



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO
INTEGRADO EM MEDICINA**

PEDRO MANUEL BERNARDES BARREIROS ANTUNES

***FEOCROMOCITOMA E PARAGANGLIOMA
MALIGNOS: A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO
GENÉTICO***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE ENDOCRINOLOGIA

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
DOUTORA MARIA MARGARIDA DOS SANTOS ANTUNES
CATARINO BASTOS FERREIRA**

MARÇO/2014

**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
COIMBRA**

**Feocromocitoma e Paraganglioma Malignos:
A Importância do Estudo Genético**

ARTIGO DE REVISÃO

Pedro Manuel Bernardes Barreiros Antunes¹, Maria Margarida dos Santos

Antunes Catarino Bastos Ferreira^{1,2}

¹Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal

²Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, E.P.E., Coimbra, Portugal

e-mail: pedrobba@gmail.com

A presente dissertação é escrita de acordo com a antiga ortografia.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. Lista de Abreviaturas | 2 |
| 2. Resumo..... | 4 |
| 3. Abstract | 6 |
| 4. Introdução..... | 8 |
| 5. Marcadores de Potencial Maligno..... | 12 |
| 5.1. Clínicos | 12 |
| 5.2. Bioquímicos | 12 |
| 5.3. Histológicos/Imunohistoquímicos | 13 |
| 5.4. Imagiológicos..... | 15 |
| 6. Genética..... | 20 |
| 6.1. <i>Cluster 1</i> – vHL/SDHx | 22 |
| 6.1.1. Gene vHL/Doença de von Hippel-Lindau | 24 |
| 6.1.2. Genes SDHx/Síndromes de paragangliomas familiares | 26 |
| 6.2. <i>Cluster 2</i> – RET/NF1 | 29 |
| 6.2.1. Gene RET/ NEM2 | 31 |
| 6.2.2. Gene NF1/ Neurofibromatose tipo 1 | 32 |
| 6.2.3. Gene TMEM127 | 33 |
| 6.2.4. Gene MAX..... | 34 |
| 6.3. Teoria da via comum..... | 35 |
| 7. Teste genético..... | 36 |
| 8. Tratamento | 39 |
| 8.1. Cirurgia..... | 39 |
| 8.2. Radiofármacos | 39 |
| 8.3. Quimioterapia | 41 |
| 8.4. Terapêutica personalizada | 41 |
| 9. Conclusão | 45 |
| 10. Agradecimentos..... | 47 |
| 11. Bibliografia..... | 48 |

LISTA DE ABREVIATURAS

CgA – Cromogranina A

DA – Dopamina

DOPA – Dihidroxifenilalanina

FEO – Feocromocitoma

HIF – Factor induzível pela hipóxia

hNET – Transportador de norepinefrina humana

HNPGL – Paraganglioma da cabeça e pescoço

Hsp90 – *Heat shock protein 90*

MAX – *MYC-associated factor-X*

MIBG – Metaiodobenzilguanidina

mTOR – *Mammalian target of rapamycin*

NEM2 – Neoplasia endócrina múltipla tipo 2

NF1 – Neurofibromatose tipo 1

PASS – *Pheochromocytoma of the Adrenal gland Scaled Score*

PDGF-β – Factor-β de crescimento derivado das plaquetas

PET – Tomografia por emissão de positrões

PGL – Paraganglioma

RM – Ressonância magnética

RET – *Rearranged during transfection*

SDH – Succinato desidrogenase

SNG – Sequenciamento de nova geração

SSTR – Receptores de somatostatina

TC – Tomografia computadorizada

TMEM127 – *Transmembrane protein 127*

VEGF – Factor de crescimento endotelial vascular

vHL – von Hippel-Lindau

RESUMO

Os feocromocitomas e paragangliomas malignos são tumores muito raros com mau prognóstico. A malignidade caracteriza-se pela presença de metástases em locais que não têm células cromafins. No entanto, o potencial maligno destes tumores é muito difícil de prever.

Visto que grande parte dos tumores malignos apresenta metastização apenas anos mais tarde do diagnóstico inicial, têm sido estudados vários marcadores a nível bioquímico, histológico, imunohistoquímico e imagiológico que possam indicar o potencial maligno. Até hoje, nenhum destes mostrou ser totalmente eficaz na identificação do carácter maligno do tumor. Aqueles que mostraram ter maior relação com o risco potencial de disseminação à distância foram tumor de grandes dimensões, localização extra-adrenal e secreção de dopamina. Novos marcadores moleculares como a telomerase, a Hsp90 e o SNAIL parecem ser promissores.

Nos últimos anos, foram descobertos novos genes relacionados com o aparecimento de feocromocitomas e paragangliomas e concluiu-se que cerca dum terço destes tumores estão associados à presença de mutações genéticas herdadas. O estudo dos genes e das suas funções a nível celular permitiu decifrar as principais vias moleculares de oncogénese, identificando possíveis alvos moleculares para terapêuticas personalizadas que estão actualmente sob estudo. Esta investigação tem grande importância dado que o tratamento dos casos malignos continua sem apresentar resultados favoráveis.

A análise genética permitiu estabelecer uma relação entre as alterações genéticas e o fenótipo dos indivíduos afectados. As mutações que conferem maior risco de malignidade são principalmente aquelas localizadas no gene SDHB, embora a mutação NF1 tenha também alguma predisposição para essa evolução.

O teste genético tem um papel importante no futuro da abordagem a estes indivíduos, dando indicações quanto ao prognóstico da doença, à possibilidade da realização de terapêuticas personalizadas e à necessidade de investigar os seus familiares.

Palavras-chave: feocromocitoma maligno, paraganglioma maligno, genética, marcadores de potencial maligno, terapêutica personalizada

ABSTRACT

Malignant pheochromocytomas and paragangliomas are very rare tumours with a poor prognosis. Malignancy is characterized by the presence of metastases in sites devoid of chromaffin tissue. However, the malignant potential of these tumours is very difficult to predict.

As a large part of the malignant tumours may present metastization just several years after diagnosis, there have been studied many biochemical, histological, immunohistochemical and imagiological markers that possibly indicate malignant potential. Until now, none of these has shown to be totally efficient in identifying the malignant tumour's nature. Large size, extraadrenal location and dopamine secretion are the ones that have demonstrated to be more related to distance dissemination. New molecular markers like telomerase, Hsp90 or SNAIL are under investigation, promising good results in the near future.

During the last years, new genes related to pheochromocytomas and paragangliomas have been identified and it has been concluded that around one third of these tumours are associated with the presence of mutations genetically inherited. The study of the genes and their cellular functions has permitted to uncover the major pathways involved in the oncogenesis, identifying possible targets for targeted therapy. This kind of treatment is being studied before its validation, due to the inefficacy shown by the current therapeutic methods.

Genetic analysis has permitted to establish a relationship between genotype and phenotype in the affected individuals. Considering the malignancy risk, the mutations that confer greater predisposition to this development are those localized in the SDHB, although NF1 mutations and the recently described MAX seem to have some risk too.

Genetic testing has a major role in the future approach to these patients, as it gives information about the disease prognostic, the possibility of administration of targeted therapies and the need to investigate other family members.

Keywords: malignant pheochromocytoma, malignant paraganglioma, genetics, malignant potential markers, targeted therapy

INTRODUÇÃO

Os feocromocitomas (FEOs) e paragangliomas (PGLs) são tumores neuroendócrinos raros com origem nas células cromafins. Estas células têm origem embriológica na crista neural. Os FEOs localizam-se na medula adrenal, enquanto que os PGLs têm localização extra-adrenal, ao longo das cadeias ganglionares, desde a região cervical até à cavidade pélvica (Fig.1). Podemos ainda destacar um grupo específico de paragangliomas que têm localização na cabeça e pescoço (HNPGs), cujas características são mais específicas, por derivarem de tecido parassimpático.

Os FEO/PGLs produzem quantidades excessivas de catecolaminas, nomeadamente, epinefrina e norepinefrina (Fig.2), que têm efeitos a nível cardiovascular, muscular e metabólico. Tanto estas como os seus metabolitos metanefrina, normetanefrina ou ácido vanilmandélico podem ser detectados no sangue e na urina (Fig. 3).

Embora a grande maioria destes tumores ocorra de forma esporádica, sabe-se hoje que a percentagem de formas hereditárias é superior a 30%, o que os torna um dos tumores mais ligados à hereditariedade genética.¹ Os genes que conferem susceptibilidade ao aparecimento de FEO/PGL's são o gene supressor tumoral vHL (von Hippel-Lindau), o proto-oncogene RET (*Rearranged During Transfection*), os genes codificadores das quatro subunidades do complexo enzimático succinato desidrogenase (SDHA, SDHB, SDHC e SDHD) e um gene responsável pela flavinização da subunidade proteica SDHA (SDHAF2). Mais recentemente, foi evidenciada a relação com outros dois genes, o TMEM127 e o MAX. Estão actualmente a decorrer estudos com vista a pesquisar outras mutações genéticas. Prevê-se que o peso da hereditariedade seja ainda mais significativo do que o hoje estimado e que a percentagem de formas chamadas de “esporádicas” tenda a diminuir.²

Aproximadamente, 10% dos FEOs e 20% dos PGLs abdominais são de natureza maligna, enquanto que os HNPGs são normalmente benignos.³ A malignidade é definida

pela presença de metástases em locais onde não existe tecido de células cromafins, tais como, gânglios linfáticos, fígado, pulmões e esqueleto ósseo. Cerca de 50% das metastizações são reconhecidas à apresentação inicial da doença, enquanto as outras 50% podem desenvolver-se e manifestar-se até 20 anos depois do diagnóstico inicial. O tempo médio deste intervalo de tempo é de 5,6 anos.⁴

Visto ainda não existirem marcadores que traduzam natureza maligna dos FEOs e PGLs nem tratamento curativo para estes, o estudo genético pode revelar-se como um importante instrumento na avaliação dos pacientes com esta patologia. Através da identificação das mutações pode ser estabelecido o prognóstico e o seguimento da doença de forma mais precisa. O estudo molecular também permitiu reconhecer as principais alterações intracelulares que levam à formação tumoral, o que pode ter extrema importância no desenvolvimento de tratamentos individualizados, que atinjam alvos moleculares específicos.

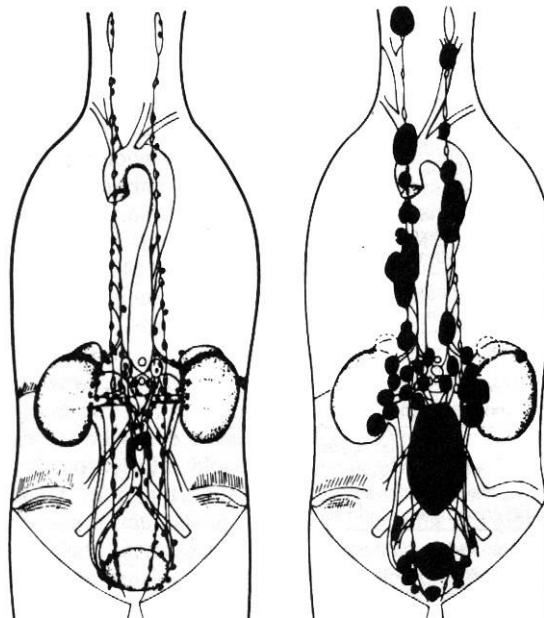


Figura 1. Esquerda: distribuição do tecido cromafim extra-adrenal no recém-nascido.

