

**JANAINA PETENUCCI**

**Investigação genética de feocromocitomas e paragangliomas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do título  
de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Madson Queiroz de Almeida

**São Paulo  
2022**

**JANAINA PETENUCCI**

**Investigação genética de feocromocitomas e paragangliomas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do título  
de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Madson Queiroz de Almeida

**São Paulo  
2022**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Petenuci, Janaina  
Investigação genética de feocromocitomas e  
paragangliomas / Janaina Petenuci. -- São Paulo,  
2022.  
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Endocrinologia.  
Orientador: Madson Queiroz de Almeida.

Descritores: 1.Feocromocitoma 2.Paraganglioma  
3.Genética 4.Metástase

USP/FM/DBD-241/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*Aos meus pais, João Luís e Jaqueline, por todo amor e apoio; e por serem minha maior referência e exemplos de responsabilidade, dedicação e trabalho.*

*A meu irmão e melhor amigo, João, por estar sempre ao meu lado, me ajudando e apoiando em tudo.*

*Ao meu bem, Phillip, por me apoiar e compartilhar esta grande conquista comigo.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida, pela possibilidade de trilhar este caminho e alcançar esta vitória.

A realização deste trabalho se tornou possível com a ajuda de pessoas que estiveram ao meu lado neste período, e a essas pessoas aqui estão os meus agradecimentos:

Ao meu orientador Prof. Dr. Madson Queiroz de Almeida, pela valiosa orientação e pelo exemplo como pesquisador e profissional competente e dedicado. Por estar sempre disponível quando precisei, me ajudando com seu vasto conhecimento e experiência. Agradeço-lhe pela atenção, apoio e ensinamentos. Sua orientação tornou possível a construção do nosso trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos no Ambulatório de Hipertensão Endócrina.

À Profa. Dra. Maria Cândida Barisson Villares Fragoso, por quem tenho uma grande admiração, pelo exemplo de altruísmo e assistência humanizada aos pacientes. Obrigada por todos os ensinamentos no Ambulatório de Suprarrenal.

Às Profas. Dras. Berenice Bilharinho de Mendonça e Ana Claudia Latrônico, pelo incentivo à realização deste projeto e por serem grandes incentivadoras da busca pelo conhecimento e da pesquisa.

À Profa. Dra. Maria Claudia Nogueira Zerbini, pelo exemplo de dedicação e paciência, pela colaboração e pelos ensinamentos durante a revisão do estudo anatomopatológico deste trabalho.

Às equipes da Unidade de Endocrinologia Geral, Unidade de Hipertensão do Instituto do Coração, Serviço de Urologia e Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da FMUSP, ICESP, Unidade de Genética: em especial aos Drs. Maria Adelaide Pereira, Daniela Iguchi, Alexander Jorge, João Evangelista, Delmar Lourenço, Ana Hoff, José Luis Chambô, Victor Srougi, Fábio Tanno, João Vicente da Silveira, Fernando Morbeck e Fernando Yamauchi, pela valiosa colaboração.

Ao Dr. Anna Flávia Figueiredo Benedetti e Lucas Santos de Santana, pelas contribuições nas análises de bioinformática.

À equipe do Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala da FMUSP (SELA), pela expertise e empenho na realização do sequenciamento paralelo em larga escala.

A todas as funcionárias do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM42, em especial à Mirian, Mariana, Nilda (*in memoriam*), Rosangele, Cidinha, Fran e Cristina, pela ajuda e contribuições constantes.

À Anna Flávia Figueiredo Benedetti e Augusto Garcia Guimarães, pelos ensinamentos de bancada transmitidos, por toda paciência e ajuda na realização deste trabalho. Sou imensamente grata por sempre estarem ao meu lado neste grande desafio que me propus.

Agradecimento em especial a Ana Caroline de Freitas Afonso que tem uma participação muito importante na rotina de sequenciamento diagnóstico dos pacientes com feocromocitomas e paragangliomas.

Às amigas e também companheiras de pós-graduação Amanda Meneses, Leticia Vilela, Marcela Rassi da Cruz, Vânia Balderrama, Helaine Charchar que desde o início dividem comigo as dificuldades e alegrias desta caminhada. Obrigada pelo companheirismo, carinho e amizade.

Às amigas feitas durante os anos de convivência na Unidade de Hipertensão Endócrina: Ana Alice Wolf Maciel e Gustavo FC Fagundes obrigada pela companhia sempre agradável, por toda ajuda e por tornarem essa caminhada mais proveitosa.

Aos membros participantes da minha banca de qualificação, Profa. Dra. Maria Cândida Barisson Villares Fragoso, Profa. Dra. Mariana Ferreira de Assis Funari e Prof. Dr. Leonardo Vieira Neto pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aprimoramento desta tese.

À minha mãe, Jaqueline, pelo amor incondicional e pelo exemplo e inspiração de ser humano que é para mim.

Ao meu pai, João Luis, por seu amor, integridade e caráter que são espelho e inspiração para mim.

Ao meu irmão, João, pelo amor, apoio e torcida em cada vitória alcançada.

Aos meus avós, pelo amor dedicado a mim e pelo incentivo e torcida durante toda esta caminhada.

À toda minha família, tios, tias, primas e primos que tanto torcem pelo meu sucesso.

Ao meu amor, Phillip, por todo apoio e por tornar esta caminhada mais leve e feliz.

Aos meus sogros e familiares, pelo incentivo e por toda torcida durante esta caminhada

Aos meus amigos, pelo apoio, incentivo e compreensão do tempo de convívio muitas vezes reduzido para a realização deste projeto.

Aos pacientes e seus familiares, por aceitarem participar e contribuir com este projeto.

*Construí amigos, enfrentei derrotas,  
venci obstáculos, bati na porta da vida  
e disse-lhe: Não tenho medo de vivê-la.*

*Augusto Cury*



### Agradecimentos Especiais

**À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo Temático 2019/15873-6**, que aprovou e financiou a execução deste projeto, pela confiança que dedica aos pesquisadores e à pesquisa científica.

**À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**, pela contribuição financeira por meio da bolsa de estudos, incentivo fundamental durante o período de pós-graduação.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de quadros	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Feocromocitomas e paragangliomas.....	2
1.2 Diagnóstico.....	3
1.2.1 Diagnóstico clínico e bioquímico.....	3
1.2.2 Diagnóstico topográfico.....	6
1.2.3 Diagnóstico anatomopatológico.....	7
1.3 PPGLs metastáticos.....	8
1.4 Tratamento.....	9
1.4.1 PPGLs localizados.....	9
1.4.2 PPGLs metastático.....	10
1.5 Aspectos genéticos dos PPGLs.....	14
1.5.1 Genética dos mPPGLs metastáticos.....	20
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 MÉTODOS.....	24
3.1 Considerações éticas.....	25
3.2 Avaliações hormonais e estudos moleculares.....	25
3.3 Pacientes.....	26
3.4 Estudos moleculares.....	27
3.4.1 Sequenciamento automático por SANGER.....	28
3.4.2 <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> .....	30
3.4.3 Sequenciamento paralelo em larga escala.....	32
3.4.4 Análise de bioinformática.....	34
3.4.5 Seleção de variantes de interesse.....	38
3.5 Análise estatística.....	39
4 RESULTADOS.....	40
4.1 Características clínicas e genéticas dos pacientes com PPGLs.....	41
4.2 Características clínicas e genéticas dos pacientes com PPGLs pediátricos.....	45
4.3 Pacientes com PPGLs metastáticos.....	52
4.3.1 Características clínicas.....	52
4.3.2 Diagnóstico genético.....	56

4.3.3	Correlação do diagnóstico genético com a captação das lesões metastáticas na cintografia com <sup>131</sup> I-MIBG.....	61
4.3.4	Tratamento sistêmico dos PPGLs metastáticos .....	63
4.4	Comparação entre PPGLs com e sem diagnóstico genético definido .....	64
4.5	Comparação entre PPGLs metastáticos e não metastáticos.....	65
5	DISCUSSÃO.....	67
6	CONCLUSÕES .....	75
7	ANEXOS .....	77
8	REFERÊNCIAS .....	93
	APÊNDICES.....	119

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<sup>131</sup> I-MIBG	- Metaiodobenzilguanidina marcada com I <sup>131</sup>
ACMG-	- <i>American of Medical Genetics and Genomics</i>
AMP	- <i>Association for Molecular Pathology</i>
ATRX	- Gene remodelador de cromatina ATRX
AZEDRA	- <sup>131</sup> I-MIBG de alta seletividade
BAM	- <i>Binary alignment map</i>
<i>BRAF</i>	- Proto-oncogene BRAF
<i>CDKN2A</i>	- Gene inibidor 2A de ciclina dependente de quinase
CVD	- Cisplatina, vincristina e dacarbazina
dNTP	- Desoxinucleotídeo trifosfato
<i>EGLN1</i>	- Gene prolil hidroxilase 2
<i>EGLN2</i>	- Gene prolil hidroxilase 1
ENS@T	- <i>European Network for the Study of Adrenal Tumors</i>
<i>EPAS1</i>	- Gene que codifica o fator indutor de hipóxia 2A
<i>FGFR1</i>	- Gene receptor 1 do fator de crescimento FGF
<i>FH</i>	- Gene fumarato desidrogenase
FMUSP	- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GnomAD	- <i>Genome Aggregation Database</i>
<i>H3F3A</i>	- Gene membro 3A da família de histona H3
HA	- Hipertensão arterial
HIF-2 $\alpha$	- Fator induzido por hipóxia 2 $\alpha$
<i>HRAS</i>	- Proto-oncogene HRas
ICESP	- Instituto do Câncer de São Paulo Octavio Frias de Oliveira
<i>IDH2</i>	- Gene isocitrato desidrogenase 2
IGV	- <i>Integrative Genomics Viewer</i>
<i>KIF1B</i>	- Gene membro 1B da família das kinases
<i>KMT2D</i>	- Gene lisina metiltransferase 2D

LB	- Variante provavelmente benigna
LP	- Variante provavelmente patogênica
MAX	- Gene MYC associado ao fator X
MDH2	- Gene malato desidrogenase 2
MERTK	- Proto-oncogene MER
MET	- Proto-oncogene MET
MGMT	- 6-metilguanidina-DNA-metiltransferase
MIBG	- metaiodobenzilguanidina
MLPA	- <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
NEM	- Neoplasia endócrina múltipla
NF1	- Neurofibromatose tipo 1
OMS	- Organização Mundial da Saúde
P	- Variante Patogênica
PASS	- <i>Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score</i>
PCR	- Reação em polimerase da cadeia
PET-TC	- Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons
PHD	- Prolil-hidroxilases
PPGLs	- Feocromocitomas e o paragangliomas
RECIST	- <i>Response Evaluation Criteria in Solid Tumours</i>
RET	- REarranged during Transfection
RM	- Ressonância magnética
ROC	- <i>Receiver operator characteristic curve</i>
SDH	- Succinato desidrogenases
SDHAF2	- Gene enzima responsável pela flavinação da subunidade SDHA
SDHx	- Genes codificadores das subunidades da succinato desidrogenase
SELA	- Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala
SLC25A11	- Gene codificador da proteína carreadora da malato/2-oxoglutarato mitocondrial
SPECT-TC	- Tomografia computadorizada de emissão de fóton único
SPLE	- Sequenciamento paralelo em larga escala
TC	- Tomografia computadorizada
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

<i>TERT</i>	- Gene codificador da transcriptase reversa da telomerase
<i>TMEM217</i>	- Genes codificadores da proteína transmembrana
TNM	- <i>Tumor size, Lymph Nodes affected, Metastases</i>
<i>TP53</i>	- Gene supressor tumoral
VCF	- <i>Variant Call Format</i>
VHL	- von Hippel-Lindau
VPs	- Variantes patogênicas
VUS	- Variante de significado incerto

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Algoritmo para tratamento dos PPGLs metastáticos .....	12
Figura 2 -	Mecanismos de pseudohipóxia nos feocromocitomas e paragangliomas causados por defeitos nos genes do <i>cluster 1</i> <sup>54</sup> .....	16
Figura 3 -	Fluxograma dos pacientes com PPGLs atendidos no Hospital das Clínicas e ICESP de 1981 a 2021 .....	26
Figura 4 -	Algoritmo de investigação genética dos pacientes com PPGLs .....	27
Figura 5 -	Processo de filtragem das variantes germinativas identificadas no <i>Freebayes</i> que foram anotadas utilizando o <i>AnnoVar</i> .....	38
Figura 6 -	Eletroferogramas obtido por meio do sequenciamento pelo método Sanger de paciente com paraganglioma metastático mostrando as variantes patogênicas c.423+1G>A (A) e c.688C>T (B) no <i>SDHB</i> .....	57
Figura 7 -	Deleção do exon 1 (A) e completa (B) do gene <i>SDHB</i> em um paciente com paraganglioma metastático detectada por MLPA .....	58
Figura 8 -	Deleção do exon 4 do gene <i>SDHD</i> em um paciente com paraganglioma metastático detectada por MLPA .....	59
Figura 9 -	A, Paciente (caso 32) com deleção do exon 1 no <i>SDHB</i> com metástase pulmonar na TC de tórax, metástases ósseas na cintilografia óssea e ausência de captação das lesões metastáticas na cintilografia com <sup>131</sup> I-MIBG. B, Paciente (caso 33) com paraganglioma cervical metastático e deleção do exon 1 do <i>SDHB</i> com metástases ósseas e pulmonares evidenciadas no octreoscan, mas sem captação na cintilografia com <sup>131</sup> I-MIBG. C, Paciente (caso 14) com paraganglioma metastático e VP germinativa (c.201-2A>G) no <i>SDHB</i> com lesões metastáticas com alta avidéz na cintilografia com <sup>131</sup> I-MIBG .....	62



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resposta objetiva baseada nos critérios de RECIST associadas às terapias sistêmicas para os feocromocitomas e paragangliomas metastáticos .....	11
Tabela 2 - Características clínicas dos pacientes (casos índices) com feocromocitomas e paragangliomas.....	41
Tabela 3 - Diagnóstico genético dos casos índices com feocromocitomas e paragangliomas após investigação por SANGER, MLPA e painel genético por SPLE .....	42
Tabela 4 - Frequência dos defeitos genéticos identificados no gene <i>SDHB</i> na coorte de pacientes com feocromocitomas e paragangliomas .....	43
Tabela 5 - Variantes de significado incerto identificadas em pacientes com feocromocitomas e paragangliomas pelo painel de genes alvo por SPLE.....	44
Tabela 6 - Características clínicas dos pacientes com feocromocitomas e paragangliomas pediátricos.....	45
Tabela 7 - Diagnóstico genético dos pacientes índices pediátricos com feocromocitomas e paragangliomas após investigação por SANGER, MLPA e painel genético por SPLE.....	46
Tabela 8 - Dados clínicos e genéticos dos pacientes com feocromocitomas e paragangliomas pediátricos com VPs germinativas em heterozigose no gene <i>VHL</i> ou <i>RET</i> .....	48
Tabela 9 - Dados clínicos e genéticos dos pacientes com feocromocitomas e paragangliomas pediátricos com VPs germinativas em heterozigose no gene <i>SDHB</i> ou <i>SDHD</i> .....	49
Tabela 10 - Dados clínicos e genéticos dos pacientes com feocromocitomas e paragangliomas pediátricos sem diagnóstico genético definido após investigação por painel genético por SPLE .....	50
Tabela 11 - Características clínicas dos pacientes com feocromocitomas e paragangliomas metastáticos .....	52
Tabela 12 - Características clínicas, genéticas e evolutivas dos pacientes com feocromocitomas e paragangliomas metastáticos.....	53

Tabela 13 - Diagnóstico genético dos pacientes com feocromocitomas e paragangliomas metastáticos após investigação por SANGER, MLPA e painel genético por SPLE.....	56
Tabela 14 - Características clínicas e genéticas dos pacientes com feocromocitomas e paragangliomas metastáticos com VPs no gene <i>SDHB</i> identificadas por SANGER.....	57
Tabela 15 - Características clínicas e genéticas dos pacientes com feocromocitoma e paraganglioma metastáticos com grandes deleções nos genes <i>SDHB</i> e <i>SDHD</i> detectadas pela técnica de MLPA .....	57
Tabela 16 - Características clínicas e genéticas dos pacientes com feocromocitoma e paraganglioma metastáticos com variantes patogênicas identificadas no painel genético por SPLE .....	60
Tabela 17 - Características clínicas e genéticas dos pacientes com feocromocitomas e paragangliomas metastáticos sem diagnóstico definido após o painel genético por SPLE .....	61
Tabela 18 - Comparação entre pacientes com feocromocitomas e paragangliomas com e sem diagnóstico genético definido.....	64
Tabela 19 - Comparação entre pacientes com feocromocitomas e paragangliomas metastáticos e não metastáticos (com mais de 12 meses de seguimento) .....	66
Tabela 20 - Análise multivariada por regressão logística dos preditores de doença metastática em pacientes com feocromocitomas e paragangliomas .....	66

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais síndromes genéticas associadas aos feocromocitomas e paragangliomas.....	15
Quadro 2 - Classificação molecular dos genes envolvidos na patogênese dos feocromocitomas e paragangliomas .....	18
Quadro 3 - Oligonucleotídeos dos genes <i>SDHB</i> , <i>SDHD</i> e <i>SDHC</i> utilizados para sequenciamento pelo método Sanger .....	28
Quadro 4 - Oligonucleotídeos dos genes <i>VHL</i> , <i>TMEM127</i> e <i>MAX</i> utilizados para sequenciamento pelo método Sanger .....	29

