense, que resultam no subtipo I desta síndrome, diminuem a estabilidade e alteram a capacidade de ligação e interacção com a elongina C e HIF α , e que as associadas ao subtipo II tendem a afectar os aminoácidos responsáveis pela ligação da elongina C à pVHL. Esta alteração foi exemplificada por *Olschwang et al*²⁶ que, após a análise de 92 doentes, detectaram 61 mutações diferentes, das quais 18 ocorriam a montante ao codão 156, uma região que, quando afectada, altera a capacidade de interacção entre a pVHL e as elonginas B e C. As mutações missense associadas aos subtipos IIA e C resultam numa proteína que retém a capacidade de ubiquitinar o HIF α , na presença de oxigénio, em contraste com as mutações que estão na base da variante sindrómica IIB.²³

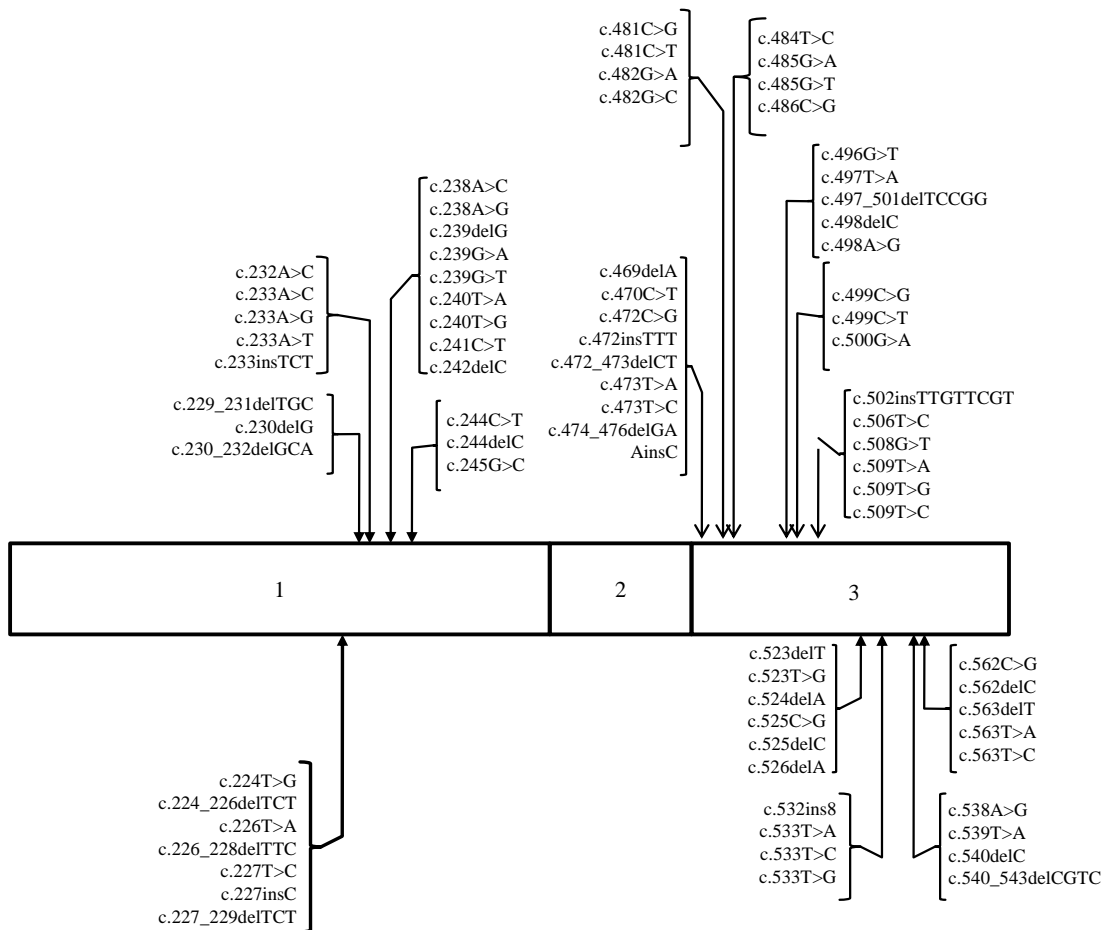


Figura 1 - Estrutura do gene *VHL* e localização das principais mutações exónicas identificadas. Estas mutações afectam sobretudo duas regiões, situadas entre os codões 75 e 82 no exão 1, e entre os codões 157 e 189 no exão 3. Por razões de clareza, os intrões e as regiões UTR não foram representados.

Em 1995, *Chen et al*²⁷ demonstraram que microdeleções/inserções, mutações nonsense ou deleções extensas ocorriam em 56% das famílias com doença tipo I, enquanto que na doença tipo II as mutações missense ocorrem em 96% das pessoas afectadas. De salientar que mutações específicas no codão 167 representam 43% do total de mutações encontradas na doença tipo II.

*Zbar et al*²⁸ realizaram uma análise com vista a detectar mutações germinais em 469 famílias portadoras da síndrome de VHL provenientes da América do Norte, Europa e Japão, tendo identificado um total de 137 mutações distintas. Os resultados obtidos permitiram verificar: (1) que mutações similares produziam fenótipos semelhantes nos Caucasianos e Japoneses, tendo sido identificados três fenótipos distintos: a) carcinoma renal sem feocromocitoma, b) carcinoma renal com feocromocitoma e c) feocromocitoma isolado; (2) que existiam seis eventos mutacionais mais comuns (c.226_228delTTC; c.233A>G; c.481C>T; c.499C>T; c.500G>A;

c.533T>C); (3) que as mutações que afectavam o codão 167 (c.499C>T; c.500G>A) estavam associadas a um maior probabilidade de desenvolvimento de feocromocitoma e carcinoma das células renais (risco de 62%); (4) que o gene *VHL* apresenta três regiões, onde a frequência de eventos mutacionais é maior, localizando-se uma dessas regiões entre os codões 75 e 82, outra entre o 157 e 189 (local de ligação às elonginas) e a última região entre os exões 2 e 3.

*Hes et al*²⁹ conduziram uma investigação que lhes permitiu verificar que famílias com deleções germinais do gene *VHL* (parciais ou totais) apresentavam um baixo risco de desenvolverem feocromocitoma, mas possuíam uma forte associação com a ocorrência de hemangiomas do sistema nervoso central.

*Ong et al*³⁰ verificaram que a idade de início desta patologia era significativamente mais precoce e que os riscos, relacionados com a idade, de angiomas da retina e de carcinoma renal eram mais elevados em indivíduos com mutações nonsense ou frameshift, relativamente aos que apresentavam mutações missense. Os resultados obtidos confirmaram, ainda, a associação entre o feocromocitoma e mutações missense, particularmente quando estas resultavam em substituições dos aminoácidos mais superficiais.

*Gallou et al*³¹ investigaram o fenótipo renal em 247 indivíduos portadores da síndrome de *VHL*, tendo identificado 92 mutações diferentes. Analisando o exão onde estas ocorriam, verificou-se que o mais afectado era o 3, com um total de 43 mutações, e que o menos afectado era o exão 1, com um total de 26 mutações. A análise genótipo-fenótipo mostrou a existência de um elevado número de mutações que afectavam o terminal amina da pVHL entre os indivíduos com lesões renais, estando estas mutações localizadas, mais frequentemente, no codão codificador do aminoácido 131. Verificou-se, também, que 105 das 129 mutações (81%) do tipo MLTP ou grandes rearranjos estavam associadas a uma frequência mais elevada de lesões renais, enquanto que apenas 63% dos indivíduos com mutações missense desenvolviam este tipo de lesões. As mutações do tipo MLTP estão presentes ao longo de todo o gene *VHL*, não se verificando a

existência de uma correlação entre o tamanho da pVHL e a severidade do fenótipo renal. Por sua vez, as mutações do tipo missense encontravam-se distribuídas entre os codões 52 e 188, com 45% a localizarem-se entre os codões 157 e 172. Analisando a distribuição das mutações pela pVHL, identificaram-se duas zonas de maior densidade mutacional, que se correlacionavam com uma maior probabilidade de desenvolvimento de lesões renais. As mutações que afectam a primeira zona (entre os codões 74 e 90) parecem estar associadas a um maior risco de desenvolvimento de carcinoma renal do que as que afectam a segunda (entre os codões 130 e 136), que se associam a uma maior probabilidade de patologia renal benigna (p. ex. quistos renais) sem contudo conferirem um maior risco de tumores renais malignos.

*Wong et al*³², em 2007, caracterizaram as mutações germinais detectadas em 335 indivíduos portadores da síndrome de VHL associada a hemangioblastomas capilares. Como principais resultados obtidos deve-se referir que: (1) a prevalência de hemangioblastomas capilares era menor (14,5%) entre os doentes com deleções completas, os quais apresentavam uma acuidade visual média mais elevada e que (2) a prevalência de hemangioblastomas com localização justapapilar foi mais baixa entre os doentes com mutações que conduziam à formação de proteína truncadas comparativamente aos doentes com substituições de aminoácidos. No entanto, as alterações genóticas não apresentam qualquer correlação com a uni ou bilateralidade da doença ocular ou com o número e extensão de hemangioblastomas capilares.

As mutações ocorridas no gene *VHL* parecem influenciar a gravidade da doença como evidenciado por *Maranchie et al*³³ em 2004, quando demonstraram que 11 de 13 famílias portadoras da síndrome de VHL, com deleções germinais completas, apresentavam um fenótipo atenuado da doença, enquanto que as outras duas famílias, portadoras de mutações parciais, tinham uma forma particularmente agressiva, o que sugere a possibilidade da severidade da doença se poder correlacionar, pelo menos em parte, com o tamanho da deleção.

4- SÍNDROME MEN 2

A MEN 2 é uma doença autossômica dominante, com uma prevalência estimada de 1 a 10 casos por 100.000 pessoas na população geral. Esta pode ser dividida em duas formas sindrômicas - (1) MEN 2A e (2) MEN 2B - e o seu mecanismo fisiopatológico reside num defeito associado ao proto-oncogene *RET*.³⁴

A) MEN 2A

Esta forma sindrômica representa 60 a 90% do total de casos, tendo uma prevalência aproximada de 1 caso por cada 35.000 pessoas.^{34, 35} A sua penetrância relaciona-se com a idade e as suas manifestações fenotípicas englobam feocromocitomas, carcinoma medular da tiróide e hiperparatiroidismo primário. Com o advento dos testes genéticos tornou-se aparente que 95% dos indivíduos portadores desta síndrome desenvolvem carcinoma medular da tiróide, 50% desenvolvem feocromocitomas e 20 a 30% desenvolvem hiperparatiroidismo.^{34, 35}

O carcinoma medular da tiróide é, por norma, a primeira manifestação desta síndrome. As manifestações bioquímicas (elevação dos níveis de calcitonina plasmática) surgem entre os 5 e os 25 anos. Num indivíduo portador, esta neoplasia apresenta-se como uma massa ou dor no pescoço entre os 15 e os 20 anos, no entanto mais de 50% destes indivíduos irão apresentar doença metastática, nos nódulos linfáticos cervicais, na altura do diagnóstico. A doença neoplásica é precedida de uma fase de hiperplasia celular de distribuição multifocal, sendo a diarreia o sintoma que, com mais frequência, está associado a esta manifestação fenotípica.³⁶

Os feocromocitomas manifestam-se após o carcinoma medular da tiróide, na maioria dos casos, como uma hipertensão arterial resistente à terapêutica. A morte súbita, devido a uma crise hipertensiva induzida pela anestesia, tem sido descrita em alguns indivíduos portadores desta síndrome e com feocromocitomas não detectados antes da cirurgia. Estes são frequentemente

bilaterais e a transformação maligna ocorre em 4% dos casos. Como podem ser a primeira manifestação, o seu diagnóstico pode justificar a necessidade de se excluir esta síndrome.³⁷

As alterações da função paratiroideia podem oscilar entre uma hiperplasia paratiroideia e múltiplos adenomas associados a hipercalcémia, urolitíase ou osteíte fibrosa quística. O hiperparatiroidismo primário ocorre em 20 a 30% dos indivíduos e tende a ser assintomático na sua grande maioria. Uma revisão cuidadosa da histologia dos adenomas paratiroideus revelou que estes podem ter origem em lesões de hiperplasia paratiroideia, de forma semelhante à do carcinoma medular da tiróide.³⁸

Outras associações raras têm sido descritas, tal como o líquen amilóide cutâneo - uma lesão pruriginosa localizada na região escapular e caracterizada por deposição de tecido amilóide - ou a doença de Hirschsprung.⁴

B) MEN 2B

O subtipo 2B representa aproximadamente 5% de todos os casos da síndrome MEN 2. Esta variante é caracterizada pelo desenvolvimento precoce de uma forma agressiva de carcinoma medular da tiróide. Os indivíduos portadores, que não são submetidos a tiroidectomia numa idade precoce, tendem a desenvolver, com grande probabilidade, uma doença metastática. Os feocromocitomas ocorrem em 50% dos casos, sendo em cerca de metade múltiplos e com frequência bilaterais. Caso não sejam diagnosticados atempadamente, muitos podem vir a falecer durante o período peri-operatório, devido a um colapso cardiovascular. Ao contrário da variante 2 A, a patologia das paratiróides é extremamente rara.^{35, 39}

Muitas vezes, os doentes são identificados durante a infância devido à presença de neuromas da mucosa, localizados na superfície dorso-anterior da língua, palato ou faringe e por uma aparência facial distinta. Os lábios tendem a tornar-se proeminentes e podem coexistir nódulos submucosos. Caso os neuromas se desenvolvam nas pálpebras, podem causar espessamento e eversão das margens palpebrais superiores. Um espessamento proeminente dos

nervos corneanos pode ser visualizado através da realização de um exame oftalmológico com uma lâmpada de fenda. Em 40% dos indivíduos, pode haver uma ganglioneuromatose difusa do aparelho gastrointestinal, que se manifesta através de um quadro de distensão abdominal, megacólon, obstipação ou diarreia. Em 75% dos casos pode haver um aspecto marfanóide, muitas vezes com cifoscoliose ou lordose, laxidez articular e diminuição do tecido adiposo subcutâneo, sendo que a atrofia e fraqueza muscular proximal podem também estar presentes.³⁴

C) GENE *RET*

O gene *RET* é um proto-oncogene que codifica um receptor tirosina-cinase, presente na superfície das células, que regula os fenómenos de crescimento e diferenciação celular.⁴⁰

Este gene é constituído 21 exões e apresenta um tamanho de 55 Kb, sendo que os exões 2 a 20 estão contidos numa região com uma extensão de 31 Kb. A estrutura global deste gene é muito semelhante à de outros genes que codificam receptores tirosina cinase, sendo a sua orientação no cromossoma 10q11.2 tal que a sua região 5' está orientada para o centrómero e a 3' para a região telomérica.⁴¹

D) PROTEÍNA DO GENE *RET*

O receptor tirosina-cinase *RET* é uma proteína transmembranar composta por uma porção extracelular, onde estão presentes quatro regiões de adesão celular dependentes de Ca^{2+} - domínio caderina - e uma região rica em cisteína, localizada na porção justa-membranar — domínio cisteína. Esta porção contém vários locais passíveis de glicosilação, que definem o estado de maturidade da proteína. O *RET* 170 encontra-se totalmente glicosilado e está presente na membrana celular, enquanto o *RET* 150, parcialmente glicosilado, se encontra no citoplasma e retículo endoplasmático. A porção intracelular engloba dois domínios tirosina-cinase, os quais estão envolvidos em numerosas vias de transdução de sinal.^{42,43}

O gene *RET* está sujeito a processos de splicing alternativos, dos quais resultam três isoformas diferentes que contêm 9 (RET 9), 43 (RET 43) e 51 (RET 51) aminoácidos no terminal carboxil, a contar após a glicina presente na posição 1063. O RET 9 e o 51 consistem em 1072 e 1114 aminoácidos, respectivamente e são as principais isoformas *in vivo*.⁴³

(i) *Activação do receptor RET pelo GFL*

O RET é um receptor para ligandos pertencentes à família dos GFL: GDNF, NRTN, PSPN e ARTN. Os vários ligandos associam-se a vários receptores denominados globalmente de GFR α correspondendo a cada um deles um ligando, com o qual interage com alta afinidade. Deste modo, o GDNF associa-se preferencialmente ao GFR α 1, o NRTN ao GFR α 2, o ARTN ao GFR α 3 e a PSPN ao GFR α 4. Desta associação resulta a formação de um complexo GFR α /GFL, que interage com o RET conduzindo à fosforilação dos seus resíduos tirosina presentes no domínio tirosina-cinase.⁴³

Apesar de, por regra, se apresentarem ligados à membrana plasmática, os GFR α podem encontrar-se na forma solúvel. Como consequência, a activação do RET pode ocorrer por duas vias distintas denominadas de *cis* e *trans*. A primeira baseia-se na ligação entre o GDNF dimérico e o GFR α 1. O complexo de sinalização resultante interage com o receptor RET estando, esta etapa, dependente de três aminoácidos localizados no domínio caderina do referido receptor. O modelo *trans* sugere que o GDNF pode, como alternativa, interagir com a forma solúvel do seu receptor culminando na formação de um complexo que, ao associar-se ao receptor tirosina-cinase, resulta na sua activação e dimerização.⁴⁴

(ii) *Activação do RET por outros factores de crescimento*

Apesar do RET ser activado principalmente pelos GFL, outros factores de crescimento possuem a capacidade de interagir com este receptor, do qual é exemplo o factor de crescimento

neurotrófico. Da interacção com este factor resulta uma estimulação do crescimento e metabolismo celular e expressão de vários genes.⁴³

(iii) *Vias de sinalização intracelulares*

Os processos de sinalização intracelulares desencadeados pelo RET desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do sistema nervoso entérico, na organogénese renal e na espermatogénese. A activação do seu domínio tirosina-cinase ocorre após a indução da sua dimerização pelo complexo GFL/GFR α /RET e conduz à fosforilação de várias tirosinas, as quais servem de local de ancoragem para proteína adaptadoras que medeiam a activação de várias vias de transdução de sinal.⁴³

A tirosina 1062 desempenha um papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso entérico e renal visto controlar as principais vias de sinalização intracelular. Esta serve de lugar de ancoragem para várias proteínas adaptadoras - Shc, GAB 2, SHANK 3, entre outras - as quais regulam processos como a motilidade, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. As interacções entre o RET e Shc ocorrem via a tirosina 981 e promovem a sobrevivência neuronal. A fosfotirosina 905 interage com as proteínas de ancoragem GRB7/10 após activação do RET, mas o seu significado biológico não se encontra esclarecido. A tirosina localizada na posição 1015 liga-se e activa a PLC culminando na produção de IP3 e de DAG. O primeiro promove a libertação de Ca^{2+} intracelular conduzindo à activação de várias enzimas, como a aPKC, as quais podem, também, ser reguladas pelo DAG. Estas proteínas cinase parecem exercer um mecanismo regulador, por feedback negativo, sobre este receptor. A tirosina 1096, presente unicamente na isoforma longa, serve, uma vez fosforilada, como local de ancoragem para o GAB 2, o qual activa vias importantes no controlo da proliferação e diferenciação celular.⁴⁵⁻⁴⁷

E) MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA SÍNDROME MEN 2

Apesar de correlações genótipo-fenótipo claras se encontrarem descritas para a síndrome MEN 2, os mecanismos moleculares não são totalmente compreendidos. A maior parte das mutações identificadas para esta síndrome resultam num ganho de função do receptor RET e afectam principalmente o domínio cisteína - MEN 2A - ou o tirosina-cinase - MEN 2B. As mutações que afectam o primeiro domínio condicionam a substituição de um resíduo de cisteína por um outro aminoácido, o que altera as propriedades do receptor e conduz à formação de ligações entre dois monómeros RET e consequente dimerização e activação do mesmo. As mutações que afectam o domínio intracelular ocasionam a activação constitutiva do referido receptor de um modo algo diferente do acima descrito. Estas mutações afectam directamente o centro catalítico do receptor tirosina-cinase, ocasionando a autofosforilação dos resíduos de tirosina e induzindo a activação do RET na forma monomérica, não existindo, portanto, necessidade de fenómenos de dimerização. Estudos recentes indicam a possibilidade da fosfotirosina 1062, em particular, ter uma importante função na actividade transformadora do RET, uma vez que serve de local de acoplagem para várias proteínas que regulam as principais vias de sinalização intracelular.⁴⁰ As mutações que afectam este domínio parecem condicionar, não só uma alteração da função catalítica, mas também uma alteração da especificidade do substrato, uma vez que as proteínas mutadas revelam uma preferência por substratos como o Shc, o qual funciona como uma proteína de ancoragem necessária para o correcto desenrolar de várias vias de sinalização intracelular.^{40, 43, 52}

F) MODELOS ANIMAIS PARA A SÍNDROME MEN 2

*Smith-Hicks et al*⁴⁸ desenvolveram um modelo animal da síndrome MEN2B através da introdução de uma mutação activadora no codão 919 do gene *Ret* do ratinho. Os ratinhos heterozigóticos *Ret*^{MEN2B} desenvolveram uma hiperplasia das células C da tiróide e das células

cromafins adrenais, a qual progredia, com frequência, para feocromocitoma, enquanto que os homozigóticos apresentaram ganglioneuromas da medula adrenal e uma hiperplasia da gânglia simpática, assim como defeitos no aparelho reprodutor masculino. Usando uma metodologia semelhante, *Acton et al*⁴⁹, verificaram que três de oitos ratinhos, portadores de uma mutação ativadora do *Ret*, desenvolveram um carcinoma medular da tiróide macroscópico e bilateral, patologia que não se verificou em qualquer um dos ratinhos não portadores da mutação.