Direita: localizações dos paragangliomas

(Adaptado de Gardner DG, Shoback D. *Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology. 9th edition.*)⁵

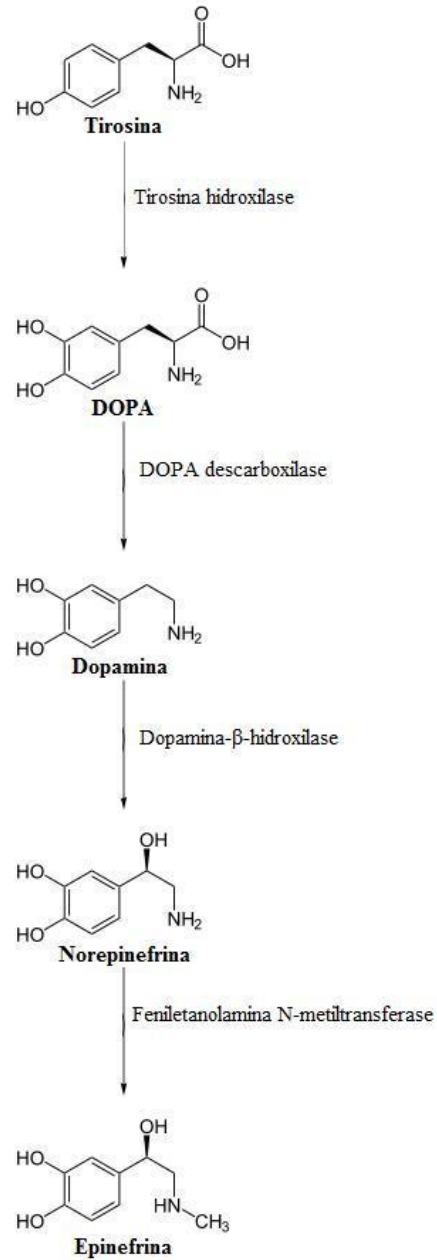


Figura 2. Biossíntese de catecolaminas.

(Adaptado de Gardner DG, Shoback D. *Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology. 9th edition.*)⁵

MARCADORES DE POTENCIAL MALIGNO

Como já referido, grande parte dos pacientes portadores de FEO ou PGL malignos podem não apresentar ao diagnóstico inicial evidência de metastização. No entanto, eles podem vir a desenvolver metástases metácronas anos mais tarde. É por isso de extrema importância que seja feita uma caracterização precoce do potencial maligno do tumor de modo a que seja estabelecida uma estratégia de seguimento do doente adequada e que se evite a identificação da evolução maligna da doença tarde demais, quando já existe metastização multifocal e incurável.

CLÍNICOS

As manifestações clínicas dos FEO/PGL's malignos são geralmente semelhantes às dos benignos, incluindo hipertensão, cefaleias, palpitações e sudorese. Forma também relatados sintomas como dispneia, astenia, arritmias, perturbações visuais e distúrbios metabólicos, como por exemplo, intolerância à glicose.⁶ Porém, os tumores malignos menos diferenciados, por segregarem menos catecolaminas e mais dopamina, podem não provocar hipertensão e sintomas relacionados, dificultando o diagnóstico inicial da patologia. Na malignidade os sintomas por efeito de massa podem ser mais acentuados, enquanto que aqueles por invasão de outras estruturas, como dor óssea, ou sistémicos, como anorexia, perda de peso e astenia podem estar presentes.³

BIOQUÍMICOS

O fenótipo bioquímico não permite normalmente diferenciar entre tumores benignos e malignos.

Após a avaliação inicial por medição das metanefrinas livres plasmáticas e das urinárias, não existem diferenças significativas entre as duas formas. No entanto, os FEOs

malignos segregam maioritariamente noradrenalina e, quando existe uma menor diferenciação, podem segregar parcial ou unicamente dopamina. Assim, a presença de PGLs com valores plasmáticos muito elevados de noradrenalina, dopamina ou do seu metabolito metoxitiramina podem sugerir malignidade.^{3,7}

A cromogranina A (CgA) é uma proteína co-armazenada e co-secretada com as catecolaminas específica dos tumores neuroendócrinos. Apesar de estar elevada tanto nos PGLs funcionais ou não funcionais, esta pode ajudar a diferenciar a doença benigna ou maligna. Valores muito elevados desta proteína são sugestivos de malignidade, existindo uma relação positiva entre a CgA e o volume tumoral.⁸

Outros biomarcadores que parecem estar mais relacionados com o carácter maligno são a enolase neuro-específica e a adrenocorticotrofina. Por outro lado, a expressão de secretogranina II e das pró-hormona convertases I e II estão mais relacionadas com os tumores benignos.

HISTOLÓGICOS/IMUNOHISTOQUÍMICOS

Ao contrário de muitos tipos de neoplasias, os FEO/PGLs raramente apresentam histologia característica de malignidade. Visto isto, foram já apresentadas várias escalas que permitiriam, através da microscopia, histologia e imunohistoquímica, obter um *score* indicador de maior ou menor probabilidade de malignidade.

A primeira, apresentada por Linnoila *et al.*, indica quatro parâmetros como preditores de malignidade: localização extra-adrenal, nodularidade grosseira, necrose confluenta e ausência de glóbulos de hialina. Os tumores malignos teriam dois ou mais critérios positivos, enquanto os benignos teriam apenas um ou nenhum.⁹ No entanto, chegou-se à conclusão que este método não era viável e que apenas 70% dos tumores poderiam ser classificados desta forma.

Outro sistema utilizado, o mais conhecido, foi o PASS (*Pheochromocytoma of the Adrenal gland Scaled Score*) que usa 12 critérios histomorfológicos para distinguir entre FEOs benignos e malignos, nomeadamente, padrão de crescimento difuso, mitoses atípicas, necrose confluyente ou central, invasão extra-adrenal, elevada celularidade, invasão vascular, monotonia celular, invasão da cápsula, células fusiformes, pleomorfismo nuclear, hipercromasia nuclear e índice mitótico $>3/\text{campo}$ de grande aumento.¹⁰ Um PASS >4 indicaria tumor maligno, enquanto que se <3 seria a favor de benigno. No entanto, ensaios recentes vieram pôr em causa a validade deste modelo, tendo sido relatada também grande variabilidade intra e inter-observador na sua aplicação.^{11,12}

Por fim, um estudo realizado por Kimura *et al.*, apresenta um sistema que usa características imunohistoquímicas. A imunoreactividade ao marcador de proliferação Ki-67, em conjunto com bioquímica e o fenótipo, são usados num score máximo de 10 para classificar os tumores como bem, mal ou parcialmente diferenciados. Com um score de 7-10, os pacientes estudados teriam 100% de probabilidade de ter tumores malignos. Porém, 13% do grupo dos “bem diferenciados” mostraram ter doença metastática, tendo sido este *score* afastado do uso clínico.¹³

Outros marcadores moleculares foram propostos, como por exemplo, o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF), o factor-1 α induzido pela hipóxia (HIF-1 α), os receptores da endotelina tipo A e B (ETA e ETB), a telomerase e o factor de transcrição SNAIL. O VEGF e o HIF-1 α estão directamente relacionados com um grupo específico de genes, como veremos mais à frente.

A telomerase é um complexo de ribonucleoproteínas que conjuga o componente de RNA da telomerase, a proteína associada à telomerase (TP1), a subunidade catalítica da telomerase (hTERT) e a *heat shock protein 90* (Hsp90), e parece ter alguma relação com o potencial maligno destes tumores. De facto, um estudo evidenciou que em células malignas

de FEO as hTERT, Hsp90 e telomerase pareciam estar sobrerreguladas e, por isso, expressas em valores superiores aos normais.³

O SNAIL é um factor de transcrição regulador de genes que promovem a disseminação sistémica dos tumores e a carcinogénese. É actualmente estudado como um marcador maligno promissor, tendo sido descrita uma reactividade imunológica significativamente superior em PGLs metastáticos.^{14,15} Contudo, mais estudos são necessários para comprovar se existe uma verdadeira relação com doença metastática.

IMAGIOLÓGICOS

A primeira abordagem radiológica de um paciente com FEO/PGL deve ser a realização de uma tomografia computadorizada (TC) (Fig.4) ou ressonância magnética (RM). A RM é preferível por apresentar maiores sensibilidade (90-100%) e especificidade (50-100%) que a TC e pela menor exposição a radiações. A RM tem também maior taxa de detecção dos tumores extra-adrenais.¹⁶ Normalmente, os PGLs apresentam sinal hiperintenso na fase T2 da RM por serem tumores altamente irrigados. Contudo, nos PGLs malignos, devido a áreas tumorais necróticas e hemorrágicas este sinal pode não se apresentar hiperintenso. A utilidade destas técnicas passa maioritariamente pela determinação da localização e do tamanho do tumor.

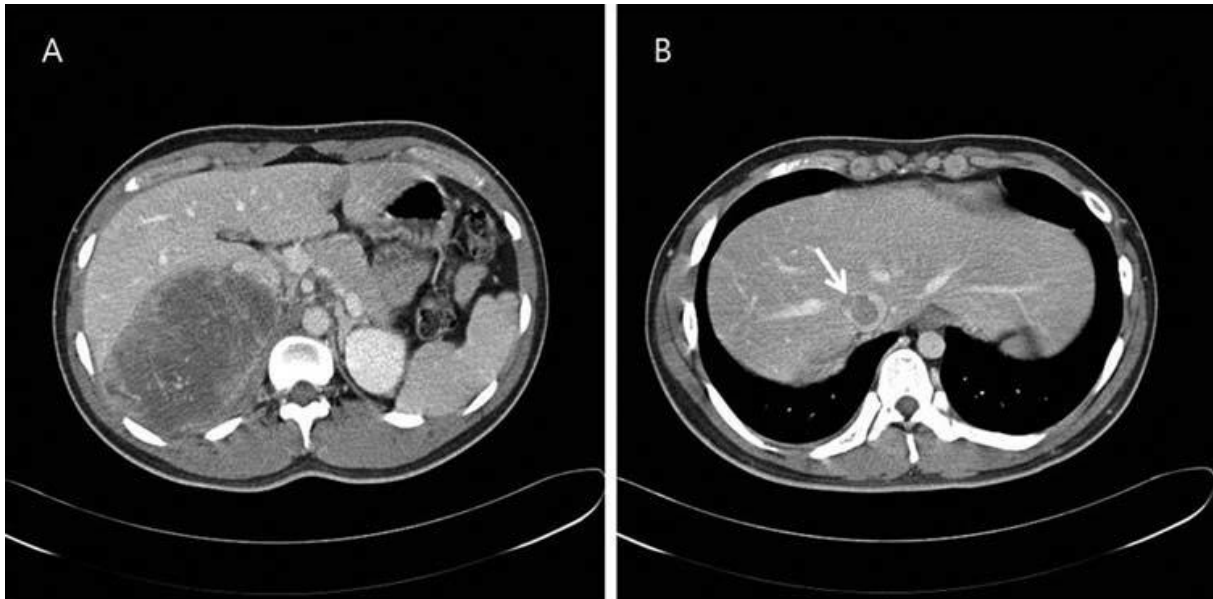


Figura 4. TC abdominal mostra feocromocitoma direito de grandes dimensões, com trombo na veia cava inferior.

(Adaptado de Park K-S *et al.* Sunitinib, a novel therapy for anthracycline- and cisplatin-refractory malignant pheochromocytoma)¹⁷

Especialmente quando estamos perante tumores de localização extra-adrenal, múltiplos, de diâmetro superior a 5cm ou mutação no gene SDHB, que será descrita mais adiante, é indicada a realização de exames de imagem funcionais através de tomografia de emissão de positrões (PET) ou tomografia por emissão de fóton único (SPECT).

As células cromafins possuem transportadores de norepinefrina humana (hNETs) através dos quais a metaiodobenzilguanidina (MIBG) é transportada para o interior destas células e armazenada em grânulos citoplasmáticos. Assim, a cintigrafia através da MIBG marcada com iodo-123 (¹²³I-MIBG) é a primeira técnica de aquisição de imagem funcional utilizada, permitindo um exame de “corpo inteiro” (Fig.5). Possibilita uma avaliação inicial quanto à presença de tumores extra-adrenais, múltiplos ou metastáticos e ainda apresenta como vantagem o facto de analisar simultaneamente a possibilidade de tratamento com ¹³¹I-MIBG. Contudo, o relativamente baixo *uptake* em tumores extra-adrenais e o considerável

número de falsos negativos quanto à detecção de tumores metastáticos são limitações a considerar neste método.¹³ A sensibilidade desta técnica é especialmente baixa na detecção de PGLs secretores de dopamina e, sobretudo, aos associados a mutação SDHB, situações estas altamente associadas a malignidade.¹⁸ Assim é necessária a realização de outros estudos quando este se apresenta negativo.