## RESUMO

Petenuci J. *Investigação genética de feocromocitomas e paragangliomas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

**Introdução:** feocromocitomas e paragangliomas (PPGLs) são tumores neuroendócrinos derivados das células cromafins (80% são feocromocitomas e 20% são paragangliomas). Aproximadamente 15%-20% dos PPGLs são classificados como metastáticos, definidos pela presença de metástase em tecidos de origem não cromafim. Os PPGLs são as neoplasias mais associadas com hereditariedade, com variantes patogênicas (VPs) germinativas sendo identificadas em 40% dos pacientes. Até o momento, pelo menos 20 genes de susceptibilidade tumoral para PPGLs foram descritos. Variantes patogênicas germinativas no *SDHB* representam o fator preditor mais estabelecido para doença metastática. **Objetivo:** investigar a etiologia genética de uma grande coorte de pacientes com PPGLs metastáticos e não metastáticos. **Métodos:** variantes patogênicas e grandes deleções germinativas nos genes *VHL*, *SDHB*, *SDHD*, *SDHC*, *TMEM127* e *MAX* foram investigadas pelas técnicas de SANGER e *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) em 155 pacientes índices com PPGLs. Posteriormente, 33 casos negativos foram estudados por meio de um painel genético por sequenciamento paralelo em larga escala. **Resultados:** o diagnóstico genético foi definido em 72 (46,5%) dos 155 pacientes com PPGLs. Os genes mais frequentemente afetados foram *SDHB* (14%) e *RET* (13,5%), seguidos por *VHL* (7,8%), *SDHD* (3,2%), *NFI* (2,6%), *SDHA* (1,3%), *TMEM127* (1,3%), *MAX* (1,3%), *KIF1B* (< 1%) e *H3F3A* (< 1%). Todas os defeitos genéticos germinativos foram identificados em heterozigose. Dentre os 22 defeitos germinativos no *SDHB*, 7 são VP *missense* (32%), 4 são VP *frameshift/stop codon* (18%), 2 VP em sítio de *splicing* (9%) e 9 grandes deleções do *SDHB* (41%). A deleção completa do exon 1 do *SDHB* foi a alteração genética mais frequente do *SDHB*, sendo identificada em 8 de 22 pacientes (36,4%). Doença metastática foi diagnosticada em 11 de 22 casos (52%) com *SDHB* mutado. Na coorte de PPGLs pediátricos, VPs germinativas em heterozigose foram identificadas em 12 (72%) de 21 casos índices: *VHL* 28%, *SDHB* 28%, *SDHD* 9% e *RET* 4%. Doença metastática foi diagnosticada em 37 (24%) de 155 casos índices com PPGLs. Dentre os PPGLs metastáticos, 16 casos (43,2%) tiveram diagnóstico genético definido: *SDHB* 11 casos (29,7%), *NFI* dois casos (5,4%), *SDHD* um caso (2,7%), *SDHA* um caso (2,7%) e *KIF1B* um caso (2,7%). A deleção completa do exon 1 do *SDHB* foi associada a ausência de captação das lesões metastáticas na cintilografia com  $^{131}\text{I}$ -MIBG ( $\chi^2 = 6,39$ ,  $p = 0,012$ ). A presença de alterações genéticas do *SDHB* ( $p = 0,01$ ) e um escore de PASS  $\geq 4$  ( $p = 0,04$ ) foram preditores independentes de doença metastática. **Conclusões:** o diagnóstico genético foi definido em 47% dos pacientes com PPGLs. A deleção completa do exon 1 foi a alteração genética mais frequente do *SDHB*. O diagnóstico genético foi definido em 72% dos PPGLs pediátricos, com

o *VHL* sendo o gene mais comumente mutado. A frequência de diagnóstico genético nos PPGLs metastáticos foi 43%, com *SDHB* sendo o gene mais afetado. A deleção completa do exon 1 do *SDHB* foi associada a ausência de captação das lesões metastáticas na cintilografia com <sup>131</sup>I-MIBG.

Descritores: Feocromocitoma; Paraganglioma; Genética; Metástase.

## ABSTRACT

Petenuci J. *Genetic investigation of pheochromocytomas and paragangliomas* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

**Introduction:** pheochromocytomas and paragangliomas (PPGLs) are rare neuroendocrine tumors arising from chromaffin cells (pheochromocytomas 80% and paragangliomas 20%). About 10%-20% of the patients with PPGLs develop metastatic disease, defined by the presence of tumor in non-chromaffin tissues. PPGLs have the highest heritability among endocrine tumors. Currently, about 40% of PPGL individuals have genetic germline pathogenic variants (PVs) in at least 20 different susceptibility genes. Germline PVs in *SDHB* gene are the most well-established risk factor to predict metastatic disease. **Aim:** to investigate genetic etiology of a large cohort of metastatic and non-metastatic PPGLs. **Methods:** Germline PVs and large deletions in *VHL*, *SDHB*, *SDHD*, *SDHC*, *TMEM127* and *MAX* genes were investigated by SANGER and Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) in 155 index patients with PPGLs. After this first step, a custom target enrichment panel for PPGL susceptibility genes was performed in 33 negative cases. **Results:** genetic diagnosis was identified in 72 (46.5%) out of 155 patients with PPGLs. The most affected genes were *SDHB* (14%) and *RET* (13.5%), followed by *VHL* (7.8%), *SDHD* (3.2%), *NF1* (2.6%), *SDHA* (1.3%), *TMEM127* (1.3%), *MAX* (1.3%), *KIF1B* (<1%) and *H3F3A* (<1%). All germline genetic alterations were identified in heterozygosity. Among 22 germline defects in *SDHB*, 7 were *missense* PVs (32%), 4 were *frameshift/stop codon* PVs (18%), 2 were *splicing site* PVs (9%) and 9 were *SDHB* large deletions (41%). The exon 1 complete deletion was the most frequent genetic alteration of *SDHB*, being identified in 8 out of 22 patients (36.4%). Metastatic disease was diagnosed in 11 out of 22 (52%) *SDHB* mutant PPGLs. Among pediatric PPGLs, germline PVs were identified in 12 (72%) out of 21 index cases: *VHL* 28%, *SDHB* 28%, *SDHD* 9% and *RET* 4%. Metastatic disease was diagnosed in 37 (24%) out of 155 PPGL patients. Among metastatic PPGLs, 16 cases (43.2%) had a positive genetic diagnosis: *SDHB* 11 cases (29.7%), *NF1* two cases (5.4%), *SDHD* one case (2.7%), *SDHA* one case (2.7%) and *KIF1B* one case (2.7%). Patients with *SDHB* exon 1 complete deletion presented metastatic lesions with a negative uptake in the <sup>131</sup>I-MIBG scintigraphy ( $X_2 = 6.39$ ,  $p = 0.012$ ). The presence of *SDHB* genetic defects ( $p = 0.01$ ) and a PASS score  $\geq 4$  ( $p = 0.04$ ) were independent predictors of metastatic disease. **Conclusion:** genetic diagnosis was identified in almost half of PPGLs. *SDHB* exon 1 complete deletion was the most frequent genetic alteration of *SDHB*. Genetic diagnosis was achieved in the majority (72%) of pediatric PPGLs, with *VHL* being the most frequent mutated gene. Among metastatic PPGLs, genetic diagnosis was defined in 43% of the cases, with *SDHB* being the most affected gene. *SDHB* exon 1 complete deletion was associated with absence of uptake of metastatic lesion in <sup>131</sup>I-MIBG scintigraphy.

Descriptors: Pheochromocytoma; Paraganglioma; Genetics; Metastases.

# **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Feocromocitomas e paragangliomas**

A hipertensão arterial (HA) é um importante fator de risco cardiovascular que acomete de 10% a 40% da população adulta em países industrializados<sup>1</sup>. No Brasil, a HA atinge 32,5% (36 milhões) de indivíduos adultos<sup>2</sup>. Na maior parte dos casos, a HA é primária (essencial ou idiopática), mas 15% dos pacientes têm formas secundárias de HA. Em adultos jovens (< 40 anos), a prevalência de HA secundária é de aproximadamente 30%<sup>1</sup>. O diagnóstico da HA secundária é particularmente importante porque permite o tratamento etiológico específico, aumentando a possibilidade de cura. Dentre as causas endócrinas de HA secundária, os feocromocitomas e o paragangliomas (PPGLs) constituem a causa com maior potencial de remissão completa da HA após o tratamento cirúrgico<sup>3</sup>.

Os PPGLs são tumores neuroendócrinos derivados das células cromafins da medula adrenal (feocromocitomas) ou dos gânglios simpáticos paravertebrais torácicos e abdominais ou dos gânglios parassimpáticos cervicais ou da base do crânio (paragangliomas). Os achados anatomopatológicos não distinguem feocromocitomas e paragangliomas, sendo a distinção estabelecida pela localização anatômica<sup>4</sup>. A diferenciação entre feocromocitomas e paragangliomas tem implicações nas neoplasias associadas, no potencial de malignidade e na positividade da investigação genética<sup>5</sup>. Aproximadamente 80% a 85% dos PPGLs são feocromocitomas e 15%-20% são paragangliomas<sup>5</sup>.



A maioria dos pacientes com PPGLs apresenta doença localizada, sendo potencialmente curáveis com a ressecção cirúrgica<sup>5,6</sup>. Entretanto, 15%-17% dos PPGLs apresentam comportamento maligno, definido pela presença de metástases em tecidos não cromafins<sup>7</sup>. Após a revisão da classificação dos tumores pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o PPGLs passaram a ser classificados em não-metastáticos e metastáticos, ao invés de benignos e malignos<sup>4</sup>.

## **1.2 Diagnóstico**

### **1.2.1 Diagnóstico clínico e bioquímico**

A HA é a apresentação mais comum e decorre dos efeitos cardiovasculares das catecolaminas. O quadro clássico é de paroxismos adrenérgicos pela liberação tumoral súbita de catecolaminas<sup>8</sup>. O diagnóstico é usualmente sugerido por uma sintomatologia típica, pelo diagnóstico de incidentaloma adrenal (principalmente lesões heterogêneas com baixo conteúdo lipídico) ou por uma história familiar de PPGLs. A tríade clássica é cefaleia (90%), sudorese (60%-70%) e taquicardia<sup>5</sup>. Paroxismos estão presentes em aproximadamente 50% dos casos, enquanto o restante dos pacientes apresenta HA mantida ou menos frequentemente (10%-15% dos casos) pressão arterial normal<sup>5,9</sup>. Outros sintomas e sinais menos frequentes incluem perda de peso, constipação, *flushing*, febre e alterações visuais. Os pacientes com PPGLs podem apresentar também alterações glicêmicas (aumento da resistência insulínica e redução da secreção de insulina) e cardiomiopatia associadas ao excesso de catecolaminas<sup>9</sup>.

Recentemente, um estudo multicêntrico da Europa comparou uma coorte de 245 pacientes com PPGLs com 1820 pacientes com quadro clínico sugestivo, mas para os quais o diagnóstico de PPGL foi excluído após investigação bioquímica<sup>10</sup>. Os pacientes com PPGLs tiveram mais sudorese, palpitação, palidez e tremores, enquanto outros sintomas e sinais como cefaleia, *flushing* ou paroxismos de pressão não diferiram entre os dois grupos.

Os paragangliomas abdominais estão associados com manifestações clínicas decorrentes do excesso da secreção de catecolaminas em 50% dos casos. A grande maioria dos paragangliomas de cabeça e pescoço são não-funcionantes, apresentando somente sintomas decorrentes do efeito de massa, como dor e compressão de estruturas adjacentes<sup>5,11</sup>.

A investigação bioquímica inicial para os pacientes com suspeita de PPGLs deve ser feita pela dosagem de metanefrinas plasmáticas livres ou metanefrinas fracionadas em urina de 24 horas determinadas por cromatografia líquida com espectrometria de massa<sup>5,12</sup>. As metanefrinas plasmáticas devem ser coletadas após 30 min em posição supina, já que a coleta em posição sentada aumenta resultados falsos positivos em até três vezes<sup>13</sup>. As metanefrinas e normetanefrinas plasmáticas livres ou fracionadas na urina têm uma acurácia diagnóstica superior que as catecolaminas fracionadas (epinefrina, norepinefrina e dopamina) e o ácido vanilmandélico urinário, em virtude da contínua metabolização intratumoral das catecolaminas<sup>14,15</sup>. As catecolaminas fracionadas urinárias são menos sensíveis (86%), mas valores bem elevados (três vezes acima do limite superior do método) são usualmente diagnósticos<sup>5</sup>. A combinação de diferentes testes não aumentou a acurácia diagnóstica bioquímica dos PPGLs<sup>16</sup>.

Uma dosagem de metanefrinas e normetanefrinas livres plasmáticas ou fracionadas urinárias dentro da normalidade em pacientes sintomáticos praticamente exclui o diagnóstico de PPGL funcionante<sup>12</sup>. A sensibilidade das metanefrinas e normetanefrinas livres plasmáticas é superior à da dosagem fracionada na urina (98% vs. 93%), mas possuem especificidades similares (94%)<sup>17</sup>. As metanefrinas e normetanefrinas livres plasmáticas são superiores aos metabólitos urinários principalmente em pacientes com uma elevada suspeição para o diagnóstico de PPGLs, como indivíduos com história prévia ou doença hereditária associada aos PPGLs.

Qualquer condição clínica ou uso de medicações (antidepressivos tricíclicos, inibidores de recaptção de norepinefrina e levodopa) que aumentem a atividade simpática podem levar a resultados falsos positivos<sup>5</sup>. No caso das medicações interferentes, é essencial suspender as medicações duas semanas para a investigação bioquímica<sup>8</sup>. Se as normetanefrinas plasmáticas livres permanecem elevadas (abaixo de duas vezes o limite superior do método) após a suspensão dos interferentes, o teste de supressão com a clonidina pode ser útil para excluir falsos positivos<sup>18</sup>.

Os paragangliomas associados a variantes patogênicas (VPs) germinativas nos genes codificadores das subunidades da succinato desidrogenase (*SDHx*) apresentam elevação da 3-metoxitiramina, metabólito da dopamina, em 70% dos casos<sup>19</sup>. A dosagem de 3-metoxitiramina pode ser empregada para o diagnóstico e seguimento de PPGLs produtores de dopamina<sup>12</sup>. A cromogranina A é um marcador de tumor neuroendócrino e pode estar elevada em pacientes com PPGLs, mas apresenta uma baixa especificidade e não é utilizada rotineiramente na prática clínica<sup>5</sup>.

### 1.2.2 Diagnóstico topográfico

A investigação topográfica dos PPGLs deve ser iniciada somente após a confirmação do diagnóstico bioquímico<sup>5</sup>. Como 90% dos PPGLs estão localizados no abdômen, o exame de imagem inicial deve ser uma tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM) de abdômen. Para a maioria dos casos, a RM não apresenta nenhuma vantagem adicional em relação a TC, que possui uma excelente resolução espacial<sup>5</sup>. A RM é o exame de escolha em pacientes com doença metastática, paraganglioma de cabeça e pescoço, alergia a contraste iodado ou que devem ter exposição reduzida a radiação como em crianças, gestantes e portadores de defeitos genéticos germinativos<sup>5</sup>.

A metaiodobenzilguanidina (MIBG) é um análogo da norepinefrina e compete com esse neurotransmissor em um mecanismo de recaptação tumoral. O MIBG é, portanto, um marcador de tumor de linhagem de origem neuroectodérmica. A sensibilidade da cintilografia com MIBG marcada com <sup>131</sup>I (<sup>131</sup>I-MIBG) é aproximadamente 80% para feocromocitomas e 50% para paragangliomas<sup>20,21</sup>. Os métodos de imagem funcionais como a cintilografia com MIBG-<sup>131</sup>I acoplada à TC de emissão de fóton único (SPECT-TC) ou TC por emissão de pósitrons (PET-TC) com análogo de somatostatina marcado com <sup>68</sup>Ga estão indicados para pacientes com alto risco para doença metastática ou multifocal, feocromocitoma > 5 cm ou paraganglioma de qualquer tamanho<sup>5,8,12</sup>. A PET-TC com DOTATE marcado com <sup>68</sup>Ga se mostrou o método de maior sensibilidade (98%) para o diagnóstico da doença metastática associada aos PPGLs quando comparado à PET-TC com 18-fluorodeoxiglicose (<sup>18</sup>FDG) e a cintilografia com <sup>131</sup>I-MIBG<sup>11,22,23</sup>. A cintilografia com <sup>131</sup>I-MIBG com SPECT-TC possui uma maior sensibilidade para o seguimento de pacientes com feocromocitoma<sup>24,25</sup>.

### 1.2.3 Diagnóstico anatomopatológico

Até o momento, é difícil prever doença metastática em pacientes com PPGL sem metástases ao diagnóstico<sup>6,26,27</sup>. Com base nesses achados, a OMS (definiu que todos os PPGLs têm potencial metastático e que o diagnóstico de PPGL metastático deve ser feito somente a partir do momento do diagnóstico da doença metastática<sup>28</sup>.