*Michielis et al*⁵⁰ desenvolveram um modelo animal da síndrome MEN 2A através da introdução de uma mutação ativadora no codão 634 do gene *Ret* do ratinho. Assim, constatou-se que os ratinhos heterozigóticos *Ret*^{MEN2A} tendem a desenvolver uma hiperplasia das células C da tiróide, que progride, com frequência, para carcinoma medular da tiróide multifocal e bilateral. Do mesmo modo, *Kawai et al*⁵¹ verificaram que o produto resultante da expressão do gene mutado, apesar de presente em vários órgãos (tiróide, coração, fígado, cólon, glândula paratiróide e cérebro), estava associado a manifestações fenotípicas restritas ao desenvolvimento de hiperplasia das células C de tiróide ou de carcinoma medular de tiróide.

G) CORRELAÇÕES GENÓTIPO – FENÓTIPO NA SÍNDROME MEN 2

Várias são as mutações descritas para o gene *RET*. Durante a realização desta tese identifiquei 53 mutações diferentes associadas a este gene (ver anexo 2), as quais se encontram distribuídas pelos exões 5, 8, 10, 11, 13, 14, 15 e 16 (ver figura 2). Relativamente aos eventos mutacionais, estes consistem, principalmente, em mutações do tipo missense (84,9%) e, raramente, em mutações do tipo frameshift (13,2%) e nonsense (1,9%).

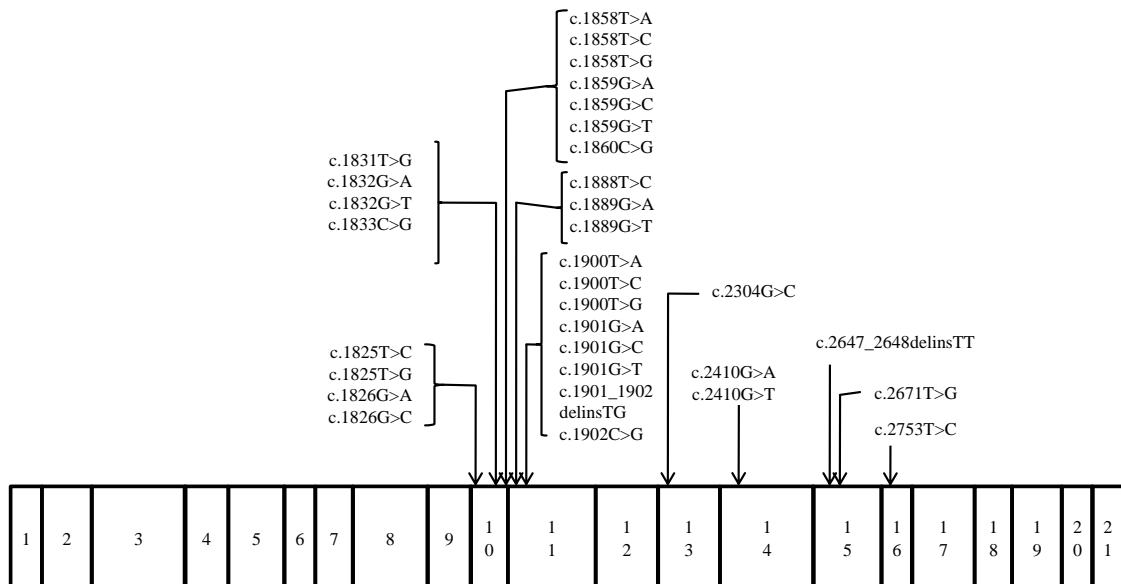


Figura 2 – Estrutura do gene *RET* e localização das principais mutações exônicas. As mutações associadas à síndrome MEN 2A afectam principalmente os exões 10 e 11, ao passo que as identificadas na MEN 2B se situam nos exões 15 e 16. Por razões de clareza, os intrões e as UTR não foram representados.

Nesta síndrome, as mutações do tipo missense, que afectam os codões codificadores dos resíduos de cisteína, presentes no domínio extracelular do receptor RET, são o evento mutacional mais frequente. Os codões afectados, com mais frequência, são: o 609, 611 e 620 localizados no exão 10 e o 630 e 634 presentes no exão 11.⁵²

Aproximadamente 95% das famílias afectadas pela síndrome MEN 2A são portadoras de mutações nos codões acima referidos, tendo sido identificadas outras mutações nos codões 631, 768, 790, 791, 804, 844 e 891. Nos indivíduos afectados pela variante 2B, 95% apresentam uma mutação pontual que afecta o codão 918 (c.2753T>C), situado no exão 16, a qual se traduz numa substituição de um resíduo de treonina por um de metionina. Uma segunda mutação foi, mais tarde, detectada no codão 883 em vários indivíduos com MEN2B (c.2647_2648delinsTT). Além destas mutações associadas à variante síndrómica 2B, outras mutações germinais missense, mais raras, foram localizadas nos codões 804 e 806, bem como no 904.^{43, 53, 54}

Ao contrário do que se passa com a MEN 2B, as mutações relacionadas com o fenótipo MEN 2A tendem a envolver o domínio cisteína extracelular e, com menos frequência, o domínio tirosina-cinase intracelular.⁴³

As mutações que afectam o codão 634, localizado no exão 11, estão associadas a uma maior incidência de feocromocitomas e de hiperparatiroidismo. Entre estas, a mutação c.1900T>C parece relacionar-se com uma maior incidência de hiperparatiroidismo, embora alguns estudos não suportem esta observação.⁵⁶ A esta mutação tem sido atribuída uma maior incidência de metástases à distância, quando comparada com outras mutações que envolvem este codão, como são exemplo as mutações c.1901G>A e c.1902C>G. A associação entre MEN 2A e o líquen cutâneo tem sido atribuída a alterações na cisteína codificada pelo codão 634. Isto foi comprovado através de um trabalho de investigação, conduzido por *Verga et al*⁵⁷ onde se verificou que 36% dos indivíduos com a associação acima referida eram portadores de uma mutação envolvendo o codão 634.^{35, 56}

As mutações no codão 768, localizado no exão 13, parecem relacionar-se com o desenvolvimento de carcinoma medular familiar da tiróide, enquanto as dos codões 804 e 891, que inicialmente foram relatadas como estando associados apenas a carcinoma medular familiar da tiróide, foram encontradas em famílias com a síndrome MEN 2A. A estes respeito, mutações no codão 804 localizado no exão 14, foram identificadas em feocromocitomas (c.2410G>T e c.2410G>A). O fenótipo associado às mutações neste codão é extremamente variável, mesmo dentro da mesma família. Uma mutação, em particular, do codão atrás referido, denominada de c.2410G>A, foi identificada num indivíduo portador da síndrome MEN2B.⁴³

5 – SÍNDROMES DE PARAGANGLIOMAS FAMILIARES

As Síndromes de Paragangliomas Familiares são caracterizadas pelo desenvolvimento de neoplasias com origem na paragânglia derivada das células da crista neural, distribuídas pelo eixo paravertebral, desde a base do crânio até à pélvis. A sua prevalência não é conhecida com precisão mas a sua incidência estimada ronda 1/300.000 casos/ano.⁵⁸

Os paragangliomas localizados na cabeça e pescoço estão, com frequência, associados ao sistema nervoso parassimpático e localizam-se nas áreas que envolvem o corpo carotídeo, o nervo vago e a região jugulo-timpânica. Estes paragangliomas não hiper-secretam catecolaminas (95%) e não tendem a metastizar; as suas principais consequências advêm do seu efeito de massa, que pode condicionar compressão dos pares cranianos e da cadeia simpática na região carotídea, sensação de preenchimento faríngeo, disfagia, disfonia, dor, tosse e aspiração na presença de paragangliomas vagais e acufenos, hipoacúsia e alterações dos nervos cranianos inferiores quando perante paragangliomas jugulo-timpânicos. Os de origem torácica, abdominal e pélvica estão, por norma, associados ao sistema nervoso simpático e, como tal, hiper-secretam catecolaminas. Os feocromocitomas e os paragangliomas simpáticos, hipersecretadores de catecolaminas, apresentam um quadro clínico constituído por sinais e sintomas atribuíveis a este estado: elevações da pressão arterial e da frequência cardíaca, cefaleias, palpitações, hiperidrose e ansiedade. As náuseas, vómitos e perda de peso podem também ocorrer. Estes sintomas têm como principal característica o facto de serem, por regra, episódicos.^{58,59}

Os paragangliomas simpáticos apresentam uma maior probabilidade de malignização, quando comparados com os feocromocitomas e paragangliomas localizados na cabeça e pescoço.⁵⁹

Os Paragangliomas Familiares encontram-se divididos em quatro formas sindrómicas denominadas de PGL 1, 2, 3 e 4. O gene responsável pela PGL 2 ainda não está identificado,

apesar de ser conhecida a sua região cromossômica (11q13.1), razão pela qual esta variante sindrômica não será abordada nesta tese.^{58, 59}

A) PGL 1

A PGL 1 é uma doença autossômica dominante resultante de mutações no gene *SDHD*, codificador da pequena subunidade do citocromo b. Esta variante sindrômica é caracterizada pela presença de paragangliomas da cabeça e pescoço e, com menor frequência, por paragangliomas simpáticos e feocromocitomas e apresenta uma penetrância elevada mas relacionada com a idade (48% aos 30 anos e 86% aos 50 anos).^{58, 59} Em 1998, *Van Schothorst et al*⁶⁰, analisaram dez famílias portadoras de paragangliomas da cabeça e pescoço, tendo-se constatado que a bifurcação da artéria carotídea é o local mais afectado (57% do total de casos). Outras regiões afectadas, por ordem decrescente de frequência, são: (1) glomo jugular, (2) glomo vagal e, por último, o (3) glomo timpânico. Nos casos familiares, não se verifica qualquer diferença significativa na incidência entre os dois sexos, observando-se, no entanto, que na forma familiar os paragangliomas tendem a ser bilaterais em 31,8% dos casos, contra os 4,4% dos casos esporádicos.⁶¹

A natureza hereditária desta doença pode ser mascarada devido ao fenómeno de *imprinting* materno a ela associado, o que ocasiona que esta doença só se manifeste quando herdada do progenitor do sexo masculino.⁶²

B) PGL 3

A PGL 3 é uma doença autossômica dominante com origem em mutações no gene *SDHC*, o qual codifica a grande subunidade do citocromo b. Esta variante manifesta-se através de paragangliomas parassimpáticos localizados, predominantemente, na cabeça e pescoço, de natureza benigna e raramente multifocais.⁶³

C) PGL 4

A PGL 4 é uma doença autossômica dominante cuja base reside em mutações no gene *SDHB*, o qual codifica a subunidade ferro-sulfureto do complexo succinato-desidrogenase. Esta síndrome apresenta uma penetrância elevada e relacionada com a idade (29% aos 30 anos e 77% aos 50 anos) e caracteriza-se pela presença de paragangliomas simpáticos, que se manifestam por sintomas atribuíveis ao efeito de massa por eles ocasionado, mais do que pela secreção excessiva de catecolaminas.^{58, 59} O fenótipo bioquímico predominante é marcado por uma hipersecreção de noradrenalina e/ou dopamina, mas 10% podem ser bioquimicamente silenciosos. A dor relacionada com o tumor é um dos principais sintomas (presente em 54%), sendo a única queixa em 14% dos doentes. A hipertensão arterial ocorre em 76% e em 90% dos casos não é possível estabelecer uma história familiar de paragangliomas.^{64, 65}

D) COMPLEXO SUCINATO-DESIDROGENASE

As enzimas mitocondriais não estavam implicadas na gênese de neoplasias hereditárias até recentemente, quando se descobriu que mutações germinais envolvendo as subunidades *SDHB*, *SDHC* e *SDHD*, do complexo succinato-desidrogenase, estão na gênese de várias síndromes hereditárias envolvendo feocromocitomas e paragangliomas.

(i) *Genes SDH*

O gene *SDHB* localiza-se na região cromossômica 1p35-36 e apresenta um tamanho aproximado de 35 Kb. Apresenta sete intrões e oito exões, com um tamanho compreendido entre os 86 bp (exão 3) e os 204 bp (exão 1). A região promotora tem um tamanho aproximado de 2,4 Kb e a sua porção proximal contém dois locais de ligação para o Sp1 e vários para possível ligação aos NRF1 e 2. O seu produto genético codifica uma proteína madura de 280 aminoácidos e tem um peso aproximado de 31 kDa.⁶⁶

O gene *SDHC* localiza-se na região cromossómica 1q21 e apresenta um tamanho aproximado de 50 Kb. É constituído por cinco intrões e por seis exões, relativamente pequenos para o tamanho da proteína que codificam (entre os 46 pb para o exão 1 e os 859 pb para o exão 6). A sua região promotora contém vários locais para possíveis interacções com os NRF 1 e 2, os quais parecem ser necessários para a correcta expressão do gene *SDHB*. O seu produto genético consiste numa proteína com 169 aminoácidos e com 15,5 kDa de peso molecular.⁶⁷

O gene *SDHD* localiza-se na região cromossómica 11q23 e possui um tamanho aproximado de 9 Kb. É constituído por quatro exões, cujos tamanhos oscilam entre os 62 pb (exão 1) e os 989 pb (exão 4) e três intrões. A análise da região do promotor 5' revelou vários locais de ligação para factores de transcrição, entre os quais se encontram os NRF 1 e 2. O seu produto é uma proteína com 159 aminoácidos e com um peso de 17 kDa.⁶⁸

(ii) *Complexo mitocondrial II*

A enzima succinato-desidrogenase - ou complexo mitocondrial II - é um membro funcional do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória aeróbia. Este complexo associa o processo de oxidação do succinato a fumarato, que ocorre na matriz mitocondrial, com a redução da ubiquinona ocorrida na membrana deste organelo.⁶⁹

A estrutura das SDHA e SDHB encontra-se bastante conservada entre as diferentes espécies, enquanto que as estruturas de ancoragem à membrana (SDHC e D) apresentam uma grande variabilidade. A SDHA constituiu o domínio hidrofílico do complexo e contém um co-factor FAD, que forma parte do centro catalítico da enzima. A SDHB, por sua vez, contém três locais ricos em grupos ferro-sulfureto - [2Fe-2S], [4Fe-4S] e [3Fe-4S] - necessários para o processo de transferência de electrões entre o FAD e a quinona presente na membrana mitocondrial. A integridade do grupo [3Fe-4S] é essencial para a correcta ligação desta subunidade aos domínios de ancoragem à membrana e para a troca de electrões com a quinona. As SDHC e SDHD formam o domínio hidrofóbico deste complexo constituindo, cada um deles, três α -hélices trans-

membranares (I, II, III e IV, V e VI); as hélices II e V possuem, cada uma, um resíduo de histidina que serve de ligando ao grupo heme mais próximo do grupo [3Fe-4S], enquanto que as hélices I e IV contêm uma segunda histidina para ligação a um segundo grupo heme. Estas subunidades são responsáveis pela ancoragem deste complexo à membrana mitocondrial e possuem os locais de ligação para a quinona e os seus inibidores.⁷⁰

A SDHA liga-se, por meio do seu grupo FAD, aos seus substratos enzimáticos (sucinato e fumarato) e reguladores fisiológicos (oxaloacetato e ATP). O oxaloacetato, um inibidor competitivo da succinato, forma-se a partir do malato e pode ser deslocado do seu local de ligação à SDHA, após a ligação do ATP a esta enzima. Os electrões fornecidos, a esta subunidade, são depois transportados pelas várias unidades ferro-sulfureto até ao citocromo tipo b, de onde são depois transportados até às moléculas de quinona.^{69,71}

A enzima succinato-desidrogenase tem a capacidade de oxidar rapidamente o succinato a fumarato, sendo a reacção oposta raramente detectada nos tecidos humanos. Apesar disto, pensa-se que o processo de redução do fumarato pode desempenhar um papel fisiológico importante em condições hipóxicas, onde parece participar na formação de espécies reactivas de oxigénio.⁷²

A reacção de oxidação do succinato é o elo de ligação entre o complexo mitocondrial II e o ciclo de Krebs, ao participar no processo de degradação da acetil-CoA. O succinato pode ser rapidamente transportado para o interior da matriz mitocondrial por meio de transportadores específicos e por troca com o fosfato inorgânico ou outros ácidos orgânicos (p. ex. malato). São estes transportadores que controlam a acumulação de produtos de reacção e de substratos dentro e fora deste organelo podendo, deste modo, ser uma possível explicação para a susceptibilidade de determinados tecidos perante alterações nos genes *SDH*.^{69,73}

O fumarato, produto final da reacção catalisada pela succinato-desidrogenase, não é capaz de atravessar a membrana mitocondrial interna acumulando-se no interior deste organelo. Esta acumulação, principalmente no tecido muscular, parece reduzir a velocidade da reacção catalisada

pelo referido complexo. O succinato também pode ser produzido na matriz mitocondrial por uma succinil-CoA ligase formadora de GTP ou por uma cetoácido-CoA transferase na presença de acetoacetato. Esta última enzima encontra-se em tecidos extra-hepáticos (coração, rins e cérebro), sendo responsável pela cetólise e uso dos corpos cetónicos sintetizados pelo fígado (acetoacetato, hidroxibutirato) durante o stress lipolítico e em jejum. A acetoacetyl-CoA derivada do succinato favorece a secreção de insulina, ao actuar como um secretogogo, e participa na formação de mevalonato.^{69,74}

Nas mitocôndrias renais e hepáticas, a actividade deste complexo é particularmente alta quando comparada com outras enzimas mitocondriais. Nestes tecidos, esta enzima pode entregar mais electrões à reserva de quinona do que aquela quantidade que pode ser acomodada pelos segmentos citocromos da cadeia, favorecendo a depleção dessas reservas. Este fenómeno pode potencializar a reversão do fluxo electrónico ao longo da cadeia e o seu desvio para outras funções como a produção de NADH. A velocidade com que o fumarato deve ser removido, de modo a manter este fluxo electrónico invertido, pode ser potencializada pela elevada actividade da enzima fumarase, presente nestes tecidos. Este controlo redox, imposto pela inversão da corrente electrónica, pode induzir vias catabólicas, como são a formação de CoA e de esteres de carnitina pelas mitocôndrias hepáticas.⁷⁵

Como são poucas as enzimas extra-mitocondriais que metabolizam o succinato, os efeitos potencialmente deletérios por ele produzidos não podem ser compensados por uma actividade enzimática alternativa. Deste modo, os defeitos, mesmo que parciais, nos genes *SDH* podem ter efeitos rápidos e devastadores no metabolismo celular.⁶⁹

E) MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DAS SÍNDROMES DE PARAGANGLIOMAS FAMILIARES

Consistente com o modelo proposto por Knudson, uma mutação germinal heterozigótica num gene *SDH* está geralmente associada à inactivação somática do alelo normal nas células neoplásicas. A natureza das mutações germinais que afectam o complexo succinato-desidrogenase condiciona uma perda de função por parte desta enzima. O processo carcinogénico desencadeado pelas alterações no referido complexo não é totalmente conhecido, mas dados recentes apontam para a possibilidade de estarem envolvidos mecanismos relacionados com a hipóxia.⁷²

Um dos mecanismos propostos para explicar o processo oncogénico baseia-se no facto da disfunção do complexo succinato-desidrogenase resultar numa acumulação de succinato no interior da célula, de onde resulta uma inactivação da enzima prolil-hidroxilase, a qual é importante para a correcta degradação do HIF α em condições de normóxia. Como consequência, o HIF α torna-se estável, mesmo em condições de normóxia, migrando para o núcleo onde interage com o ADN para favorecer a hiper-expressão de genes induzíveis pela hipóxia. Uma outra explicação envolve a produção de espécies reactivas de oxigénio, as quais favorecem o processo de interacção do HIF α com o ADN e consequente expressão de genes induzíveis pela hipóxia. A terceira explicação possível para a associação entre mutações nos genes *SDH* e feocromocitomas/paragangliomas relaciona-se com o papel apoptótico desempenhado pelas mitocôndrias. Assim, as referidas mutações alterariam a capacidade de regular o processo apoptótico, principalmente nas células precursoras neuroendócrinas, o que favoreceria o desenvolvimento de feocromocitomas e/ou paragangliomas.^{69, 72, 75}

F) MODELOS ANIMAIS PARA AS SÍNDROMES DE PARAGANGLIOMAS FAMILIARES

Até ao momento não foram desenvolvidos modelos animais, nomeadamente na forma de knockout, para os genes associados aos paragangliomas. No entanto, destaco o trabalho elaborado por *Ishii et al*⁷⁶, em 2007. Este grupo pretendia estudar o stress oxidativo intracelular mitocondrial

como elemento preponderante no processo tumorigênico, tendo, para tal, introduzindo uma mutação no gene *Sdhc* de linhagens celulares de fibroblastos provenientes de ratinhos. Como consequência, verificou-se que essas células hiper-produziam aniões superóxido, conseguindo algumas contornar o processo apoptótico. Após a re-introdução destas células em ratinhos verificou-se que estas originavam, com frequência, neoplasias de características benignas, demonstrando assim o papel deste gene na supressão tumoral.⁷⁶

G) CORRELAÇÕES GENÓTIPO-FENÓTIPO NAS SÍNDROMES DE PARAGANGLIOMAS FAMILIARES

As mutações nos genes *SDHB*, *SDHC* e *SDHD* podem estar na gênese de feocromocitomas/paragangliomas, existindo algumas diferenças fenotípicas associadas às várias mutações, que podem ser úteis para a prática clínica.