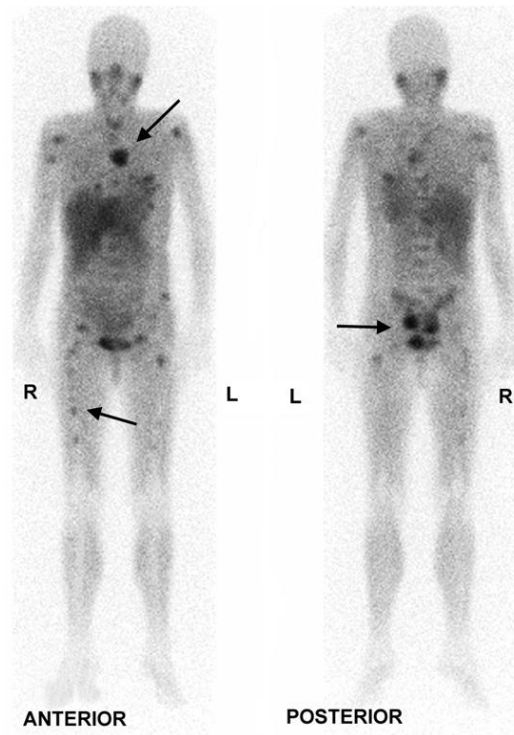


Figura 5. Cintigrafia com 123I-MIBG num paciente com paraganglioma maligno.

São visualizadas metástases nos membros, tórax e pélvis.

(Adaptado de Andersen KF et al. Malignant pheochromocytomas and paragangliomas - the importance of a multidisciplinary approach)⁸

Tal como a MIBG, os precursores de catecolaminas, dopamina (DA) e dihidroxifenilalanina (DOPA), são transportados para o interior das células cromafins pelos hNETs. Assim, quando radiomarcadas com flúor-18 (18F) estas são utilizadas em tomografia por emissão de positrões (PET), como alternativa à MIBG. A 18F-DA PET (Fig.6) apresenta boa especificidade para FEOs metastáticos,¹⁹ enquanto que a 18F-DOPA PET detecta com

grande qualidade PGLs, incluindo HNPGLs.²⁰ No entanto, tal como na 123I-MIBG, a PET com estes marcadores tem baixa sensibilidade para tumores ligados a mutações SDHB. Nestes casos, pode-se usar como marcador a 18F-fluorodesoxiglicose (18F-FDG), que apresenta uma sensibilidade de 97-100%.²¹

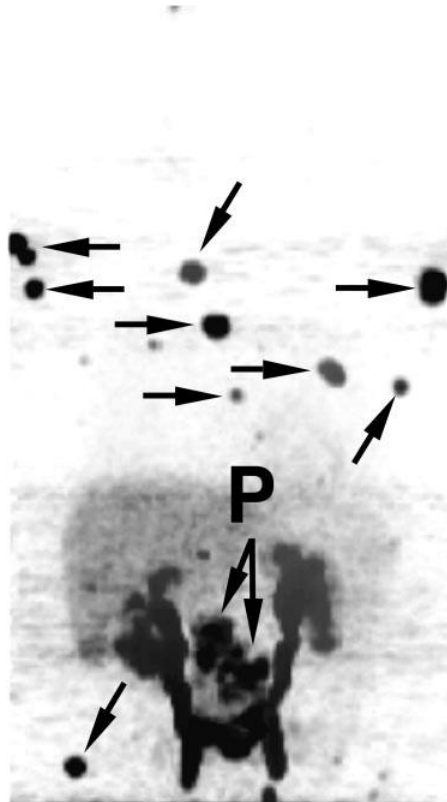


Figura 6. Imagem de uma 18F-DA PET num paciente do sexo masculino de 25 anos com um paraganglioma primário pélvico (P) e múltiplas metástases no úmero direito, pélvis, abdómen, mediastino e tórax (setas). Os cálices renais e ureteres estão proeminentes.

(Adaptado de: Ilias I, Pacak K. Current approaches and recommended algorithm for the diagnostic localization of pheochromocytoma)¹⁶

Adicionalmente, outras técnicas de medicina nuclear podem ser utilizadas, especialmente em caso de alta suspeita de malignidade, através de substâncias análogas da somatostatina. Os FEO/PGLs possuem receptores de somatostatina (SSTRs) nas células cromafins, e, sobretudo os SSTR 2, 3 e 5, servem de base à utilização de radiomarcadores

análogos da somatostatina para pesquisa de tumores extra-adrenais ou metástases, tais como, o índio-111-DTPA-ocreótido ($^{111}\text{InDTPAOC}$, *Octreoscan*). Esta técnica obteve, segundo alguns ensaios, uma sensibilidade aproximadamente de 90% para localização de PGLs abdominais, HNPGLs ou FEOs malignos.¹³ Pode usar-se também o gálio-68 para marcar substâncias na PET ($^{68}\text{Ga-DOTATOC}$), que mostrou maior sensibilidade que o *Octreoscan*, sobretudo na detecção de pequenas lesões e de tumores cujas células apresentavam baixa densidade de SSTRs. Permite também uma melhor identificação de metástases pulmonares e ósseas. Além disso, este exame apresenta uma superior taxa de detecção de FEOs e PGLs malignos quando comparada com a $^{18}\text{F-FDG}$ PET.^{22,23}

É de referir que as técnicas que têm por base o uso de substâncias transportadas pelos hNETs ou que se ligam aos SSTRs têm como desvantagem o facto de se irem tornando menos sensíveis em caso de progressiva indiferenciação do tumor.

Concluindo, o papel das técnicas de imagiologia e medicina nuclear ainda é limitado relativamente à determinação do potencial maligno dos tumores, visto que permitem apenas confirmar a metastização. Porém, novos métodos em estudo que detectam a ocorrência de apoptose, stress oxidativo e angiogénese no próprio tumor poderão dar às técnicas de obtenção de imagem um papel preditivo mais importante.

GENÉTICA

A maioria dos FEOs e PGLs ocorrem de forma esporádica e historicamente, até 2000, pensava-se que apenas cerca de 10% destes tumores estariam associados a síndromes genéticas, tais como, a neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (NEM2), a doença de von Hippel-Lindau e a neurofibromatose tipo 1 (NF1).

No entanto, a descoberta de novos genes associados ao aparecimento de FEOs e PGLs fez com que hoje se saiba que pelo menos cerca de 30% destes tumores anteriormente classificados como esporádicos estejam ligados a mutações num desses genes. A adicionar aos genes acima mencionados, foram identificados os genes codificadores das quatro subunidades do complexo succinato-desidrogenase (SDHA, SDHB, SDHC, SDHD), o gene SDHAF2 responsável pela flavinização da subunidade A do mesmo complexo e, ainda, os mais recentes TMEM127 e MAX. Prevê-se ainda que esta percentagem aumente, visto que há ainda muitos casos de indivíduos atingidos em idades jovens classificados como esporádicos e outros em que há história familiar positiva mas não foi encontrada nenhuma mutação pelos métodos actuais.²⁴

Para além da vantagem de se poder decifrar agora com mais eficácia a etiologia destes tumores, o estudo genético permite que se faça hoje uma correlação genótipo-fenótipo bem definida (Tabela 1). Este facto facilita o estudo genético mais personalizado, bem como uma maior previsibilidade quanto às características do tumor. Por exemplo, o potencial maligno varia conforme a mutação genética subjacente, havendo genótipos que provereão maior risco de aparecimento de metástases e um pior prognóstico, como veremos mais adiante.

A análise dos genes associados aos FEOs e PGLs e dos perfis de transcrição correspondentes através de análise cromossómica por microarray enriqueceu muito o conhecimento sobre a sua génese tumoral. Do ponto de vista biomolecular são hoje conhecidas as principais vias de sinalização intracelular oncogénicas, por sua vez dependentes

da mutação em causa. Os genes mutados e os síndromes correspondentes foram, então, organizados em dois grupos diferentes (*clusters*), consoante a via de génese tumoral que lhes está associada. Um dos grupos é aquele com tumores associados a mutações nos genes vHL e SDHx, que está associado a um estado de pseudo-hipóxia e à regulação pelo HIF- α , enquanto o outro grupo diz respeito aos tumores associados às mutações nos genes RET e NF1,^{25,26} em que a via de sinalização por activação de cinases, conduzida por oncogenes é responsável pela formação tumoral. As mutações TMEM127²⁷ e MAX²⁸ também se podem incluir neste último grupo. Curiosamente, os tumores esporádicos, que não estão associados a alterações genéticas conhecidas, estão representados em ambos variando de caso para caso.

Tabela 1. Correlação entre mutações genéticas e o fenótipo clínico

| Gene (Síndrome) | Locus | Localização primária (mais comum) | Tumor bilateral/multifocal | Taxa de Malignidade | Bioquímica |
|-----------------------------------|---------|-----------------------------------|----------------------------|---------------------|-------------------------|
| vHL (Doença de von Hippel-Lindau) | 3p25-26 | Adrenal | + | 5% | NMN, NE |
| SDHD (PGL1) | 11q23.1 | HNPGL | + | <5% | NMN, MN, DA, MT, nenhum |
| SDHAF2 (PGL2) | 11q12.2 | HNPGL | + | Baixa | ? |
| SDHC (PGL3) | 1q23.3 | HNPGL | - | Baixa | NMN, MN, DA, MT, nenhum |
| SDHB (PGL4) | 1p36.1 | Extra-adrenal | + | 31-71% | DA, MT, MN, NMN |
| SDHA | 5q15 | Variável | ? | ? | ? |
| RET (NEM2) | 10q11.2 | Adrenal | + | <5% | E, MN |

| | | | | | |
|--------------------------------------|---------|----------|---|-------|---------|
| NF1 (Neurofibromatose tipo 1) | 17q11.2 | Adrenal | - | 12% | MN, NMN |
| TMEM127 | 2q11.2 | Variável | + | Baixa | ? |
| MAX | 14q23 | Adrenal | + | ? | ? |

HNPGL: paraganglioma da cabeça e do pescoço; +: presente; -: ausente; MN: metanefrina; NMN: normetanefrina; E: epinefrina; NE: norepinefrina; DA: dopamina; MT: metoxitiramina; ?: desconhecida (Adaptado de Fishbein et Nathanson. Pheochromocytoma and paraganglioma : understanding the complexities of the genetic background)¹

CLUSTER 1 – vHL/SDHx

No passado foi observada uma associação curiosa entre indivíduos expostos de forma crónica a condições de hipóxia e uma maior prevalência de paragangliomas e hiperplasia dos corpos carotídeos comparada com indivíduos que viviam ao nível da água do mar. Este facto fez os investigadores acreditar que esta diferente sensibilidade ao oxigénio poderia estar na origem do aparecimento de PGLs.²⁹ De facto, esta é a base para a hipótese da pseudo-hipóxia que explica os mecanismos que levam à formação dos tumores ligados aos genes vHL/SDHx. As suas mutações têm em comum o facto de levarem ao aumento e estabilização da subunidade α do factor induzível pela hipoxia (HIF- α) em condições de normóxia (Fig.7).²

O factor induzível pela hipóxia (HIF) é um factor de transcrição que se liga a uma sequência específica de DNA responsável pela activação de vários genes que promovem a adaptação celular a baixos níveis de oxigénio. Mecanismos como a angiogénese, alterações do metabolismo energético, sobrevivência e crescimentos celulares, são activados por factores como o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) e factor- β de crescimento derivado das plaquetas (PDGF- β). O HIF é composto por duas subunidades, uma α e uma β , sendo que para a α existem três genes humanos, o HIF-1 α , o HIF-2 α e o HIF-3 α . Os dois primeiros

destes genes são os mais bem caracterizados e os com maior importância em caso de FEO/PGL. A subunidade β é expressa de forma estável e é regulada pelos níveis de HIF- α .²⁴

O HIF- α é hidroxilado principalmente pela EGLN1, que é uma prolil hidroxilase, quando os níveis de oxigênio são normais. O produto hidroxilado é reconhecido pela proteína vHL, que faz parte do complexo ubiquitina ligase E3, que o marca para degradação no proteossoma 26S. Assim, no caso de mutação do gene vHL e conseqüentemente na presença de uma proteína vHL disfuncional ou na sua ausência, bem como em caso de hipóxia, o HIF- α não é sinalizado para degradação e acumula-se, provocando as adaptações celulares já acima descritas.