A classificação histológica que mais têm sido utilizada para auxiliar na determinação do potencial de malignidade dos PPGLs é o escore de *Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score* (PASS)<sup>26,29</sup>. O escore de PASS avalia: a) invasão vascular (escore = 1), capsular (escore = 1) ou de tecido adiposo periadrenal (escore = 2); b) crescimento difuso ou nichos volumosos (escore = 2); c) necrose focal ou difusa (escore = 2); d) alta celularidade (escore = 2); e) tumor com células espiculadas (escore = 2); f) monotonia celular (escore = 2); g) índice mitótico ( $> 3/10$ ; escore = 2); h) mitoses atípicas (escore = 2); i) pleomorfismo nuclear (escore = 1); j) hiper cromasia (escore = 1) (Anexo A). Um escore de PASS  $\geq 4$  sugere um maior potencial para comportamento biologicamente mais agressivo<sup>26,30</sup>. A sensibilidade de um escore de PASS  $\geq 4$  para determinar o potencial metastático dos feocromocitomas foi 97% em uma metanálise, mas foi associada a uma baixa especificidade de 68%<sup>26</sup>. Outras limitações incluem a não aplicabilidade a paragangliomas, falta de validação em estudos prospectivos e reprodutibilidade questionável<sup>31</sup>.

Em 2017, o primeiro sistema de estadiamento *scoring system: Tumor size, Lymph Nodes affected, Metastases* (TNM) para PPGLs foi estabelecido (Anexo B)<sup>6</sup>. Feocromocitomas  $< 5$  cm são classificados como T<sub>1</sub>, enquanto feocromocitomas  $\geq 5$  cm ou paragangliomas simpáticos de qualquer tamanho são estadiados como T<sub>2</sub>. PPGLs localmente invasivos são classificados como T<sub>3</sub>. Até o momento, o papel do marcador de proliferação celular Ki-67 para caracterizar a agressividade dos PPGLs não foi determinada<sup>31</sup>.

### 1.3 PPGLs metastáticos

Os PPGLs metastáticos são definidos pela presença de metástases em tecidos não cromafins. A prevalência de malignidade nos PPGLs é de 10%-15%, mas depende fundamentalmente do tipo de alteração genética germinativa<sup>5</sup>. Pacientes com paraganglioma de qualquer tamanho, feocromocitomas > 5 cm ou com VP germinativa nos genes *SDHB* ou *SDHD* possuem um risco maior de doença metastática e requerem um seguimento mais rigoroso<sup>5</sup>. Pacientes com teste genético negativo e feocromocitoma < 5 cm possuem um risco de menor para o desenvolvimento de metástase<sup>32</sup>. A produção de dopamina também se correlacionou com a presença de doença metastática<sup>11</sup>.

Uma progressão mais rápida dos PPGLs metastáticos foi associada a idade avançada ao diagnóstico do tumor primário, tamanho tumoral e metástases sincrônicas<sup>11</sup>. Em uma análise retrospectiva da *European Network for the Study of Adrenal Tumors* (ENS@T), elevação de metanefrinas cinco vezes maior que o limite superior de normalidade também se correlacionou com redução da sobrevida global<sup>7</sup>. A presença de VP no *SDHB* foi previamente associada com redução da sobrevida global em pacientes com PPGLs, mas esse achado não foi confirmado em estudo subsequente<sup>7,33</sup>.

Aproximadamente 35% dos pacientes com PPGLs metastáticos se apresentam com metástases sincrônicas, enquanto 65% desenvolvem metástases após um tempo de seguimento médio de 5,5 anos. Os principais sítios de metástases são ossos (59%), linfonodos (47%), fígado (38%) e pulmão (36%)<sup>7,11</sup>. Aproximadamente 20% dos pacientes com PPGLs metastáticos desenvolvem somente metástases ósseas, que são principalmente líticas<sup>34</sup>. A sobrevida média dos pacientes com PPGLs metastáticos é de aproximadamente 6 anos<sup>7</sup>.

## 1.4 Tratamento

### 1.4.1 PPGLs localizados

Os pacientes com PPGLs funcionantes devem ser submetidos a um preparo pré-operatório que consiste no bloqueio  $\alpha$ -adrenérgico para prevenir complicações cardiovasculares. Esse preparo deve ser iniciado no mínimo 14 dias antes da cirurgia a fim de permitir o adequado controle pressórico e da frequência cardíaca<sup>35</sup>. O tratamento deve incluir também uma dieta rica em sódio e líquidos para corrigir a depleção volêmica causada pela vasoconstrição e evitar hipotensão grave no pós-operatório<sup>5</sup>. O uso de bloqueadores seletivos dos receptores  $\alpha_1$  (prazosina ou doxazosina de liberação lenta) está indicado para o controle da HA e dos sintomas adrenérgicos. A dose inicial de doxazosina é 1 mg 2x/dia e deve ser titulada em geral até 6-12 mg/dia. O objetivo do tratamento é manter uma pressão < 130 mmHg x 80 mmHg na posição supina e uma pressão sistólica > 90 mmHg em ortostase. Se o paciente apresentar hipotensão postural, a dose do  $\alpha$ -bloqueador deve ser ajustada para evitar hipotensão postural e outras classes de anti-hipertensivos devem ser adicionadas (preferencialmente bloqueadores de canal de cálcio). O uso de  $\beta$ -bloqueador deve ser iniciado somente nos pacientes que já estão em uso de  $\alpha$ -bloqueador e apresentaram taquicardia reflexa durante o  $\alpha$ -bloqueio. Os bloqueadores  $\alpha_1$  devem ser suspensos 12 horas antes da cirurgia para evitar hipotensão refratária após a ressecção do tumor.

A ressecção cirúrgica está indicada inicialmente para os tumores primários, sendo a via preferencial laparoscópica. Os tumores com mais de 8 cm e sinais radiológicos de invasão local devem ser abordados por via aberta.

### 1.4.2 PPGLs metastático

O tratamento dos PPGLs metastáticos inclui o tratamento dos sintomas adrenérgicos com a-bloqueio, tratamento sistêmico para controle de crescimento tumoral, terapia antirreabsortiva para metástases ósseas e terapias locais (radioterapia e ablação). A terapia com a-bloqueio para prevenção e tratamento de crises adrenérgicas está indicada para os PPGLs funcionantes e segue as mesmas orientações descritas no preparo perioperatório. Vale ressaltar que os pacientes com PPGLs funcionantes devem estar adequadamente a-bloqueados antes de qualquer terapia sistêmica para prevenir crises adrenérgicas causadas pela lise tumoral. Como os PPGLs metastáticos são em geral indolentes e associados a uma sobrevida global média superior a 5 anos, a ressecção cirúrgica para *debulking* deve ser considerada no tratamento<sup>36</sup>.

O tratamento sistêmico está indicado no diagnóstico inicial de doença metastática em pacientes sintomáticos ou na vigência de progressão de doença documentada por critérios de *Response Evaluation Criteria in Solid Tumours* (RECIST) (Tabela 1, Figura 1). A terapia sistêmica mais utilizada é o tratamento com <sup>131</sup>I-MIBG. Como o MIBG possui uma estrutura similar a norepinefrina, ele é captado pelas células tumorais e induz morte celular causada pela emissão de radiação  $\beta$ . Aproximadamente 50%-80% das lesões metastáticas têm uma captação positiva no MIBG. Dessa forma, o <sup>131</sup>I-MIBG é a primeira linha de tratamento nesse grupo com captação positiva. O único estudo fase II com <sup>131</sup>I-MIBG (dose 492 a 1.160 mCi fracionada em várias aplicações) demonstrou resposta objetiva em 22% dos pacientes com PPGLs metastáticos<sup>37</sup>. Os efeitos tóxicos mais importantes foram neutropenia (87%) e trombocitopenia (83%). Recentemente, a tecnologia de preparo

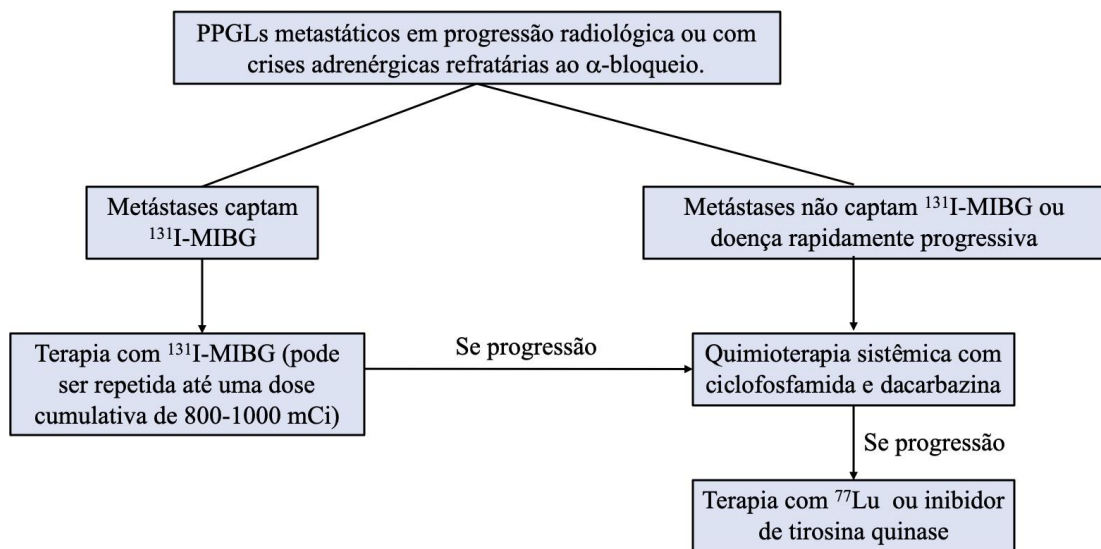


do  $^{131}\text{I}$ -MIBG foi aperfeiçoada, gerando um  $^{131}\text{I}$ -MIBG de alta seletividade (AZEDRA) com uma capacidade maior de liberar radioatividade no tumor por dose (92,5 MBq/kg vs. 1,59 MBq/kg). Um estudo fase II com AZEDRA em 50 pacientes com PPGLs metastáticos demonstrou resposta parcial em 30% e doença estável em 68% dos pacientes após a segunda dose do AZEDRA<sup>38</sup>. Após a primeira dose de tratamento, 25% dos pacientes tiveram uma redução de 50% nas medicações anti-hipertensivas com duração mínima de 6 meses. O tratamento com AZEDRA foi também associado a uma redução  $\geq 50\%$  na normetanefrina plasmática em 44% dos pacientes com duração mediana de resposta de 10 meses. Os efeitos colaterais mais frequentes foram toxicidade hematológica, náusea, vômitos, fadiga, boca seca e cefaleia. Toxicidade hematológica grau 3 ou 4 foi evidenciada em 72% dos pacientes, mas somente 25% necessitaram de terapia de suporte hematológico<sup>38</sup>. O AZEDRA foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento de PPGLs metastáticos, mas ainda não está disponível no Brasil.

**Tabela 1 - Resposta objetiva baseada nos critérios de RECIST associadas às terapias sistêmicas para os feocromocitomas e paragangliomas metastáticos**

Tratamento	Estudo	n	Taxa de resposta objetiva (%)
$^{131}\text{I}$ -MIBG (AZEDRA)*	Fase II <sup>38</sup>	50	30
$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC	Fase II <sup>39</sup>	30	23
Ciclofosfamida e dacarbazina	Retrospectivo <sup>40</sup>	52	25
Temozolomida	Retrospectivo <sup>41</sup>	15	33
Everolimus	Fase II <sup>42</sup>	7	0
Sunitinibe	Fase II <sup>43</sup>	17	18
Pazopanibe	Fase II <sup>44</sup>	7	14
Cabozantinibe <sup>#</sup>	Fase II	15	53

\*Duas doses de AZEDRA; <sup>#</sup>Dados não publicados.



MIBG: metaiodobenzilguanidina.

**Figura 1 - Algoritmo para tratamento dos PPGLs metastáticos**

O esquema de terapia citotóxica mais comumente usado para tratar PPGLs metastáticos inclui ciclofosfamida, vincristina e dacarbazina. A terapia citotóxica está indicada para os pacientes que apresentam doença rapidamente progressiva, progressão de doença após dose cumulativa elevada de <sup>131</sup>I-MIBG ou para os pacientes com lesões metastáticas que não captam <sup>131</sup>I-MIBG<sup>31</sup>. Os estudos que avaliaram a eficácia da quimioterapia são limitados pelo seu caráter retrospectivo e pelo fato de não terem utilizado critérios de RECIST para determinar resposta ao tratamento<sup>40,45</sup>. Uma metanálise mostrou uma taxa de resposta de aproximadamente 37% (resposta parcial ou estabilização de doença estável) associada a melhor controle pressórico e resposta bioquímica<sup>46</sup>.

Os tumores com VPs nos genes que codificam as enzimas do ciclo de Krebs geralmente reduzem a expressão da 6-metilguanidina-DNA-metiltransferase (MGMT), predispondo-os a uma melhor resposta terapêutica à temozolamida. Os tumores associados com VPs no *SDHB* são deficientes em MGMT e, portanto,

podem responder melhor à terapia com cisplatina, vincristina e dacarbazina (CVD) ou temozolomida. A terapia com temozolomida promoveu uma taxa de resposta parcial de 33% em PPGLs metastáticos<sup>41</sup>. Nesse estudo, somente pacientes com VP no *SDHB* tiveram resposta parcial<sup>41</sup>.

Além da quimioterapia, terapias antiangiogênicas com inibidores de tirosina quinase foram avaliadas em pacientes com PPGLs metastáticos (Tabela 1). O sunitinibe foi avaliado em 17 pacientes com PPGLs metastáticos, dos quais três apresentaram efeitos adversos graves com suspensão da medicação, três tiveram resposta parcial e cinco doença estável<sup>43</sup>. Atualmente, a eficácia do sunitinibe está sendo investigada em um estudo fase II placebo-controlado (*First International Randomized Study in Malignant Progressive Pheochromocytoma and Paraganglioma, FIRSTMAPPP, NCT01371201*). Um estudo fase II com pazopanibe em sete pacientes demonstrou somente uma resposta parcial, enquanto quatro pacientes apresentaram progressão de doença. Além disso, o pazopanibe foi associado a efeitos adversos cardiovasculares graves como piora da HA e cardiomiopatia, levando a redução ou suspensão da droga<sup>44</sup>. O everolimus, inibidor de mTORC1, não mostrou benefício em pacientes com PPGLs metastáticos<sup>42</sup>. Resultados preliminares não publicados de um estudo fase II com cabozantinibe, inibidor de cMET, mostram resultados promissores com taxa de resposta parcial de 53% em pacientes com PPGLs metastáticos<sup>47</sup>.

Como metástases ósseas (principalmente líticas) são frequentes nos PPGLs metastáticos, o uso de terapia antirreabsortiva com ácido zoledrônico está indicado para prevenir a ocorrência de eventos ósseos adversos (fraturas e dor). Terapias locais (radioterapia ou ablação por radiointervenção) podem também ser usadas para controle de dor, prevenção de fraturas e compressão medular<sup>48</sup>.

$^{90}\text{Y}$ -DOTATOC e  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC podem ser usados em pacientes com lesões metastáticas positivas para receptores de somatostatina (principalmente nos pacientes com doença metastática que não captam  $^{131}\text{I}$ -MIBG). No entanto, o  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC e  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC foram avaliados somente em séries retrospectivas pequenas<sup>39,49</sup>.

### **1.5 Aspectos genéticos dos PPGLs**

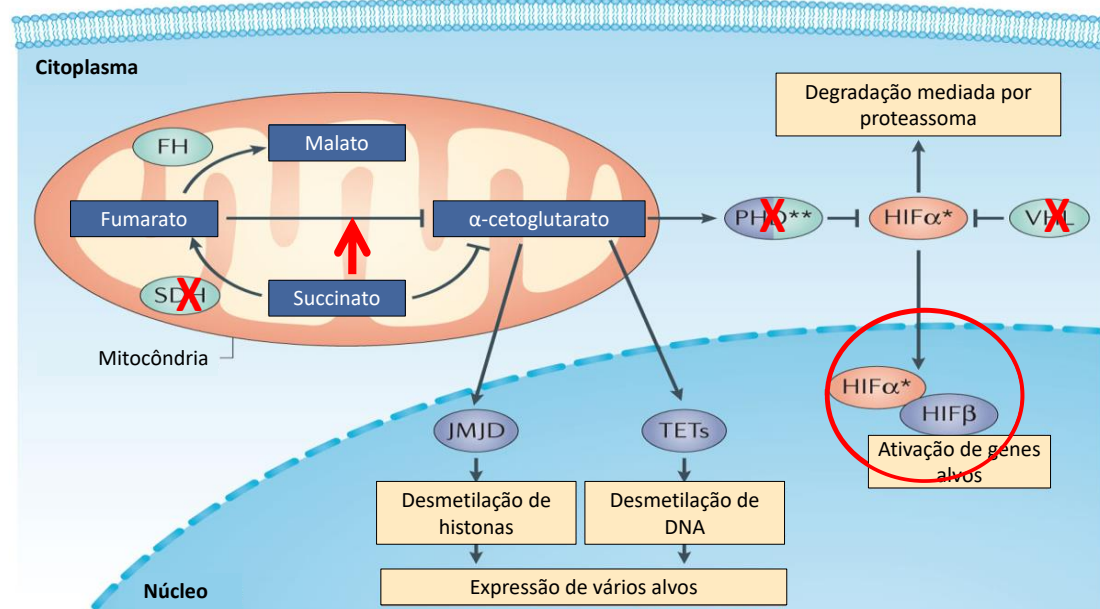
Os PPGLs estão associados a diversas síndromes genéticas (Quadro 1). A neoplasia endócrina múltipla (NEM) tipo 2 é causada por VPs germinativas no proto-oncogene *Rearranged during Transfection* (RET), que possuem uma penetrância de 98%. A NEM2A consiste na associação de carcinoma medular de tireoide (90%), feocromocitoma (50%) e hiperparatireoidismo (20%). A NEM2B é caracterizada por carcinoma medular de tireoide clinicamente mais agressivo (100%), feocromocitoma (50%), hábito marfanóide e ganglioneuromatose intestinal e de mucosa<sup>43</sup>.