Várias são as mutações identificadas para os diferentes genes que compõem o complexo succinato-desidrogenase. No decurso da minha pesquisa identifiquei 85 mutações diferentes para o gene *SDHB*, 16 para o *SDHC* e 62 para o *SDHD* (ver anexos 3, 4 e 5). As mutações que afectam o primeiro gene encontram-se amplamente distribuídas por todos os exões que o compõem com excepção do oitavo (ver figura 3), sendo os eventos mutacionais, mais frequentes, as mutações do tipo missense (47,1%) e do tipo frameshift (22,4%). Por sua vez, o gene *SDHC* é aquele que apresenta o menor número de eventos mutacionais, os quais se encontram distribuídos por todos os seus exões (ver figura 4). Os eventos mutacionais mais frequentes envolvem as mutações do tipo nonsense (31,25%), missense (25%) e splice site (25%). As mutações que ocorrem no gene *SDHD* afectam todos os exões que o constituem (ver figura 5), sendo os eventos mais comuns as mutações do tipo frameshift (35,5%), missense (25,8%) e nonsense (17,4%).

As mutações nos genes *SDHC* e *SDHD* associam-se, principalmente, a paragangliomas parassimpáticos localizados na cabeça e pescoço, tendo os portadores de mutações na subunidade *SDHD* um *odds ratio* de 24 e de 0,28 para o desenvolvimento de paragangliomas na cabeça e

pescoço, e paragangliomas abdominais, respectivamente, quando comparados com indivíduos portadores de mutações na subunidade SDHB. Quando o gene *SDHD* está envolvido, os paragangliomas tendem a ser, com frequência, multifocais mas este padrão fenotípico parece correlacionar-se melhor com alterações no gene *SDHC*.⁷⁷⁻⁷⁹

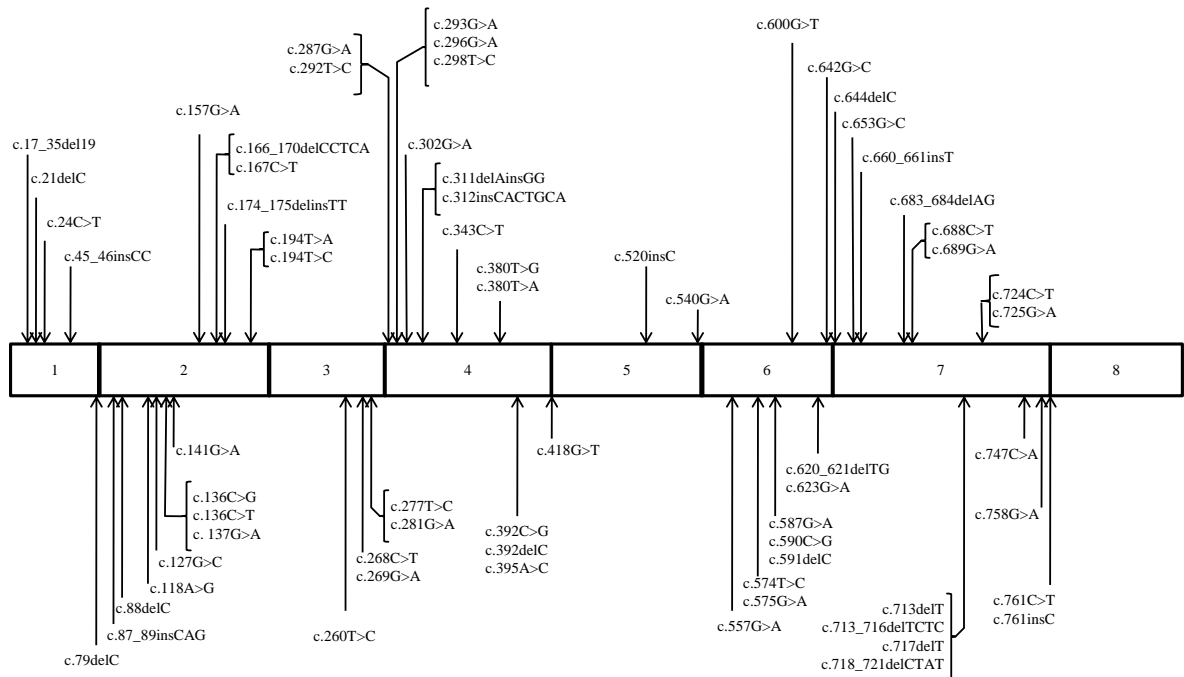


Figura 3 – Estrutura do gene *SDHB* e localização das mutações exônicas identificadas. As mutações encontram-se distribuídas por toda a seqüência codificadora deste gene, com exceção do exão 8. Por razões de clareza os intrões e s UTR não se encontram representados.

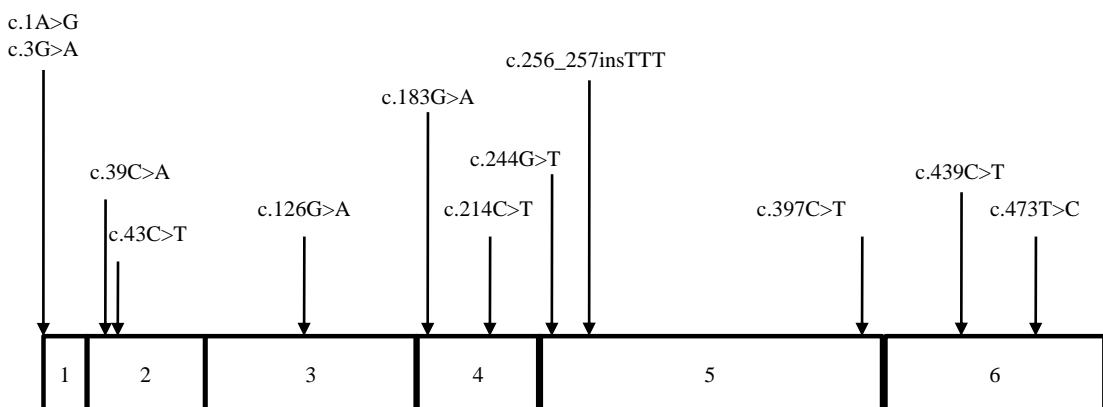


Figura 4 - Estrutura do gene *SDHC* e localização das mutações exônicas identificadas, as quais se encontram distribuídas por toda a sua seqüência codificadora. Por motivos de clareza, os intrões e UTR não foram representados.

Até 50% dos portadores de paragangliomas extra-adrenais malignos possuem mutações germinais no gene *SDHB*. De facto, estas mutações estão associadas a uma probabilidade seis vezes maior de doença extra-adrenal e a maior risco de degeneração maligna, não sendo claro se este efeito é resultado do local da mutação e/ou do evento mutacional *per se*. Apesar de raros, os feocromocitomas malignos parecem ser mais comuns em indivíduos portadores de mutações germinais do gene *SDHB* do que naqueles com mutações do gene *SDHC* ou *SDHD* ou em feocromocitomas esporádicos. ^{77, 80, 81}

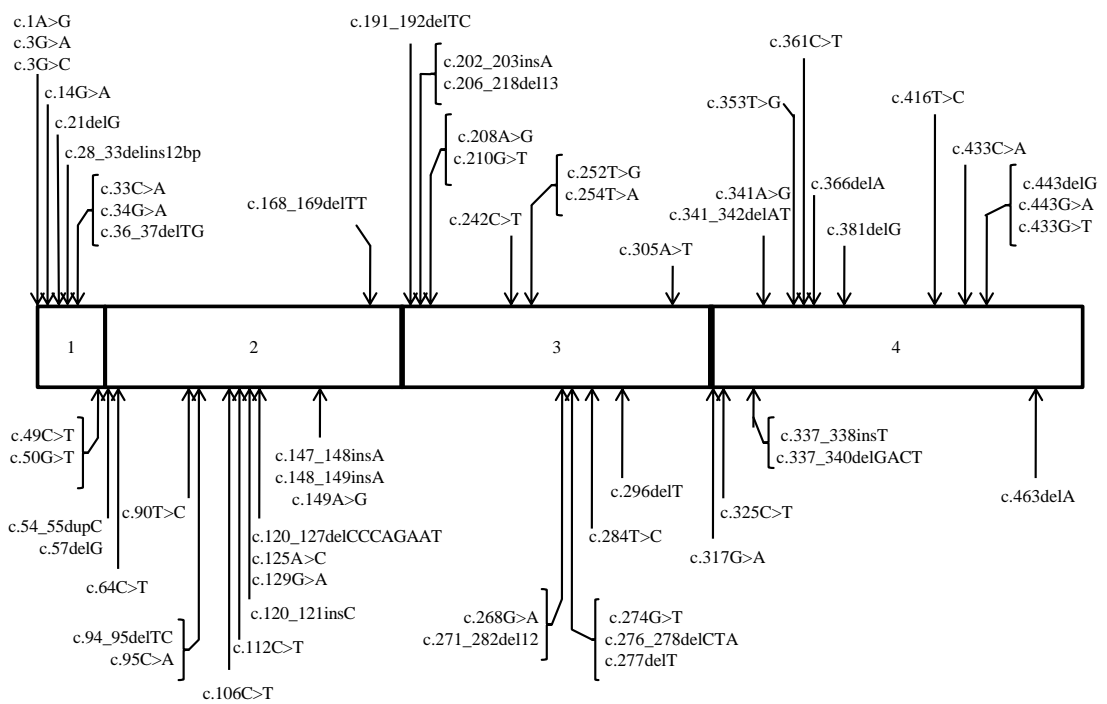


Figura 5 - Estrutura do gene *SDHD* e localização das mutações exónicas identificadas, as quais se encontram distribuídas por toda a sua sequência codificadora. Por motivos de clareza, os intrões e UTR não foram representados.

Cerca de 75% dos feocromocitomas e paragangliomas simpáticos, em pessoas portadoras de mutações do gene *SDHD*, ocorrem quando é afectada a porção 5' deste gene, havendo, recentemente, relatos de uma possível relação entre deleções ocorridas no exão 1 do gene *SDHB*, e os paragangliomas abdominais. ^{69, 82}

Os dados obtidos por estudos realizados por *Baysal et al*⁸³ e *Astrom e tal*⁸⁴ permitiram concluir que as baixas altitudes reduzem a penetrância das mutações associadas ao gene *SDHD*.

Além disto, verificou-se que os doentes portadores de tumores unifocais tinham uma tendência para viverem em baixas altitudes e estavam expostos a elas durante mais tempo, quando comparados com os casos que se apresentavam como tumores múltiplos. Os indivíduos portadores de mutações do tipo nonsense/splice site tendem a desenvolver os sintomas da sua doença 8,5 anos mais cedo do que os indivíduos portadores de mutações do tipo missense. Os feocromocitomas estão relacionados com mutações do tipo nonsense e ocorrem em doentes que, preferencialmente, vivem em altitudes mais elevadas ou que a elas estiveram expostos durante um maior período de tempo. Estes dados levaram, *Astrom et al*⁸⁴, a concluir que as altitudes elevadas e as mutações do tipo nonsense/splice site estão associadas a um fenótipo de maior gravidade clínica, suportando a evidência de que as mutações no gene *SDHD* alteram a capacidade de sensor de oxigénio do complexo succinato-desidrogenase.

6 - VIA TUMORIGÉNICA COMUM

Os genes *VHL*, *RET*, *SDHB*, *SDHC* e *SDHD* têm sido implicados no processo tumorigénico que culmina no desenvolvimento de feocromocitomas e paragangliomas.^{14, 85} No entanto, o modo como diferentes mutações em cinco genes funcionalmente e espacialmente distintos resultam no aparecimento do mesmo tipo de neoplasias carece de uma resposta definitiva, apesar dos avanços registados.^{14, 85}

Como já referido, os eventos mutacionais que afectam o gene *VHL* parecem resultar numa alteração da capacidade, deste gene, para regular as vias induzíveis pela hipoxia, o que predispõe para o desenvolvimento de feocromocitomas na síndrome de VHL. Do mesmo modo, tem sido descrita uma associação entre mutações nos genes *SDHB* e *SDHD* e alterações na capacidade de regular essas mesmas vias induzíveis pela hipoxia.^{14, 86} As mutações no gene *VHL* resultam na activação do HIF em condições de normóxia, uma vez que alteram os fenómenos de ubiquitinação e subsequente degradação da subunidade HIF α , enquanto que as mutações nos genes *SDHB* e *SDHD* parecem actuar sobre estas vias de um modo alternativo. A perda de função do complexo succinato-desidrogenase resulta na acumulação de succinato no interior da célula, o qual tem um efeito inibitório sobre a enzima prolil-hidroxilase, fundamental para a correcta degradação da subunidade HIF α . Estes fenómenos têm como consequência um aumento da actividade do HIF que, após translocação para o interior do núcleo, desencadeia uma série de eventos que culminam com a transcrição de vários genes induzíveis pela hipoxia.^{14, 69, 85, 86}

Estes dados apontam para a possibilidade da disfunção do HIF poder desempenhar um papel importante na génese dos feocromocitomas/paragangliomas. No entanto, apesar de atractiva, esta hipótese não tem em consideração o papel de outros genes, como o gene *RET*, na génese destas neoplasias.^{14, 86, 87}

Um modelo alternativo, que tenta unificar todos os genes envolvidos, foi recentemente proposto por *Lee et al*⁸⁸ (ver figura 6). Este modelo baseia-se no facto das células precursoras simpático-adrenais competirem, pela sobrevivência, por factores como GDNF durante o desenvolvimento embrionário, com a consequência de as células que perderem esta luta sofrerem apoptose. De facto, é estimado que mais de 50% de todos os neuroblastos simpáticos sejam submetidos a um processo apoptótico durante o desenvolvimento normal. Este processo regressivo permite ajustar a magnitude de cada população neuronal às necessidades e é fundamental para a correcta maturação do sistema nervoso.^{88, 89}

A via de sinalização desencadeada pelo GDNF, após ligação ao NTRK 1, conduz à inibição da actividade do factor c-Jun (ver figura 6). A perda desta via favorece os fenómenos apoptóticos dependentes de c-Jun, pois a deprivação neuronal de GDNF resulta num aumento significativo

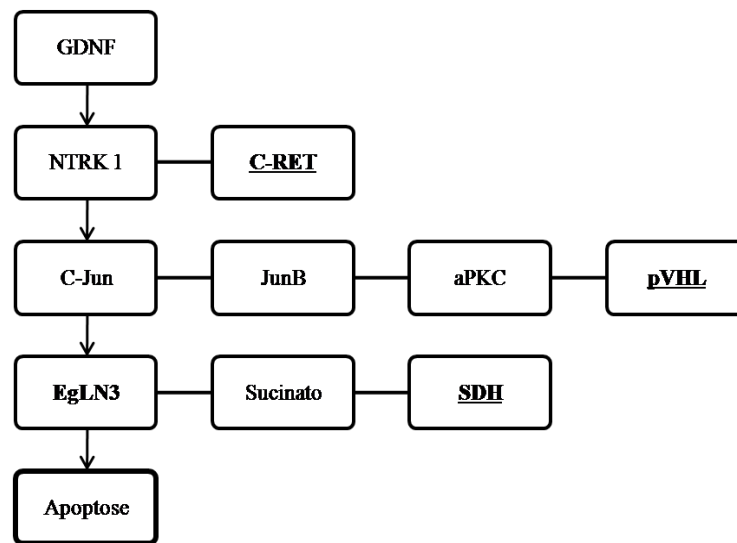


Figura 6 - Modelo unificador dos genes envolvidos na génese das síndromes de feocromocitomas/paragangliomas familiares. As mutações germinais nos genes *RET*, *VHL* e *SDH* estão na génese de feocromocitomas/paragangliomas, os quais surgem de células precursoras simpáticas. Muitas destas células sofrem processos apoptóticos, mediados pela enzima EgLN 3, durante o desenvolvimento normal à medida que o GDNF se torna limitado. As mutações nos genes *RET* e *VHL* condicionam um aumento da actividade de mediadores como o NTRK 1 e JunB, respectivamente, que possuem um efeito inibitório sobre os fenómenos apoptóticos mediados por c-Jun e pela enzima EgLN 3. As mutações que envolvem os genes *SDH* traduzem-se numa diminuição da actividade do complexo sucinato desidrogenase, o que condiciona um aumento da concentração intracelular de sucinato e consequente inibição da actividade da enzima EgLN 3. Adaptado de *Lee et al* (2005)⁸⁸

dos valores de c-Jun, que ao mesmo tempo se torna fosforilado, favorecendo os fenómenos apoptóticos. Estudos recentes sugerem a possibilidade de haver uma interligação molecular entre a proteína tirosina-quinase NTRK 1 e o proto-oncogene *RET*, visto este ser um receptor tirosina-quinase relacionado com a sobrevivência neuronal.⁸⁹⁻⁹¹ O GDNF activa o receptor RET através de mecanismos independentes de ligandos GFL e de co-receptores GFR α . A fosforilação resultante desta activação desencadeia vias de sinalização que regulam o tamanho do corpo celular e metabolismo dos neurónios, mas não a sobrevivência dos neurónios simpáticos maduros.^{90, 91}

As mutações no gene *VHL* associadas à variante IIC desta síndrome têm, em comum, uma potenciação da actividade celular da pPKC, o que se traduz num aumento dos níveis intracelulares do factor JunB, tal como acontece com as mutações activadoras do *RET*. O aumento dos níveis deste factor antagoniza os efeitos promovidos pelo c-Jun, entre os quais temos os fenómenos apoptóticos mediados por c-Jun. A *clusterin*, um biomarcador aparentemente robusto da função pVHL independente do HIF, tem sido usada para avaliar o estado da pVHL em carcinomas das células renais e feocromocitomas. Aparentemente não se encontra sob controlo pelos níveis de oxigénio nem pelo HIF, e a ela são atribuídas várias funções, entre as quais se destaca um papel anti-apoptótico e, paradoxalmente, um pró-apoptótico, pois uma redução dos seus valores intracelulares parece promover a sobrevivência, em zonas hipóxicas, de tumores sólidos pVHL deficientes. Uma outra função atribuída a esta proteína é a inibição do factor nuclear κ B, o que explica o porquê de tumores pVHL deficientes exibirem uma maior actividade deste factor nuclear e, como consequência, uma maior resistência ao TNF α .^{88, 92}

Uma outra proteína associada aos fenómenos apoptóticos neuronais é a EgLN 3. Esta é considerada uma proteína mitocondrial que é expressa em neurónios simpáticos após a remoção do GDNF, onde parece promover o fenómeno apoptótico por mecanismos dependentes de caspases. A sua transcrição é activada pelo c-Jun e é, por si só, necessária e suficiente para o correcto desenrolar da apoptose. A perda de função do complexo mitocondrial tipo II favorece a

acumulação de succinato, o que conduz à inibição da EgLN 3 e do processo apoptótico. Deste modo, parece que todos estes genes envolvidos nos feocromocitomas/paragangliomas familiares condicionam uma via molecular que desempenha um importante papel na determinação do destino das células precursoras simpático-adrenais durante o desenvolvimento. São as células que escapam a este processo apoptótico que, presumivelmente, possuem uma maior probabilidade de sofrer uma degeneração maligna.^{88, 93-95}