Por outro lado, o complexo succinato desidrogenase (SDH) é responsável pela oxidação do succinato em fumarato, no âmbito do ciclo de Krebs, e quando há mutação nalguma das suas subunidades a sua função não é realizada. Acumula-se, deste modo, succinato, que se difunde do interior da mitocôndria para o citosol e inibe competitivamente a EGLN1, impedindo a hidroxilação e degradação da HIF- α . É sugerido ainda que o acúmulo de HIF-1 α possa diminuir a transcrição do gene SDHB, visto que foi descoberto em casos de mutação vHL baixos níveis da proteína SDHB, o que pode explicar algumas semelhanças dos perfis transcripcionais entre os tumores vHL e SDHx.³⁰

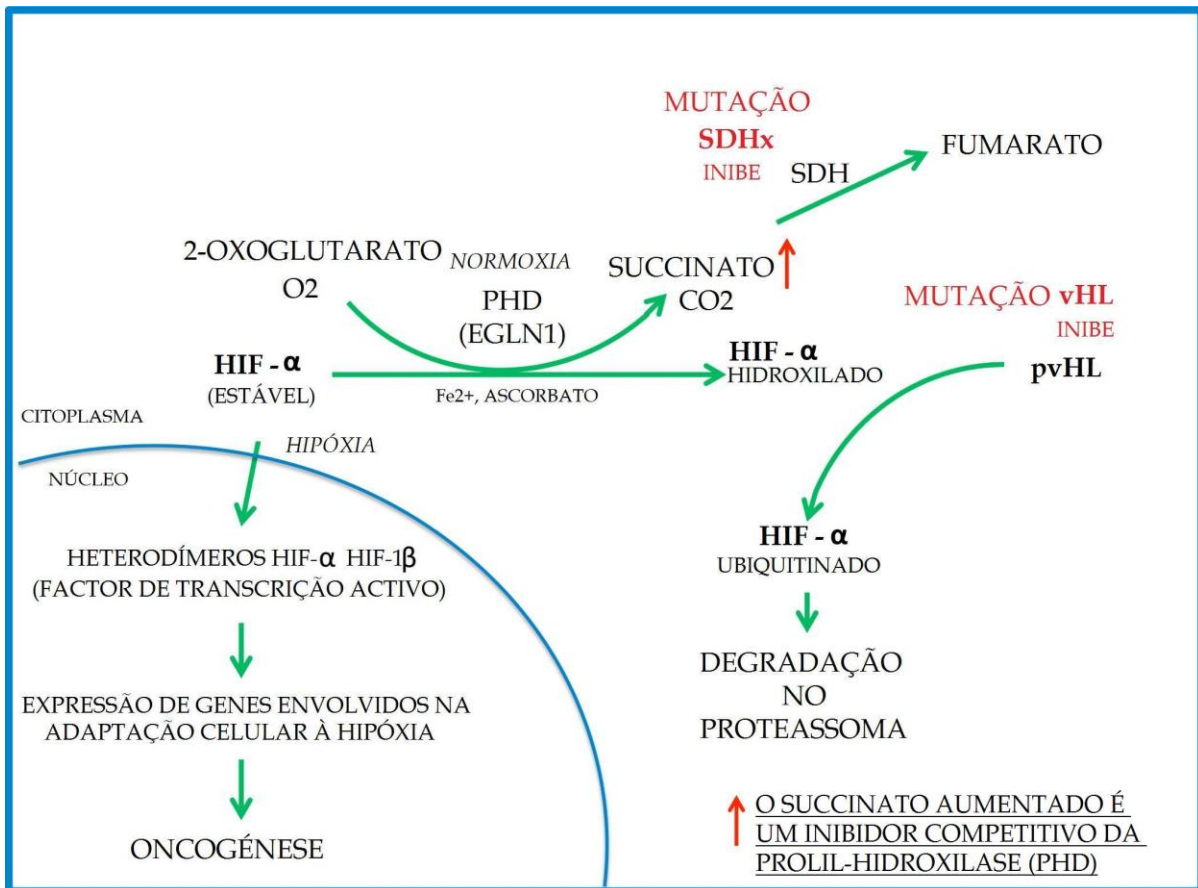


Figura 7. Hipótese da pseudo-hipóxia.

(Adaptado de Shah et al. Pheochromocytoma: implications in tumorigenesis and actual Management)²

GENE VHL/DOENÇA DE VON HIPPEL-LINDAU

O vHL é um gene supressor tumoral clássico localizado no cromossoma 3p25-26, constituído por 639 nucleótidos, que codifica duas proteínas vHL, uma com todos os 213 aminoácidos e outra mais pequena em cuja composição não entram os primeiros 53 aminoácidos. Como já foi acima descrito, a função da proteína vHL é regular a degradação do HIF- α , marcando-o para degradação proteossômica.¹ Os tumores relacionados com esta mutação germinal apresentam normalmente perda da heterozigotia em segundo tempo, de acordo com o modelo apresentado por Knudson.³¹

A doença de von Hippel-Lindau é um síndrome tumoral herdado de forma autossômica dominante que afecta 1 em cada 36000 indivíduos e é caracterizado por uma variedade de tumores que pode incluir hemangioblastomas do SNC, quistos renais, carcinoma renal de células claras, quistos e tumores neuroendócrinos pancreáticos, tumores do saco endolinfático e cistoadenomas do epidídimo.

O risco de formação de FEO varia entre 10-20%, tendo sido descrita variação do risco entre famílias e pode ser uma das manifestações mais precoces da doença. A idade média de aparecimento de FEOs associados a doença vHL é de 30 anos, sendo que estes têm tendência a se localizar na glândula adrenal e ser frequentemente bilaterais, bem como, a ter um fenótipo noradrenérgico. A taxa de malignidade apurada para estes FEOs é de cerca de 5%.¹

Dentro desta doença, existem ainda dois tipos, consoante o tipo de mutação associada, podendo-se assim fazer uma relação genótipo-fenótipo. Os pacientes com o tipo 1 de doença vHL têm baixo risco de aparecimento de FEO, porém, têm maior prevalência de formação de outros tumores associados a vHL, nomeadamente, carcinoma renal de células claras. O tipo 2 já está fortemente relacionado com a formação de FEO, podendo este ainda ser subdividido em 3 subgrupos, em que o tipo 2A e 2B têm baixo e alto risco de desenvolver carcinoma renal de células claras, respectivamente, enquanto que o subtipo 2C está reservado para famílias apenas com FEO. Segundo estudos, que analisaram especificamente os vários tipos de mutações no gene vHL, concluiu-se que as mutações que afectam a interacção entre as proteínas vHL e HIF têm maior tendência a provocar carcinoma renal enquanto as mutações de outras partes do gene vHL, que não a que codifica a parte que se liga à HIF, estão mais ligadas ao desenvolvimento de FEO.^{32,33} Este facto parece sugerir que a formação de FEO é independente da regulação HIF, curiosamente.

GENES SDHX/SÍNDROMES DE PARAGANGLIOMAS FAMILIARES

A associação entre a formação de FEO/PGLs e mutações nos genes das várias subunidades do complexo SDH foi provada nos últimos anos. Este complexo é também conhecido como o complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, promovendo a transferência de electrões para o receptor terminal da cadeia, a ubiquinona, e está também envolvido no ciclo de Krebs, catalisando a oxidação do succinato em fumarato.

Mutações em qualquer uma destas subunidades causam perda completa da actividade enzimática do complexo levando à sobre-regulação dos genes de resposta pró-angiogénica, associados à oncogénese. Os FEO/PGLs representam excelentes exemplos da ligação entre a função mitocondrial e proteínas oncogénicas na adaptação metabólica das células tumorais, combinando o aumento da glicólise com uma cadeia respiratória deficiente.

Foram descritos quatro síndromes diferentes, dependendo de qual a subunidade mutada.

GENE SDHD/PGL1

A primeira ligação descrita entre o complexo SDH e estes tumores foi feito em 2000, num estudo em que foram descobertas mutações no gene SDHD em famílias atingidas por paragangliomas em várias gerações.³⁴ Este gene localiza-se no cromossoma 11q23 e codifica uma proteína de 103 aminoácidos. As mutações no gene SDHD são herdadas de forma autossómica dominante. Anteriormente, pensava-se que a manifestação da doença só acontecia quando a mutação era herdada do pai. No entanto, todos os testes moleculares realizados não demonstraram nenhum indício de *imprinting* materno em nenhum tecido, concluindo-se que a expressão deste gene é feita de forma bi-alélica. Para além disso, Pigny *et al.*, em 2008 e Yeap *et al.*, em 2011 descreveram casos de transmissão materna da mutação SDHD, tendo o segundo demonstrado que são necessários dois fenómenos de recombinação

diferentes e independentes, nomeadamente, perda de função de ambas as cópias de SDHD e perda de função do alelo materno 11p.^{35,36} Assim, deve ser posta como hipótese a transmissão materna de SDHD no âmbito de aconselhamento genético. No entanto, as transmissões maternas continuam a ser consideradas muito mais raras, como foi corroborado por um estudo alargado francês que mostrou não haver transmissão materna em 78 casos de PGL com mutação SDHD.³⁷

As mutações SDHD são responsáveis por, pelo menos, 50% dos casos familiares de PGLs sendo que a probabilidade de ocorrência de FEO/PGL aos 70 anos é maior que 90%. A maioria dos tumores associados é do tipo parassimpático, nomeadamente, HNPGLs, que têm tendência a ser multifocais. Aos 60 anos, há ainda um risco relativamente alto (29%) de desenvolver PGLs simpáticos, sendo que o risco para a mesma idade de aparecimento de HNPGLs é de 71%. O FEO ocorre maioritariamente como um dos múltiplos tumores já existentes no organismo. A taxa de malignização apurada para estes tumores é muito baixa, <5%.¹

GENE SDHAF2/PGL2

O gene SDHAF2 não codifica nenhuma subunidade específica do complexo SDH, mas sim uma proteína responsável pela flavinização da SDHA, processo esse necessário para o correcto funcionamento desta. O gene localiza-se no cromossoma 11q12.2. É um síndrome com hereditariedade autossómica dominante muito semelhante à do gene SDHD, sendo que a susceptibilidade para a formação destes tumores está associada à transmissão paterna.

Este síndrome foi encontrado e descrito em duas famílias, uma holandesa e outra espanhola. Todos os tumores descritos foram HNPGLs, nenhum deles maligno, com idade média de apresentação aos 32 anos.^{38,39} Em 2011 foi realizado um estudo mais alargado numa família em que 24 elementos apresentavam a mutação SDHAF2. 91% destes indivíduos

apresentavam mais do que um HNPGL, sendo a média de idades correspondente à apresentação clínica da doença 33 anos. Todos os pacientes com mutação e com 50 anos ou mais tinham um ou mais HNPGL.⁴⁰ Novamente, nenhum dos tumores tinha características malignas, fazendo pensar que o risco de malignidade de um PGL associado a mutação SDHAF2 é muito baixo.

GENE SDHC/ PGL3

O gene SDHC localiza-se no cromossoma 1q23.3 e codifica uma proteína de 140 aminoácidos. A mutação é transmitida de forma autossômica dominante simples e é mais rara do que aquelas nos genes SDHD e SDHB.

Esta pode ser encontrada até 4% dos pacientes com PGL, sendo que estes sofrem mais comumente de HNPGL. No entanto, já foram encontrados PGLs extra-adrenais associados, bem como, FEO, mas em muito poucos casos. Segundo 3 estudos que estudaram no total 42 pacientes com tumores associados à mutação SDHC, obteve-se uma idade média de 43 anos quanto à apresentação clínica da doença e apenas 20-25% dos doentes tinham história familiar positiva, o que leva a suspeita de uma penetrância incompleta.²⁴ O risco de malignização dos tumores neste síndrome é classificado como muito baixo.