**Quadro 1 - Principais síndromes genéticas associadas aos feocromocitomas e paragangliomas**

Gene	Tumores
<i>RET</i> (Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2A)	Carcinoma medular de tireoide <b>Feocromocitoma (50%)</b> Hiperparatireoidismo
<i>RET</i> (Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2B)	Carcinoma medular de tireoide <b>Feocromocitoma (50%)</b> Ganglioneuromatose de mucosa Hábito marfanoide
<i>VHL</i> (Doença de von Hippel-Lindau)	Hemangioblastoma cerebelar e retina Carcinoma renal de células claras <b>Feocromocitoma (20%)</b> Doença cística renal e pancreática Tumor neuroendócrino de Pâncreas
<i>NF1</i> (Neurofibromatose 1)	Manchas café-com-leite Neurofibromas dermais múltiplos Hamartomas de íris <b>Feocromocitoma (&lt; 5%)</b>
<i>SDHB</i>	<b>Paraganglioma principalmente (25-50%)</b> Tumor estromal gastrointestinal
<i>SDHC</i>	<b>Paraganglioma cervical (&lt; 10%)</b> Tumor estromal gastrointestinal
<i>SDHD</i>	<b>Feocromocitoma ou paraganglioma (40%)</b> Tumor estromal gastrointestinal

A doença de von Hippel-Lindau (VHL) é uma síndrome de neoplasia múltipla com herança autossômica dominante e caracterizada por hemangioblastomas de retina (25%-60%), cerebelo (44%-72%) e medula (13%-50%), cistos e/ou carcinoma renal de células claras (25%-75%), PPGLs (10%-25%), cistos e tumores neuroendócrinos pancreáticos (35%-75%), tumores do saco endolinfático (10%-15%), além de cistos de epidídimo e ligamento largo<sup>50</sup>. A doença de VHL possui uma penetrância > 90% aos 65 anos e é causada por VP inativadoras no gene supressor tumoral *VHL*, responsável por regular genes induzidos por hipóxia por meio da ubiquitinação e posterior degradação do fator induzido por hipóxia 2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) (Figura 2)<sup>51</sup>. Na doença de VHL, os feocromocitomas são frequentemente

bilaterais (aproximadamente 50%), benignos e noradrenérgicos<sup>50</sup>. Os feocromocitomas podem surgir muito precocemente, já sendo descritos em pacientes com menos de 5 anos de idade ao diagnóstico<sup>52</sup>. VPs *missense* estão mais associadas ao desenvolvimento dos PPGLs (subtipo 2), enquanto as variantes truncadas ou grandes deleções estão mais com o aparecimento de hemangioblastomas e carcinoma de células renais (subtipo 1)<sup>53</sup>.



Na normóxia, o HIF-2 $\alpha$  é hidroxilado, ubiquitinado e degradado no proteassoma. Na hipóxia, a ausência de oxigênio leva à inibição das enzimas prolin-hidroxilases (PHDs) e à subsequente estabilização do HIF-2 $\alpha$  não hidroxilado. A inativação do *VHL* leva à estabilização do HIF-2 $\alpha$  e consequente estímulo para a proliferação das células cromafins. Já as variantes patogênicas nos genes que codificam as subunidades das succinato desidrogenases (SDHs) promovem o acúmulo de succinato, que inibem a produção de  $\alpha$ -cetogluturato. O resultado é a inativação da PHDs e inibição da degradação do HIF-2 $\alpha$ .

**Figura 2 - Mecanismos de pseudohipóxia nos feocromocitomas e paragangliomas causados por defeitos nos genes do *cluster 1***<sup>54</sup>

A neurofibromatose tipo 1 (NF1) é uma doença autossômica dominante com uma incidência de aproximadamente 1:3000 indivíduos. É causada por VPs no gene *NF1* localizado no cromossomo 17q11.2 e que possui 60 exons. O gene codifica a proteína neurofibromina, considerada uma proteína supressora tumoral envolvida na cascata de sinalização *RAS-RAF-MAPK*. Aproximadamente 50% dos casos de NF1

são causados por VP *de novo* no *NF1*<sup>55</sup>. Os pacientes com NF1 têm uma chance maior de desenvolver tumores malignos e benignos (2,5 a 4 vezes maior que a população geral), como gliomas, rabdomiosarcomas, tumores do estroma gastrointestinal (GIST), tumores malignos periféricos de bainha neural e feocromocitomas (< 5% dos casos de NF1). Na NF1, os feocromocitomas são bilaterais em 20% dos casos e o percentual de malignidade é similar aos feocromocitomas esporádicos<sup>56</sup>. PPGLs associados a NEM2 ou VHL raramente são metastáticos<sup>57</sup>.

Aproximadamente 30%-40% dos PPGLs “aparentemente esporádicos” (sem história familiar ou características clínicas das síndromes citadas acima) têm predisposição hereditária<sup>58</sup>. Até o momento, pelo menos 20 genes de susceptibilidade tumoral foram descritos<sup>5,59,60</sup>. Esses genes são agrupados em três *clusters*, com o *cluster* A sendo subdivido em 1A e 1B. O *cluster* 1A inclui genes que regulam diretamente a atividade do HIF-2 $\alpha$ , que são o gene supressor von Hippel-Lindau (*VHL*) e os genes que codificam o HIF-2 $\alpha$  (*EPAS1*) e as enzimas prolil-hidroxilase 1 (*EGLN2*) e prolil-hidroxilase 2 (*EGLN1*). Já o *cluster* 1B inclui os genes que codificam as quatro subunidades do complexo succinato desidrogenase (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC* e *SDHD*) e, menos comumente, os genes que codificam a enzima responsável pela flavinação da subunidade *SDHA* (*SDHAF2*) e fumarato desidrogenase (*FH*), que regulam a atividade transcricional do HIF-2 $\alpha$  por meio do acúmulo de metabólitos do ciclo de Krebs (Figura 2). O *cluster* 2 inclui o gene supressor tumoral da neurofibromatose tipo 1, o proto-oncogene *RET*, os genes codificadores da proteína transmembrana *TMEM127* e o gene *MYC* associado ao fator X (*MAX*)<sup>5,59,61</sup> (Quadro 1). Mais recentemente, um terceiro *cluster* envolvido

com a ativação da via de sinalização *WNT* foi implicado na tumorigênese dos PPGLs<sup>61</sup>. Este novo *cluster* é representado pelas seguintes alterações somáticas: translocação *UBTF-MAML3* ou VPs no gene *CSDE1*<sup>61</sup>. Este último *cluster* está provavelmente associada a PPGLs com comportamento mais agressivo. O Quadro 2 reúne os principais genes implicados na patogênese dos PPGLs classificados em *clusters*.

**Quadro 2 - Classificação molecular dos genes envolvidos na patogênese dos feocromocitomas e paragangliomas**

<i>Cluster</i> Moleculares	Genes Relacionados	Frequência	Tipo de variante patogênica
<b>Cluster 1</b> Pseudohipóxia	<i>SDHA</i>	< 1%	G
	<i>SDHB</i>	8%-10%	G
	<i>SDHC</i>	1%-2%	G
	<i>SDHD</i>	5%-7%	G
	<i>SDHAF2</i>	< 1%	G
	<i>VHL</i>	7%-10%	G e S
	<i>EPAS1</i>	6%-12%	M e S
	<i>EGLN1/PHD2</i>	< 1%	G e S
<b>Cluster 2</b> Ligado a receptores de tirosina quinases	<i>RET</i>	5%-6%	G e S
	<i>NF1</i> *	3%	G e S
	<i>MAX</i>	1%-2%	G e S
	<i>TMEM127</i>	1%-2%	G e S
	<i>HRAS</i>	7%-8%	S
	<i>KIF1B</i>	< 5%	G e S
<b>Cluster 3</b> Via <i>Wnt</i>	<i>MET</i>	2%-10%	G e S
	<i>CSDE1</i>	2%	S
	<i>MAML3</i>	5%	S

VP: variante patogênica; G: germinativa; S: somática; M: mosaicismo.

\*Variantes patogênicas no gene *NF1* são reportadas em casos somáticos em uma frequência de 20%-25%. Genes raramente associados aos PPGLs foram excluídos da tabela.

Fonte: adaptado de Toledo et al.<sup>62</sup>.

A taxa de positividade do teste genético em pacientes com PPGL isolado é maior em pacientes com < 40 anos ao diagnóstico. A frequência de VPs germinativas é mais frequente em crianças do que em adultos, assim como a multifocalidade e o diagnóstico de paraganglioma<sup>57</sup>. A análise genética dos pacientes com PPGLs tem



uma grande aplicabilidade na prática clínica, dentre as quais pode-se destacar: 1) diagnóstico precoce de síndromes genéticas associadas. Dessa forma, possibilita o rastreamento de outros componentes da síndrome, o aconselhamento genético familiar e o tratamento mais precoce a partir da vigilância ativa dos portadores assintomáticos; 2) correlação genótipo-fenótipo que é observada em algumas síndromes genéticas a partir do tipo de VP identificada; 3) avaliação do risco do desenvolvimento de metástases, o que tem implicação no seguimento pós operatório; e 4) maior entendimento da patogênese da doença, possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas e terapêuticas.

Em virtude do grande número de genes de susceptibilidade genética para os PPGLs (> 14 genes), o rastreamento genético realizado de forma sequencial por sequenciamento automático torna-se muito demorado e pouco custo-efetivo<sup>59</sup>. Desta forma, o rastreamento utilizando um painel de genes de susceptibilidade através de sequenciamento paralelo em larga escala é atualmente a estratégia mais recomendada para investigação genética de pacientes com PPGLs (Anexo C)<sup>62</sup>. O painel diagnóstico básico inclui os genes mais associados com hereditariedade nos PPGLs (variantes germinativas): *FH*, *MAX*, *NF1*, *RET*, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *TMEM127* e *VHL* (em ordem alfabética). O painel expandido inclui os genes do painel básico e outros genes associados a variantes germinativas mais raras: *ENGL1*, *EPAS1* (codifica o fator indutor de hipóxia 2A), *KIF1B* (membro 1B da família das quinases), *MET* (proto-oncogene MET) e *SDHAF2*. O painel compreensivo inclui os genes dos painéis anteriores e aqueles associados a defeitos somáticos: *ATRX* (remodelador de cromatina ATRX), *BRAF* (proto-oncogene BRAF), *CDKN2A* (inibidor 2A de ciclina dependente de quinase), *EGLN2*, *FGFR1* (receptor 1 do fator de crescimento FGF), *H3F3A*

(membro 3A da família de histona H3), *HRAS* (proto-oncogene HRas), *IDH2* (isocitrato desidrogenase 2), *KMT2D* (lisina metiltransferase 2D), *MDH2* (malato desidrogenase 2), *MERTK* (proto-oncogene MER) e *TP53* (gene supressor tumoral)<sup>62</sup>.

### 1.5.1 Genética dos PPGLs metastáticos

Variantes patogênicas germinativas no *SDHB* representam o fator preditor mais estabelecido para doença metastática. Aproximadamente 40%-50% dos pacientes com PPGLs metastáticos são carreadores de VPs germinativas no *SDHB*<sup>7,33,60,63</sup>. Em um estudo recente da Rede Europeia para Estudo dos Tumores Adrenocorticais (ENS@T), 54% dos pacientes com PPGLs metastáticos eram carreadores de VPs germinativas em genes de susceptibilidade: *SDHB* 42%, *SDHD* 6%, *RET* 4%, *VHL* 3%, *NF1* 4%, *SDHC* 1%, *MDH2* 1%<sup>7</sup>. VPs germinativas no *TMEM127* e *MAX* também foram descritas em raros casos de PPGLs metastáticos<sup>64</sup>. A ausência de imunorreatividade tumoral para *SDHB* na imunohistoquímica se correlaciona com a presença de defeitos genéticos germinativos no *SDHB*<sup>65</sup>. A ausência de imunorreatividade para o *SDHB* teve uma sensibilidade de 90% para identificar a presença de defeitos genéticos no *SDHB*, *SDHD* ou *SDHC*. A avaliação<sup>65</sup>. Apesar de representar o mais importante preditor de doença metastática, pacientes com alterações genéticas no *SDHB* não apresentam evolução clínica mais desfavorável quando comparados a pacientes com PPGLs metastáticos sem diagnóstico genético definido ou VPs em outros genes<sup>7</sup>.

Variantes patogênicas germinativas no *FH* foram identificadas em cinco de 598 (0,8%) de pacientes com PPGLs. Dois dos cinco pacientes com VPs no *FH* tinham doença metastática<sup>66</sup>. Adicionalmente, VPs no gene codificador da proteína

carreadora da malato/2-oxoglutarato mitocondrial (*SLC25A11*) foram identificadas em seis pacientes com paragangliomas (cinco dos quais metastáticos)<sup>67</sup>. Dessa forma, alterações genéticas no *FH* e *SLC25A11* são considerados preditores mais raros de doença metastática.

Variantes patogênicas somáticas no *ATRX* foram identificadas em 12,6% dos PPGLs, estando associadas a mecanismos alternativos de aumento do comprimento dos telômeros e a comportamento clínico mais agressivo<sup>68</sup>. A VP somática c.C228T na região promotora do gene codificador da transcriptase reversa da telomerase (*TERT*) está associada a um aumento da expressão gênica da *TERT*, sendo frequentemente encontrada em carcinomas adrenocorticais e raramente em PPGLs<sup>69</sup>. O aumento da expressão da *TERT* é um evento pouco frequente em PPGLs, mas está associado a doença metastática e a rearranjos cromossômicos próximos a região promotora da *TERT*<sup>70</sup>. Recentemente, Job *et al.*<sup>71</sup> demonstraram que a ativação da telomerase foi mais frequente em paragangliomas com defeitos genéticos no *SDHB* e associada a redução da sobrevida global.

Independente do diagnóstico de doença metastática, a ausência de investigação genética em pacientes com PPGLs está associada a um aumento significativo de recidivas e redução da sobrevida global<sup>72</sup>. Além disso, aproximadamente 50% dos pacientes com PPGLs não têm defeitos genéticos germinativos identificados em genes de susceptibilidade para tumores cromafins<sup>7</sup>. Dessa forma, a investigação genética de pacientes com PPGLs tem uma importância fundamental para o manejo clínico, aconselhamento familiar e identificação de novas etiologias genéticas.

## **2 OBJETIVOS**

## 2.1 Objetivo geral

Investigar a etiologia genética dos pacientes com PPGLs metastáticos e não metastáticos.

## 2.2 Objetivos específicos

- Investigar VPs nos genes *VHL*, *SDHB*, *SDHD*, *SDHC*, *TMEM127* e *MAX* pela técnica de SANGER nos pacientes com PPGLs.
- Investigar grandes deleções germinativas nos genes *SDHB*, *SDHD* e *SDHC* pela técnica de *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) nos pacientes com PPGLs sem VPs no sequenciamento por SANGER.
- Realizar a investigação genética por meio de um painel de sequenciamento paralelo em larga escala com genes de susceptibilidade para PPGLs nos pacientes com PPGLs com investigação genética negativa por SANGER e MLPA.
- Correlacionar os achados genéticos com os dados clínicos e evolutivos dos pacientes.

## **3 MÉTODOS**

### **3.1 Considerações éticas**

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da FMUSP (Parecer: 3.158.427) e do Instituto do Câncer de São Paulo Octavio Frias de Oliveira (ICESP) (Anexos D e E). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi assinado por todos os participantes (Anexo F).

### **3.2 Avaliações hormonais e estudos moleculares**

As avaliações hormonais e os estudos moleculares foram realizados no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM 42, Divisão de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). O sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE) e a análise de bioinformática foram realizados no Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala (SELA), Rede PREMium da FMUSP, financiado pela FAPESP como Equipamentos Multiusuários (14/50137-5). A confidencialidade dos resultados obtidos foi garantida a todos os pacientes. Os achados de defeitos genéticos relacionados às doenças em investigação foram informados aos pacientes e/ou seus responsáveis legais.

### 3.3 Pacientes

Neste estudo, foram avaliados pacientes com PPGLs em seguimento na Divisão de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da FMUSP e no Serviço de Oncologia Endócrina do ICESP. No período de 1981 a 2021, foram diagnosticados 314 pacientes com PPGLs, dentre os quais 183 pacientes com DNA coletado e dados clínicos evolutivos (Figura 3). Nesse estudo, foram incluídos 155 casos índices com PPGLs (34 com diagnóstico sintromico e 121 aparentemente esporádicos na avaliação inicial).