7 - TESTES GENÉTICOS

Os testes genéticos permitem uma avaliação do risco genético de determinados indivíduos e são uma peça fundamental no aconselhamento genético, o qual consiste no processo de transmissão, aos indivíduos e suas famílias, de informações relacionadas com a natureza, modo de transmissão e implicações de determinada patologia genética, de forma a possibilitar melhores decisões médicas e pessoais. ⁹⁶

Actualmente são realizados, por rotina, testes genéticos a quatro dos cinco genes referidos nesta tese, nomeadamente: *VHL*, *RET*, *SDHB* e *SDHD*. Apesar da existência de uma predisposição familiar, o uso massificado dos testes genéticos em todos os casos de feocromocitomas e paragangliomas, não é apropriado nem tem uma boa relação custo-eficácia. Como tal, a decisão final sobre quando e que gene avaliar requer uma avaliação de vários factores (ver figura 7). ⁹⁶

Numa primeira abordagem é importante uma adequada história da doença actual e familiar de modo a salientar uma possível condição hereditária subjacente. Na ausência de história familiar, episódios de morte súbita atribuíveis a eventos cardiovasculares mal explicados são sugestivos de uma doença hereditária subjacente. As manifestações clínicas do doente ou de um membro familiar podem sugerir uma doença específica e orientar o estudo genético (p. ex. mutações no gene *VHL* sugeridas por lesões vasculares da retina). ^{5,97}

Como os tumores familiares tendem a ocorrer em idades mais precoces, a idade da apresentação do quadro clínico é um importante factor a considerar para a realização dos referidos testes, mas a idade avançada não exclui a existência de uma doença familiar. ⁵

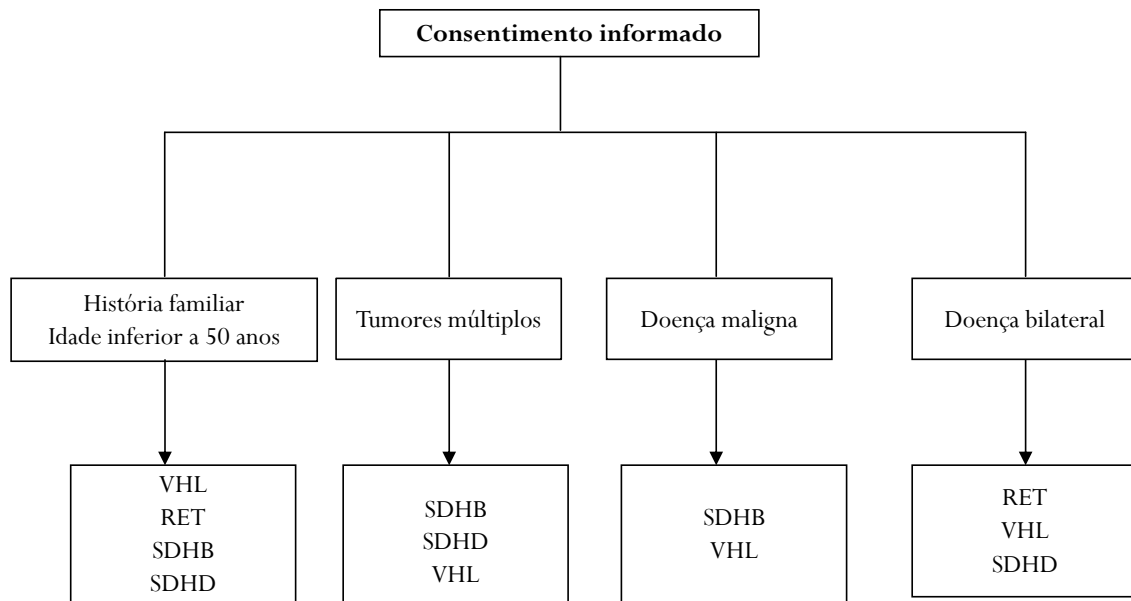


Figura 7 – Algoritmo para o diagnóstico genético dos feocromocitomas/paragangliomas. Este deve ser aplicado sempre que houver uma história familiar, quando o doente tem menos de 50 anos ou quando os tumores são múltiplos, malignos ou bilaterais. Os genes a serem avaliados, em cada situação, encontram-se dispostos de acordo com uma importância decrescente. Adaptado de Pacak *et al* (2007)⁹⁷

Excepto as manifestações clínicas óbvias que podem indicar síndromes específicas, a decisão sobre qual o gene a testar deve ser baseada em características como: (1) localização do tumor, (2) presença de metástases e o (3) fenótipo bioquímico. Apesar das mutações nos genes *SDHB* e *SDHD* poderem estar presentes em tumores adrenais solitários, estas são identificadas principalmente em paragangliomas com uma doença multifocal, pelo que a pesquisa destas na presença deste tipo de tumores pode ser importante. Como o gene *SDHB* está associado a uma maior probabilidade de doença maligna, indivíduos portadores de doença metastática, principalmente se relacionada com paragangliomas, podem beneficiar do estudo deste gene. Pelo contrário, a doença maligna e extra-adrenal é rara em mutações do gene *RET*, pelo que o estudo deste gene pode não ser compensatório. O perfil bioquímico é importante, pois tumores hiperprodutores de adrenalina estão associados a mutações no gene *RET* ao passo que os que não hiperproduzem esta substância são encontrados em mutações do gene *VHL*.⁹⁷

Deste modo, a orientação do diagnóstico genético em função das características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais do doente permite uma monitorização diferencial dos

vários doentes e um melhor aconselhamento genético aos seus familiares, o que se pode traduzir numa melhoria da qualidade de vida e dos cuidados de saúde prestados aos doentes portadores de feocromocitomas e paragangliomas.

8 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Como referido no início desta tese, os feocromocitomas são, na sua grande maioria, de ocorrência esporádica, mas a agregação familiar de feocromocitomas e paragangliomas tem sido repetidamente descrita na literatura. Se classicamente uma percentagem de 10 a 15%, do total de casos, era atribuída a causas hereditárias, actualmente admite-se que esta percentagem ronda os 20 a 25%. A identificação de vários genes como possível base etiológica para este tipo de neoplasias e a possibilidade de realização de testes genéticos permitiu uma melhor orientação clínica e terapêutica dos doentes portadores de feocromocitomas/paragangliomas familiares e melhorou a nossa compreensão sobre esta forma particular de doença. ⁴

A compreensão da função dos vários genes, quer no seu papel fisiológico, quer no seu papel patológico, resultou numa nova janela de opções terapêuticas. No entanto, as vias pelas quais apenas alguns tecidos desenvolvem o processo tumoral devem ser melhor esclarecidas, pois um melhor entendimento permitir-nos-á: (1) ter uma melhor compreensão das correlações genótipo-fenótipo, o que se pode traduzir numa abordagem clínica e terapêutica mais correcta; (2) perceber o modo como todos estes genes actuam e se correlacionam no processo de desenvolvimento e crescimento tumoral; (3) desenvolver testes genéticos cada vez mais completos, que combinados com melhores modalidades terapêuticas poderão traduzir-se na melhoria dos cuidados de saúde prestados; (4) identificar novos alvos terapêuticos com base no conhecimento dos defeitos moleculares subjacentes.

A disponibilidade de modelos animais oferece novas abordagens que podem ajudar a compreender o papel dos vários genes no processo tumorigénico. Os modelos animais podem constituir ferramentas importantes para o estudo da etiopatogénese e para avaliar a eficácia de novas modalidades terapêuticas.

É assim de extrema importância continuar todo o trabalho realizado até agora sobre estas síndromes de feocromocitomas/paragangliomas familiares. Apesar de serem, no geral, neoplasias

raras, representam uma importante fonte de morbidade e mortalidade para as pessoas que delas padecem, pelo que, uma melhor compreensão do processo tumorigénico e novas opções terapêuticas poderão traduzir-se numa melhoria substancial da sua qualidade de vida.

BIBLIOGRAFIA

1. Tischler A. Pheochromocytoma and Extra-adrenal Paraganglioma. *Arch Pathol Lab Med.* 2008; 132: 1272-84.
2. Elder EE, Elder G, Larsson C. Pheochromocytoma and functional paraganglioma syndrome: no longer the 10% tumor. *J Surg Oncol.* 2005; 89: 193-201.
3. Neumann HP, Bausch B, McWhinney SR, et al. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *N Engl J Med.* 2002; 346: 1459-66.
4. Alderazi Y, Yeh MW, Robinson BG, et al. Pheochromocytoma: current concepts. *Med J Aust.* 2005; 183: 201-4.
5. Jiménez C, Cote G, Arnold A, Gagel RF. Review: Should patients with apparently sporadic pheochromocytomas or paragangliomas be screened for hereditary syndromes? *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91: 2851-8.
6. Butman JA, Linehan WM, Lonser RR. Neurologic manifestations of von Hippel-Lindau disease. *JAMA.* 2008; 300: 1334-42.
7. Young JW. Endocrine hypertension. In: Kronenberg HM. *Williams Textbook of Endocrinology* 11 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008: 505-37.
8. Wanebo JE, Lonser RR, Glenn GM, Oldfield EH. The natural history of hemangioblastomas of the central nervous system in patients with von Hippel-Lindau disease. *J Neurosurg.* 2003; 98: 82-94.
9. Webster AR, Maher ER, Moore AT. Clinical characteristics of ocular angiomas in von Hippel-Lindau disease and correlation with germline mutation. *Arch Ophthalmol.* 1999; 117: 371-8.
10. Kreusel K, Bechrakis N, Krause L, Neumann H, Foerster M. Retinal angiomas in von Hippel-Lindau disease: a longitudinal ophthalmologic study. *Ophthalmology.* 2006; 113: 1418-24.
11. Bender B, Althofer C, Januszewicz A, et al. Functioning thoracic paraganglioma: association with Von Hippel-Lindau syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82: 3356-60.
12. Kim H, Butman J, Brewer C, et al. Tumors of the endolymphatic sac in patients with von Hippel-Lindau disease: implications for their natural history, diagnosis, and treatment. *J Neurosurg.* 2005; 102: 503-12.
13. Latif F, Tory K, Gnarr J, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science.* 1993; 260: 1317-20.

14. Zatyka M, Morrissey C, Kuzmin I, et al. Genetic and functional analysis of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene promoter. *J Med Genet.* 2002; 39: 463-72.
15. Duan D, Humphrey J, Chen D, et al. Characterization of the VHL tumor suppressor gene product: localization, complex formation, and the effect of natural inactivating mutations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 6495-9.
16. Wizigmann-Voos S, Breier G, Risau W, et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in von Hippel-Lindau disease-associated and sporadic hemangioblastomas. *Cancer Res.* 1995; 55: 1358-64.
17. Wiesener MS, Eckardt KU. Erythropoietin, tumours and the von Hippel-Lindau gene: Towards identification of mechanisms and dysfunction of oxygen sensing. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17: 356-9.
18. Iwai K, Yamanaka K, Kamura T, et al. Identification of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 12436-41.
19. Maxwell P, Weisner M, Chang G, et al. The von Hippel-Lindau gene product is necessary for oxygen-dependent proteolysis of hypoxia inducible factor α subunits. *Nature.* 1999; 399: 271-5.
20. Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 α by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J.* 2000; 19: 4298-309.
21. Bruick R, McKnight S. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science.* 2001; 294: 1337-40.
22. Ohh M, Yauch RL, Lonergan K, et al. The von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein Is Required for Proper Assembly of an Extracellular Fibronectin Matrix. *Molecular Cell.* 1998; 1: 959-68.
23. Kaelin W. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 673-82.
24. Gnarr J, Ward J, Porter F, et al. Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 9102-7.
25. Rankin E, Higgins D, Walisser J, Johnson R, Bradfield C, Haase V. Inactivation of the Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (Arnt) Suppresses von Hippel-Lindau Disease-Associated Vascular Tumors in Mice. *Mol Cell Biol.* 2005; 25: 3163-72.
26. Olschwang S, Richard S, Boisson C, et al. Germline Mutation Profile of the VHL Gene in von Hippel-Lindau Disease and in Sporadic Hemangioblastoma. *Hum Mutat.* 1998; 12: 424-30.

27. Chen F, Kishida T, Yao M, et al. Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype. *Hum Mutat.* 1995; 5: 66-75.
28. Zbar B, Kishida T, Chen F, et al. Germline mutations in the Von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in families from North America, Europe, and Japan. *Hum Mutat.* 1996; 8: 348-57.
29. Hes F, Zewald R, Peeters T, et al. Genotype-phenotype correlations in families with deletions in the von Hippel-Lindau (VHL) gene. *Hum Genet.* 2000; 106: 425-31.
30. Ong K, Woodward E, Killick P, Lim C, Macdonald F. Genotype-Phenotype Correlations in von Hippel-Lindau Disease. *Hum Mutat.* 2007; 28: 143-9.
31. Gallou C, Joly D, Mejean A, et al. Mutations of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: definition of a risk factor for VHL patients to develop an RCC. *Hum Mutat.* 1999; 13: 464-75.
32. Wong T, Agron E, Coleman H, et al. Genotype-Phenotype Correlation in von Hippel-Lindau Disease With Retinal Angiomas. *Arch Ophthalmol.* 2007; 125: 239-45.
33. Maranchie J, Afonso A, Albert P, et al. Solid Renal Tumor Severity in von Hippel Lindau Disease is Related to Germline Deletion Length and Location. *Hum Mutat.* 2004; 23: 40-6.
34. Gagel R, Marx S. Multiple endocrine neoplasia. In Kronenberg H, Melmed S, Polonsky K, Larsen P. *Williams Textbook of Endocrinology.* Philadelphia: Saunders Elsevier. 2008; 1705-47.
35. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *JAMA.* 1996; 276: 1575-9.
36. Robbins J, Merino M, Boice J, et al. Thyroid cancer: a lethal endocrine neoplasm. *Ann Intern Med.* 1991; 115: 133-47.
37. Caragliano P, Pertsemlidis D, Pertsemlidis D. Pheochromocytoma: inherited associations, bilaterality, and cortex presentation. *Surgery.* 2000; 128: 1007-11.
38. Marini F, Falchetti A, Del Monte F, et al. Multiple endocrine neoplasia type 2. *Orphanet J Rare Dis.* 2006; 1: 45-51.
39. Skinner M, DeBenedetti M, Moley J, Norton J, Wells S. Medullary thyroid carcinoma in children with multiple endocrine neoplasia types 2A and 2B. *J Pediatr Surg.* 1996; 31: 177-81.
40. Vlahovic C, Crawford J. Activation of tyrosine kinases in cancer. *Oncologist.* 2003; 8: 531-8.

41. Ishizaka Y, Tahira T, Ochiai M, Ikeda I, Sugimara T, Nagao M. Molecular cloning and characterization of human RET-II oncogene. *Oncogene Res.* 1998; 3: 193-7.
42. Anders J, Kjar S, Ibanez C. Molecular modeling of the extracellular domain of the RET receptor tyrosine kinase reveals multiple cadherin-like domains and a calcium-binding site. *J Biol Chem.* 2001; 276: 35808-17.
43. de Groot J, Links T, Plukker J, Lips C, Hofstr R. RET as a Diagnostic and Therapeutic Target in Sporadic and Hereditary Endocrine Tumors. *Endocr Rev.* 2006; 27: 535-60.
44. Yu T, Scully S, Yu Y, Fox G, Jing S, Zhou R. Expression of GDNF family receptor components during development: implications in the mechanisms of interaction. *J Neurosci.* 1998; 18: 4684-96.
45. Encinas M, Tansey M, Tsui-Pierchala B, Comella J, Milbrandt J, Johnson E. c-Src is required for glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) family ligand-mediated neuronal survival via a phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K)-dependent pathway. *J Neurosci.* 2001; 21: 1464-72.
46. Coulpier M, Anders J, Ibanez C. Coordinated activation of autophosphorylation sites in the RET receptor tyrosine kinase: importance of tyrosine 1062 for GDNF mediated neuronal differentiation and survival. *J Biol Chem.* 2002; 277: 1991-9.
47. Liu X, Vega Q, Decker R, Pandey A, Worby C, Dixon J. Oncogenic RET receptors display different autophosphorylation sites and substrate binding specificities. *J Biol Chem.* 1996; 271: 5309-12.
48. Smith-Hicks C, Sizer K, Powers J, Tischler A, Costantini F. C-cell hyperplasia, pheochromocytoma and sympathoadrenal malformation in a mouse model of multiple endocrine neoplasia type 2B. *EMBO J.* 2000; 19: 612-22.
49. Acton D, Velthuyzen D, Lips C, Hoepfener J. Multiple endocrine neoplasia type 2B mutation in human RET oncogene induces medullary thyroid carcinoma in transgenic mice. *Oncogene.* 2000; 19: 3121-5.
50. Michiels F, Chappuis S, Caillou B, et al. (1997). Development of medullary thyroid carcinoma in transgenic mice expressing the RET protooncogene altered by a multiple endocrine neoplasia type 2A mutation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 3330-5.
51. Kawai K, Iwashita T, Murakami H, et al. Tissue-specific Carcinogenesis in Transgenic Mice Expressing the RET Proto-Oncogene with a Multiple Endocrine Neoplasia Type 2A Mutation. *Cancer Res.* 2000; 60: 5254-60.
52. Takahashi M, Asai N, Iwashita T, Murakami H, Ito S. Molecular mechanisms of development of multiple endocrine neoplasia 2 by RET mutations. *J Intern Med.* 1998; 243: 509-13.

53. Carlson K, Dou S, Chi D, et al. Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the RET protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 1579-83.
54. Smith D, Houghton C, Ponder B. Germline mutation of RET codon 883 in two cases of de novo MEN 2B. *Oncogene*. 1997; 15: 1213-7.
55. Santoro M, Carlomagno F, Romano A, et al. Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science*. 1995; 267: 381-3.
56. Yip L, Cote G, Shapiro S, et al. Multiple endocrine neoplasia type 2: evaluation of the genotype-phenotype relationship. *Arch Surg*. 2003; 138: 409-16.
57. Verga U, Fugazzola L, Cambiaghi S, et al. Frequent association between MEN 2A and cutaneous lichen amyloidosis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003; 59: 156-61.
58. Baysal B. Clinical and molecular progress in hereditary paraganglioma. *J Med Genet*. 2008; 45: 689-94.
59. Gujrathi C, Donald P. Current trends in the diagnosis and management of head and neck paragangliomas. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005; 13: 339-42.
60. van Schothorst E, Jansen J, Grooters E, et al. Founder effect at PGL1 in hereditary head and neck paraganglioma families from The Netherlands. *Am J Hum Genet*. 1998; 63: 468-73.
61. Baysal B, Ferrell R, Willett-Brozick J, et al. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science*. 2000; 287: 848-51.
62. Baysal B. Genomic imprinting and environment in hereditary paraganglioma. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2004; 129: 85-90.
63. Niemann S, Muller U. Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nat Genet*. 2000; 26: 268-70.
64. Astuti D, Latif F, Dallol A, et al. Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *Am J Hum Genet*. 2001; 69: 49-54.
65. Timmers H, Kozupa A, Eisenhofer G, et al. Clinical Presentations, Biochemical Phenotypes, and Genotype-Phenotype Correlations in Patients with Succinate Dehydrogenase Subunit B-Associated Pheochromocytomas and Paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92: 779-86.
66. Kita K, Oya H, Gennis R, Ackrell B, Kasahara M. Human complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): cDNA cloning of iron sulphur (Ip) subunit of liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990; 166: 101-8.