GENE SDHB/PGL4

O gene SDHB tem a sua localização no cromossoma 1p36.1-p35 e actua como um gene supressor tumoral, com perda de heterozigotia quando um dos alelos se encontra mutado. Este codifica a subunidade de ferro-enxofre do complexo SDH. A nível celular estes tumores parecem produzir níveis elevados de HIF- α e de outros produtos relacionados com a resposta à pseudo-hipóxia, tais como, o VEGF.¹

Este síndrome é o que predispõe a maior morbidade e mortalidade dentro dos síndromes de paragangliomas familiares e está associado sobretudo a PGLs abdominais e pélvicos. É responsável por mais de 50% dos casos de PGLs malignos,⁴¹ porém também já foram descritos FEOs benignos e HNPGLs. A apresentação clínica dá-se em média entre os 29 e os 36 anos de idade, sendo que aos 70 anos 80-100% dos indivíduos com mutação SDHB apresentará a doença. Esta mutação é considerada um dos principais marcadores de potencial maligno, variando este de 31 a 71%.¹ Deve proceder-se a um seguimento muito regular dos pacientes com esta mutação, pois o desenvolvimento da doença pode acontecer em qualquer idade. Por outro lado, perante um paciente que já apresente metástases é importante realizar a pesquisa genética desta mutação, que será muito importante para o planeamento do *follow-up* do doente e para o rastreio de outros elementos da família.

GENE SDHA

O gene SDHA localiza-se no cromossoma 5p15 e é responsável pela codificação de uma flavoproteína que é uma das subunidades catalíticas do complexo SDH.

Até hoje só foram encontrados 6 pacientes que associavam FEO/PGL com mutação SDHA, cinco deles com PGL e um com FEO.²⁴ Visto o baixo número de mutações encontradas em pacientes com FEO/PGL a prevalência desta associação não pode ser definida e, por isso, não é considerado um síndrome de paraganglioma familiar.

CLUSTER 2 - RET/NF1

Este segundo grupo de expressão genética tem em comum o facto de as alterações celulares se darem por activação de vias oncogénicas de sinalização por cinases. Tanto as

mutações RET como as NF1 causam activação das vias de sinalização RAS/RAF/MAPK e PI3K/AKT/mTOR promovendo fenómenos como proliferação, crescimento e sobrevivência celulares. Os genes TMEM127 e MAX, também foram incluídos neste *cluster*. As mutações no TMEM127 activam directamente o mTOR independentemente da activação das cascatas de fosforilação a montante, enquanto que as mutações MAX levam à desregulação da rede MYC-MAX-MXD1. Esta rede é composta por um grupo de factores de transcrição cuja interacção tem um papel importante a nível da proliferação, diferenciação e morte celulares, e que está intimamente relacionada com a via mTOR (Fig.8).²

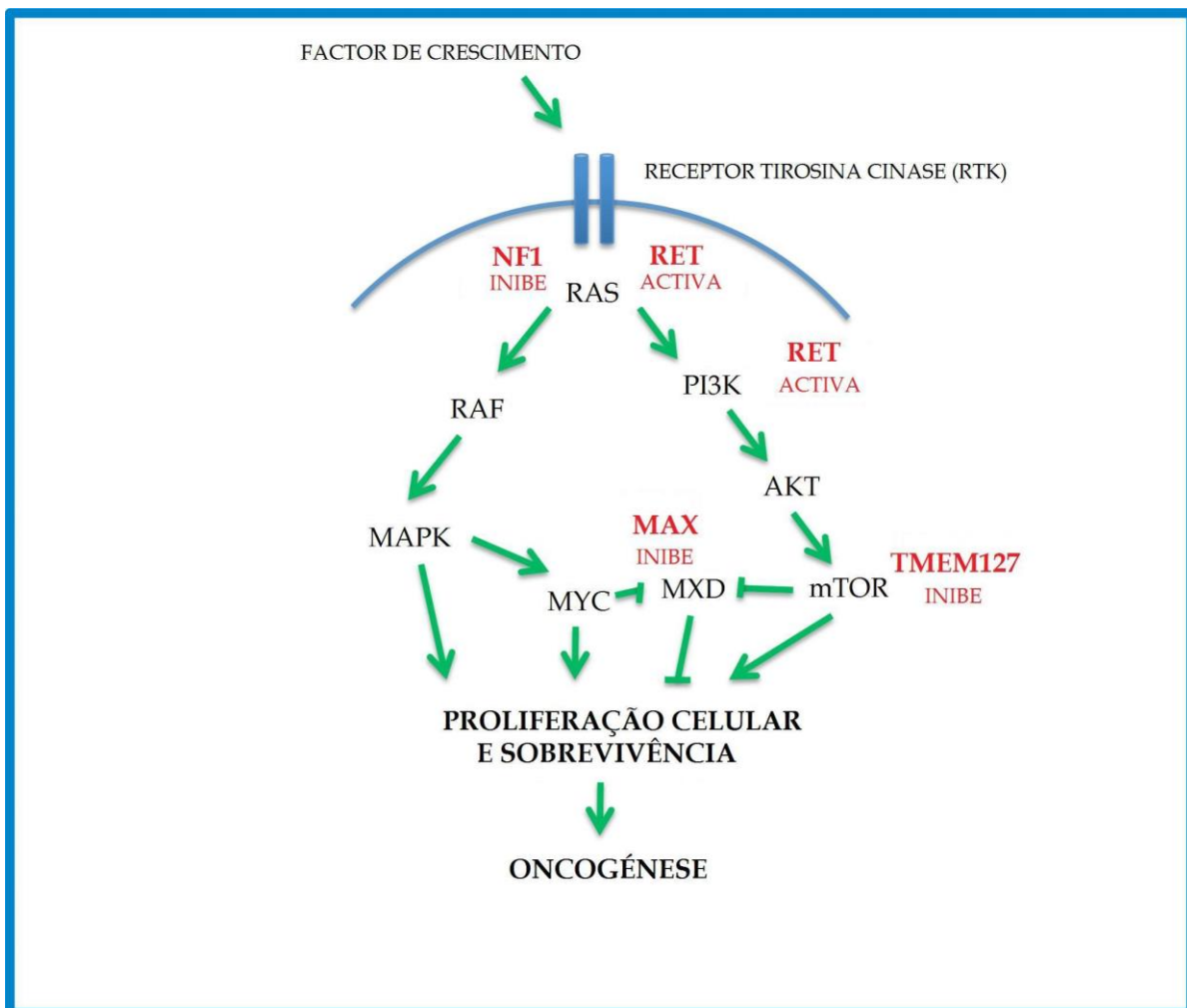


Figura 8. Vias oncogénicas celulares de sinalização por cinases

(Adaptado de Shah et al. Pheochromocytoma: implications in tumorigenesis and actual Management)²

GENE RET/NEOPLASIA ENDÓCRINA MÚLTIPLA TIPO 2 (NEM2)

O RET (*Rearranged during Transfection*) é um proto-oncogene localizado na região pericentromérica do cromossoma 10q11.2, com expressão embriológica primariamente em células derivadas da crista neural e urogenitais. É essencial para o correcto desenvolvimento do sistema nervoso autónomo e também dos rins.⁴² Curiosamente, foi descoberto em 1985 durante a transfecção de células NIH-3T3 da linha fibroblástica com DNA de células de linfoma humano.⁴³

O produto da transcrição do gene RET é um receptor do tipo tirosina cinase transmembranar para membros da família de factores neurotróficos da linhagem da célula glial (GDNF). As proteínas incluídas nesta família estão intimamente relacionadas com a regulação da proliferação celular e apoptose. A subsequente fosforilação de resíduos de tirosina específicos é o primeiro passo para a activação de vias de sinalização intracelular envolvidas no crescimento e diferenciação celular, nomeadamente, a PI3K/AKT/mTOR, a Ras/ERK e a JNK. É importante ainda referir que estes resíduos de fosfotirosina têm como alvo, entre outros, a proteína Src que activando a cinase de adesão focal (FAK), tem grande importância para fenómenos de migração celular e, por isso, formação de metástases.²

Tendo em conta as células onde embriologicamente o gene RET está activo, faz todo o sentido que as mutações com ganho de função do gene RET estejam na origem dum síndrome de neoplasia endócrina múltipla, neste caso tipo 2 (NEM2). Mutações com perda de função são responsáveis pela doença de Hirschsprung, que se caracteriza por ausência de células ganglionares nos plexos mioentéricos e submucosos do cólon.

A NEM2 é um síndrome tumoral herdado de forma autossómica dominante com uma prevalência de cerca 1/40000 na população.⁴⁴ Uma forte correlação genótipo-fenótipo foi demonstrada para este síndrome que pode ser subdividido em três subtipos. O subtipo 2A é o mais comum e apresenta carcinoma medular da tiróide, FEO e hiperparatiroidismo primário

em 95%, 50% e 15-30% dos casos, respectivamente. O síndrome NEM2B é o menos comum, mas considerado o mais agressivo, apresentando-se em pacientes tendencialmente mais jovens e é caracterizado pela presença em todos os indivíduos de carcinoma medular da tiróide, em 50% dos casos por FEO, e os doentes podem ainda apresentar hábito marfanóide e múltiplos ganglioneuromas mucosos.¹ O fenótipo mais agressivo deste subgrupo fez com que se levantasse a questão de as mutações ligadas ao NEM2B poderem activar outras vias de sinalização intracelular adicionais. O terceiro subtipo deste síndrome é chamado de carcinoma medular da tiróide familiar e os pacientes apresentam apenas este tumor.

Os FEO associados são normalmente bilaterais e recorrentes, secretando predominantemente epinefrina.⁴⁵ Os PGLs são muito raros, embora já tenham sido descritos HNPGLs na presença de NEM2. A idade de apresentação do FEO é normalmente entre os 30 e os 40 anos. Vista a elevada probabilidade de FEO em pacientes com NEM2 A e B, o rastreio bioquímico para FEO deve começar aos 8 anos para o NEM B e para algumas mutações mais agressivas do NEM2 A, enquanto que para a maioria dos NEM2 A só é recomendado começar aos 20 anos.¹ O risco de malignidade é inferior a 5%, embora em crianças com NEM2 B seja superior.⁴⁵

GENE NF1/NEUROFIBROMATOSE TIPO 1

O gene NF1 é um gene supressor tumoral, localizado no cromossoma 17q11.2. É responsável pela codificação da neurofibrina, que é uma proteína que funciona como uma GTPase inactivando a proteína RAS e controla o crescimento e diferenciação celulares.⁴⁵ As mutações ao nível do gene NF1 causam a Neurofibromatose tipo 1 ou doença de von Recklinghausen e são herdadas de forma autossómica dominante, sendo todos os doentes heterozigóticos. Estas mutações levam assim à activação das vias RAS/RAF/MAPK e mTOR provocando um crescimento celular descontrolado. No entanto, em cerca de 50% dos casos de

doença as mutações são esporádicas e se ocorrerem num tempo pós-zigótico podem dar origem ao aparecimento de mosaicos.²⁴

Este síndrome é habitualmente diagnosticado durante a infância e pode incluir alterações como manchas café com leite, neurofibromas cutâneos, sardas inguinais ou axilares, nódulos de Lisch (hamartomas benignos da íris), glioma do nervo óptico e displasia dos ossos longos. De forma mais grave, há pacientes que são afectados por tumores da bainha de nervos periféricos, leucemia mielóide crónica e deficiência cognitiva. O diagnóstico é essencialmente clínico.

Apesar da percentagem estimada de casos de FEO/PGL em doentes com Neurofibromatose tipo 1 ser de 5-7%, um estudo recente em autópsias revelou que 13% apresentavam FEO apesar de não diagnosticado. Estes tumores são maioritariamente unilaterais e tem uma idade média de apresentação clínica de 42 anos. A taxa de malignização estimada é de 12%.¹

GENE TMEM127

A ligação entre mutações no gene TMEM127 (*Transmembrane protein 127*) e o aparecimento de FEO foi feita pela primeira vez em 2010, depois de um estudo de Qin *et al.*, em que foram descritos 7 pacientes com estas duas características.²⁷ Este gene tem localização no cromossoma 2q11 e codifica uma proteína com três regiões transmembranares mas com nenhum domínio funcional conhecido. O seu papel na sinalização intracelular parece ter relação com a sua associação dinâmica com os endossomas, participando no tráfico de proteínas entre a membrana celular, o complexo de Golgi e os lisossomas. Na mutação TMEM127 não foram encontradas activação da RAS nem fosforilação da AKT da cascata PI3K/AKT/mTOR e verificou-se que a proteína TMEM127, quando não há mutação, é um regulador negativo directo da mTOR, mais especificamente da mTOR1. O gene TMEM127

pode ser considerado assim um novo gene supressor tumoral e as mutações são transmitidas de forma autossômica dominante, com perda de heterozigotia como segundo evento, de acordo com o modelo de Knudson.