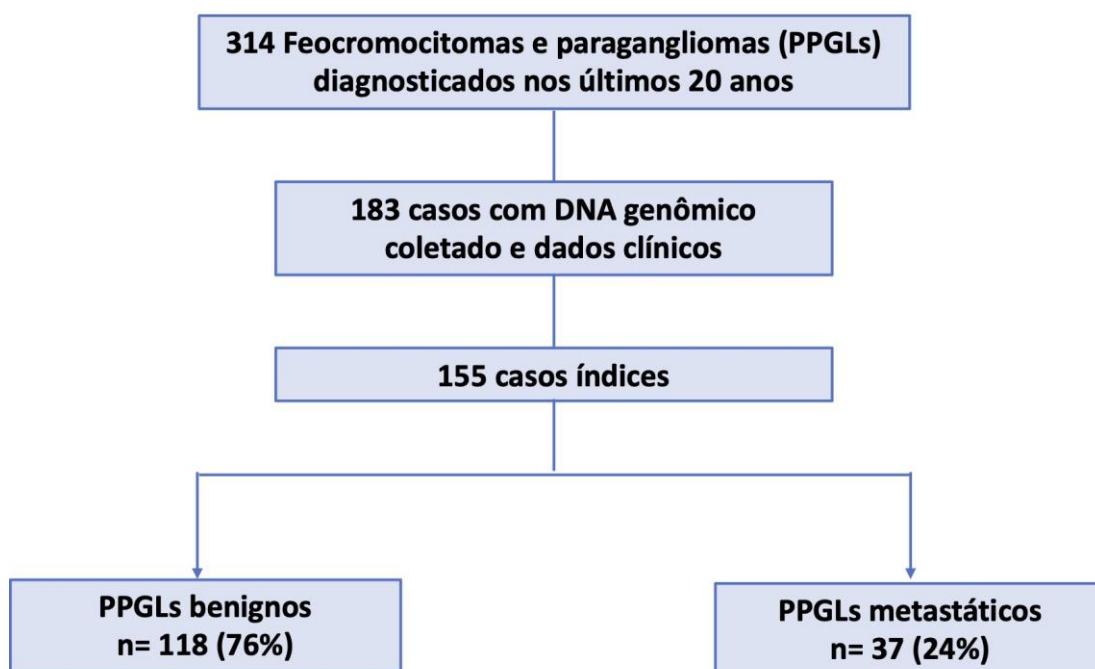


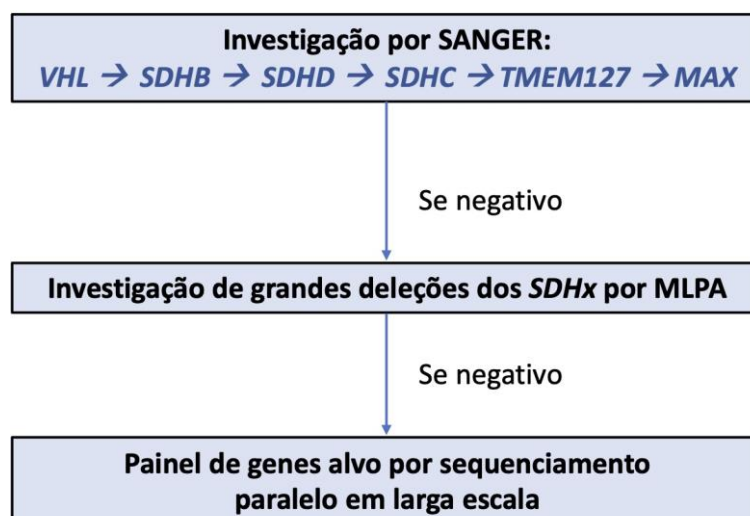
Figura 3 - Fluxograma dos pacientes com PPGLs atendidos no Hospital das Clínicas e ICESP de 1981 a 2021



### 3.4 Estudos moleculares

Amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico ou de células extraídas por *swab* da mucosa oral dos indivíduos incluídos no estudo. O DNA foi extraído de acordo com procedimento padronizado no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM42 (Anexo G). A concentração do DNA extraído foi obtida por leitura em nanofotometro no comprimento de onda de 260 nm (uma unidade DO 260 = 50 µg/mL). A relação ideal entre as leituras em 260 nm e 280 nm para a caracterização da pureza do material é entre 1,80 e 2. As amostras foram mantidas congeladas a 20 °C negativos até seu uso.

A investigação de VPs germinativas foi inicialmente realizada por sequenciamento automático pelo método *Sanger*. Nos casos sem VPs após sequenciamento por SANGER, a técnica de MLPA foi usada para detectar grandes deleções nos genes *SDHA*, *SDHAF2*, *SDHB*, *SDHC* e *SDHD*. Trinta e três casos de 83 pacientes sem diagnóstico genético após SANGER e MLPA foram investigados por um painel de genes alvo por meio de SPLE (Figura 4).



PPGLs: feocromocitoma e paraganglioma; MLPA: *multiplex ligation-dependent probe amplification*.

**Figura 4 - Algoritmo de investigação genética dos pacientes com PPGLs**

### 3.4.1 Sequenciamento automático por SANGER

Em cada reação em polimerase da cadeia (PCR) foram amplificados 100 ng a 200 ng de DNA genômico de leucócitos periféricos para investigação de variantes germinativas nos genes *VHL*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *TMEM127* e *MAX*. Todas as reações de PCR foram realizadas utilizando 10 pmol/μL a 15 pmol/μL de cada oligonucleotídeo específico (Quadros 3 e 4) e 200 μM de desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) para um volume final de 25 μL.

**Quadro 3 - Oligonucleotídeos dos genes *SDHB*, *SDHD* e *SDHC* utilizados para sequenciamento pelo método Sanger**

Gene <i>SDHB</i>	Gene <i>SDHD</i>	Gene <i>SDHC</i>
1F: AAAGTCGCCCTGCCTCTC	1F:CCTGAGCACTACCGGTCAC	1F:AGGCGGAGGAGGAGACTAAA
1R:GGTCCTCCATCTCCCTGA	1R:CCTTCGGGTAAACATCTGG	1R: CTCCCAGTCCCCTGAAGTC
2F:GAATGCCTGCCTTTTCTAAG	2F:ACATGCAGATGTTCCTGG	2F:TCTCTGTTGAACATTACCAACTCT
2R:TGGGATTATAGGCGTGAGC	2R: TGTCTGCCCAAAGGTGTA	2R: AGCGAGACTCCGCTCTCAAAA
3F:CTACAGAACAAATTCCGAAGG	3F:GCATTGAGATACCCTTGTG	3F: TGCAAAATATTAACCAAGT
3R: TGTGGCCAGGTTGATCTC	3R:CATTGAATAGGCAGGCAG	3R: CTTTCACCCACTACCTCTAG\
4F: GGAAGGGAGAAAAGCCAAC	4F: CTGACATACACACGCAAA	4F: ACTCTCTACTATGGTGTCATC
4R: ACACTGTGGTCCTCCTCCTG	4R:AAGAAGGCTCTGCACCAA	4R: CCAAGTTTTTCAAAGAAGCAC
5F: CCATGCTTAACATTGTGACC		5F: AGTTGTAACCTATGAGCAGC
5R: GGAGTAGCCACACAGCAAC		5R: CTCCCCACTCCCTTCACAGA
6F: TTAAGAACCCTGGGCAGAT		6F: AGGAACTGTTAATGTCCTAT
6R: ACTGGATGGCAATGAAGGAA		6R: TAAAGATGAGGTGGCTGCAA
7F: CGAGTTGGGGATGTAGAGGTC		
7R:CCCCTAGGCTCACACTGAAAGG		
8F:GGAGCTGACCATCTTCAAATG		
8R: TGTCAGTTCCACGGCTCATC		

**Quadro 4 - Oligonucleotídeos dos genes *VHL*, *TMEM127* e *MAX* utilizados para sequenciamento pelo método Sanger**

Gene <i>VHL</i>	Gene <i>TMEM 127</i>	Gene <i>MAX</i>
1F: CTAGCCTCGCCTCCGTAC	2F: CCCCTATCCTCTGGTGTC AA	1F: GCCGGCATTTCCTTTCTTATT
1R: GTCACCCTGGATGTGTCCTG	2R: CTGGTCCTGGCTATCTCTG	1R: CACCTCACCTTAGTGGTTAACAT
2F: TAGCCAGGACGGTCTTGA	3F: GGAGGGGAATCAAACCTCTT	2F: GTCGGATCCCGGAAGGAG
2R: CGTACAAATACATCACTTCCATT	3R: AAGACTGGAGCTTGGCACAT	2R: GACCACTTTGCCCTGAAATAA
3F: TACTACAGAGGCATGAACACC	4F: GGGTCCTCAAGCATCCTAGC	3F: CCCCTTTCTCCCCCTTTAGC
3R: CCCCTAAACATCACAATGC	4R: GGTITGGAGAAGATGGTCAGG	3R: AGGATAAACTGGAGTACGTAAGGT
		4F: TCCCACCTTACCCTCTCGTT
		4R: CGCTTTCCCCTGTGGTTGTA
		5F: CAACAAGCAAGCCCTTAGGA
		5R: GGTTC TGAGGGCTCTACCAA

Os genes *VHL*, *TMEM 127*, *MAX*, *SDHB*, *SDHC* e *SDHD* foram amplificados utilizando 0,15 µL de Taq DNA Polimerase High Fidelity (*Invitrogen*), 5 µL Buffer com MgCl, 0,5 µL dNTP. Exceto os éxons 4 e 6 do gene *SDHC*, que no exon 4 necessitou acrescentar 2 µL de Betaína e no exon 6 acrescentou 4% de DMSO. A temperatura de anelamento utilizada foi de 58 °C para os genes *SDHB*, *SDHD*, *VHL* e *TMEM 127*. Já para o gene *SDHC*, foram utilizadas diferentes temperaturas de anelamento: exon 1: 60 °C, exon 2 58 °C, exon 3 53 °C, exon 4 58 °C, exon 5 60°C e exon 6 55 °C. Assim como o gene *MAX* foram utilizadas para exon 1 63 °C, exon 2 62 °C, exon 3 60°C, exon 4 62 °C e exon 5 63 °C.

A concentração de cDNA ou DNA dos produtos gerados pela PCR foi estimada pela comparação com fragmentos do marcador de peso molecular de concentração conhecida ( $\Phi X$ ) em gel de agarose. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à purificação enzimática por ExoSap-it (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) com incubação a 37 °C por 15 minutos, seguido de 80 °C por mais 15 minutos para inativação das enzimas. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit *ABI PrismTMBigDyeTerminator* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e quantidades variáveis de produto de

PCR (10 ng a 100 ng) de acordo com o tamanho do fragmento. Os produtos desta reação foram submetidos à eletroforese em sequenciador automático *ABI PrismGeneticAnalyzer 3130xl automatic DNA sequencer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A leitura dos eletroferogramas foi realizada pelo programa *Sequencher 4.10.1* (GeneCodes Corporation, Ann Arbor, EUA), sempre em comparação à sequência referência do gene e a um eletroferograma de um indivíduo normal.

#### **3.4.2 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification**

A técnica de MLPA para *SDHx* foi realizada como previamente descrito MLPA utilizando o kit SALSA<sup>®</sup> MLPA<sup>®</sup> P226 SDH probemix (*MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands*), que contém sondas específicas para os genes *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHA* e *SDHAF2*<sup>73</sup>.

Aproximadamente 200 ng de DNA genômico das amostras tumorais foram diluídos em água ultrapura em um volume final de 5 µL. Em termociclador modelos 9700 e 2400 (*Applied Biosystem, Foster City, CA, USA*) os tubos com 5 µL de DNA diluído foram incubados por cinco minutos a 98 °C a fim de ocorrer a desnaturação. A temperatura foi diminuída para 25 °C e foram acrescentados 3 µL do mix de sondas, preparado a partir de 1,5 µL do SALSA probe mix e 1,5 µL do tampão MLPA. Essa mistura foi submetida por um minuto a 95 °C, seguida por 16 horas a 60 °C para que as sondas hibridizassem aos seus respectivos alvos.

Após a hibridação das sondas, a temperatura foi reduzida para 54 °C e então adicionados 32 µL da mistura da ligase-65 (3 µL do tampão ligase-65 A, 3 µL do tampão ligase-65 B, 1 µL ligase-65 e 25 µL de água ultrapura) em cada tubo. As

reações foram incubadas a 54 °C por 15 minutos para ocorrer a ligação das sondas previamente hibridadas e, posteriormente, a 98 °C por 5 minutos para inativação das enzimas restantes (produto de ligação).

Dez µL do produto de ligação foram transferidos para um novo tubo contendo 30 µL do mix PCR, preparado a partir de 4 µL do tampão SALSA PCR e 26 µL de água ultrapura. Os tubos foram colocados no termociclador a 60 °C e mantidos nesta temperatura enquanto foram adicionados 10 µL do mix polimerase, que contém 2 µL de SALSA PCR primers, 2 µL do tampão SALSA enzyme dilution, 0,5 µL da enzima SALSA polimerase e 5,5 µL de água ultrapura. Nessa etapa, deu-se início a reação de amplificação das sondas ligadas por PCR. O protocolo de amplificação consistiu em 35 ciclos a 95 °C (30 segundos), 60 °C (30 segundos) e 72 °C (um minuto), com um ciclo final de extensão a 72 °C por 20 minutos.

Os produtos da amplificação foram detectados e quantificados por eletroforese capilar no sequenciador automático *ABI PrismGeneticAnalyzer 3130xl automatic DNA sequencer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e analisados pelo programa de análise de fragmentos *GeneMapper 5.0* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), que determina o tamanho de cada fragmento e sua correspondente altura e área do pico no eletroferograma.

O conjunto de dados de altura dos picos de cada amostra foi transferido para uma planilha excel (*Microsoft Corporation, Redmond, WA 98052, EUA*). Em cada ensaio foram utilizados no mínimo dois controles que tiveram seus DNAs extraídos pela mesma metodologia. Inicialmente, a média da altura dos picos de cada sonda dos controles da reação foi determinada. Posteriormente, a média das proporções  $P_n$  de cada sonda foi calculada para cada amostra tumoral. O valor obtido desta média

(média das proporções) corresponde ao número de cópias estimado de cada sonda. Uma determinada região analisada foi considerada normal quando a média das proporções estivesse entre 0,7 e 1,3, com diminuição no número de cópias quando era inferior a 0,7 e com aumento no número de cópias quando era superior a 1,3. Um ensaio foi considerado válido somente quando os controles eram diploides para as sondas analisadas e quando as amostras tumorais também apresentavam duas cópias na maioria das sondas controles.

### 3.4.3 Sequenciamento paralelo em larga escala

Trinta e três pacientes sem diagnóstico genético após sequenciamento por SANGER e MLPA foram investigados por um painel de genes alvo por SPLE que inclui os seguintes genes: *FH*, *MAX*, *NF1*, *RET*, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *TMEM127*, *VHL*, *ENGL1*, *EPAS1*, *KIF1B*, *MET*, *SDHAF2*, *ATRX*, *BRAF*, *FGFR1*, *HRAS*, *KMT2D* e *TP53*.

O painel customizado foi elaborado a partir da ferramenta *Agilent SureDesign 2.0* (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, EUA), que desenha sondas específicas para seleção e captura das regiões codificadoras e franqueadoras dos exons, cobrindo 100% da região alvo. As bibliotecas do painel e do exoma foram preparadas de acordo com o protocolo *SureSelect<sup>XT</sup> Target Enrichment System for Illumina Paired-End Sequencing Library* (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, EUA).

O SPLE foi realizado em sequenciadores da plataforma *Illumina NextSeq 500* (*Illumina, Inc, San Diego, CA, EUA*), kit High Output 300 ciclos e envolveu três etapas fundamentais:

a) Confecção de bibliotecas de fragmentos de DNA. A biblioteca para o painel de genes alvo foi preparada com o kit *SureSelectXT custom* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) com *probes* desenhadas para genes selecionados por meio do *SureDesign*. Inicialmente, 200 ng do DNA genômico foram fragmentados por ação mecânica utilizando o *Covaris* (Covaris Inc, Woburn, MA, EUA), em seguida foram adicionados os adaptadores (que são sequências complementares às sequências de oligonucleotídeos presentes na *flow-cell*) e os *barcodes* (identificadores específicos para o DNA de cada paciente). A seguir, as bibliotecas foram enriquecidas pela adição de sondas biotinizadas (sequências selecionadas dos genes de todo o exoma). Após uma hibridação do DNA fragmentado com essas sondas, foi feita a captura das regiões de interesse por meio de *beads* magnéticos acoplados à estreptavidina. Os fragmentos capturados pela biotina-estreptavidina foram purificados e amplificados estando prontos para o sequenciamento paralelo em larga escala.

b) Amplificação clonal. Nesta etapa, as bibliotecas com seus fragmentos de DNA ligados aos adaptadores foram depositadas em uma lâmina especial denominada *flowcell*, em cuja superfície estão fixados, de maneira paralela, duas espécies de oligonucleotídeos. Após a ligação dos adaptadores aos seus oligonucleotídeos complementares presentes na superfície da *flowcell* ocorreu a clusterização, onde cada molécula foi amplificada várias vezes por uma reação conhecida como PCR em ponte (*bridge PCR*). Ao final desta etapa, foram gerados *clusters* de moléculas de DNA idênticas à molécula original, ligadas covalentemente à superfície da *flowcell*.

c) Sequenciamento. Após a amplificação clonal, as moléculas *antisense* foram removidas enzimaticamente e o processo de sequenciamento iniciado com o acoplamento de um oligonucleotídeo iniciador especial (*sequencing primer*). Em

seguida, nucleotídeos modificados com terminadores reversíveis marcados com fluoróforos específicos foram adicionados ao meio. A cada ciclo de incorporação, foram geradas imagens de toda a superfície da *flowcell* por um *scanner* de fluorescência em cada um dos comprimentos de onda específico para cada fluoróforo. Os *clusters* presentes na superfície da *flowcell* foram então identificados e mapeados. A sobreposição das imagens produzidas a cada ciclo de incorporação propiciou a identificação da sequência de bases nucleotídicas de cada *cluster* de moléculas, ou seja, a sequência do fragmento que deu origem ao *cluster*. Este processo é conhecido como sequenciamento por síntese. As sequências produzidas pela plataforma possuem de 75 a 150 pares de bases e foram lidas por configuração *paired-end* (quando a sequência *antisense* da molécula do DNA também é lida), permitindo a leitura de fragmentos de até 300 pares de base. Ao fim deste processo, as sequências lidas foram separadas entre si de acordo com seus *barcodes*, sendo então pareadas as sequências *sense* e *antisense* com a criação de sequências contíguas. Estas são alinhadas para comparação com a sequência de DNA referência, de forma a permitir a comparação entre o sequenciamento obtido e a sequência referência.