67. Elbehti-Green A, Au H, Mascarello J, Ream-Robinson D, Scheffler I. Characterization of the human SDHC gene encoding one of the integral membrane proteins of succinate-quinone oxidoreductase in mitochondria. *Gene*. 1998; 213: 133-40.
68. Aguiar C, Cox G, Pomeroy S, Dahia P. Analysis of the SDHD gene the susceptibility gene for familial paraganglioma syndrome (PGL1), in pheochromocytomas. *J Clin Endocr Metab*. 2001; 86: 2890-4.
69. Eng C, Kiuru M, Fernandez M, Aaltonen L. A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 193-202.
70. Yankovskaya V, Horsefield R, Törnroth S, et al. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science*. 2003; 299: 700-4.
71. Birch-Machin M, Taylor R, Cochran B, Ackrell B, Turnbull D. Late-onset optic atrophy, ataxia, and myopathy associated with a mutation of a complex II gene. *Ann Neurol*. 2000; 48: 330-5.
72. Favier J, Brière J, Strompf L, et al. Hereditary Paraganglioma/Pheochromocytoma and Inherited Succinate Dehydrogenase Deficiency. *Horm Res*. 2005; 63: 171-9.
73. Yudkoff M, Nelson D, Daikhin Y, Erecinska M. Tricarboxylic acid cycle in rat brain synaptosomes. Fluxes and interactions with aspartate aminotransferase and malate/aspartate shuttle. *J Biol Chem*. 1994; 269: 27414-20.
74. MacDonald M, Fahien L, Brown L, Hasan N, Buss J. Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005; 288: E1-15.
75. Rustin P, Munnich A, Rotig A. Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme. *Eur J Hum Genet*. 2002; 10: 289-91.
76. Ishii N, Ishii T, Hartman PS. The role of the electron transport SDHC gene on lifespan and cancer. *Mitochondrion*. 2007;7:24-8.
77. Benn D, Gimenez-Roqueplo A, Reilly J, et al. Clinical presentation and penetrance of pheochromocytoma/paraganglioma syndromes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91: 827-36.
78. Neumann H, Pawlu C, Peczowska M, et al. European-American Paraganglioma Study Group; Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *JAMA*. 2004; 292: 943-51.
79. Boedeker C, Ridder G, Schipper J. Paragangliomas of the head and neck: diagnosis and treatment. *Fam Cancer*. 2005; 4: 55-9.
80. Gimenez-Roqueplo A, Favier J, Rustin P, Rieubland C, Crespin M. Mutations in the SDHB gene are associated with extra-adrenal and/or malignant pheochromocytomas. *Cancer Res*. 2003; 63: 5615-21.

81. Jimenez C, Cote G, Arnold A, Gagel R. Should patients with apparently sporadic pheochromocytomas or paragangliomas be screened for hereditary syndromes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91: 2851-8.
82. Cascón A, Landa I, Lopez-Jimenez E, et al. Molecular characterisation of a common SDHB deletion in paraganglioma patients. *J Med Genet.* 2008; 45: 233-8.
83. Baysal B, Willett-Brozick J, Lawrence E, et al. Prevalence of SDHB, SDHC, and SDHD germline mutations in clinic patients with head and neck paragangliomas. *J Med Genet.* 2002; 39: 178-83.
84. Astrom K, Cohen J, Willett-Brozick J, Aston C, Baysal B. Altitude is a phenotypic modifier in hereditary paraganglioma type 1: evidence for an oxygen-sensing defect. *Hum Genet.* 2003; 113: 228-37.
85. Maher E, Eng C. The pressure rises: update on the genetics of pheochromocytoma. *Hum Mol Genet.* 2002; 11: 2347-54.
86. Gottlieb E, Tomlinson I. Mitochondrial tumor suppressors: a genetic and biochemical update. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5: 857-66.
87. Dahia P, Ross K, Wright M, et al. A HIF1 α regulatory loop links hypoxia and mitochondrial signals in pheochromocytomas. *PLoS Genet.* 2005; 1:72-80.
88. Lee S, Nakamura E, Yang H, et al. Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: developmental culling and cancer. *Cancer Cell.* 2005; 8: 155-67.
89. Oppenheim R. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 1991; 14: 453-501.
90. Estus S, Zaks W, Freeman R, Gruda M, Bravo R, Johnson E. Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-Jun as necessary for neuronal apoptosis. *J Cell Biol.* 1994; 127: 1717-27.
91. Dechant G. Chat in the trophic web: NGF activates Ret by inter-RTK signaling. *Neuron.* 2002; 33: 156-8.
92. Nakamura E, Abreu E, Awakura Y, et al. Clusterin is a secreted marker for a hypoxia-inducible factor-independent function of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Am J Pathol.* 2006; 168: 574-84.
93. Lipscomb E, Sarmiere P, Freeman R. SM-20 is a novel mitochondrial protein that causes caspase-dependent cell death in nerve growth factor-dependent neurons. *J Biol Chem.* 2001; 276: 11775-82.
94. Marxsen J, Stengel P, Doege K, et al. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF- α -prolyl-4-hydroxylases. *Biochem J.* 2004; 381: 761-7.

95. Aprelikova O, Chandramouli G, Wood M, et al. Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors. *J Cell Biochem.* 2004; 92: 491-501.
96. Benn D, Richardson A, Marsh D, Robinson B. Genetic testing in pheochromocytoma- and paraganglioma-associated syndromes. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1073: 104-11.
97. Pacak K, Eisenhofer G, Ahlman H, et al. Pheochromocytoma: Recommendations for Clinical Practice from the First International Symposium. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007; 3: 92-102.
98. Suzuki H, Ueda T, Komiya A, et al. Mutational state of von Hippel-Lindau and adenomatous polyposis coli genes in renal tumors. *Oncology.* 1997; 54: 252-7.
99. Kishida T, Stackhouse T, Chen F, Lerman M, Zbar B. Cellular proteins that bind the von Hippel-Lindau disease gene product: mapping of binding domains and the effect of mssense mutations. *Cancer Res.* 1995; 55: 4544-8.
100. van der Harst E, de Krijger R, Dinjens W, et al. Germline mutations in the vhl gene in patients presenting with phaeochromocytomas. *Int J Cancer.* 1998; 77: 337-40.
101. Shuin T, Kondo K, Torigoe S, et al. Frequent somatic mutations and loss of heterozygosity of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res.* 1994; 54: 2852-5.
102. Crossey P, Richards F, Foster K, et al. Identification of intragenic mutations in the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene and correlation with disease phenotype. *Hum Mol Genet.* 1994, 3: 1303-8.
103. Bailly M, Bain C, Favrot M, Ozturk C. Somatic mutations of Von Hippel-Lindau (VHL) tumor-suppressor gene in european kidney cancers. *Int J Cancer.* 1995; 63: 660-4.
104. Brauch H, Weirich G, Hornauer M, Storkel S, Wohl T, Bruning T. Trichloroethylene exposure and specific somatic mutations in patients with renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91: 854-61.
105. Whaley J, Naglich J, Gelbert L, Hsia Y, Lamiell J. Germ-line mutations in the von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene are similar to somatic von Hippel-Lindau aberrations in sporadic renal cell carcinoma. *Am J Hum Genet.* 1994; 55: 1092-102.
106. Gnarr J, Tory K, Weng Y, et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet.* 1994; 7: 85-90.
107. Martin R, Hockey A, Walpole I, Goldblatt J. Variable penetrance of familial pheochromocytoma associated with the von Hippel Lindau gene mutation, S68W. *Hum Mutat.* 1998; 12: 71.
108. Maher E, Webster A, Richards F, et al. Phenotypic expression in von Hippel-Lindau disease : correlations with germline VHL gene mutations. *J Med Genet.* 1996; 33: 328-32.

109. Foster K, Prowse A, van den Berg A, et al. Somatic mutations of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in non-familial clear cell renal carcinoma. *Hum Mol Genet.* 1994; 3: 2169-73.
110. Glavac D, Neumann H, Wittke C, et al. Mutations in the VHL tumor suppressor gene and associated lesions in families with von Hippel-Lindau disease from central Europe. *Hum Genet.* 1996; 98: 271-80.
111. Neumann H, Bender B. Genotype-phenotype correlations in von Hippel-Lindau disease. *J Intern Med.* 1998; 243: 541-5.
112. Woodward E, Eng C, McMahon R, et al. Genetic predisposition to pheochromocytoma: analysis of candidate genes GDNF, RET and VHL. *Hum Mol Genet.* 1997; 6: 1051-6.
113. Clinical Research Group for VHL in Japan. Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in Japanese VHL. *Hum Mol Genet.* 1995; 4: 2233-7.
114. Crossey PA, Eng C, Ginalska-Malinowska M, et al. Molecular genetic diagnosis of von Hippel-Lindau disease in familial pheochromocytoma. *J Med Genet.* 1995; 32: 885-6.
115. Stanojevic BR, Lohse P, Neskovic GG, et al. Germline VHL gene mutations in three Serbian families with von Hippel-Lindau disease. *Neoplasma.* 2007; 54: 402-6.
116. Stolle C, Glenn G, Zbar B, et al. Improved detection of germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Hum Mutat.* 1998; 12: 417-23.
117. Rocha JC, Silva RL, Mendonça BB, Marui S, Simpson AJ, Camargo AA. High frequency of novel germline mutations in the VHL gene in the heterogeneous population of Brazil. *J Med Genet.* 2003; 40: e31.
118. Kanno H, Kondo K, Ito S, et al. Somatic mutations of the Von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in sporadic central nervous system hemangioblastomas. *Cancer Res.* 1994; 54: 4845-7.
119. Moore PS, Antonello D, Martignoni G, Racchini C, Ventrucci M, Scarpa A. Identification of a novel mutation (c279delC) and a polymorphism (c291C>G) in the von Hippel-Lindau gene in Italian patients. *Hum Mutat.* 2000; 15: 582.
120. Sekido Y, Bader S, Latif F, et al. Molecular analysis of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene in human lung cancer cell lines. *Oncogene.* 1994; 9: 1599-604.
121. Kang HC, Kim IJ, Park JH, et al. Three novel VHL germline mutations in Korean patients with von Hippel-Lindau disease and pheochromocytomas. *Oncol Rep.* 2005; 14: 879-83.
122. Bradley JF, Collins DL, Schimke RN, Parrott HN, Rothberg PG. Two distinct phenotypes caused by two different missense mutations in the same codon of the VHL gene. *Am J Med Genet.* 1999; 87: 163-7.

123. Brieger J, Weidt E, Gansen K, Decker H. Detection of a novel germline mutation in the von Hippel-Lindau tumour-suppressor gene by fluorescence-labelled base excision sequence scanning (F-BESS). *Clin Genet.* 1999; 56: 210-5.
124. Eng C, Crossey P, Mulligan L, et al. Mutations in the RET proto-oncogene and the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in sporadic and syndromic pheochromocytomas. *J Med Genet.* 1995; 32: 934-7.
125. Vortmeyer A, Lubensky I, Fogt F, Linehan W, Khettry U, Zhuang Z. Allelic deletion and mutation of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene in pancreatic microcystic adenomas. *Am J Pathol.* 1997; 151: 951-6.
126. Lee J, Dong S, Park W, et al. Loss of heterozygosity and somatic mutations of the VHL tumor suppressor gene in sporadic cerebellar hemangioblastomas. *Cancer Res.* 1998; 58: 504-8.
127. Lemm I, Lingott A, Pogge V, et al. Loss of HNF1alpha function in human renal cell carcinoma: frequent mutations in the VHL gene but not the HNF1alpha gene. *Mol Carcinog.* 1999; 24: 305-14.
128. Zhuang Z, Gnarr J, Dudley C, Zbar B, Linehan W, Lubensky I. Detection of von Hippel-Lindau disease gene mutations in paraffin-embedded sporadic renal cell carcinoma specimens. *Mod Pathol.* 1996; 9: 838-42.
129. Oberstrass J, Reifenberger G, Reifenberger J, Wechsler W, Collins V. Mutation of the Von Hippel-Lindau tumour suppressor gene in capillary haemangioblastomas of the central nervous system. *J Pathol.* 1996; 179: 151-6.
130. Kanno H, Shuin T, Kondo K, et al. Somatic mutations of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and loss of heterozygosity on chromosome 3p in human glial tumors. *Cancer Res.* 1997; 57: 1035-8.
131. den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet.* 2001; 109: 121-4.
132. Dvorakova S, Vaclavikova E, Duskova J, Vlcek P, Ryska A, Bendlova B. Exon 5 of the RET proto-oncogene: a newly detected risk exon for familial medullary thyroid carcinoma, a novel germ-line mutation Gly321Arg. *J Endocrinol Invest.* 2005; 28: 905-9.
133. Pigny P, Bauters C, Wemeau J, et al. A novel 9-base pair duplication in RET exon 8 in familial medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84: 1700-4.
134. Da Silva A, Maciel R, Da Silva M, Toledo S, De Carvalho M, Cerutti J. A novel germ-line point mutation in RET exon 8 (Gly(533)Cys) in a large kindred with familial medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88: 5438-43.
135. Rey J, Brouillet J, Fonteneau-Allaire J, et al. Novel germline RET mutation segregating with papillary thyroid carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2001; 32: 390-1.

136. Kambouris M, Jackson C, Feldman G. Diagnosis of multiple endocrine neoplasia [MEN] 2A, 2B and familial medullary thyroid cancer [FMTC] by multiplex PCR and heteroduplex analyses of RET proto-oncogene mutations. *Hum Mutat.* 1996; 8: 64-70.
137. Frank-Raue K, Höppner W, Frilling A, et al. Mutations of the ret protooncogene in German multiple endocrine neoplasia families: relation between genotype and phenotype. German Medullary Thyroid Carcinoma Study Group. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81: 1780-3.
138. Mulligan L, Eng C, Healey C, et al. Specific mutations of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC. *Nat Genet.* 1994; 6: 70-4.
139. Klein I, Esik O, Homolya V, Szeri F, Váradi A. Molecular genetic diagnostic program of multiple endocrine neoplasia type 2A and familial medullary thyroid carcinoma syndromes in Hungary. *J Endocrinol.* 2001; 170: 661-6.
140. Oriola J, Páramo C, Halperin I, García-Mayor V, Rivera-Filla F. Novel point mutation in exon 10 of the RET proto-oncogene in a family with medullary thyroid carcinoma. *Am J Med Genet.* 1998; 78: 271-3.
141. Donis-Keller H, Dou S, Chi D, et al. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Molec Genet.* 1993; 2: 851-6.
142. Mulligan L, Kwok J, Healey C, et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature.* 1993; 363: 458-60.
143. Xue F, Yu H, Maurer L, et al. Germline RET mutations in MEN 2A and FMTC and their detection by simple DNA diagnostic tests. *Hum Mol Genet.* 1994; 3: 635-8.
144. Wells S, Chi D, Toshima K, et al. Predictive DNA testing and prophylactic thyroidectomy in patients at risk for multiple endocrine neoplasia type 2A. *Ann Surg.* 1994; 220: 237-47.
145. Blaugrund J, Johns M, Eby Y, et al. RET proto-oncogene mutations in inherited and sporadic medullary thyroid cancer. *Hum Mol Genet.* 1994; 3: 1895-7.
146. Kitamura Y, Goodfellow P, Shimizu K, et al. Novel germline RET proto-oncogene mutations associated with medullary thyroid carcinoma (MTC): mutation analysis in Japanese patients with MTC. *Oncogene.* 1997; 14: 3103-6.
147. Schuffenecker I, Billaud M, Calender A, et al. RET proto-oncogene mutations in French MEN 2A and FMTC families. *Hum Mol Genet.* 1994; 3: 1939-43.
148. Dvorakova S, Vaclavikova E, Ryska A, et al. Double germline mutations in the RET Proto-oncogene in MEN 2A and MEN 2B kindreds. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2006; 114: 192-6.

149. Siegelman M, Mohabeer A, Fahey T, et al. Rapid, nonradioactive screening for mutations in exons 10, 11, and 16 of the RET protooncogene associated with inherited medullary thyroid carcinoma. *Clin Chem.* 1997; 43: 453-7.
150. Machens A, Niccoli-Sire P, Hoegel J, et al. Early malignant progression of hereditary medullary thyroid cancer. European Multiple Endocrine Neoplasia (EUROMEN) Study Group. *N Engl J Med.* 2003; 349: 1517-25.
151. Komminoth P, Kunz E, Matias-Guiu X, et al. Analysis of RET protooncogene point mutations distinguishes heritable from nonheritable medullary thyroid carcinomas. *Cancer.* 1995; 76: 479-89.
152. Beldjord, C, Desclaux-Arramond F, Raffin-Sanson M, et al. The RET protooncogene in sporadic pheochromocytomas: frequent MEN 2-like mutations and new molecular defects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80: 2063-8.
153. Amar L, Bertherat J, Baudin E, et al. Genetic testing in pheochromocytoma or functional paraganglioma. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 8812-8.
154. Höppner W, Ritter M. A duplication of 12 bp in the critical cysteine rich domain of the RET proto-oncogene results in a distinct phenotype of multiple endocrine neoplasia type 2A. *Hum Mol Genet.* 1997; 6: 587-90.
155. Höppner W, Dralle H, Brabant G. Duplication of 9 base pairs in the critical cysteine-rich domain of the RET proto-oncogene causes multiple endocrine neoplasia type 2A. *Hum Mutat.* 1998; 1: S128-30.
156. Ahmed S, Snow-Bailey K, Highsmith W, Sun W, Fenwick R, Mao R. Nine novel germline gene variants in the RET proto-oncogene identified in twelve unrelated cases. *J Mol Diagn.* 2005; 7: 283-8.
157. Vandenbosch K, Renard M, Uyttebroeck A, Sciote R, Matthijs G, Legius E. Medullary thyroid carcinoma in a child with a new RET mutation and a RET polymorphism. *Genet Couns.* 2005; 16: 95-100.
158. Eng C, Smith D, Mulligan L, et al. A novel point mutation in the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma and in a family with FMTC. *Oncogene.* 1995; 10: 509-13.
159. Berndt I, Reuter M, Saller B, et al. A new hot spot for mutations in the ret protooncogene causing familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2A. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 770-4.
160. Fink M, Weinhüsel A, Niederle B, Haas O. Distinction between sporadic and hereditary medullary thyroid carcinoma (MTC) by mutation analysis of the RET proto-oncogene. "Study Group Multiple Endocrine Neoplasia Austria (SMENA)". *Int J Cancer.* 1996; 69: 312-6.

161. Bolino A, Schuffenecker I, Luo Y, et al. RET mutations in exons 13 and 14 of FMTC patients. *Oncogene*. 1995; 10: 2415-9.
162. Hofstra R, Fattoruso O, Quadro L, et al. A novel point mutation in the intracellular domain of the ret protooncogene in a family with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82: 4176-8.
163. Hofstra R, Landsvater R, Ceccherini I, et al. A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature*. 1994; 367: 375-6.
164. Cascón A, Montero-Conde C, Ruiz-Llorente S, et al. Gross SDHB deletions in patients with paraganglioma detected by multiplex PCR: a possible hot spot? *Genes Chromosomes Cancer*. 2006; 45: 213-9.
165. Cascón A, Landa I, López-Jiménez E, et al. Molecular characterisation of a common SDHB deletion in paraganglioma patients. *J Med Genet*. 2008; 45: 233-8.
166. Amar L, Baudin E, Burnichon N, et al. Succinate Dehydrogenase B Gene Mutations Predict Survival in Patients with Malignant Pheochromocytomas or Paragangliomas. *J. Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92: 3822-8.
167. Neumann H, Pawlu C, Peczkowska M, et al. Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *JAMA*. 2004; 292: 943-51.
168. Bayley J, van Minderhout I, Weiss M, et al. Mutation analysis of SDHB and SDHC: novel germline mutations in sporadic head and neck paraganglioma and familial paraganglioma and/or pheochromocytoma. *BMC Med Genet*. 2006; 7: 1.
169. Pasini B, McWhinney S, Bei T, et al. Clinical and molecular genetics of patients with the Carney-Stratakis syndrome and germline mutations of the genes coding for the succinate dehydrogenase subunits SDHB, SDHC, and SDHD. *Eur J Hum Genet*. 2008; 16: 79-88.
170. Benn D, Crosson M, Tucker K, et al. Novel succinate dehydrogenase subunit B (SDHB) mutations in familial pheochromocytomas and paragangliomas, but an absence of somatic SDHB mutations in sporadic pheochromocytomas. *Oncogene*. 2003; 22: 1358-64.
171. Badenhop R, Jansen J, Fagan P, et al. 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: e99.
172. McDonnell C, Benn D, Marsh D, Robinson B, Zacharin M. K40E: a novel succinate dehydrogenase (SDH)B mutation causing familial pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004; 61: 510-4.
173. Gimenez-Roqueplo A, Favier J, Rustin P, et al. Functional consequences of a SDHB gene mutation in an apparently sporadic pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87: 4771-4.