A incidência estimada desta mutação em pacientes com FEO/PGL é de 2% para todos os casos negativos para mutações nos outros genes RET, vHL e SDHx. Nestes casos os pacientes tendem a apresentar tumores adrenais, uni ou bilaterais e valores elevados de metanefrinas. No entanto, também já foram descritos casos de aparecimento de PGLs, incluindo HNPGLs. A idade média de apresentação clínica é de aproximadamente 42 anos, curiosamente próxima daquela dos casos esporádicos e claramente mais alta do que aquela dos pacientes com mutação nos outros genes envolvidos. O risco de malignidade calculado até hoje é muito baixo, tendo estes casos sido classificados como muito raros.⁴⁶

GENE MAX

Em 2011, o MAX (*MYC-Associated Factor X*) foi identificado como um gene supressor tumoral ligado ao aparecimento de FEO/PGL, quando foi evidenciada a sua mutação em três pacientes com FEO e com história familiar da doença.²⁸ Entretanto, após um largo estudo internacional realizado por Burnichon *et al.*, confirmou-se que as mutações MAX podem ser responsáveis pelo aparecimento de FEO/PGL em 1,12% dos casos.⁴⁷ O gene MAX está localizado no cromossoma 14q23 e codifica uma proteína membro da família de factores de transcrição bHLHZ (*Basic helix-loop-helix leucine zipper*), expressa constitutivamente, que tem um papel fundamental na rede MYC/MAX/MXD1. A quase totalidade das mutações encontradas leva à formação de proteínas truncadas e as mutações parecem ser transmitidas apenas por via paterna. A patogênese dos FEO/PGLs por mutações MAX permanece um pouco indefinida, mas segundo Cascon *et Robledo*, a proteína MAX parece ter um papel maioritariamente repressivo em relação à rede MYC.⁴⁸

Os tumores associados à mutação MAX, tendem a ter localização adrenal e a ser bilaterais, embora também já tenham sido encontrados PGLs tóraco-abdominais.⁴⁶ O risco de doença maligna pode ir até 25% dos casos,⁴⁹ mas mais investigação é necessária para clarificar o risco de malignização tumoral e a penetrância para a doença.

TEORIA DA VIA COMUM

Apesar da divisão acima descrita em dois *clusters* foi proposta outra teoria que defende que as mutações nos vários genes associados a FEO/PGLs convergem numa única via comum de oncogénese. Segundo este modelo, as mutações germinais RET, NF1, vHL e SDHx causam todas a prevenção da apoptose (c-Jun/EGLN3-dependente) das células progenitoras neurais, que normalmente ocorre durante a embriogénese, neste caso limitada pela expressão do factor de crescimento neural (NGF).²⁴ Porém, esta teoria não reúne muito consenso.

TESTE GENÉTICO

Devido à constatação da presença de mutações germinais numa porção significativa de doentes “esporádicos”, é defendido por alguns autores que todos os pacientes com esta patologia devem ser submetidos a teste genético. No entanto, através do uso racional da correlação genótipo-fenótipo pode ser feita uma abordagem sequenciada segundo as probabilidades que limitará os gastos inapropriados (Fig.9).

O estudo genético é muito importante em caso de tumores múltiplos ou metastáticos, localização extra-adrenal, idade inferior a 45 anos de idade, história familiar positiva ou secreção de dopamina aumentada.²

Nos pacientes com síndrome familiar ou suspeita, as principais razões para realização do estudo genético são o facto de estes casos estarem mais relacionados com malignidade e de apresentarem formas recorrentes e multifocais da doença frequentemente. Deste modo, o prognóstico é mais facilmente estabelecido e pode-se realizar um seguimento adequado de maneira a que o tratamento seja instaurado o mais precocemente possível.⁴⁵

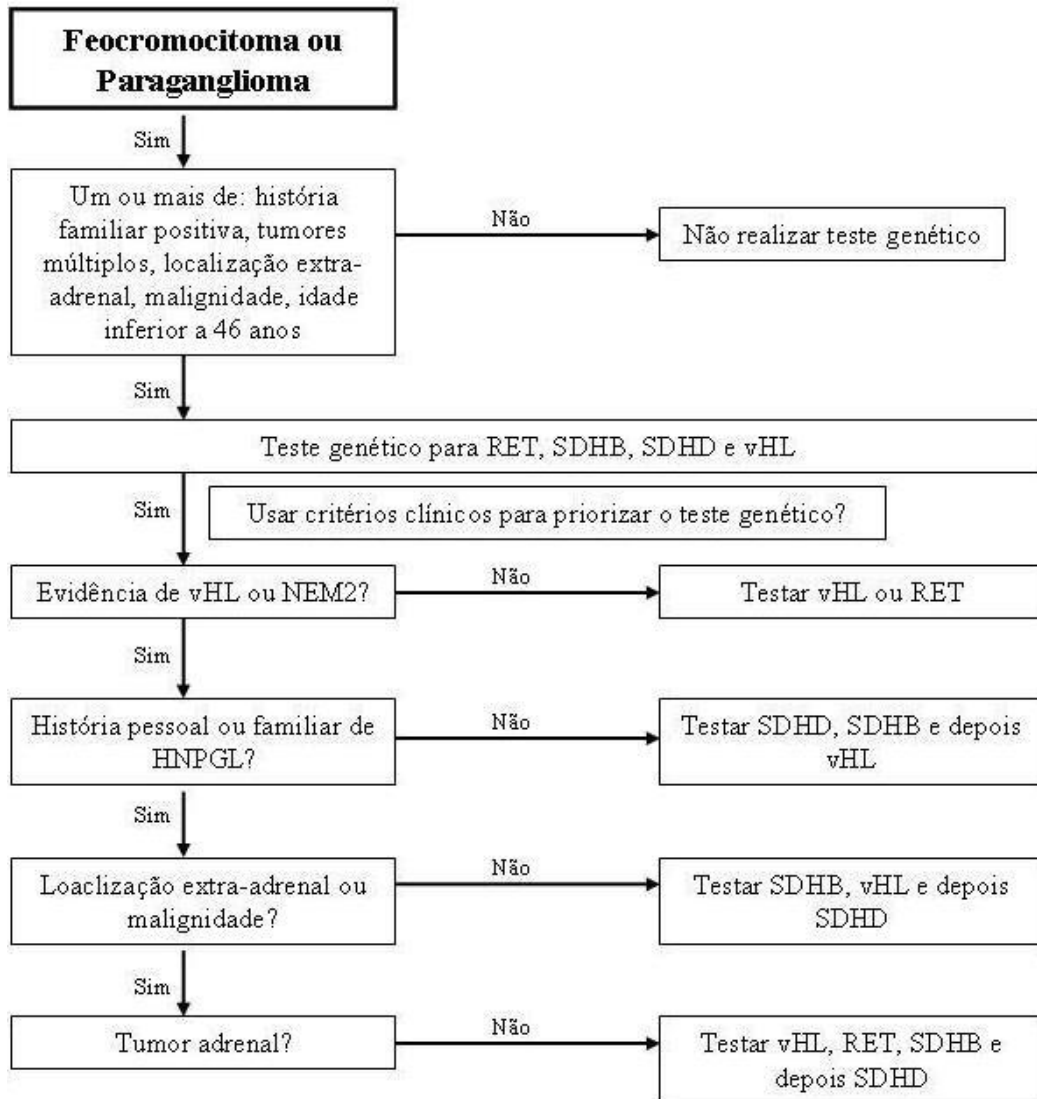


Figura 9. Exemplo de protocolo de análise de mutações genéticas para os genes principais (vHL, RET, SDHB e SDHD) para pacientes com feocromocitoma ou paraganglioma.

(Adaptado de Jafri M, Maher ER. The genetics of pheochromocytoma: using clinical features to guide genetic testing)⁴⁹

Uma série de novas estratégias de identificação dos genes envolvidos no aparecimento de FEO/PGLs estão sob estudo e espera-se que em curto prazo irão permitir a identificação das mutações na maioria dos pacientes. Uma das técnicas muito promissoras é o teste genético baseado em Sequenciamento de Nova Geração (SNG) que mostra melhor capacidade

e maior velocidade de detecção com um custo reduzido, comparativamente às outras técnicas. Este método promete alterar as estratégias quanto ao uso do *screening* genético, nomeadamente em pacientes com FEO/PGL, visto que através do uso de “códigos de barra” moleculares permite que o estudo não seja apenas dirigido ao gene mais provável, mas que estude, de modo simultâneo, vários genes possivelmente envolvidos na etiologia da doença. Num estudo de Julho de 2013, que incluiu a análise genética de 205 pacientes com FEO/PGL realizado por Ratenberry *et al.*, a implementação desta técnica, que possibilita o estudo de 9 genes simultaneamente (SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, SDHAF2, vHL, RET, TMEM127 e MAX) foi conseguida com sucesso. Destes 205 doentes foram isoladas 85 amostras de DNA de pacientes com mutação genética previamente conhecida, tendo o SNG mostrado uma sensibilidade de 98,7% para a detecção destas mutações.⁵⁰ Contudo, certamente serão precisos mais estudos para comprovarem este método, de modo a prevenir sobretudo o aparecimento de resultados falsos positivos.

TRATAMENTO

CIRURGIA

O único tratamento curativo e ideal para FEO/PGLs é a ressecção cirúrgica. No entanto, na maioria dos pacientes com patologia maligna esta abordagem não é curativa, a não ser que os pacientes apresentem apenas metástases loco-regionais ou isoladas à distância e ressecáveis.

Assim, na doença maligna a cirurgia pode oferecer alguns benefícios, tais como, redução da secreção hormonal para alívio dos sintomas, prevenção de complicações relacionadas com localização anatômica da metástase, por exemplo, compressão de estruturas como o tracto urinário, e ainda pode aumentar a eficácia de outras terapêuticas.⁸ As metástases ósseas necessitam frequentemente de ser excisadas ou, pelo menos, reduzidas quer cirurgicamente quer por radioterapia, visto provocarem dor intensa. As hepáticas podem ser tratadas por ressecção cirúrgica, embolização ou ablação por radiofrequência.

Em caso de alto risco de malignidade, como por exemplo, por mutação SDHB, deve ser realizada uma excisão total do tumor por via aberta ou, no caso de FEO, adrenalectomia total.⁴¹

RADIOFÁRMACOS

Para os pacientes com doença metastática e lesões irresecáveis pode ser considerado o tratamento com radionuclídeos, como a MIBG e os análogos da somatostatina.

Como já foi referido, as células tumorais dos FEO/PGLs apresentam os receptores hNET que promovem a absorção de MIBG. A MIBG conjuga, assim, várias características muito interessantes para o tratamento desta doença, apresentando grande afinidade pelo tumor, baixa absorção por outros tecidos e capacidade de causar dano local quando radiomarcada. Deste modo, esta substância marcada com iodo-131 (131I-MIBG), que tem

maior tempo de semi-vida que o ^{123}I , pode ser usada para tratamento de FEO/PGLs malignos quando a cintigrafia com ^{123}I -MIBG é positiva. As quantidades e a radioatividade utilizada com fins terapêuticos são muito maiores do que aquelas para efeitos diagnósticos. Uma análise a 116 pacientes por Loh *et al.* demonstrou regressão tumoral em 30%, resposta bioquímica em 45% e alívio sintomático em 76% dos pacientes.⁵¹ O tratamento é normalmente bem tolerado e os efeitos secundários principais são leucopenia e trombocitopenia. A toxicidade medular aumenta quanto mais radiação é utilizada. A principal limitação deste método é o facto de muitos tumores de carácter maligno terem um *uptake* baixo ou nulo de MIBG, especialmente aqueles associados a mutações SDHB.