#### **3.4.4 Análise de bioinformática**

A análise de bioinformática foi realizada a partir dos arquivos gerados no processo de sequenciamento acima descrito. O grande volume de dados gerados pelos sequenciadores de nova geração requer o emprego de ferramentas de bioinformática altamente sofisticadas, a fim de que as poucas alterações genômicas de interesse sejam identificadas em meio a milhares de alterações não relacionadas ao processo de tumorigênese. Este processo é realizado por diversos programas de computador que



funcionam em cadeia (ou *pipelines*). Uma biblioteca de exoma gera tipicamente 50 a 100 milhões de sequências de 100 a 150 pares de base, armazenadas de forma aleatória em dois arquivos fastq (*forward* e *reverse* no caso da configuração *paired-end*), que são basicamente arquivos de texto. Além da sequência literal de cada um dos fragmentos, os arquivos fastq também armazenam os escores de qualidade para cada uma das bases de determinada sequência, e a unidade de leitura do sequenciador que originou aquele fragmento.

A partir dos dados brutos gerados pelo sequenciador e armazenados nos arquivos fastq, a análise de bioinformática seguiu os passos detalhados a seguir:

- a) Checagem da consistência dos arquivos fastq (cujo tamanho varia de dezenas a centenas de gigabytes) e cálculo de estatísticas básicas como número de sequências produzidas. Esta etapa foi realizada pelo software FastQC.
- b) Alinhamento das sequências das amostras à uma sequência referência do genoma humano (hg19 UCSC ou b37 GRC/NCBI). Nesta etapa, a origem de cada fragmento do DNA da amostra foi determinada. Existem vários programas alinhadores e a maioria leva em conta a qualidade da sequência produzida para fazer a melhor escolha. Optou-se pela utilização do algoritmo *mem* do programa BWA (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>). Informações como coordenadas genômicas de cada base de determinada sequência, bem como *mismatches*, pequenas deleções ou inserções e suas respectivas coordenadas foram acrescentadas. Também foi calculado um escore de qualidade do alinhamento, que reflete a probabilidade deste ter sido efetuado de forma correta (isto é, realmente pertencer àquela coordenada genômica).

- c) Ordenamento das sequências. A etapa descrita anteriormente processou as sequências de forma aleatória, seguindo a ordem em que aparecem no arquivo fastq. Para as etapas posteriores, foi necessário que as sequências sejam ordenadas de acordo com as coordenadas genômicas. Este ordenamento foi feito simultaneamente a um processo de compactação, que gera arquivos binários em formato *binary alignment map* (BAM). Esta etapa foi realizada pela ferramenta *bamsort* do software *biobambam2*.
- d) Marcação de sequências duplicadas. Cópias idênticas de determinadas sequências de uma biblioteca, também chamadas de duplicatas, são artefatos inerentes ao SPLE e podem gerar erros em etapas posteriores do processamento. Além disso, um número excessivo de sequências duplicadas pode indicar problemas na construção da biblioteca. Estas duplicatas devem ser marcadas para posteriormente serem quantificadas e desconsideradas nas próximas análises. Para a marcação das sequências duplicadas foi utilizada a ferramenta *bammarkduplicates* do software *biobambam2*. Após esta etapa, os arquivos BAM ficaram prontos para os diversos tipos de análise descritos posteriormente.
- e) Controle de qualidade dos arquivos BAM. Após a marcação das sequências duplicadas foi feita uma análise quantitativa de alguns parâmetros para indicar a qualidade e a quantidade de sequências obtidas de determinada biblioteca. Além da qualidade global das sequências e da taxa de erro, foram calculados a quantidade de sequências duplicadas, o número de sequências não mapeadas e a cobertura média das regiões alvo do genoma. Esta verificação foi feita pelo software *Qualimap2*.

f) Pesquisa de alterações germinativas. Nesta etapa foram determinados, com bases estatísticas, todos os alelos divergentes do genoma referência, que foram reportados em arquivos de texto no formato *Variant Call Format* (VCF). Além das coordenadas genômicas e da alteração observada, estes arquivos também contém informações cruciais tais como a frequência do alelo alterado em relação ao normal para cada posição, escores de qualidade, nível de cobertura, e a frequência daquele alelo em relação à todas as amostras que foram processadas. Este procedimento foi feito pelo software *Freebayes*. Apesar de ser possível ler estes arquivos em um processador de texto ou planilha, as informações contidas neles são difíceis de serem contextualizadas e interpretadas. Para isso, é necessário a utilização de um software para anotação. São acrescentadas informações tais como a região genômica afetada por determinada alteração (região intergênica, intron, exon), e para as alterações exômicas, o tipo de alteração (sinônima, não sinônima, pequenas inserções ou deleções), qual gene e qual transcrito a alteração afeta e, finalmente, qual a consequência em nível proteico (e.x., qual alteração na sequência de aminoácidos é produzida por determinada variante). Além disso, anotações referentes às frequências alélicas em bancos de dados públicos (incluindo banco de dados do SELA, que atualmente conta com cerca de 500 exomas), descrição de patogenicidade em bancos de dados clínicos e predição de patogenicidade de acordo com diversos algoritmos *in silico* foram incluídas<sup>74</sup>. Para esta etapa, utilizou-se o software *AnnoVar*. Foram gerados arquivos de texto que podem ser manipulados por ferramentas padrão como o software *Excel* e que contêm todas as variantes já associadas a informações sobre localização, tipo, frequência em banco de dados e predições *in silico*.

### 3.4.5 Seleção de variantes de interesse

O processo de filtragem das variantes germinativas e somáticas dos pacientes com PPGLs está ilustrado na (Figura 5). Após esse processo inicial de filtragem, as variantes foram também avaliadas quanto à frequência no banco de dados 1000 Genomes (<https://www.internationalgenome.org/>), *Genome Aggregation Database* (gnomAD) (<http://gnomad.broadinstitute.org>), no Arquivo Brasileiro Online de Mutações (AbraOM) (<http://abraom.ib.usp.br/>) e em um banco de dados interno SELAdb (<https://intranet.fm.usp.br/sela/>)<sup>74</sup>. Para confirmar a presença das variantes, foram visualizados todos os *reads* gerados no sequenciamento, alinhados ao genoma referência, no programa *Integrative Genomics Viewer* (IGV) do *Broad Institute* (<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>).

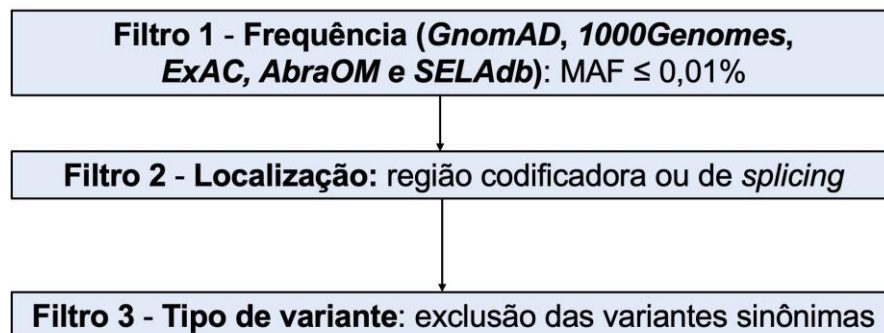


Figura 5 - Processo de filtragem das variantes germinativas identificadas no *Freebayes* que foram anotadas utilizando o *Annovar*

A predição de patogenicidade *in silico* das variantes foi analisada pelas ferramentas já incluídas na VCF anotada (Anexo H). A classificação das variantes germinativas em relação ao fenótipo do paciente foi realizada seguindo a recomendação da *American of Medical Genetics and Genomics e Association for Molecular Pathology* (ACMG-AMP)<sup>75</sup>. Para determinação de patogenicidade, esta classificação leva em consideração a frequência na população, análise *in silico*,

segregação familiar, análises funcionais, dentre outros. A variante é classificada em patogênica (P), provavelmente patogênica (LP), variante de significado incerto (VUS), provavelmente benigna (LB) ou benigna (B). A classificação das variantes foi realizada utilizando as ferramentas *InterVar* (<http://wintervar.wglab.org/>), *Varsome* (<https://varsome.com>) e *Franklin* (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>).

### **3.5 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS (*IBM SPSS Statistics, Version 25.0, Armonk, NY*). Dados contínuos foram expressos por valores de mediana (mínimo ao máximo). Variáveis numéricas contínuas foram analisadas por meio do teste Mann-Whitney U. O teste do  $\chi^2$  foi utilizado para análise de variáveis categóricas. A sensibilidade e especificidade dos critérios de PASS foi determinada pela *receiver operator characteristic curve* (ROC). A regressão logística foi utilizada para análise multivariada, que incluiu as variáveis com  $p < 0,2$  na análise univariada. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## **4 RESULTADOS**

#### 4.1 Características clínicas e genéticas dos pacientes com PPGLs

Nesse estudo, 155 pacientes (casos índices) com PPGLs (34 com diagnóstico sintromico e 121 aparentemente esporádicos na avaliação inicial) foram incluídos. Trinta e sete pacientes (24%) tiveram diagnóstico de doença metastática. As características clínicas da coorte de pacientes com PPGLs estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2 - Características clínicas dos pacientes (casos índices) com feocromocitomas e paragangliomas**

n = 155	
Idade ao diagnóstico (anos)*	38 (5-79)
Sexo Feminino n (%)	100 (64,5%)
Feocromocitomas n (%)	111 (71,6 %)
Bilateral	32 (28,8%)
Sincrônico	19 (59,3%)
Assincrônico	13 (40,6%)
Paragangliomas n (%)	52 (33,5%)
Produção hormonal n (%)	
Noradrenérgico (NE)	39 (65,4%)
Adrenérgico (E)	6 (3,8%)
Misto (NE + E)	31 (20%)
Não-funcionante	13 (8,3%)
Sem informação	55 (35,4%)
Escore de PASS*	
Feocromocitoma	4 (0-17)
Paraganglioma	4 (0-10)
Tamanho*	
Feocromocitoma (cm)	4,95 (0,5-16)
Paraganlioma (cm)	6,35 (1,5-15)
Doença metastática	37 (24%)
Estadiamento n (%)	
I	47 (30,3%)
II	63 (40,6%)
III	9 (5,8%)
IV	30 (19,3%)
Seguimento (meses)*	82 (2-532)

F: feminino; M: masculino; PASS: *Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score*. \*Mediana (variação).

O diagnóstico genético foi definido em 72 (46,5%) dos 155 pacientes com PPGLs (Tabela 3 e Anexo I). O painel genético de genes alvo por SPLE foi realizado em 33 dos 83 pacientes sem diagnóstico genético definido. Todos os pacientes com PPGLs metastáticos e pediátricos sem diagnóstico por SANGER e MLPA realizaram painel genético. Os genes mais frequentemente afetados foram *SDHB* (14%) e *RET* (13,5%), seguidos por *VHL* (7,8%), *SDHD* (3,2%), *NF1* (2,6%), *SDHA* (1,3%), *TMEM127* (1,3%), *MAX* (1,3%), *KIF1B* (< 1%) e *H3F3A* (< 1%). Todas os defeitos genéticos germinativos foram identificados em heterozigose.

**Tabela 3 - Diagnóstico genético dos casos índices com feocromocitomas e paragangliomas após investigação por SANGER, MLPA e painel genético por SPLE**

n = 155	
<i>SDHB</i>	22 (14%)
<i>RET</i>	21 (13,5%)
<i>VHL</i>	12 (7,7%)
<i>SDHD</i>	5 (3,2%)
<i>NF1</i>	4 (2,6%)
<i>SDHA</i>	2 (1,3%)
<i>TMEM127</i>	2 (1,3%)
<i>MAX</i>	2 (1,3%)
<i>KIF1B</i>	1 (0,65%)
<i>H3F3A</i>	1 (0,65%)
Sem diagnóstico	83 (53,5%)

MLPA: *multiplex ligation-dependent probe amplification*; SPLE: sequenciamento paralelo em larga escala.

Dentre os 22 defeitos germinativos no *SDHB*, 7 (32%) são VP *missense*, 4 (18%) são VP *frameshift/stop codon*, 2 (9%) VP em sítio de *splicing* e 9 (41%) grandes deleções do *SDHB*. A deleção completa do exon 1 do *SDHB* foi a alteração genética mais frequente do *SDHB*, sendo identificada em 8 (36,4%) de 22 pacientes



(Tabela 4). Doença metastática foi diagnosticada em 11 (50%) de 22 casos com gene *SDHB* afetado.

**Tabela 4 - Frequência dos defeitos genéticos identificados no gene *SDHB* na coorte de pacientes com feocromocitomas e paragangliomas**

	n = 22	ACMG	Nova
Deleção completa do exon 1	8 (36,4%)	P	N
Deleção completa do <i>SDHB</i>	1 (4,6%)	P	N
c.540G>A / p.(Leu180Leu)	2 (9,1%)	LP	N
c.293G>A / p.(Cys98Tyr)	2 (9,1%)	LP	N
c.688C>T / p.(Arg230Cys)	2 (9,1%)	P	N
c.206G>A / p.(Gly69Asp)	1 (4,6%)	VUS	N
c.136C>T / p.(Arg46*)	1 (4,6%)	P	N
c.617dupA / p.(Tyr206fs*)	1 (4,6%)	LP	S
c.498delC / p.Lys167fs*8	1 (4,6%)	LP	S
c.591delC / p.(Ser198Alafs*22)	1 (4,6%)	P	N
c.423+1G>A	1 (4,6%)	P	S
c.201-2A>G	1 (4,6%)	LP	S

S: sim; N: não; ACMG: *American College of Medical Genetics*; P: patogênica; LP: provavelmente patogênica; VUS, variante de significado incerto.

Uma paciente (caso 72, Anexo I) apresentou feocromocitoma bilateral diagnosticado aos 48 anos. Essa paciente tinha uma história de tumor ósseo de células gigantes recidivante. Essa associação de feocromocitoma bilateral e tumor ósseo de células gigantes é causada pela VP p.(Gly35Trp) no gene *H3F3A* em todos os casos descritos. Esse defeito ocorre em mosaicismo e só foi detectado por SPLE por amplificação de amplicon (com cobertura de > 1000x)<sup>76</sup>. Na paciente do presente estudo, essa variante foi identificada nos dois feocromocitomas, mas não foi identificada no DNA germinativo por SANGER e no painel por SPLE (com cobertura > 100x). Dessa forma, o diagnóstico de mosaicismo para o gene *H3F3A* foi presumido.

Variantes de significado incerto germinativas foram identificadas em 5 pacientes (3 com feocromocitoma e 2 com paraganglioma) no painel genético por SPLE (Tabela 5). As VUS foram identificadas em genes previamente associados a alterações somáticas somente (*KMT2D* e *CTNNB1*) ou apresentaram uma probabilidade de patogenicidade baixa ( $\leq 50\%$ ). Dessa forma, o diagnóstico genético dos pacientes carreadores dessas variantes foi considerado indefinido.

**Tabela 5 - Variantes de significado incerto identificadas em pacientes com feocromocitomas e paragangliomas pelo painel de genes alvo por SPLE**

Sexo	Idade	PGL	FEO	PASS	Metastático	Gene	VUS	Probabilidade Patogenicidade das VUS
F	47	N	D (9 cm)	3	S	<i>CTNNB1</i>	c.2128C>T p.(Arg710Cys)	67,5%
F	34	8 Abdominal	N	8	N	<i>KMT2D</i>	c.7084C>T p.(Pro2362Ser)	50%
F	41	N	D (4,5 cm)	4	N	<i>SDHD</i>	c.314+3A>G p?	32,5%
M	66	8,5 Abdominal	N	7	N	<i>RET</i>	c.3077C>T p.(Ser1026Phe)	50%
F	56	N	E (7,6 cm)	0	N	<i>MAX</i>	c.295+149dupT p?	32,5%

F: feminino; M: masculino; PGL: paraganglioma; D: direita; E: esquerda; S: sim; N: não; FEO: feocromocitoma; PASS: *Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score*; VUS: variante de significado incerto.