174. Brouwers F, Eisenhofer G, Tao J, et al. High frequency of SDHB germline mutations in patients with malignant catecholamine-producing paragangliomas: implications for genetic testing. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91: 4505–9.
175. Bayley JP, Grimbergen AE, van Bunderen PA, et al. The first Dutch SDHB founder deletion in paraganglioma-pheochromocytoma patients. *BMC Med Genet.* 2009; 10: 34.
176. Castellano M, Mori L, Giacchè M, et al. Genetic mutation screening in an Italian cohort of nonsyndromic pheochromocytoma/paraganglioma patients. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1073: 156-65.
177. Lima J, Feijão T, Ferreira da Silva A, et al. High frequency of germline succinate dehydrogenase mutations in sporadic cervical paragangliomas in Northern Spain: mitochondrial succinate dehydrogenase structure-function relationships and clinical pathological correlations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92: 4853-64.
178. Mannelli M, Simi L, Ercolino T, et al. SDH mutations in patients affected by paraganglioma syndromes: a personal experience. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1073: 183-9.
179. Astuti D, Hart-Holden N, Latif F, et al. Genetic analysis of mitochondrial complex II subunits SDHD, SDHB and SDHC in paraganglioma and pheochromocytoma susceptibility. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003; 59: 728-33.
180. Pollard P, Briere J, Alam N, et al. Accumulation of Krebs cycle intermediates and overexpression of HIF1 α in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum Mol Genet.* 2005; 14: 2231-9.
181. Zantour B, Guilhaume B, Tissier F, et al. A thyroid nodule revealing a paraganglioma in a patient with a new germline mutation in the succinate dehydrogenase B gene. *Eur J Endocrinol.* 2004; 151: 433-8.
182. Maier-Woelfle M, Brändle M, Komminoth P, et al. A novel succinate dehydrogenase subunit B gene mutation, H132P, causes familial malignant sympathetic extraadrenal paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 362-7.
183. Srirangalingam U, Walker L, Khoo B, et al. Clinical manifestations of familial paraganglioma and pheochromocytomas in succinate dehydrogenase B (SDH-B) gene mutation carriers. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008; 69: 587-96.
184. Drucker A, Houlden R. A case of familial paraganglioma syndrome type 4 caused by a mutation in the SDHB gene. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2006; 2: 702-6.
185. Mora J, Cascón A, Robledo M, Catala A. Pediatric paraganglioma: an early manifestation of an adult disease secondary to germline mutations. *Pediatr Blood Cancer.* 2006; 47: 785-9.
186. Schiavi F, Boedeker C, Bausch B, et al. Predictors and prevalence of paraganglioma syndrome associated with mutations of the SDHC gene. *JAMA.* 2005; 294: 2057-63.

187. Fakhry N, Niccoli-Sire P, Barlier-Seti A, Giorgi R, Giovanni A, Zanaret M. Cervical paragangliomas: is SDH genetic analysis systematically required? *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2008; 265: 557-63.
188. Peczkowska M, Cascon A, Prejbisz A, et al. Extra-adrenal and adrenal pheochromocytomas associated with a germline SDHC mutation. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008; 4: 111-5.
189. Mannelli M, Ercolino T, Giachè V, Simi L, Cirami C, Parenti G. Genetic screening for pheochromocytoma: should SDHC gene analysis be included? *J Med Genet.* 2007; 44: 586-7.
190. Garrel R, Raynaud P, Raingeard I, et al. An unusual succinate dehydrogenase gene mutation C in a case of laryngeal paraganglioma. *J Laryngol Otol.* 2009; 123: 141-4.
191. López-Jiménez E, de Campos J, Kusak E, et al. SDHC mutation in an elderly patient without familial antecedents. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008; 69: 906-10.
192. Zbuk K, Patocs A, Shealy A, Sylvester H, Miesfeldt S. Germline mutations in PTEN and SDHC in a woman with epithelial thyroid cancer and carotid paraganglioma. *Nat Clin Pract Oncol.* 2007; 4: 608-12.
193. Niemann S, Müller U, Engelhardt D, Lohse P. Autosomal dominant malignant and catecholamine-producing paraganglioma caused by a splice donor site mutation in SDHC. *Hum Genet.* 2003; 113: 92-4.
194. Bauters C, Vantghem M, Leteurtre E, et al. Hereditary phaeochromocytomas and paragangliomas: a study of five susceptibility genes. *J Med Genet.* 2003; 40: e75.
195. Riemann K, Sotlar K, Kupka S, et al. Chromosome 11 monosomy in conjunction with a mutated SDHD initiation codon in nonfamilial paraganglioma cases. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004; 150: 128-35.
196. Cascón A, Pita G, Burnichon N, et al. Genetics of pheochromocytoma and paraganglioma in Spanish patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94: 1701-5.
197. Badenhop R, Cherian S, Lord R, Baysal B, Taschner P, Schofield P. Novel mutations in the SDHD gene in pedigrees with familial carotid body paraganglioma and sensorineural hearing loss. *Genes Chromosomes Cancer.* 2001; 31: 255-63.
198. Neumayer C, Moritz A, Asari R, et al. Novel SDHD germ-line mutations in pheochromocytoma patients. *Eur J Clin Invest.* 2007; 37: 544-51.
199. Gimm O, Armanios M, Dziema H, Neumann H, Eng C. Somatic and occult germ-line mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in nonfamilial pheochromocytoma. *Cancer Res.* 2000; 60: 6822-5.

200. Pappaspyrou K, Rossmann H, Fottner C, et al. Malignant paraganglioma caused by a novel germline mutation of the succinate dehydrogenase D-gene-a case report. *Head Neck*. 2008; 30: 964-9.
201. Taschner P, Jansen J, Baysal B, et al. Nearly all hereditary paragangliomas in the Netherlands are caused by two founder mutations in the SDHD gene. *Genes Chromosomes Cancer*. 2001; 31: 274-81.
202. Cascon A, Ruiz-Llorente S, Fraga M, et al. Genetic and epigenetic profile of sporadic pheochromocytomas. *J Med Genet*. 2004; 41: e30.
203. Cascon A, Ruiz-Llorente S, Cebrian A, et al. Identification of novel SDHD mutations in patients with pheochromocytoma and/or paraganglioma. *Eur J Hum Genet*. 2002; 10: 457-61.
204. Perren A, Barghorn A, Schmid S, et al. Absence of somatic SDHD mutations in sporadic neuroendocrine tumors and detection of two germline variants in paraganglioma patients. *Oncogene*. 2001; 21: 7605-8.
205. Velasco A, Palomar-Asenjo V, Gañan L, et al. Mutation analysis of the SDHD gene in four kindreds with familial paraganglioma: description of one novel germline mutation. *Diagn Mol Pathol*. 2005; 14: 109-14.
206. Timmers H, Pacak K, Bertherat J, et al. Mutations associated with succinate dehydrogenase D-related malignant paragangliomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008; 68: 561-6.
207. Dannenberg H, Dinjens W, Abbou M, et al. Frequent germ-line succinate dehydrogenase subunit D gene mutations in patients with apparently sporadic parasympathetic paraganglioma. *Clin Cancer Res*. 2002; 8: 2061-6.
208. Ogawa K, Shiga K, Saijo S, Ogawa T, Kimura N, Horii A. A novel G106D alteration of the SDHD gene in a pedigree with familial paraganglioma. *Am J Med Genet A*. 2006; 140: 2441-6.
209. Milunsky J, Maher T, Michels V, Milunsky A. Novel mutations and the emergence of a common mutation in the SDHD gene causing familial paraganglioma. *Am J Med Genet*. 2001; 100: 311-4.
210. Takahashi M, Yang XJ, McWhinney S, et al. cDNA microarray analysis assists in diagnosis of malignant intrarenal pheochromocytoma originally masquerading as a renal cell carcinoma. *J Med Genet*. 2005; 42: e48.
211. Leube B, Huber R, Goecke T, Sandmann W, Royer-Pokora B. SDHD mutation analysis in seven German patients with sporadic carotid body paraganglioma: one novel mutation, no Dutch founder mutation and further evidence that G12S is a polymorphism. *Clin Genet*. 2004; 65: 61-3.

ANEXO 1 – MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NO GENE *VHL*

Exão	Mutação ^(a)	Tipo de mutação	Alteração de aminoácido	Fenótipo ^(b)	Referência
1	c.42insA	Frameshift		VHL	Suzuki et al 1997 ⁹⁸
1	c.52G>A	Missense	Ala18Thr	VHL	Kishida et al 1995 ⁹⁹
1	c.74C>T	Missense	Pro25Leu	Feo	van der Harst et al 1998 ¹⁰⁰
1	c.136G>T	Nonsense	Glu46Term	VHL	Olschwang et al 1998 ²⁶
1	c.154G>A	Missense	Glu52Lys	VHL	Olschwang et al 1998 ²⁶
1	c.162delG	Frameshift		VHL	Chen et al 1995 ²⁷
1	c.162_166delGGAGG	Frameshift		VHL	Shuin et al 1994 ¹⁰¹
1	c.163delG	Frameshift		VHL	Chen et al 1995 ²⁷
1	c.164insG	Frameshift		VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
1	c.165G>A	Missense	Glu55Glu	VHL	Olschwang et al 1998 ²⁶
1	c.167insA	Frameshift		VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
1	c.175delC	Frameshift		VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
1	c.179delG	Frameshift		VHL	Olschwang et al 1998 ²⁶
1	c.180delG	Frameshift		VHL	Chen et al 1995 ²⁷
1	c.181delC	Frameshift		VHL	Bailly et al 1995 ¹⁰³
1	c.182_185delCCGT	Frameshift		VHL	Webster et al 1999 ⁹
1	c.183C>G	Missense	Pro61Pro	VHL	Bailly et al 1995 ¹⁰³
1	c.183delC	Frameshift		VHL	Shuin et al 1994 ¹⁰¹
1	c.184delG	Frameshift		VHL	Brauch et al 1999 ¹⁰⁴
1	c.187delC	Frameshift		VHL	Bailly et al 1995 ¹⁰³
1	c.188T>C	Missense	Leu63Pro	VHL	van der Harst et al 1998 ¹⁰⁰
1	c.189_192delGCGC	Frameshift		VHL	Whaley et al 1994 ¹⁰⁵
1	c.191G>C	Missense	Arg64Pro	VHL	van der Harst et al 1998 ¹⁰⁰
1	c.192delC	Frameshift		VHL	Shuin et al 1994 ¹⁰¹
1	c.193T>C	Missense	Ser65Pro	VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
1	c.194C>A	Nonsense	Ser65Term	VHL	Whaley et al 1994 ¹⁰⁵
1	c.194C>G	Missense	Ser65Trp	VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
1	c.194C>T	Missense	Ser65Leu	VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
1	c.196delG	Frameshift		VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
1	c.203C>A	Nonsense	Ser68Term	VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
1	c.203C>G	Missense	Ser68Trp	Feo	Martin et al 1998 ¹⁰⁷
1	c.205C>T	Missense	Arg69Cys	VHL	Brauch et al 1999 ¹⁰⁴
1	c.206_208delGCG	In-frame		VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
1	c.208G>A	Missense	Glu70Lys	VHL	Olschwang et al 1998 ²⁶
1	c.208G>T	Nonsense	Glu70Term	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
1	c.212insT	Frameshift		VHL	Olschwang et al 1998 ²⁶
1	c.214delT	Frameshift		VHL	Maher et al 1996 ¹⁰⁸
1	c.214T>C	Missense	Ser72Pro	VHL	Ong et al 2007 ³⁰

1	c.214_215delT	Frameshift		VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
1	c.214_218insGCCC	Frameshift		VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
1	c.215delC	Frameshift		VHL	Foster et al 1994 ¹⁰⁹
1	c.217C>T	Nonsense	Gln73Term	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
1	c.219delG	Frameshift		VHL	Suzuki et al 1997 ⁹⁸
1	c.221T>G	Missense	Val74Gly	VHL	Glavac et al 1996 ¹¹⁰
1	c.221_223delTCA	In-frame		VHL	Latif et al 1993 ¹³
1	c.224T>G	Missense	Ile75Ser	VHL	Ong et al 2007 ³⁰
1	c.224_226delTCT	In-frame		VHL	Whaley et al 1994 ¹⁰⁵
1	c.226T>A	Missense	Phe76Ile	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
1	c.226_228delTTC	In-frame		VHL	Kishida et al 1995 ⁹⁹
1	c.227T>C	Missense	Phe76Ser	VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
1	c.227insC	Frameshift		VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
1	c.227_229delTCT	In-frame		VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
1	c.229_231delTGC	In-frame		VHL	Webster et al 1999 ⁹
1	c.230delG	Frameshift		VHL	Kishida et al 1995 ⁹⁹
1	c.230_232delGCA	In-frame		VHL	Foster et al 1994 ¹⁰⁹
1	c.232A>C	Missense	Asn78His	VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
1	c.233A>C	Missense	Asn78Thr	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
1	c.233A>G	Missense	Asn78Ser	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
1	c.233A>T	Missense	Asn78Ile	VHL	Neumann et al 1998 ¹¹¹
1	c.233insTCT	In-frame		VHL	Kishida et al 1995 ⁹⁹
1	c.236G>C	Missense	Arg79Pro	VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
1	c.238A>C	Missense	Ser80Arg	VHL	Olschwang et al 1998 ²⁶
1	c.238A>G	Missense	Ser80Gly	Feo	Woodward et al 1997 ¹¹²
1	c.239delG	Frameshift		VHL	Kishida et al 1995 ⁹⁹
1	c.239G>A	Missense	Ser80Asn	VHL	Zbar et al 1996 ²⁸
1	c.239G>T	Missense	Ser80Ile	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
1	c.240T>A	Missense	Ser80Arg	VHL	Foster et al 1994 ¹⁰⁹
1	c.240T>G	Missense	Ser80Arg	VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
1	c.241C>T	Missense	Pro81Ser	VHL	CRG ¹¹³
1	c.242delC	Frameshift		VHL	Foster et al 1994 ¹⁰⁹
1	c.243_251delGCGCGTTCGT	In-frame		VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
1	c.244C>T	Missense	Arg82Cys	VHL	Whaley et al 1994 ¹⁰⁵
1	c.244delC	Frameshift		VHL	Shuin et al 1994 ¹⁰¹
1	c.245G>C	Missense	Arg82Pro	VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
1	c.250G>T	Missense	Val84Leu	Feo	Crossey et al 1995 ¹¹⁴
1	c.250G>A	Missense	Val84Met	Feo	Stanojevic et al 2007 ¹¹⁵
1	c.254T>C	Missense	Leu85Pro	VHL	Bailly et al 1995 ¹⁰³
1	c.255insC	Frameshift		VHL	Chen et al 1995 ²⁷
1	c.256C>G	Missense	Pro86Ala	VHL	Chen et al 1995 ²⁷

1	c.256C>T	Missense	Pro86Ser	VHL	Whaley et al 1994 ¹⁰⁵
1	c.257C>A	Missense	Pro86His	VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
1	c.257C>G	Missense	Pro86Arg	VHL	Stolle et al 1998 ¹¹⁶
1	c.257C>T	Missense	Pro86Leu	VHL	Kishida et al 1995 ⁹⁹
1	c.258_259delCG	Frameshift		VHL	Shuin et al 1994 ¹⁰¹
1	c.260_262delTAT	In-frame		VHL	Brauch et al 1999 ¹⁰⁴
1	c.262T>A	Missense	Trp88Arg	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
1	c.262T>C	Missense	Trp88Arg	VHL	Rocha et al 2003 ¹¹⁷
1	c.263G>A	Nonsense	Trp88Term	VHL	Webster et al 1999 ⁹
1	c.263G>C	Missense	Trp88Ser	VHL	Kanno et al 1994 ¹¹⁸
1	c.263G>T	Missense	Trp88Leu	VHL	Whaley et al 1994 ¹⁰⁵
1	c.264G>A	Nonsense	Trp88Term	VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
1	c.266T>A	Missense	Leu89His	VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
1	c.266T>C	Missense	Leu89Pro	VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
1	c.266T>G	Missense	Leu89Arg	VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
1	c.268A>T	Missense	Asn90Tyr	VHL	Foster et al 1994 ¹⁰⁹
1	c.272T>A	Nonsense	Phe91Term	VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
1	c.273C>A	Nonsense	Phe91Term	VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
1	c.273C>G	Missense	Phe91Leu	VHL	Olschwang et al 1998 ²⁶
1	c.274G>A	Missense	Asp92Asn	VHL	Suzuki et al 1997 ⁹⁸
1	c.275delA	Frameshift		VHL	Gallou et al 1999 ³¹
1	c.277delG	Frameshift		VHL	Whaley et al 1994 ¹⁰⁵
1	c.277G>A	Missense	Gly93Ser	VHL	Glavac et al 1996 ¹¹⁰
1	c.278G>A	Missense	Gly93Asp	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
1	c.279delC	Frameshift		VHL	Moore et al 2000 ¹¹⁹
1	c.280G>T	Nonsense	Glu94Term	VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
1	c.286C>T	Nonsense	Gln96Term	VHL	Stolle et al 1998 ¹¹⁶
1	c.286insT	Frameshift		VHL	Bailly et al 1995 ¹⁰³
1	c.287A>C	Missense	Gln96Pro	VHL	Maher et al 1996 ¹⁰⁸
1	c.287_289delAGC	In-frame		VHL	Kishida et al 1995 ⁹⁹
1	c.288_290delGCC	In-frame		VHL	Kishida et al 1995 ⁹⁹
1	c.292T>A	Missense	Tyr98Asn	VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
1	c.292T>C	Missense	Tyr98His	VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
1	c.294delC	Frameshift		VHL	Gallou et al 1999 ³¹
1	c.296insCAA	Frameshift		VHL	Shuin et al 1994 ¹⁰¹
1	c.298A>G	Missense	Thr98Ala	VHL	Bailly et al 1995 ¹⁰³
1	c.302T>G	Missense	Leu101Arg	VHL	Zbar et al 1996 ²⁸
1	c.305delC	Frameshift		VHL	Rocha et al 2003 ¹¹⁷
1	c.307_311delCCTGG	Frameshift		VHL	Foster et al 1994 ¹⁰⁹
1	c.309delT	Frameshift		VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
1	c.309_310delTG	Frameshift		VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²

1	c.310delG	Frameshift		VHL	Whaley et al 1994 ¹⁰⁵
1	c.311G>C	Missense	Gly104Ala	VHL	Olschwang et al 1998 ²⁶
1	c.312C>G	Missense	Gly104Gly	VHL	Olschwang et al 1998 ²⁶
1	c.312delC	Frameshift		VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
1	c.313A>C	Missense	Thr105Pro	VHL	Stolle et al 1998 ¹¹⁶
1	c.316insAC	Frameshift		VHL	Olschwang et al 1998 ²⁶
1	c.317G>A	Missense	Gly106Asp	VHL	Sekido et al 1994 ¹²⁰
1	c.317G>C	Missense	Gly106Ala	VHL	Suzuki et al 1997 ⁹⁸
1	c.320delG	Frameshift		VHL	Suzuki et al 1997 ⁹⁸
1	c.320G>C	Missense	Arg107Pro	VHL	Stolle et al 1998 ¹¹⁶
1	c.320C>G	Missense	Arg107Gly	Feo	Neumann et al 2002 ³
1	c.322delC	Frameshift		VHL	Brauch et al 1999 ¹⁰⁴
1	c.323_324delGC	Frameshift		VHL e Feo	Kang et al 2005 ¹²¹
1	c.327delC	Frameshift		VHL	Gallou et al 1999 ³¹
1	c.328insTT	Frameshift		VHL	Kishida et al 1995 ⁹⁹
1	c.331A>G	Missense	Ser111Gly	VHL	Whaley et al 1994 ¹⁰⁵
1	c.331delA	Frameshift		VHL	Chen et al 1995 ²⁷
1	c.332G>A	Missense	Ser111Asn	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
1	c.333C>A	Missense	Ser111Arg	VHL	Webster et al 1999 ⁹
1	c.333C>G	Missense	Ser111Arg	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
1	c.334T>A	Missense	Tyr112Asn	VHL	Bradley et al 1999 ¹²²
1	c.334T>C	Missense	Tyr112His	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
1	c.336C>A	Nonsense	Tyr112Term	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
1	c.337C>T	Nonsense	Arg113Term	VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
1	c.337delC	Frameshift		VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
1	c.340G>A	Missense	Gly114Ser	VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
1	c.340G>C	Missense	Gly114Arg	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
1	c.340G>T	Missense	Gly114Cys	VHL	Foster et al 1994 ¹⁰⁹
1-2	c.340+1G>A	Splice site		VHL	Olschwang et al 1998 ²⁶
1-2	c.340+5G>C	Splice site		VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
1-2	c.340+8C>T	Splice site		VHL	Brauch et al 1999 ¹⁰⁴
1-2	c.341-1G>C	Splice site		VHL	Olschwang et al 1998 ²⁶
1-2	341-2A>C	Splice site		VHL	Ong et al 2007 ³⁰
2	c.342dupGGT	In-frame		VHL	Onge et al 2007 ⁸⁰
2	c.343C>T	Missense	His115Tyr	VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
2	c.344A>G	Missense	His115Arg	VHL	Glavac et al 1996 ¹¹⁰
2	c.344A>C	Missense	His115Pro	VHL	Ong et al 2007 ³⁰
2	c.344delA	Frameshift		VHL	Shuin et al 1994 ¹⁰¹
2	c.345C>A	Missense	His115Gln	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
2	c.345C>G	Missense	His115Gln	VHL	Olschwang et al 1998 ²⁶
2	c.345delC	Frameshift		VHL	Brieger et al 1999 ¹²³