Também já foi descrita a presença de SSTRs em tumores neuroendócrinos e, por isso, a utilização de análogos de somatostatina no seu tratamento também pode ser usada de forma racional quando o estudo cintigráfico confirma a sua absorção. Agentes péptidos como o ocreótido ou o DOTA podem ser associados aos radioisótopos ítrio-90 ou ao lutécio-177 (90YDOTA-TOC; ^{177}Lu -DOTA-TATE), apresentando baixa toxicidade e produzindo redução da secreção hormonal e do tamanho do tumor em alguns casos. A sua eficácia ainda não está definida devido, sobretudo à falta de estudos comparativos que permitam perceber quais as doses mais eficazes.⁸ No futuro, o desenvolvimento de análogos da somatostatina mais específicos pode dar mais garantias no tratamento de FEO/PGL metastáticos irressecáveis.

Visto que têm uma biodistribuição e um mecanismo de localização diferentes o uso combinado dos análogos da somatostatina com a MIBG pode ter um efeito sinérgico, permitindo talvez o uso de menores quantidades de radionuclídeos e, assim, menor aparecimento de efeitos secundários.³

QUIMIOTERAPIA

A quimioterapia é uma forma de terapêutica a ter em conta para os pacientes com doença metastática ou localmente avançada, cujas lesões não são ressecáveis, após a utilização de radiofármacos ter sido posta de parte por ineficácia. A combinação mais utilizada até hoje associa ciclofosfamida, vincristina e dacarbazina. Esta modalidade não aumenta a sobrevida dos pacientes, mas pode ser útil para o alívio de sintomas, redução do tamanho tumoral e como método neo-adjuvante da cirurgia.^{52,53} O tumor normalmente sofre recorrência após paragem do tratamento e quando volta a crescer tende a não responder mais ao tratamento. Visto isto, a quimioterapia deveria ser administrada por longos períodos de tempo, o que indica que a sua utilização deve ser criteriosamente julgada caso a caso.⁵⁴

TERAPÊUTICA PERSONALIZADA

A elevada mortalidade constatada em doentes com FEO/PGLs malignos com os tratamentos até agora utilizados revela a necessidade da investigação de novos métodos e substâncias que possam melhorar este estado de ciência. Assim, a descoberta de genes e a interpretação das vias de génese tumoral permitiu a identificação de novos alvos terapêuticos moleculares. No entanto, é preciso ter em conta que por serem tumores raros a evidência para cada modalidade terapêutica, sobretudo para as mais recentes, é ainda limitada.

A eficácia destes novos possíveis tratamentos baseia-se no seu efeito citostático por intervenção directa nas cascatas moleculares responsáveis pela carcinogénese e crescimento celular, devendo ser enquadrados no âmbito do tratamento paliativo e não curativo.

Para além da evidência que os FEO/PGLs são tumores muito vascularizados, já foi demonstrada a relação da sua existência com a angiogénese, nomeadamente através do aumento da expressão de VEGFs e dos seus receptores, tal como revela a teoria da pseudo-hipóxia, através da estabilização do HIF- α . Assim, os produtos celulares dependentes deste

último factor podem ser interessantes alvos para terapêutica personalizada. A sobre-expressão de outras moléculas angiogénicas, como a angiopoietina-2, e os receptores de endotelina ETA e ETB reforçam ainda mais esta relação.⁵⁵

O sunitinib é um inibidor do receptor da tirosina cinase que inibe os receptores VEGFR e PDGFR, o c-KIT e o FLT3, demonstrando actividade anti-angiogénica e anti-tumoral. A sua eficácia já foi validada para tratamento de tumores como o cancro de células renais, tumores neuroendócrinos do pâncreas e GISTs (gastrointestinal stromal tumors). Em estudos recentes sobre o seu uso nos FEO/PGLs malignos, foram observadas respostas positivas num número significativo de indivíduos.^{17,56,57} Foi então constatado nestes doentes estabilização prolongada da doença, redução dos marcadores tumorais, diminuição do *uptake* de glicose pelas células tumorais e normalização da tensão arterial, tendo sido referidos até casos de descontinuação de medicação anti-hipertensiva. É importante referir que a maioria dos pacientes que revelou responder ao sunitinib apresentaria mutação no gene SDHB e os tumores refractários ao tratamento seriam sobretudo aqueles classificados como esporádicos. O principal efeito secundário desta medicação é o facto de causar na fase inicial uma exacerbação da hipertensão arterial que deve ser controlada com o aumento temporário da medicação hipertensiva. Contudo, este efeito positivo atingido pelo sunitinib parece causar também alguma resistência, dado que a grande maioria dos doentes desenvolveram mais tarde progressão tumoral e reaparecimento de sintomas. Pensa-se que esta suposta resistência terá relação com uma activação compensatória de vias moleculares não inibidas por este fármaco, tal como a via do mTOR.⁴¹ A eficácia do sunitinib está neste momento a ser avaliada num estudo randomizado e duplamente cego a nível internacional com o apoio de vários centros, iniciado por membros da PRESSOR (*Pheochromocytoma and paraganglioma Research Support Organization*), pretendendo-se determinar a capacidade do sunitinib em proporcionar ausência de progressão da doença em 12 meses.

O imatinib, outro inibidor da tirosina cinase, já utilizado para tumores hematológicos e GISTs não demonstrou qualquer efeito no tratamento de feocromocitomas malignos.⁵⁸ O pazopanib, um inibidor da VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, c-Kit e PDGFR está a ser actualmente avaliado.

A já descrita via do mTOR, está também relacionada com o aparecimento destes tumores malignos neuroendócrinos. Assim, foi ponderado o uso de substâncias como o everolimus e a rapamicina que se ligam directamente ao complexo mTOR1, inibindo assim a sua via de carcinogénese e crescimento tumoral.

O everolimus apresentou inicialmente resultados muito desencorajadores quando testado num pequeno número de pacientes com FEO/PGLs metastáticos.⁵⁹ Pensa-se que este fracasso seja devido a uma activação compensatória da PI3K/AKT e ERK em resposta à inibição directa do mTOR. No entanto, para além de num estudo recente de fase II ter sugerido que este agente pode ter alguma eficácia,⁶⁰ o seu interesse passará mais por associações a outros agentes terapêuticos, estando em curso investigações que o associam a outros fármacos com alvos moleculares específicos, tal como, o ertolonib, o ocreótido e o cixutumumab.⁶¹

A combinação dos inibidores do mTOR com o sunitinib pode levar a efeitos sinérgicos anti-neoplásicos. Esta ideia suporta-se no relato de um paciente com doença metastática óssea e mutação SDHB que, após uma resposta parcial inicial ao sunitinib isolado, desenvolveu de novo doença progressiva e sintomática passados 18 meses do tratamento. Nessa altura adicionou-se rapamicina ao tratamento. Houve, então, estabilização da doença sem progressão verificada durante 3 anos. Assim, este caso específico sugere que a utilização de terapêuticas combinadas personalizadas pode ser uma das soluções viáveis para estes casos. É preciso, contudo, ter muita atenção e reforçar a vigilância dos pacientes, visto que

inevitavelmente a utilização de vários fármacos vai multiplicar também a probabilidade de ocorrência de eventos adversos tóxicos.⁴¹

Adicionalmente, sabe-se hoje que as células tumorais dos FEO/PGLs malignos expressam a proteína Hsp90 (*Heat shock protein 90*), que é um chaperon molecular responsável por funções de *housekeeping*, como a estabilização e manutenção da conformação de várias oncoproteínas.⁶² Deste modo, a Hsp90 pode ser um importante alvo na futura terapêutica destes tumores. Desenvolveram-se vários inibidores desta proteína na última década, como a geldanamicina e análogos, que estão agora em fase de estudo e validação.

O agente anti-angiogénico talidomida, já utilizado na investigação do tratamento de carcinoma de células renais, mieloma múltiplo e carcinoma do pulmão de células não-pequenas, foi também usado numa série de pacientes com tumores neuroendócrinos, associado à temozolomida. Foram obtidas respostas a nível da bioquímica em 40% dos casos e de 33% a nível imagiológico, tendo sido contemplados neste estudo apenas 3 pacientes com FEO, dos quais apenas um respondeu.⁶¹ Será provavelmente de grande importância a selecção de pacientes através do estudo genético, sendo, obviamente, os pacientes do *cluster 1* aqueles que mais probabilidade terão de responder a estes tipos de abordagem, que poderá também envolver combinação com outros fármacos.

CONCLUSÃO

Actualmente, ainda não foi descoberto nenhum marcador bioquímico, histopatológico ou imagiológicos que diferencie com absoluta certeza os feocromocitomas e paragangliomas malignos dos benignos, excepto a evidência de metástases. Todos os *scores* propostos até hoje, que englobavam características clínicas, bioquímicas imunohistoquímicas e imagiológicas, demonstraram ter fraca precisão quanto à predição do comportamento dos tumores estudados. Tumores de grandes dimensões e de localização extra-adrenal têm alguma relação com o potencial maligno, mas são indicadores de baixa sensibilidade e especificidade. A elevação da dopamina é rara, mas quando presente é indicadora de mau prognóstico, denunciando baixo grau de diferenciação do tumor. Outros marcadores, sobretudo a nível biomolecular, como o Hsp90 e o SNAIL, estão a ser estudados com resultados promissores.

A imagiologia em conjunto com a medicina nuclear, através da utilização de radionuclídeos cada vez mais específicos, tem um papel importante sobretudo no que toca ao diagnóstico e ao estadiamento da doença.

As descobertas genéticas feitas no âmbito dos feocromocitomas e paragangliomas nos últimos anos vieram dar um grande contributo no conhecimento da fisiopatologia destes tumores. Para além disso, a identificação do perfil genético do doente permite determinar o risco de situações como desenvolvimento de lesões multifocais, malignização e de outros tumores característicos de determinados síndromes. O gene SDHB é aquele que confere maior predisposição ao desenvolvimento de metástases, sendo que o NF1 também tem algum risco significativo.

Visto que foi provado que cerca de um terço destes tumores se desenvolvem devido a transmissão de mutações genéticas, o estudo genético de todos os pacientes com esta patologia parece ser de grande interesse. Pelo menos, em todos os casos de presença de história familiar da doença, desenvolvimento da patologia em idade jovem, localização

tumoral extra-adrenal, tumores múltiplos ou de grandes dimensões e elevação dos valores de dopamina deve-se tentar traçar o perfil genético do doente. Por haver uma correlação genótipo-fenótipo comprovada, a pesquisa das mutações pode ser feita dum modo dirigido, permitindo, assim, a poupança de recursos. No entanto, o desenvolvimento de técnicas como o Sequenciamento de Nova Geração, permitirá em breve trecho fazer um estudo de múltiplos genes simultaneamente, de forma rápida e eficaz, prometendo assim revolucionar muitos conceitos e dar um passo importante quanto à caracterização cada vez mais personalizada da doença.

Quanto ao tratamento da patologia maligna, não existem terapêuticas curativas para estes casos. Têm sido várias as áreas em que se tem investido neste âmbito, incluindo quimioterapia, radioterapia ou medicina nuclear. Há respostas positivas em alguns casos mas não de um modo satisfatório. A avaliação genética permitiu a identificação das principais vias de sinalização celulares que levam ao desenvolvimento tumoral associadas a cada mutação. A divisão destas em dois *clusters* distintos, possibilitou a investigação de novas terapêuticas que atinjam alvos moleculares específicos. Estas estão hoje em estudo com resultados promissores, pensando-se ser este o futuro caminho no tratamento dos feocromocitomas e paragangliomas malignos. Assim, por último, prevê-se que a influência da genética nesta patologia continue a ter um impacto preponderante, tanto pela prevista identificação de mais mutações, como pela cada vez mais importante personalização da medicina. Este pode ser dos principais casos mais exemplificativos nesse sentido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Doutora Maria Margarida dos Santos Antunes Catarino Bastos Ferreira pelo interesse, disponibilidade e dedicação demonstrados.

Agradeço ao Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra por permitir a realização deste trabalho e pela disponibilidade de recursos.

Agradeço à minha mãe, Teresa, e ao meu irmão, João, por serem os grandes pilares da minha vida e por todo o apoio, confiança, paciência e alegria.

Agradeço à Rosa pelo carinho, cuidado e preocupação pelo meu bem-estar todos os dias.

Por fim, agradeço ao meu pai, Fernando, pelo grande exemplo e valores que me deixou e por nunca deixar de me acompanhar onde quer que eu esteja.