#### 4.2 Características clínicas e genéticas dos pacientes com PPGLs pediátricos

Embora esse estudo tenha incluído somente casos índices com PPGLs, optou-se por incluir casos adicionais da mesma família somente para a análise do subgrupo de PPGLs pediátricos (idade  $\leq 18$  anos) em virtude da raridade dessa coorte. Vinte e sete pacientes de 24 famílias tiveram o diagnóstico de PPGLs na faixa pediátrica, sendo 21 casos índices e outros 6 casos familiares diagnosticados pelo surgimento de manifestações clínicas ou por rastreamento (Tabela 6).

**Tabela 6 - Características clínicas dos pacientes com feocromocitomas e paragangliomas pediátricos**

	n = 27
Idade ao diagnóstico (anos)*	14 (4-18)
Sexo Feminino n (%)	13 (48%)
Feocromocitomas n (%)	20 (74 %)
Bilateral	13 (65%)
Sincrônico	2 (15%)
Assincrônico	11 (85%)
Paragangliomas n (%)	14 (52 %)
Produção hormonal n (%)	
Noradrenérgico	11 (40,8%)
Misto (Noradrenérgico e adrenérgico)	4 (14,8%)
Não-funcionante	1 (3,6%)
Sem informação	11 (40,8%)
Escore de PASS* mediana (range)	
Feocromocitoma	3 (0-8)
Paraganglioma	2,5 (0-10)
Tamanho*	
Feocromocitoma (cm)	4 (0,8 a 16)
Paraganlioma (cm)	5,3 (1,2-8,5)
Doença metastática	5 (18,5%)
Estadiamento n (%)	
I	8 (29,6%)
II	12 (44,4%)
III	0
IV	5 (18,5%)
Sem informação	2 (7,5%)
Seguimento (meses)*	168 (7-532)

F: feminino; M: masculino.

\*Mediana (variação).

Na coorte de PPGLs pediátricos, VPs germinativas em heterozigose foram identificadas em 12 (72%) de 21 casos índices: *VHL* 28%, *SDHB* 28%, *SDHD* 9% e *RET* 4% (Tabelas 7, 8 e 9). Somente um paciente da coorte teve diagnóstico de NEM2A. As VPs no *VHL* foram *missense* em todos os pacientes (5 no exon 1 e 7 no exon 3). Todos os 12 pacientes com *VHL* tiveram feocromocitoma e 4 (33,3%) deles apresentaram também paragangliomas abdominais (Tabela 8). Além disso, 10 de 12 casos (83,3%) com VPs no *VHL* apresentaram feocromocitoma bilateral (2 sincrônicos e 8 assincrônicos). Somente uma paciente com feocromocitoma bilateral (caso 27, Tabela 10) não teve diagnóstico de *VHL*. Outros tumores do espectro de *VHL* foram diagnosticados durante o seguimento em todos os pacientes com VPs germinativas no gene *VHL*.

**Tabela 7 - Diagnóstico genético dos pacientes índices pediátricos com feocromocitomas e paragangliomas após investigação por SANGER, MLPA e painel genético por SPLE**

	n = 21
<i>SDHB</i>	6 (28%)
<i>VHL</i>	6 (28%)
<i>SDHD</i>	2 (9%)
<i>RET</i>	1 (4%)
Sem diagnóstico no painel	6 (28%)

MLPA: *multiplex ligation-dependent probe amplification*;

SPLE: sequenciamento paralelo em larga escala.

O caso 27 teve diagnóstico de um feocromocitoma a esquerda de 3 cm aos 5 anos de idade. Durante o seguimento, a paciente apresentou feocromocitoma contralateral, dois paragangliomas para-aórticos e policitemia. A investigação pelo painel genético não identificou VPs nos genes *EGLN1*, *EGLN2* e *EPAS1*. Como essa paciente foi encaminhada para a instituição onde foi realizado este estudo somente após as ressecções dos feocromocitomas e paragangliomas, não se dispunha do

tecido tumoral para investigar VPs somáticas nos genes citados acima e avaliar a possibilidade de mosaïcismo (caso a mesma VP somática seja identificada em todas as amostras tumorais).

Um adolescente de 15 anos (caso 12, Tabela 8) teve o diagnóstico de feocromocitoma bilateral assincrônico. Esse paciente evoluiu com três tumores neuroendócrinos em cabeça do pâncreas após 9 anos de seguimento. O gene *VHL* foi estudado por SANGER, MLPA e SPLE, não sendo encontrada nenhuma alteração. Adicionalmente, uma região intrônica do *VHL*, recentemente considerada como um exon críptico, foi sequenciada por SANGER e estava normal. O sequenciamento do feocromocitoma esquerdo revelou a VP somática em heterozigose p.(Thr157Ile)/c.1900T>C. Não se dispunha do tecido do feocromocitoma direito. Como esse paciente possui diagnóstico clínico de VHL e foi identificada uma VP somática no gene *VHL*, pode-se presumir que esse paciente é portador de um mosaïcismo. Embora a cobertura do gene *VHL* no painel tenha sido adequada (> 100x), é necessária uma técnica de SPLE por amplificação de amplicon (com cobertura de > 1000x) para se identificar VPs germinativas com balanço alélico baixo (< 10%-15%).

Dentre os pacientes pediátricos com VPs no *SDHB*, cinco apresentaram paraganglioma abdominal e somente um feocromocitoma (Tabela 9). A presença de VPs germinativas no *SDHB* foi identificada em dois dos cinco pacientes com doença metastática (Tabela 10). Os dois pacientes com VPs no *SDHD* apresentaram paraganglioma de cabeça e pescoço.

**Tabela 8 - Dados clínicos e genéticos dos pacientes com feocromocitomas e paragangliomas pediátricos com VPs germinativas em heterozigose no gene *VHL* ou *RET***

Caso	Família	Idade (anos)	Sexo	Produção hormonal	Tumor (cm)	FEO bilateral	Sincronico	PGL abdominal	PASS	Metastático	Seguimento (meses)	Gene	Exon	Variante Patogênica	ACMG
1	1	12	M	ND	D 4.0 E 3.0	S	Assincronico	S (1.2 cm)	D 5 E 0	N	135	<i>VHL</i>	3	c.499C>T p.(Arg167Trp)	P
2	1	16	M	ND	D 1.7 E 0.6	S	Assincronico	N	D 0	N	141	<i>VHL</i>	3	c.499C>T p.(Arg167Trp)	P
3	2	15	M	Mista	D 5.2 E 6.8	S	Sincronico	S (4.3 cm)	D 6 E 8	N	35	<i>VHL</i>	3	c.499C>T p.(Arg167Trp)	P
4	3	12	F	Noradrenérgica	D 5.0 E 4.0	S	Assincronico	N		N	244	<i>VHL</i>	1	c.340G>A p.(Gly114Ser)	P
5	3	15	M	ND	NA	S	Assincronico	N		N	532	<i>VHL</i>	1	c.340G>A p.(Gly114Ser)	P
6	3	15	M	Noradrenérgica	NA	S	Assincronico	N		N	44	<i>VHL</i>	1	c.340G>A p.(Gly114Ser)	P
7	4	4	M	Noradrenérgica	D 4.0 E 1.3	S	Sincronico	N	D 6 E 2	N	249	<i>VHL</i>	1	c.340G>A p.(Gly114Ser)	P
8	5	8	F	ND	D 5.5 E 6.0	S	Assincronico	N		N	190	<i>VHL</i>	1	c.340G>A p.(Gly114Ser)	P
9	6	12	M	Noradrenérgica	D 6.0 E 1.5	S	Sincronico	S (2.2 cm)	D 2 E 2	N	59	<i>VHL</i>	3	c.500G>A p.(Arg167Gln)	P
10	7	9	F	ND	NA	S	Sincronico	N		N	10	<i>VHL</i>	3	c.496G>T p.Val166Phe	P
11	8	9	F	ND	NA	N	Assincronico	S (8,1 cm)	PGL 0	N	264	<i>VHL</i>	3	c.482G>A p.(Arg161Gln)	P
12	9	15	M	ND	D 0,8 E 2,5	S	Assincronico	N	E 3	N	258	<i>VHL</i>	3	c.470C>T p.(Thr157Ile)*	P
13	10	18	M	ND	D 0.8 E 6.0	N	Assincronico	N		N	258	<i>RET</i>	11	c.1900T>C p.(Cys634Arg)	P

F: feminino; M: masculino; ND: não disponível; D: direita; E: esquerda; PGL: paraganglioma; S: sim; N: não; FEO: feocromocitoma; PASS: *Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score*; ACMG: *American College of Medical Genetics*; P: patogênica.

\*VP somática em um paciente com diagnóstico clínico de *VHL* (diagnóstico de mosaicismo presumido).

**Tabela 9 - Dados clínicos e genéticos dos pacientes com feocromocitomas e paragangliomas pediátricos com VPs germinativas em heterozigose no gene *SDHB* ou *SDHD***

Caso	Família	Idade (anos)	Sexo	Produção hormonal	PGL (cm)	PGL localização	Metastático	FEO	PASS	Seguimento (meses)	Gene	Variante Patogênica	ACMG
14	11	16	F	Noradrenérgico	6.0	Abdominal	S	N	10	146	<i>SDHB</i>	c.201-2A>G p.?	LP
15	12	14	M	Noradrenérgico	5.5	Abdominal	N	N	3	55	<i>SDHB</i>	c.540G>A p.(Leu180Leu)	LP
16	13	18	F	ND	9.0	Abdominal	N	N		335	<i>SDHB</i>	c.293G>A p.(Cys98Tyr)	LP
17	14	18	F	ND	8.5	Abdominal	N	N	4	204	<i>SDHB</i>	c.540G>A p.(Leu180Leu)	LP
18	15	11	M	Noradrenérgico	6,5	Abdominal	S	N	3	84	<i>SDHB</i>	c.498delC p.(Lys167fs*8)	LP
19	16	13	M	Misto			N	S (7 cm)	6	7	<i>SDHB</i>	c.617dupA p.(Tyr206fs*)	LP
20	17	14	F	NF	3.5	Cabeça e pescoço	N	N	2	60	<i>SDHD</i>	c.361C>T p.(Gln12*)	P
21	18	15	M	NF	4.1	Cabeça e pescoço	N	S (2 cm)		48	<i>SDHD</i>	c.430_435del p.(Tyr144_His145del)	LP

F: feminino; M: masculino; ND: não disponível; D: direita; E: esquerda; PGL: paraganglioma; S: sim; N: não; FEO: Feocromocitoma; PASS: *Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score*; ACMG: *American College of Medical Genetics*; P: patogênica; LP: provavelmente patogênica.

**Tabela 10 - Dados clínicos e genéticos dos pacientes com feocromocitomas e paragangliomas pediátricos sem diagnóstico genético definido após investigação por painel genético por SPLE**

Caso	Família	Idade (anos)	Sexo	Produção hormonal	FEO (cm)	Bilateral S/N	PGL (cm)	PGL localização	PASS	Metastático	Seguimento (meses)
22	19	17	F	ND	D 7.5	N			ND	N	-
23	20	11	F	Noradrenérgico	E 16	N			ND	S	346
24	21	14	F	Noradrenérgico	E 6.4	N			ND	N	75
25	22	15	M	Noradrenérgico	D 3.0	N			8	S	259
26	23	18	F	Noradrenérgico	N		6.0	Bexiga	ND	S	229
27	24	5	F	Noradrenérgico	D 1.0 E 3.0	S	4.0	Abdominal	E 0	N	190

F: feminino; M: masculino; FEO: feocromocitoma; PGL: paraganglioma; ND: não disponível; S: sim; N: não; D: direita; E: esquerda; PASS: *Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score*.



A mediana de idade ao diagnóstico não foi diferente entre as crianças com VPs no *VHL* (12 anos, variando de 4 a 16) quando comparada ao grupo com outros diagnósticos genéticos (15 anos, variando de 5 a 18 anos) ( $p = 0,072$ ). O tamanho tumoral também não foi diferente entre os dois grupos. A mediana de idade ao diagnóstico das crianças com e sem diagnóstico genético foi similar [14 anos (4 a 18 anos) vs. 14,5 anos (5 a 18 anos);  $p = 0,84$ ].

PPGL metastático foi diagnosticado em 5 de 27 pacientes (18,5%). Dois pacientes (casos 14 e 18, Tabela 9) possuem VPs germinativas no *SDHB* e os outros 3 casos (dois feocromocitomas e um paraganglioma de bexiga) não possuem diagnóstico genético definido (casos 23, 25 e 26, Tabela 10). Todos os cinco casos apresentaram metástases ósseas e dois casos tiveram metástases hepáticas.

### 4.3 Pacientes com PPGLs metastáticos

#### 4.3.1 Características clínicas

Trinta e sete (24%) de 155 casos índices com PPGLs foram diagnosticados com doença metastática, sendo 22 (59,5%) do sexo feminino. A mediana de idade dos pacientes com PPGLs metastáticos ao diagnóstico foi 34 anos, variando de 11 a 70 anos (Tabelas 11 e 12). A prevalência de doença metastática foi maior nos pacientes com paraganglioma do que nos pacientes com feocromocitoma (38% vs. 17,6%;  $X_2 = 7,8$ ,  $p = 0,006$ ) na coorte de 155 casos índices com PPGLs.

**Tabela 11 - Características clínicas dos pacientes com feocromocitomas e paragangliomas metastáticos**

	n = 37
Idade ao diagnóstico (anos)*	34 (11-70)
Sexo Feminino n (%)	22 (59,5%)
Feocromocitomas n (%)	20 (54 %)
Paragangliomas n (%)	19 (51 %)
Produção hormonal n (%)	
Noradrenérgico	16 (43%)
Misto (Noradrenérgico e adrenérgico)	8 (21%)
Dopamina exclusivo	1 (2%)
Não-funcionante	4 (10%)
Sem informação	8 (21%)
Escore de PASS* mediana (range)	
Feocromocitoma	9 (3-17)
Paraganglioma	4,5 (2-10)
Tamanho*	
Feocromocitoma (cm)	5,4 (2,5 a 16)
Paraganlioma (cm)	6,1 (2,5 a 15)
Metástases sincrônicas	13 (35%)
Metástases n (%)	
Ósseas	22 (59%)
Linfonodos	22 (59%)
Fígado	8 (21%)
Pulmão	6 (16%)
Doença localmente avançada	5 (13%)
Estadiamento n (%)	
III	7 (18%)
IV	30 (81%)
Seguimento*	88 (2-372)
Óbito relacionado a doença n (%)	3 (8%)

F: feminino; M: masculino; PASS: *Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score*.

\*Mediana (variação).

**Tabela 12 - Características clínicas, genéticas e evolutivas dos pacientes com feocromocitomas e paragangliomas metastáticos**

Caso	FEO/ PGL	Idade diagnóstico (anos)	Tamanho (cm)	Produção hormonal	TNM	Metástase diagnóstico	Sítios	Gene	Defeitos genéticos	<sup>131</sup> I-MIBG captação das lesões metastáticas	Tempo (meses)	Desfecho
14	PGL	16	6 (abdômen)	Noradrenérgico	4	Não	Ossos, linfonodos	<i>SDHB</i>	c.201-2A>G	Sim	146	Vivo
18	PGL	11	6,5 (abdômen)	Noradrenérgico	4	Não	Ossos	<i>SDHB</i>	c.498delC p.(Lys167Serfs*8)	Sim	84	Vivo
23	FEO	11	16	Noradrenérgico	4	Sim	Ossos, linfonodos, fígado	Não	-	Sim	346	Vivo
25	FEO	15	3	Noradrenérgico	4	Não	Linfonodos	Não	-	Sim	259	Vivo
26	PGL	18	4,6 (genitourinário)	Noradrenérgico	4	Não	Ossos, linfonodos, fígado, pulmão Invasão local	Não	-	Sim	229	Vivo
28	PGL	26	6,2 (abdômen)	Noradrenérgico	4	Não	Ossos, linfonodos fígado	<i>SDHB</i>	c.423+1G>A	Sim	106	Vivo
29	PGL	29	15 (abdômen)	Noradrenérgico	4	Sim	Ossos, linfonodos	<i>SDHB</i>	c.688C>T p.(Arg230Cys)	Sim	15	Vivo
30	PGL	57	7 (genitourinário)	Noradrenérgico	4	Sim	Ossos	<i>SDHB</i>	c.293G>A p.(Cys98Tyr)	ND	2	Óbito
31	PGL	33	13,5 (abdômen)	Mista	3	Sim	Invasão local	<i>SDHB</i>	c.591delC p.(Ser198Alafs*22)	Não	18	Vivo
32	PGL	53	8,2 (abdômen)/ 8,5 (cervical)	ND	4	Não	Ossos, linfonodos, Pulmão	<i>SDHB</i>	Deleção Exon 1	Não	360	Óbito
33	PGL	26	6,5 (cervical)	Não-funcionante	4	Não	Ossos, pulmão	<i>SDHB</i>	Deleção Exon 1	Não	117	Vivo
34	PGL	33	13,7 (abdômen)	Dopamina	4	Sim	Ossos, linfonodo	<i>SDHB</i>	Deleção Exon 1	Não	21	Vivo
35	PGL	43	ND	ND	4	Não	Ossos	<i>SDHB</i>	Deleção Exon 1	Não	24	Vivo
36	PGL	30	7,4 (cervical)	Não-funcionante	3	Não	Linfonodo, invasão local	<i>SDHB</i>	Deleção completa	Não	35	Vivo
37	FEO / PGL	26	3 (FEO)/ 2,6 (cervical)	Noradrenérgico	4	Não	Linfonodos	<i>SDHD</i>	Deleção Exon 4	Sim	46	Vivo
38	PGL	56	3 (abdômen)	ND	3	Sim	Linfonodo (ressecado)	<i>SDHA</i>	c.910C>T p.(Arg352*)	Sem evidência de doença	168	Vivo
39	FEO	36	12,5	Noradrenérgico	4	Sim	Linfonodos, pulmão, fígado	<i>NFI</i>	c.980T>G p.(Leu327Arg)	Sim	110	Vivo