2	c.346C>G	Missense	Leu116Val	VHL	Maher et al 1996 ¹⁰⁸
2	c.349T>A	Missense	Trp117Arg	VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
2	c.350delG	Frameshift		VHL	Brieger et al 1999 ¹²³
2	c.350G>A	Nonsense	Trp117Term	VHL	Bailly et al 1995 ¹⁰³
2	c.351G>A	Nonsense	Trp117Term	VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
2	c.351G>T	Missense	Trp117Cys	VHL	Stolle et al 1998 ¹¹⁶
2	c.352insA	Frameshift		VHL	Chen et al 1995 ²⁷
2	c.353T>C	Missense	Leu118Pro	VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
2	c.353T>G	Missense	Leu118Arg	VHL	Maher et al 1996 ¹⁰⁸
2	c.355T>C	Missense	Phe119Leu	VHL e Feo	Kang et al 2005 ¹²¹
2	c.356T>C	Missense	Phe119Ser	Feo	Eng et al 1995 ¹²⁴
2	c.357C>G	Missense	Phe119Leu	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
2	c.358_361delAGAG	Frameshift		VHL	Shuin et al 1994 ¹⁰¹
2	c.359delG	Frameshift		VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
2	c.361delG	Frameshift		VHL	Maher et al 1996 ¹⁰⁸
2	c.361G>A	Missense	Asp121Asn	VHL e Feo	Kang et al 2005 ¹²¹
2	c.362A>G	Missense	Asp121Gly	VHL	Whaley et al 1994 ¹⁰⁵
2	c.363T>C	Missense	Asp121Asp	VHL	Vortmeyer et al 1997 ¹²⁵
2	c.363T>G	Missense	Asp121Glu	VHL	Foster et al 1994 ¹⁰⁹
2	c.367delG	Frameshift		VHL	Webster et al 1999 ⁹
2	c.369_375delGACA	Frameshift		VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
2	c.371C>T	Missense	Thr124Ile	VHL	Rocha et al 2003 ¹¹⁷
2	c.374dupA	Frameshift		VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
2	c.377A>G	Missense	Asp126Gly	VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
2	c.378delT	Frameshift		VHL	Brieger et al 1999 ¹²³
2	c.381delG	Frameshift		VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
2	c.381G>T	Missense	Gly127Gly	VHL	Zbar et al 1996 ²⁸
2	c.382C>T	Missense	Leu128Phe	VHL	Zbar et al 1996 ²⁸
2	c.382delC	Frameshift		VHL	Brauch et al 1999 ¹⁰⁴
2	c.383T>G	Missense	Leu128Arg	VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
2	c.384delT	Frameshift		VHL	Zbar et al 1996 ²⁸
2	c.386insAGA	Frameshift		VHL	Chen et al 1995 ²⁷
2	c.388G>C	Missense	Val130Leu	VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
2	c.388G>T	Missense	Val130Phe	VHL	Rocha et al 2003 ¹¹⁷
2	c.390_391delTA	Frameshift		VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
2	c.392A>C	Missense	Asn131Thr	VHL	Stolle et al 1998 ¹¹⁶
2	c.393C>A	Missense	Asn131Lys	VHL	Olschwang et al 1998 ²⁶
2	c.394C>T	Nonsense	Gln132Term	VHL	Zbar et al 1996 ²⁸
2	c.395delA	Frameshift		VHL	Bailly et al 1995 ¹⁰³
2	c.395A>C	Missense	Gln132Pro	VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
2	c.395_396delAA	Frameshift		VHL	Whaley et al 1994 ¹⁰⁵

2	c.396A>C	Missense	Gln132His	VHL	Lee et al 1998 ¹²⁶
2	c.397A>T	Missense	Thr133Ser	VHL	Foster et al 1994 ¹⁰⁹
2	c.397_400delACTG	Frameshift		VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
2	c.400G>T	Nonsense	Glu134Term	VHL	Lemm et al 1999 ¹²⁷
2	c.402insT	Frameshift		VHL	Foster et al 1994 ¹⁰⁹
2	c.404T>A	Nonsense	Leu135Term	VHL	Whaley et al 1994 ¹⁰⁵
2	c.404delT	Frameshift		VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
2	c.405A>C	Missense	Leu135Phe	VHL	Kanno et al 1994 ¹¹⁸
2	c.405delA	Frameshift		VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
2	c.406delT	Frameshift		VHL	Brauch et al 1999 ¹⁰⁴
2	c.406T>A	Missense	Phe136Ile	VHL	Shuin et al 1994 ¹⁰¹
2	c.407T>C	Missense	Phe136Ser	VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
2	c.407T>G	Missense	Phe136Cys	VHL	Whaley et al 1994 ¹⁰⁵
2	c.413C>G	Missense	Pro138Arg	VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
2	c.414delA	Frameshift		VHL	Foster et al 1994 ¹⁰⁹
2	c.417_418delTC	Frameshift		VHL	Olschwang et al 1998 ²⁶
2	c.418delC	Frameshift		VHL	Zhuang et al 1996 ¹²⁸
2	c.419delT	Frameshift		VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
2	c.421delA	Frameshift		VHL	Maher et al 1996 ¹⁰⁸
2	c.421_422delAA	Frameshift		VHL	Oberstrass et al 1996 ¹²⁹
2	c.423delT	Frameshift		VHL	Foster et al 1994 ¹⁰⁹
2	c.426_429delTGAC	Frameshift		VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
2	c.429C>G	Missense	Asp143Glu	VHL	Eng et al 1995 ¹²⁴
2	c.429delC	Frameshift		VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
2	c.430_433delGGAC	Frameshift		VHL	Oberstrass et al 1996 ¹²⁹
2	c.431delG	Frameshift		VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
2	c.431G>A	Missense	Gly144Glu	Feo	van der Harst et al 1998 ¹⁰⁰
2	c.431G>C	Missense	Gly144Ala	VHL	Lee et al 1998 ¹²⁶
2	c.433C>T	Nonsense	Gln45Term	VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
2	c.435_436delGC	Frameshift		VHL	Whaley et al 1994 ¹⁰⁵
2	c.436delC	Frameshift		VHL	Foster et al 1994 ¹⁰⁹
2	c.440T>C	Missense	Ile147Thr	Feo	van der Harst et al 1998 ¹⁰⁰
2	c.442delT	Frameshift		VHL	Brauch et al 1999 ¹⁰⁴
2	c.445G>A	Missense	Ala149Thr	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
2	c.445G>C	Missense	Ala149Pro	VHL	Foster et al 1994 ¹⁰⁹
2	c.446delC	Frameshift		VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
2	c.448delA	Frameshift		VHL	Chen et al 1995 ²⁷
2	c.450delT	Frameshift		VHL	Kanno et al 1994 ¹¹⁸
2	c.450T>A	Missense	Asn150Lys	VHL	Brieger et al 1999 ¹²³
2	c.452T>G	Missense	Ile151Ser	VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
2	c.452T>C	Missense	Ile151Thr	VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰

2	c.453C>G	Missense	Ile151Met	VHL	Whaley et al 1994 ¹⁰⁵
2	c.455insA	Frameshift		VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
2	c.457delC	Frameshift		VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
2	c.458T>C	Missense	Leu153Pro	VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
2	c.461C>T	Missense	Pro154Leu	VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
2	c.462A>C	Missense	Pro154Pro	VHL	Olschwang et al 1998 ²⁶
2	c.462delA	Frameshift		VHL	Chen et al 1995 ²⁷
2	c.463G>A	Missense	Val155Met	VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
2	c.463G>T	Missense	Val155Leu	VHL	Neumann et al 1998 ¹¹¹
2	c.464T>A	Missense	Val155Glu	VHL	Ong et al 2007 ³⁰
2-3	c.463+1G>C	Splice site		VHL	Glavac et al 1996 ¹¹⁰
2-3	c.463+3A>T	Splice site		VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
2-3	c.463+7A>T	Splice site		VHL	van der Harst et al 1998 ¹⁰⁰
2-3	c.464-1G>C	Splice site		VHL	Oberstrass et al 1996 ¹²⁹
2-3	c.464-1G>T	Splice site		VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
2-3	c.464-1G>C	Splice site		VHL	Ong et al 2007 ³⁰
2-3	c.464-2A>G	Splice site		VHL	Glavac et al 1996 ¹¹⁰
2-3	c.464-2A>T	Splice site		VHL	Glavac et al 1996 ¹¹⁰
3	c.466T>G	Missense	Tyr156Asp	VHL	Olschwang et al 1998 ²⁶
3	c.466_467delTA	Frameshift		VHL	Suzuki et al 1997 ⁹⁸
3	c.467A>G	Missense	Tyr156Cys	VHL	Olschwang et al 1998 ²⁶
3	c.468T>G	Nonsense	Tyr156Term	VHL	Kishida et al 1995 ⁹⁹
3	c.468_471delTACT	Frameshift		VHL	Suzuki et al 1997 ⁹⁸
3	c.469delA	Frameshift		VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
3	c.470C>T	Missense	Thr157Ile	VHL	Kishida et al 1995 ⁹⁹
3	c.472C>G	Missense	Leu158Val	VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
3	c.472insTTT	In-frame		VHL	Zbar et al 1996 ²⁸
3	c.472_473delCT	Frameshift		VHL	Brauch et al 1999 ¹⁰⁴
3	c.473T>A	Missense	Leu158Gln	VHL	Suzuki et al 1997 ⁹⁸
3	c.473T>C	Missense	Leu158Pro	VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
3	c.474_476delGAAinsC	Frameshift		VHL	Ong et al 2007 ³⁰
3	c.475A>G	Missense	Lys159Glu	VHL	Zbar et al 1996 ²⁸
3	c.477delA	Frameshift		VHL	Stolle et al 1998 ¹¹⁶
3	c.478G>T	Nonsense	Glu160Term	VHL	Whaley et al 1994 ¹⁰⁵
3	c.481C>G	Missense	Arg161Gly	VHL	Kishida et al 1995 ⁹⁹
3	c.481C>T	Nonsense	Arg161Term	VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
3	c.482G>A	Missense	Arg161Gln	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
3	c.482G>C	Missense	Arg161Pro	VHL	Zbar et al 1996 ²⁸
3	c.484T>C	Missense	Cys162Arg	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
3	c.485G>A	Missense	Cys162Tyr	VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
3	c.485G>T	Missense	Cys162Phe	VHL	Chen et al 1995 ²⁷

3	c.486C>G	Missense	Cys162Trp	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
3	c.488delT	Frameshift		VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
3	c.490C>T	Nonsense	Gln164Term	VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
3	c.491A>G	Missense	Gln164Arg	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
3	c.496G>T	Missense	Val166Phe	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
3	c.497T>A	Missense	Val166Asp	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
3	c.497_501delTCCGG	Frameshift		VHL	Foster et al 1994 ¹⁰⁹
3	c.498delC	Frameshift		VHL	Shuin et al 1994 ¹⁰¹
3	c.498A>G	Missense	Val166Phe	VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
3	c.499C>G	Missense	Arg167Gly	VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
3	c.499C>T	Missense	Arg197Trp	VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
3	c.500G>A	Missense	Arg197Gln	VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
3	c.502insTTGTTCGT	Frameshift		VHL	Chen et al 1995 ²⁷
3	c.506T>C	Missense	Leu169Pro	VHL	Suzuki et al 1997 ⁹⁸
3	c.508G>T	Missense	Val170Phe	VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
3	c.509delT	Frameshift		VHL	Shuin et al 1994 ¹⁰¹
3	c.509T>A	Missense	Val170Asp	VHL	Kishida et al 1995 ⁹⁹
3	c.509T>G	Missense	Val170Gly	VHL	Kishida et al 1995 ⁹⁹
3	c.509T>C	Missense	Val170Gly	VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
3	c.510insA	Frameshift		VHL	Foster et al 1994 ¹⁰⁹
3	c.513G>C	Missense	Lys171Asn	VHL	Lemm et al 1999 ¹²⁷
3	c.514delC	Frameshift		VHL	Oberstrass et al 1996 ¹²⁹
3	c.520delA	Frameshift		VHL	Bailly et al 1995 ¹⁰³
3	c.523delT	Frameshift		VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
3	c.523T>G	Missense	Tyr175Asp	VHL	Stolle et al 1998 ¹¹⁶
3	c.524delA	Frameshift		VHL	Latif et al 1993 ¹³
3	c.525C>G	Nonsense	Tyr175Term	VHL	Kishida et al 1995 ⁹⁹
3	c.525delC	Frameshift		VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
3	c.526delA	Frameshift		VHL	Chen et al 1995 ²⁷
3	c.528delG	Frameshift		VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
3	c.529A>T	Nonsense	Arg177Term	VHL	Whaley et al 1994 ¹⁰⁵
3	c.532ins18	In-frame		VHL	Olschwang et al 1998 ²⁶
3	c.533T>A	Missense	Leu178Gln	VHL	Zbar et al 1996 ²⁸
3	c.533T>C	Missense	Leu178Pro	VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
3	c.533T>G	Missense	Leu178Arg	VHL	Webster et al 1999 ⁹
3	c.535delG	Frameshift		VHL	Suzuki et al 1997 ⁹⁸
3	c.536delA	Frameshift		VHL	Foster et al 1994 ¹⁰⁹
3	c.538A>G	Missense	Ile180Val	VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
3	c.539T>A	Missense	Ile180Asn	VHL	Whaley et al 1994 ¹⁰⁵
3	c.540delC	Frameshift		VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
3	c.540_543delCGTC	Frameshift		VHL	Stolle et al 1998 ¹¹⁶

3	c.548C>A	Nonsense	Ser183Term	VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
3	c.551T>C	Missense	Leu184Pro	VHL	Bailly et al 1995 ¹⁰³
3	c.551T>G	Missense	Leu184Arg	VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
3	c.553delT	Frameshift		VHL	Shuin et al 1994 ¹⁰¹
3	c.554delA	Frameshift		VHL	Suzuki et al 1997 ⁹⁸
3	c.555C>G	Nonsense	Tyr185Term	VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
3	c.556G>A	Missense	Glu186Lys	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
3	c.556G>T	Nonsense	Glu186Term	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
3	c.558_560delAGA	In-frame		VHL	Maher et al 1996 ¹⁰⁸
3	c.559insC	Frameshift		VHL	Shuin et al 1994 ¹⁰¹
3	c.562C>G	Missense	Leu188Val	VHL	Kishida et al 1995 ⁹⁹
3	c.562delC	Frameshift		VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
3	c.563delT	Frameshift		VHL	Maher et al 1996 ¹⁰⁸
3	c.563T>A	Missense	Leu188Gln	VHL	Chen et al 1995 ²⁷
3	c.563T>C	Missense	Leu188Pro	Feo	Stolle et al 1998 ¹¹⁶
3	c.565delG	Frameshift		VHL	Suzuki et al 1997 ⁹⁸
3	c.571delC	Frameshift		VHL	Kishida et al 1995 ⁹⁹
3	c.573delC	Frameshift		VHL	Zbar et al 1996 ²⁸
3	c.578delA	Frameshift		VHL	Foster et al 1994 ¹⁰⁹
3	c.579_580delTG	Frameshift		VHL	Whaley et al 1994 ¹⁰⁵
3	c.581_582delTG	Frameshift		VHL	Foster et al 1994 ¹⁰⁹
3	c.582G>T	Missense	Val194Val	VHL	Brauch et al 1999 ¹⁰⁴
3	c.583C>T	Nonsense	Gln195Term	VHL	Crossey et al 1994 ¹⁰²
3	c.584_585delAG	Frameshift		VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
3	c.589delG	Frameshift		VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
3	c.593T>G	Missense	Leu198Arg	VHL	Whaley et al 1994 ¹⁰⁵
3	c.598C>T	Missense	Arg200Trp	VHL	Kishida et al 1995 ⁹⁹
3	c.606dupA	Frameshift		VHL	Ong et al 2007 ⁸⁰
3	c.607delC	Frameshift		VHL	Gnarra et al 1994 ¹⁰⁶
3	c.620C>T	Missense	Ala207Val	VHL	Kanno et al 1997 ¹³⁰
3	c.628C>T	Missense	Arg210Trp	VHL	Kanno et al 1997 ¹³⁰

(a) - Número dos nucleotídeos baseado na sequência de cDNA, de acordo com *den Dunnen et al* (2001)¹³¹

(b) - VHL: síndrome von Hippel-Lindau; Feo: feocromocitoma; Feo: feocromocitoma

A negrito encontram-se representadas as mutações referidas como germinais.

ANEXO 2 - MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NO GENE *RET*

Exão	Mutação^(a)	Tipo de mutação	Alteração de aminoácido	Fenótipo^(b)	Referência
5	c.961G>A	Missense	Gly321Arg	CMT	Dvorakova et al 2005 ¹³²
8	c.1585_1593dupGAGGAGTGT	In-frame		CMT	Pigny et al 1999 ¹³³
8	c.1597G>T	Missense	Gly533Cys	MEN2A e CMT	da Silva et al 2003 ¹³⁴
10	c.1807A>C	Missense	Lys603Gln	CMT	Rey et al 2001 ¹³⁵
10	c.1825T>C	Missense	Cys609Arg	MEN2A e CMT	Kambouris et al 1996 ¹³⁶
10	c.1825T>G	Missense	Cys609Gly	MEN2A	Frank-Raue et al 1996 ¹³⁷
10	c.1826G>A	Missense	Cys609Tyr	MEN2A e CMT	Mulligan et al 1994 ¹³⁸
10	c.1826G>C	Missense	Cys609Ser	MEN2A	Klein et al 2001 ¹³⁹
10	c.1831T>A	Missense	Cys611Ser	MEN2A	Kambouris et al 1996 ¹³⁶
10	c.1831T>C	Missense	Cys611Arg	MEN2A	Kambouris et al 1996 ¹³⁶
10	c.1831T>G	Missense	Cys611Gly	CMT	Oriola et al 1998 ¹⁴⁰
10	c.1832G>A	Missense	Cys611Tyr	MEN2A e CMT	Mulligan et al 1994 ¹³⁸
10	c.1832G>T	Missense	Cys611Phe	CMT	Frank-Raue et al 1996 ¹³⁷
10	c.1833C>G	Missense	Cys611Trp	MEN2A e CMT	Donis-Keller et al 1993 ¹⁴¹
10	c.1852T>A	Missense	Cys618Ser	MEN2A e CMT	Donis-Keller et al 1993 ¹⁴¹
10	c.1852T>C	Missense	Cys618Arg	MEN2A e CMT	Donis-Keller et al 1993 ¹⁴¹
10	c.1852T>G	Missense	Cys618Gly	MEN2A	Mulligan et al 1993 ¹⁴²
10	c.1853G>A	Missense	Cys618Tyr	MEN2A e CMT	Donis-Keller et al 1993 ¹⁴¹
10	c.1853G>C	Nonsense	Cys618Term	MEN2A e CMT	Xue et al 1994 ¹⁴³
10	c.1853G>T	Missense	Cys618Phe	MEN2A e CMT	Wells et al 1994 ¹⁴⁴
10	c.1858T>A	Missense	Cys620Ser	MEN2A	Blaugrund et al 1994 ¹⁴⁵
10	c.1858T>C	Missense	Cys620Arg	MEN2A e CMT	Donis-Keller et al 1993 ¹⁴¹
10	c.1858T>G	Missense	Cys620Gly	MEN2A	Kitamura et al 1997 ¹⁴⁶
10	c.1859G>A	Missense	Cys620Tyr	MEN2A e CMT	Donis-Keller et al 1993 ¹⁴¹
10	c.1859G>C	Missense	Cys620Ser	MEN2A e CMT	Schuffenecker et al 1994 ¹⁴⁷
10	c.1859G>T	Missense	Cys620Phe	MEN2A e CMT	Dvorakova et al 2006 ¹⁴⁸
10	c.1860C>G	Missense	Cys620Trp	MEN2A	Siegelman et al 1997 ¹⁴⁹
11	c.1888T>C	Missense	Cys630Arg	MEN2A e CMT	Machens et al 2003 ¹⁵⁰
11	c.1889G>A	Missense	Cys630Tyr	MEN2A	Kitamura et al 1997 ¹⁴⁶
11	c.1889G>T	Missense	Cys630Phe	CMT	Komminoth et al 1995 ¹⁵¹
11	c.1891G>T	Missense	Asp631Tyr	MEN2A	Beldjord et al 1995 ¹⁵²
11	c.1896_1900delinsCGTGC	In-frame		MEN2A	Mulligan et al 1993 ¹⁴²

11	c.1900T>A	Missense	Cys634Ser	MEN2A	Mulligan et al 1994 ¹³⁸
11	c.1900T>C	Missense	Cys634Arg	MEN2A e CMT	Donis-Keller et al 1993 ¹⁴¹
11	c.1900T>G	Missense	Cys634Gly	MEN2A	Mulligan et al 1993 ¹⁴²
11	c.1901G>A	Missense	Cys634Tyr	MEN2A e CMT	Mulligan et al 1993 ¹⁴²
11	c.1901G>C	Missense	Cys634Ser	MEN2A e CMT	Mulligan et al 1993 ¹⁴²
11	c.1901G>T	Missense	Cys634Phe	MEN2A e CMT	Mulligan et al 1993 ¹⁴²
11	c.1901_1902delinsTG	In-frame		MEN2A	Amar et al 2005 ¹⁵³
11	c.1902C>G	Missense	Cys634Trp	MEN2A e CMT	Mulligan et al 1994 ¹³⁸
11	c.1892_1903dupACGAGCTGTGCC	In-frame		MEN2A	Hoepfner et al 1997 ¹⁵⁴
11	c.1900_1908dupTGCCGCACG	In-frame		MEN2A	Hoepfner et al 1998 ¹⁵⁵
11	c.1996A>G	Missense	Ly666Glu	MEN2A	Ahmed et al 2005 ¹⁵⁶
11	c.1998delinsTTCT	In-frame		MEN2A	VandenBosch et al 2005 ¹⁵⁷
13	c.2304G>C	Missense	Glu768Asp	MEN2A e CMT	Eng et al 1995 ¹⁵⁸
13	c.2370G>C	Missense	Leu790Phe	MEN2A e CMT	Berndt et al 1998 ¹⁵⁹
13	c.2370G>T	Missense	Leu790Phe	MEN2A e CMT	Berndt et al 1998 ¹⁵⁹
13	c.2372A>T	Missense	Tyr791Phe	MEN2A e CMT	Berndt et al 1998 ¹⁵⁹
14	c.2410G>A	Missense	Val804Met	MEN2A e CMT	Fink et al 1996 ¹⁶⁰
14	c.2410G>T	Missense	Val804Leu	MEN2A e CMT	Bolino et al 1995 ¹⁶¹
15	c.2647_2648delinsTT	In-frame		MEN2B	Smith et al 1997 ⁵⁴
15	c.2671T>G	Missense	Ser891Ala	MEN2A e CMT	Hofstra et al 1997 ¹⁶²
16	c.2753T>C	Missense	Met918Thr	MEN2B	Hofstra et al 1994 ¹⁶³

(a) - Número do nucleotido baseado na sequência de cDNA, de acordo com *den Dunnen et al* (2001)¹³¹

(b) - MEN2A: neoplasia endócrina múltipla tipo 2A; MEN2B: neoplasia endócrina múltipla tipo 2B; CMT: carcinoma medular da tireóide familiar.