BIBLIOGRAFIA

1. Fishbein L, Nathanson KL. Pheochromocytoma and paraganglioma: understanding the complexities of the genetic background. *Cancer Genet.* 2013;205:1–11.
2. Shah U, Giubellino A, Pacak K. Pheochromocytoma: implications in tumorigenesis and the actual management. *Minerva Endocrinol.* 2012;37(2):141–156.
3. Parenti G, Zampetti B, Rapizzi E, Ercolino T, Giachè V, Mannelli M. Updated and new perspectives on diagnosis, prognosis, and therapy of malignant pheochromocytoma/paraganglioma. *J Oncol.* 2012;2012:872713.
4. Kantorovich V, Pacak K. Pheochromocytoma and paraganglioma. *Prog Brain Res.* 2010;182:343–73.
5. Gardner DG, Shoback D. *Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology. 9th edition.* McGraw-Hill Medical; 2011.
6. Lenders JWM, Eisenhofer G, Mannelli M, Pacak K. Phaeochromocytoma. *Lancet.* 366(9486):665–75.
7. Eisenhofer G, Lenders JWM, Siegert G, et al. Plasma methoxytyramine: a novel biomarker of metastatic pheochromocytoma and paraganglioma in relation to established risk factors of tumour size, location and SDHB mutation status. *Eur J Cancer.* 2012;48(11):1739–49.
8. Andersen KF, Altaf R, Krarup-Hansen A, et al. Malignant pheochromocytomas and paragangliomas - the importance of a multidisciplinary approach. *Cancer Treat Rev.* 2011;37(2):111–9.
9. Linnoila RI, Keiser HR, Steinberg SM, Lack EE. Histopathology of benign versus malignant sympathoadrenal paragangliomas: clinicopathologic study of 120 cases including unusual histologic features. *Hum Pathol.* 1990;21(11):1168–80.
10. Thompson LDR. Pheochromocytoma of the Adrenal gland Scaled Score (PASS) to separate benign from malignant neoplasms: a clinicopathologic and immunophenotypic study of 100 cases. *Am J Surg Pathol.* 2002;26(5):551–66.
11. Agarwal A, Mehrotra PK, Jain M, et al. Size of the tumor and pheochromocytoma of the adrenal gland scaled score (PASS): can they predict malignancy? *World J Surg.* 2010;34(12):3022–8.
12. Wu D, Tischler AS, Lloyd R V, et al. Observer variation in the application of the Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(4):599–608.
13. Korevaar TIM, Grossman AB. Pheochromocytomas and paragangliomas: assessment of malignant potential. *Endocrine.* 2011;40(3):354–65.

14. Häyry V, Salmenkivi K, Arola J, Heikkilä P, Haglund C, Sariola H. High frequency of SNAIL-expressing cells confirms and predicts metastatic potential of pheochromocytoma. *Endocr Relat Cancer*. 2009;16(4):1211–8.
15. Waldmann J, Slater EP, Langer P, et al. Expression of the transcription factor snail and its target gene twist are associated with malignancy in pheochromocytomas. *Ann Surg Oncol*. 2009;16(7):1997–2005.
16. Ilias I, Pacak K. Current approaches and recommended algorithm for the diagnostic localization of pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(2):479–91.
17. Park K-S, Lee J-L, Ahn H, et al. Sunitinib, a novel therapy for anthracycline- and cisplatin-refractory malignant pheochromocytoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2009;39(5):327–31.
18. Dubois LA, Gray DK. Dopamine-secreting pheochromocytomas: in search of a syndrome. *World J Surg*. 2005;29(7):909–13.
19. Ilias I, Yu J, Carrasquillo JA, et al. Superiority of 6-[18F]-fluorodopamine positron emission tomography versus [131I]-metaiodobenzylguanidine scintigraphy in the localization of metastatic pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(9):4083–7.
20. Hoegerle S, Nitzsche E, Althoefer C, et al. Pheochromocytomas: detection with 18F DOPA whole body PET--initial results.. *Radiology*. 2002;222(2):507–12.
21. Timmers HJLM, Kozupa A, Chen CC, et al. Superiority of fluorodeoxyglucose positron emission tomography to other functional imaging techniques in the evaluation of metastatic SDHB-associated pheochromocytoma and paraganglioma. *J Clin Oncol*. 2007;25(16):2262–9.
22. Buchmann I, Henze M, Engelbrecht S, et al. Comparison of 68Ga-DOTATOC PET and 111In-DTPAOC (Octreoscan) SPECT in patients with neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007;34(10):1617–26.
23. Hofmann M, Maecke H, Börner R, et al. Biokinetics and imaging with the somatostatin receptor PET radioligand (68)Ga-DOTATOC: preliminary data. *Eur J Nucl Med*. 2001;28(12):1751–7.
24. Welander J, Soderkvist P, Gimm O. Genetics and clinical characteristics of hereditary pheochromocytomas and paragangliomas. *Endocr Relat Cancer*. 2011;18(6):R253–R276.
25. Favier J, Brière J-J, Burnichon N, et al. The Warburg effect is genetically determined in inherited pheochromocytomas. *PLoS One*. 2009;4(9):e7094.
26. Waldmann J, Fendrich V, Holler J, et al. Microarray analysis reveals differential expression of benign and malignant pheochromocytoma. *Endocr Relat Cancer*. 2010;17(3):743–56.

27. Qin Y, Yao L, King EE, et al. Germline mutations in TMEM127 confer susceptibility to pheochromocytoma. *Nat Genet.* 2010;42(3):229–33.
28. Comino-Méndez I, Gracia-Aznárez FJ, Schiavi F, et al. Exome sequencing identifies MAX mutations as a cause of hereditary pheochromocytoma. *Nat Genet.* 2011;43(7):663–7.
29. Hensen EF, Bayley J-P. Recent advances in the genetics of SDH-related paraganglioma and pheochromocytoma. *Fam Cancer.* 2011;10(2):355–63.
30. Hayashida Y, Santagata S, Barontini M, et al. A HIF1 a Regulatory Loop Links Hypoxia and Mitochondrial Signals in Pheochromocytomas. 2005;1(1).
31. Knudson AG. Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1996;122(3):135–40.
32. Rechsteiner MP, von Teichman A, Nowicka A, Sulser T, Schraml P, Moch H. VHL gene mutations and their effects on hypoxia inducible factor HIF α : identification of potential driver and passenger mutations. *Cancer Res.* 2011;71(16):5500–11.
33. Forman JR, Worth CL, Bickerton GRJ, Eisen TG, Blundell TL. Structural bioinformatics mutation analysis reveals genotype-phenotype correlations in von Hippel-Lindau disease and suggests molecular mechanisms of tumorigenesis. *Proteins.* 2009;77(1):84–96.
34. Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, et al. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science.* 2000;287(5454):848–51.
35. Pigny P, Vincent A, Cardot Bauters C, et al. Paraganglioma after maternal transmission of a succinate dehydrogenase gene mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(5):1609–15.
36. Yeap PM, Tobias ES, Mavraki E, et al. Molecular analysis of pheochromocytoma after maternal transmission of SDHD mutation elucidates mechanism of parent-of-origin effect. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(12):E2009–13.
37. Burnichon N, Rohmer V, Amar L, et al. The succinate dehydrogenase genetic testing in a large prospective series of patients with paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(8):2817–27.
38. Hao H-X, Khalimonchuk O, Schradars M, et al. SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. *Science.* 2009;325(5944):1139–42.
39. Bayley J-P, Kunst HPM, Cascon A, et al. SDHAF2 mutations in familial and sporadic paraganglioma and phaeochromocytoma. *Lancet Oncol.* 2010;11(4):366–72.
40. Kunst HPM, Rutten MH, de Mönnink J-P, et al. SDHAF2 (PGL2-SDH5) and hereditary head and neck paraganglioma. *Clin Cancer Res.* 2011;17(2):247–54.

41. Jimenez C, Rohren E, Habra MA, et al. Current and future treatments for malignant pheochromocytoma and sympathetic paraganglioma. *Curr Oncol Rep.* 2013;15(4):356–71.
42. Ichihara M, Murakumo Y, Takahashi M. RET and neuroendocrine tumors. *Cancer Lett.* 2004;204(2):197–211.
43. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell.* 1985;42(2):581–8.
44. Raue F, Frank-Raue K. Update multiple endocrine neoplasia type 2. *Fam Cancer.* 2010;9(3):449–57.
45. Karasek D, Frysak Z, Pacak K. Genetic testing for pheochromocytoma. *Curr Hypertens Rep.* 2010;12(6):456–64.
46. Vicha A, Musil Z, Pacak K. Genetics of pheochromocytoma and paraganglioma syndromes: new advances and future treatment options. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2013;20(3):186–91.
47. Burnichon N, Cascón A, Schiavi F, et al. MAX mutations cause hereditary and sporadic pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin Cancer Res.* 2012;18(10):2828–37.
48. Cascón A, Robledo M. MAX and MYC: a heritable breakup. *Cancer Res.* 2012;72(13):3119–24.
49. Jafri M, Maher ER. GENETICS IN ENDOCRINOLOGY: The genetics of phaeochromocytoma: using clinical features to guide genetic testing. *Eur J Endocrinol.* 2011;166(2):151–158.
50. Rattenberry E, Vialard L, Yeung A, et al. A Comprehensive Next Generation Sequencing–Based Genetic Testing Strategy To Improve Diagnosis of Inherited Pheochromocytoma and Paraganglioma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(7):E1248–E1256.
51. Loh KC, Fitzgerald PA, Matthay KK, Yeo PP, Price DC. The treatment of malignant pheochromocytoma with iodine-131 metaiodobenzylguanidine (131I-MIBG): a comprehensive review of 116 reported patients. *J Endocrinol Invest.* 1997;20(11):648–58.
52. Nomura K, Kimura H, Shimizu S, et al. Survival of patients with metastatic malignant pheochromocytoma and efficacy of combined cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine chemotherapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(8):2850–6.
53. Huang H, Abraham J, Hung E, et al. Treatment of malignant pheochromocytoma/paraganglioma with cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine: recommendation from a 22-year follow-up of 18 patients. *Cancer.* 2008;113(8):2020–8.

54. Grogan RH, Mitmaker EJ, Duh Q-Y. Changing paradigms in the treatment of malignant pheochromocytoma. *Cancer Control J Moffitt Cancer Cent.* 2011;18(2):104–112.
55. Favier J, Igaz P, Burnichon N, et al. Rationale for anti-angiogenic therapy in pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocr Pathol.* 2012;23(1):34–42.
56. Joshua AM, Ezzat S, Asa SL, et al. Rationale and evidence for sunitinib in the treatment of malignant paraganglioma/pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(1):5–9.
57. Jimenez C, Cabanillas ME, Santarpia L, et al. Use of the tyrosine kinase inhibitor sunitinib in a patient with von Hippel-Lindau disease: targeting angiogenic factors in pheochromocytoma and other von Hippel-Lindau disease-related tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(2):386–91.
58. Gross DJ, Munter G, Bitan M, et al. The role of imatinib mesylate (Glivec) for treatment of patients with malignant endocrine tumors positive for c-kit or PDGF-R. *Endocr Relat Cancer.* 2006;13(2):535–40.
59. Druce MR, Kaltsas GA, Fraenkel M, Gross DJ, Grossman AB. Novel and evolving therapies in the treatment of malignant phaeochromocytoma: experience with the mTOR inhibitor everolimus (RAD001). *Horm Metab Res.* 2009;41(9):697–702.
60. Oh D-Y, Kim T-W, Park YS, et al. Phase 2 study of everolimus monotherapy in patients with nonfunctioning neuroendocrine tumors or pheochromocytomas/paragangliomas. *Cancer.* 2012;118(24):6162–70.
61. Lowery AJ, Walsh S, McDermott EW, Prichard RS. Molecular and therapeutic advances in the diagnosis and management of malignant pheochromocytomas and paragangliomas. *Oncologist.* 2013;18(4):391–407.
62. Matro J, Giubellino A, Pacak K. Current and Future Therapeutic Approaches for Metastatic Pheochromocytoma and Paraganglioma: Focus on SDHB Tumors. *Horm Metab Res.* 2013;45(2):147–153.