As mutações associadas ao carcinoma medular familiar da tireóide foram incluídas nesta tabela devido à possibilidade deste carcinoma poder representar a primeira manifestação da síndrome MEN2.

A negrito encontram-se representadas as mutações que ocorrem nos códons, descritos na literatura, como os que com mais frequência estão envolvidos na síndrome MEN 2.

ANEXO 3 - MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NO GENE *SDHB*

Exão	Mutação ^(a)	Tipo de mutação	Alteração de aminoácido	Fenótipo ^(b)	Referência
1	c.1-10413_73-3866del	Deleção extensa		Para	Cascon et al 2006 ¹⁶⁴
1	c.1-16418_73-5173del	Deleção extensa		Para	Cascon et al 2008 ¹⁶⁵
1	c.17_35del19	Frameshift		Feo e Para	Amar et al 2007 ¹⁶⁶
1	c.21delC	Frameshift		Feo	Neumann et al 2004 ¹⁶⁷
1	c.24C>T	Missense	Ser8Ser	Feo e Para	Bayley et al 2006 ¹⁶⁸
1	c.45_46insCC	Frameshift		Para	Pasini et al 2008 ¹⁶⁹
1-2	c.72+1G>T	Splice site		Feo	Benn et al 2006 ⁷⁷
1-2	c.73-29delT	Splice site		Feo	Benn et al 2003 ¹⁷⁰
2	c.79delC	Frameshift		Para	Badenhop et al 2004 ¹⁷¹
2	c.87_88insCAG	In-frame		Feo	Neumann et al 2002 ³
2	c.88delC	Frameshift		Feo	Benn et al 2003 ¹⁷⁰
2	c.118A>G	Missense	Lys40Glu	Feo e Para	McDonnell et al 2004 ¹⁷²
2	c.127G>C	Missense	Ala43Pro	Feo	Gimenez-Roqueplo et al 2003 ⁸⁰
2	c.136C>G	Missense	Arg46Gly	Feo	Neumann et al 2002 ³
2	c.136C>T	Nonsense	Arg46Term	Feo	Benn et al 2003 ¹⁷⁰
2	c.137G>A	Missense	Arg46Gln	Feo	Gimenez-Roqueplo et al 2002 ¹⁷³
2	c.141G>A	Nonsense	Trp47Term	Feo e Para	Bayley et al 2006 ¹⁶⁸
2	c.157G>A	Missense	Gly53Arg	Feo	Neumann et al 2004 ¹⁷⁸
2	c.166_170delCCTCA	Frameshift		Feo	Neumann et al 2004 ¹⁶⁷
2	c.167C>T	Missense	Pro56Leu	Feo	Benn et al 2006 ⁷⁷
2	c.174_175delinsTT	In-frame		Para	Baysal et al 2002 ⁸³
2	c.194T>A	Missense	Leu65His	Feo	Benn et al 2003 ¹⁷⁰
2	c.194T>C	Missense	Leu65Pro	Feo	Neumann et al 2004 ¹⁶⁷
2-3	c.200+3G>C	Splice site		Feo	Benn et al 2003 ¹⁷⁰
2-3	c.201-5A>G	Splice site		Para	Brouwers et al 2006 ¹⁷⁴
2-3	c.201-4429_287-933del	Deleção extensa		Feo e Para	Bayley et al 2009 ¹⁷⁵
3	c.260T>C	Missense	Leu87Ser	Feo	Astuti et al 2001 ⁶⁴
3	c.268C>T	Nonsense	Arg90Term	Feo e Para	Astuti et al 2001 ⁶⁴
3	c.269G>A	Missense	Arg90Gln	Feo e Para	Castellano et al 2006 ¹⁷⁶
3	c.277T>C	Missense	Cys93Arg	Para	Lima et al 2007 ¹⁷⁷
3	c.281G>A	Missense	Arg94Lys	Feo e Para	Bayley et al 2006 ¹⁶⁸
3-4	c.286+1G>A	Splice site		Para	Mammelli et al 2006 ¹⁷⁸
3-4	c.286+2T>A	Splice site		Para	Brouwers et al 2006 ¹⁷⁴
3-4	c.287-2A>G	Splice site		Para	Neumann et al 2004 ¹⁶⁷
3-4	c.287-1G>C	Splice site		Feo e Para	Timmers et al 2007 ⁶⁵
4	c.287G>A	Missense	Gly96Asp	Feo e Para	Benn et al 2006 ⁷⁷
4	c.292T>C	Missense	Cys98Arg	Feo e Para	Benn et al 2006 ⁷⁷
4	c.293G>A	Missense	Cys98Tyr	Feo e Para	Benn et al 2006 ⁷⁷

4	c.296G>A	Missense	Gly99Asp	Feo e Para	Benn et al 2006 ⁷⁷
4	c.298T>C	Missense	Ser100Pro	Para	Pollard et al 2005 ¹⁷⁷
4	c.302G>A	Missense	Cys101Tyr	Feo	Neumann et al 2002 ³
4	c.311delAinsGG	Frameshift		Feo	Benn et al 2006 ⁷⁷
4	c.312insCACTGCA	Frameshift		Para	Lima et al 2007 ¹⁷⁷
4	c.343C>T	Nonsense	Arg115Term	Feo e Para	Bayley et al 2006 ¹⁶⁸
4	c.380T>A	Missense	Ile127Asn	Feo	Astuti et al 2003 ¹⁷⁹
4	c.380T>G	Missense	Ile127Ser	Para	Pollard et al 2005 ¹⁸⁰
4	c.392C>G	Missense	Pro131Arg	Para	Baysal et al 2002 ⁸³
4	c.392delC	Frameshift		Para	Zantour et al 2004 ¹⁸¹
4	c.395A>C	Missense	His132Pro	Para	Maier-Woelfle et al 2004 ¹⁸²
4	c.418G>T	Missense	Val140Phe	Para	Brouwers et al 2006 ¹⁷⁴
4-5	c.423+1G>C	Splice site		Feo e Para	Amar et al 2005 ¹⁵³
4-5	c.423+20T>A	Splice site		Feo e Para	Srirangalingam et al 2008 ¹⁸³
4-5	c.424-3C>G	Splice site		Feo	Neumann et al 2004 ¹⁶⁷
4-5	c.424-1G>A	Splice site		Feo	Benn et al 2003 ¹⁷⁰
5	c.502insC	Frameshift		Feo	Benn et al 2006 ⁷⁷
5	c.540G>A	Missense	Cys180Tyr	Para	Lima et al 2007 ¹⁷⁷
5-6	c.541-3C>G	Splice site		Feo	Neumann et al 2004 ¹⁶⁷
5-6	c.541-2A>G	Splice site		Feo e Para	Timmers et al 2007 ⁶⁵
6	c.557G>A	Missense	Cys186Tyr	Para	Lima et al 2007 ¹⁷⁷
6	c.574T>C	Missense	Cys192Arg	Feo	Neumann et al 2002 ³
6	c.575G>A	Missense	Cys192Tyr	Feo e Para	Benn et al 2006 ⁷⁷
6	c.587G>A	Missense	Cys196Tyr	Feo	Neumann et al 2002 ³
6	c.590C>G	Missense	Pro197Arg	Feo	Astuti et al 2001 ⁶⁴
6	c.591delC	Frameshift		Feo	Astuti et al 2001 ⁶⁴
6	c.600G>T	Missense	Trp200Cys	Feo e Para	Drucker et al 2006 ¹⁸⁴
6	c.620_621delTG	Frameshift		Feo	Gimenez-Roqueplo et al 2003 ⁸⁰
6	c.623G>A	Missense	Gly208Glu	Feo e Para	Benn et al 2006 ⁷⁷
6	c.642G>C	Missense	Gln214His	Para	Brouwers et al 2006 ¹⁷⁴
6	c.644delC	Frameshift		Para	Mora et al 2005 ¹⁸⁵
7	c.653G>C	Missense	Trp218Ser	Feo e Para	Bayley et al 2006 ¹⁶⁸
7	c.660_661insT	Frameshift		Feo	Astuti et al 2003 ¹⁷⁹
7	c.683_684delAG	Frameshift		Para	Brouwers et al 2006 ¹⁷⁴
7	c.688C>T	Missense	Arg230Cys	Feo	Gimenez-Roqueplo et al 2003 ⁸⁰
7	c.689G>A	Missense	Arg230His	Feo e Para	Amar et al 2005 ¹⁵³
7	c.713delT	Frameshift		Feo	Amar et al 2005 ¹⁵³
7	c.713_716delTCTC	Frameshift		Feo	Neumann et al 2002 ³
7	c.717delT	Frameshift		Feo e Para	Amar et al 2005 ¹⁵³
7	c.718_721delCTAT	Frameshift		Feo	Amar et al 2005 ¹⁵³
7	c.724C>T	Missense	Arg242Cys	Para	Badenhop et al 2004 ¹⁷¹

7	c.725G>A	Missense	Arg242His	Feo	Neumann et al 2002 ³
7	c.747C>A	Nonsense	Cys249Term	Feo	Neumann et al 2002 ³
7	c.758G>A	Missense	Cys253Tyr	Feo e Para	Amar et al 2005 ¹⁵³
7	c.761C>T	Missense	Pro254Leu	Para	Lima et al 2007 ¹⁷⁷
7	c.761insC	Frameshift		Feo	Benn et al 2006 ⁷⁷
7-8	c.765+1G>A	Splice site		Para	Neumann et al 2004 ¹⁶⁷

(a) - Número do nucleótido baseado na sequência de cDNA, de acordo com *den Dunnen et al* (2001)¹³¹

(b) - Para: Paraganglioma; Feo: feocromocitoma

ANEXO 4 - MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NO GENE *SDHC*

Exão	Mutação ^(a)	Tipo de mutação	Alteração de aminoácido	Fenótipo ^(b)	Referência
1	c.1A>G	Codão de iniciação		Para	Schiavi et al 2005 ¹⁸⁶
1	c.3G>A	Codão de iniciação		PGL 3	Niemann & Muller 2000 ⁶³
1-2	c.20+2A>C	Splice site		Para	Fakhry et al 2008 ¹⁸⁷
2	c.39C>A	Missense	Met13Val	Para	Schiavi et al 2005 ¹⁸⁶
2	c.43C>T	Nonsense	Arg15Term	Para	Pasini et al 2008 ¹⁶⁹
2-3	c.78-2A>G	Splice site		Feo e Para	Peczowska et al 2008 ¹⁸⁸
3	c.126G>A	Nonsense	Trp42Term	PGL 3	Mannelli et al 2007 ¹⁸⁹
4	c.183G>A	Nonsense	Trp61Term	Para	Garrel et al 2009 ¹⁹⁰
4	c.214C>T	Missense	Arg72Cys	Para	Schiavi et al 2005 ¹⁸⁶
4	c.244G>T	Missense	Val82Phe	Para	López-Jiménez et al 2008 ¹⁹¹
5	c. 256_257insTTT	In-frame		Para	López-Jiménez et al 2008 ¹⁹¹
5	c.397C>T	Nonsense	Arg133Term	Para	Zbuk et al 2007 ¹⁹²
5-6	c.405+1G>A	Splice site		Para	Pasini et al 2008 ¹⁶⁹
5-6	c.405+1G>T	Splice site		PGL 3	Niemann et al 2003 ¹⁹³
6	c.439C>T	Nonsense	Gln147Term	Para	Schiavi et al 2005 ¹⁸⁶
6	c.473T>C	Missense	Leu158Pro	Para	Bauters et al 2003 ¹⁹⁴

(a) - Número do nucleótido baseado na sequência de cDNA, de acordo com *den Dunnen et al* (2001)¹³¹

(b) - Para: Paraganglioma; PGL 3: Paragangliomas familiares tipo 3; Feo: feocromocitoma

ANEXO 5 - MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NO GENE *SDHD*

Exão	Mutação ^(a)	Tipo de mutação	Alteração de aminoácido	Fenótipo ^(b)	Referência
1	c.1A>G	Codão de iniciação		Para	Riemann et al 2004 ¹⁹⁵
1	c.3G>A	Codão de iniciação		Feo e Para	Cásccon et al 2009 ¹⁹⁶
1	c.3G>C	Codão de iniciação		Para	Badenhop et al 2001 ¹⁹⁷
1	c.14G>A	Nonsense	Trp5Term	Feo	Neumann et al 2002 ³
1	c.21delG	Frameshift		Para	Benn et al 2006 ⁷⁷
1	c.28_33delins12bp	In-frame		Feo	Neumayer et al 2007 ¹⁹⁸
1	c.33C>A	Nonsense	Cys11Term	Feo	Neumann et al 2002 ³
1	c.34G>A	Missense	Gly12Ser	Para	Gimm et al 2000 ¹⁹⁹
1	c.36_37delTG	Frameshift		Feo	Neumann et al 2002 ³
1	c.49C>T	Nonsense	Arg17Term	Para	Papaspyrou et al 2008 ²⁰⁰
1	c.50G>T	Missense	Arg17Leu	Para	Lima et al 2007 ¹⁷⁷
1-2	c.52+2T>G	Splice site		Para	Gimm et al 2000 ¹⁹⁹
2	c.54_55dupC	Frameshift		Para	Taschner et al 2001 ²⁰¹
2	c.57delG	Frameshift		Para	Pasini et al 2008 ¹⁶⁹
2	c.64C>T	Nonsense	Arg22Term	Para	Taschner et al 2001 ²⁰¹
2	c.94_95delTC	Frameshift		Feo	Astuti et al 2001 ⁶⁴
2	c.106C>T	Nonsense	Gln36Term	Para	Baysal et al 2000 ⁶¹
2	c.112C>T	Nonsense	Arg38Term	Para	Baysal et al 2000 ⁶¹
2	c.120_121insC	Frameshift		Para	Taschner et al 2001 ²⁰¹
2	c.120_127delCCCAG AAT	Frameshift		Para	Lima et al 2007 ¹⁷⁷
2	c.125A>C	Missense	Glu42Ala	Feo	Cascon et al 2004 ²⁰²
2	c.129G>A	Nonsense	Trp43Term	Para	Cascon et al 2002 ²⁰³
2	c.147_148insA	Frameshift		Para	Astrom et al 2003 ⁸⁴
2	c.148_149insA	Frameshift		Para	Amar et al 2005 ¹⁵³
2	c.149A>G	Missense	His50Arg	Para	Perren et al 2002 ²⁰⁴
2	c.168_169delTT	Frameshift		Para	Velasco et al 2005 ²⁰⁵
2-3	c.169+1G>T	Splice site		Para	Benn et al 2006 ⁷⁷
2-3	c.169+5G>A	Splice site		Para	Timmers et al 2008 ²⁰⁶
2-3	c.170-1G>T	Splice site		Para	Dannenberg et al 2002 ²⁰⁷
3	c.191_192delTC	Frameshift		Para	Badenhop et al 2001 ¹⁹⁷
3	c.202_203insA	Frameshift		Para e Feo	Amar et al 2005 ¹⁵³
3	c.206_218del13bp	Frameshift		Feo	Neumann et al 2004 ¹⁶⁷
3	c.208A>G	Missense	Arg70Gly	Para	Taschner et al 2001 ²⁰¹
3	c.210G>T	Missense	Arg70Ser	Para	Cásccon et al 2009 ¹⁹⁶
3	c.242C>T	Missense	Pro81Leu	Para	Baysal et al 2000 ⁶¹
3	c.252T>G	Nonsense	Tyr84Term	Para	Neumann et al 2004 ¹⁶⁷
3	c.254T>A	Nonsense	Leu85Term	Para e Feo	Amar et al 2005 ¹⁵³

3	c.268G>A	Missense	Ala90Tyr	Feo	Cascon et al 2004 ²⁰²
3	c.271_282del12bp	In-frame		Feo	Neumayer et al 2007 ¹⁹⁸
3	c.274G>T	Missense	Asp92Tyr	Para	Baysal et al 2000 ⁶¹
3	c.276_278delCTA	In-frame		Para	Badenhop et al 2001 ¹⁹⁷
3	c.277delT	Frameshift		Para	Dannenberg et al 2002 ²⁰⁷
3	c.284T>C	Missense	Leu95Pro	Para	Taschner et al 2001 ²⁰¹
3	c.296delT	Frameshift		Feo	Astuti et al 2003 ¹⁷⁹
3	c.305A>T	Missense	His102Leu	Para	Baysal et al 2000 ⁶¹
3-4	c.314+1G>A	Splice site		Para	Benn et al 2006 ⁷⁷
3-4	c.315-32T>C	Splice site		Para	Taschner et al 2001 ²⁰¹
4	c.317G>A	Missense	Gly106Asp	Para	Ogawa et al 2006 ²⁰⁸
4	c.325C>T	Nonsense	Gln109Term	Para	Baysal et al 2002 ⁸³
4	c.337_340delGACT	Frameshift		Para e Feo	Cascon et al 2002 ²⁰³
4	c.341A>G	Missense	Tyr114Gys	Para	Milunsky et al 2001 ²⁰⁹
4	c.341_342delAT	Frameshift		Para e Feo	Benn et al 2006 ⁷⁷
4	c.353T>G	Missense	Asp118Glu	Para	Takahashi et al 2005 ²¹⁰
4	c.361C>T	Nonsense	Gln121Term	Feo	Neumann et al 2002 ³
4	c.366delA	Frameshift		Para e Feo	Amar et al 2005 ¹⁵³
4	c.381delG	Frameshift		Para	Baysal et al 2002 ⁸³
4	c.386_387insT	Frameshift		Para	Lima et al 2007 ¹⁷⁷
4	c.416T>C	Missense	Leu139Pro	Para	Taschner et al 2001 ²⁰¹
4	c.443delG	Frameshift		Para	Milunsky et al 2001 ²⁰⁹
4	c.443G>A	Missense	Gly148Asp	Para e Feo	Benn et al 2006 ⁷⁷
4	c.443G>T	Missense	Gly148Val	Para	Neumann et al 2004 ¹⁶⁷
4	c.463delA	Frameshift		Para	Leube et al 2004 ²¹¹

(a) - Número do nucleótido baseado na sequência de cDNA, de acordo com *den Dunnen et al (2001)*¹³¹

(b) - Para: Paraganglioma; feo: feocromocitoma