continua

*conclusão*

Caso	FEO/ PGL	Idade diagnóstico (anos)	Tamanho (cm)	Produção hormonal	TNM	Metástase diagnóstico	Sítios	Gene	Defeitos genéticos	<sup>131</sup> I-MIBG captação das lesões metastáticas	Tempo (meses)	Desfecho
40	FEO	70	5	Mista	4	Não	Ossos	<i>NFI</i>	c.3892C>T p.(Gln1298*)	ND	55	Óbito
41	PGL	58	6,5 (abdômen)	Mista	3	Sim	Linfonodo (ressecado)	-	-	Sem evidência de doença	99	Vivo
42	FEO	35	6,8	Mista	3	Não	Invasão local	<i>KIF1B</i>	c.161A>C p.(Tyr54Ser)	Sim	73	Vivo
43	FEO /PGL	52	4,4 (FEO)/ 4,8 (abdômen)	Noradrenérgico	3	Sim	Linfonodos	Não	-	Sem evidência de doença	20	Vivo
44	FEO	58	3,0	Noradrenérgico	4	Sim	Ossos, linfonodos	Não	-	Não*	40	Vivo
45	PGL	41	3,4 (cervical)	Não-funcionante	4	Não	Linfonodos, fígado	Não	-	Não	36	Vivo
46	FEO	34	9	ND	4	Não	Ossos, linfonodos	Não	-	Sim	209	Vivo
47	PGL	55	3,0 (abdômen)	Noradrenérgico	4	Não	Linfonodo, pulmão	Não	-	Sim	88	Vivo
48	FEO	31	4	Noradrenérgico	4	Não	Ossos	Não	-	Sim	4	Vivo
49	FEO	35	9	Não-funcionante	4	Sim	Linfonodo, pulmão	Não	-	Sim	353	Vivo
50	FEO	28	12 (abdômen)	Mista	4	Sim	Ossos, linfonodos, fígado	Não	-	Sim	112	Vivo
51	FEO	25	4,4	ND	3	Não	Linfonodos	Não	-	ND	276	Vivo
52	FEO	41	ND	Mista	4	Não	Ossos	Não	-	Sim	372	Vivo
53	FEO	20	5,4	ND	4	Não	Ossos	Não	-	Sim	84	Vivo
54	FEO	35	3,5	Mista	4	Sim	Ossos, linfonodos	Não	-	Sim	174	Vivo
55	FEO	43	14	Noradrenérgico	4	Sim	Ossos, fígado	Não	-	Sim	66	Vivo
56	PGL	25	4,3 (abdômen)	Mista Dopamina	4	Não	Ossos	Não	-	Sim	115	Vivo
57	FEO	44	ND	ND	4	Não	Ossos, fígado	Não	-	Sim	84	Vivo
58	FEO	47	9	Noradrenérgico	3	Não	Linfonodos Invasão local	<i>CTNNB1</i>	c.2128C>T p.(Arg710Cys)	Não	40	Vivo
59	FEO	23	11	ND	4	Não	Linfonodos, Invasão Local	Não	-	Sim	131	Vivo

FEO: feocromocitoma; PGL: paraganglioma; ND: não disponível; TNM: *Tumor-Node-Metastasis staging*; MIBG: metaiodobenzilguanidina.  
 Todos os defeitos genéticos são germinativos em heterozigose.

Dentre os pacientes com PPGLs metastáticos, 20 (54%) tiveram feocromocitoma e 19 (51%) tiveram paraganglioma. Dois pacientes com feocromocitoma metastático tiveram também o diagnóstico de paraganglioma de carótida (caso 37, Tabela 11) e paraganglioma para-aórtico (caso 43, Tabela 11). A mediana do tempo de seguimento foi 88 meses.

O tamanho mediano dos feocromocitomas (maior tumor de cada paciente) foi 5,4 cm (3,0 a 16) e dos paragangliomas 6,1 cm (3,0 a 15). Doença metastática até 6 meses após diagnóstico (sincrônica) foi identificada em 13 casos (35%). Os principais sítios de metástases foram linfonodos (59%) e ossos (59%), seguidos por fígado (21%) e pulmão (16%). Dentre os pacientes que não apresentaram metástase ao diagnóstico (66%), a mediana de tempo até o diagnóstico da doença metastática foi 54 meses (12 a 324).

### 4.3.2 Diagnóstico genético

Após a realização da investigação genética nos pacientes com PPGLs metastáticos, o diagnóstico genético foi identificado em 16 (43,2%) casos: *SDHB* 11 (29,7%) casos, *NF1* 2 (5,4%) casos, *SDHD* 1 (2,7%) caso, *SDHA* 1 (2,7%) caso e *KIF1B* 1 (2,7%) caso. Vinte (56,8%) paciente com PPGLs metastáticos tiveram investigação genética negativa no painel de genes alvo por SPLE (Tabela 13). Todas as alterações genéticas são germinativas e foram identificadas em heterozigose.

**Tabela 13 - Diagnóstico genético dos pacientes com feocromocitomas e paragangliomas metastáticos após investigação por SANGER, MLPA e painel genético por SPLE**

n = 37	
<i>SDHB</i>	11 (29,7%)
<i>NF1</i>	2 (5,4%)
<i>SDHD</i>	1 (2,7%)
<i>SDHA</i>	1 (2,7%)
<i>KIF1B</i>	1 (2,7%)
Sem diagnóstico no painel	21 (56,8%)

MLPA: *multiplex ligation-dependent probe amplification*; SPLE: sequenciamento paralelo em larga escala.

Dentre os pacientes com defeitos germinativos no *SDHB*, VPs germinativas foram identificadas em 6 (54,5%) de 11 casos, enquanto grandes deleções (4 deleções do exon 1 e uma deleção completa) foram diagnosticadas em 5 (45,5%) casos (Tabelas 14 e 15, Figura 6). Somente duas VPs no *SDHB* não foram previamente descritas (Tabela 15). Os pacientes com VPs no *SDHB* apresentaram paraganglioma abdominal ao diagnóstico. O caso 14 teve o diagnóstico de um paraganglioma cervical (2,7 cm) 132 meses após o diagnóstico inicial. A mãe do caso 14 teve o diagnóstico de um paraganglioma abdominal não metastático após o diagnóstico da filha e é portadora da VP germinativa c.201-2A>G do *SDHB*.

**Tabela 14 - Características clínicas e genéticas dos pacientes com feocromocitomas e paragangliomas metastáticos com VPs no gene *SDHB* identificadas por SANGER**

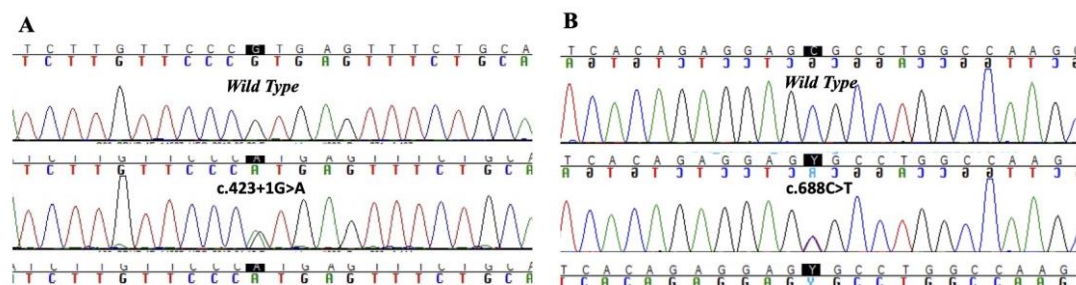
Caso	Gene	Idade (anos)	Sexo	FEO/ PGL	Tumor (cm)	PASS	Ki67	Metástase Diagnóstico	Captação <sup>131</sup> I-MIBG	Variante Patogênica	ACMG	Nova
14	<i>SDHB</i>	16	F	PGL	6	10	1%-3%	N	S	c.201-2A>G	LP	S
18	<i>SDHB</i>	11	M	PGL	ND	3	5,0%	N	S	c.498delC p.(Lys167Serfs*8)	LP	S
28	<i>SDHB</i>	26	F	PGL	6,2	6	10%	N	S	c.423+1G>A	P	N
29	<i>SDHB</i>	29	M	PGL	15	7		S	S	c.688C>T p.(Arg230Cys)	P	N
30	<i>SDHB</i>	57	M	PGL	7	5		S	ND	c.293G>A p.(Cys98Tyr)	P	N
31	<i>SDHB</i>	33	M	PGL	13,5	2	<1%	S	N	c.591delC p.(Ser198Alafs*22)	P	N

M: masculino; F: feminino; FEO: feocromocitoma; PGL: paraganglioma; S: sim; N: não; PASS: *Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score*; MIBG: metaiodobenzilguanidina; ND: não disponível; ACMG: *American College of Medical Genetics*; P: patogênica; LP: provavelmente patogênica.

**Tabela 15 - Características clínicas e genéticas dos pacientes com feocromocitoma e paraganglioma metastáticos com grandes deleções nos genes *SDHB* e *SDHD* detectadas pela técnica de MLPA**

Caso	Gene	Idade	Sexo	Tumor (cm)	FEO/ PGL	PASS	Ki67	Metástase Diagnóstico	Captação <sup>131</sup> I-MIBG	Deleção	ACMG
32	<i>SDHB</i>	53	F	8,5	PGL		até 30%	N	N	Deleção exon 1	P
33	<i>SDHB</i>	26	M	6,5	PGL	4	<1%	N	N	Deleção exon 1	P
34	<i>SDHB</i>	33	F	13,7	PGL			S	N	Deleção exon 1	P
35	<i>SDHB</i>	43	M	ND	PGL			N	N	Deleção exon 1	P
36	<i>SDHB</i>	30	F	7,4	PGL			N	N	Deleção completa	P
37	<i>SDHD</i>	26	M	3	PGL/ FEO	5	<1%	N	S	Deleção exon 4	P

M: masculino; F: feminino; FEO: feocromocitoma; PGL: paraganglioma; S: sim; N: não; PASS: *Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score*; MIBG: metaiodobenzilguanidina; ND: não disponível; ACMG: *American College of Medical Genetics*; P: patogênica; MLPA: *multiplex ligation-dependent probe amplification*.



**Figura 6 - Eletroferogramas obtido por meio do sequenciamento pelo método Sanger de paciente com paraganglioma metastático mostrando as variantes patogênicas c.423+1G>A (A) e c.688C>T (B) no *SDHB***

De forma interessante, cinco pacientes com paragangliomas metastáticos são carreadores de grandes deleções do *SDHB*, sendo 4 casos com deleção do exon 1 e um caso com deleção completa (Tabela 15 e Figura 7). A deleção do exon 1 foi a alteração genética mais frequente no *SDHB* (4 de 11 casos, 36%) na presente coorte. O caso 32 apresentou paraganglioma abdominal e cervical ao diagnóstico. Os casos 33 e 36 foram diagnosticados com paraganglioma cervical. Já o caso 34 foi diagnosticada com um paraganglioma abdominal irressecável e tinha história familiar de paraganglioma.

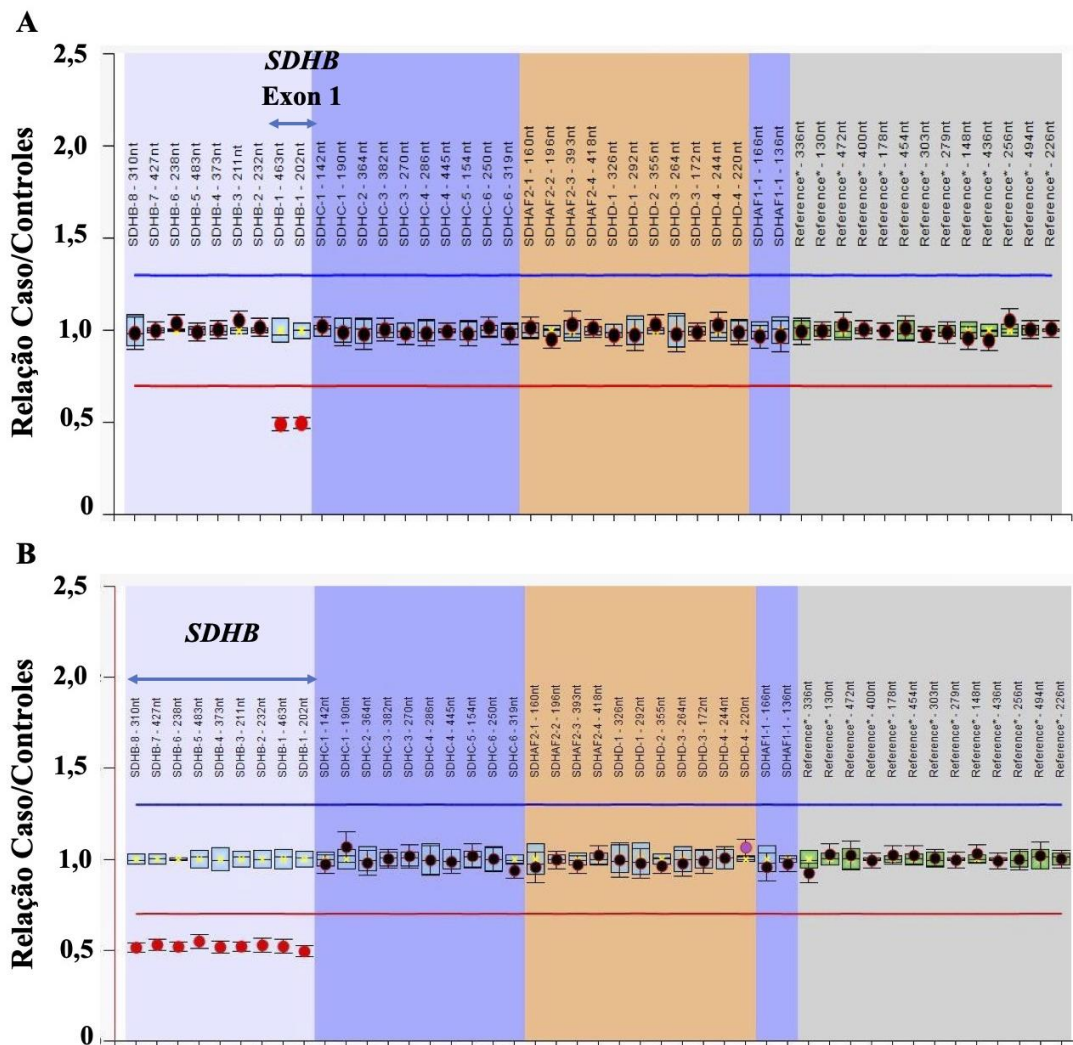


Figura 7 - Deleção do exon 1 (A) e completa (B) do gene *SDHB* em um paciente com paraganglioma mestastático detectada por MLPA



O caso 7 com a deleção do exon 4 do *SDHD* foi diagnosticado com feocromocitoma unilateral e paraganglioma cervical (Tabela 15 e Figura 8). Durante o seguimento foi evidenciada a presença de metástase linfonodal mediastinal. A deleção do exon 4 do *SDHD* foi identificada no pai do paciente, que tem antecedente de ressecção de paraganglioma cervical.

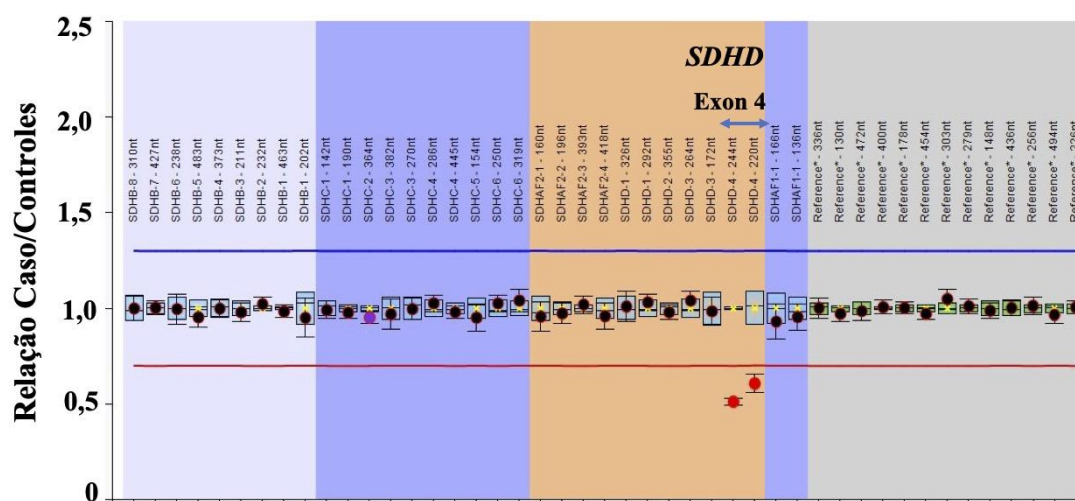


Figura 8 - Deleção do exon 4 do gene *SDHD* em um paciente com paraganglioma metastático detectada por MLPA

Três pacientes tiveram o diagnóstico genético por meio do painel de genes alvo por SPLE (Tabela 16). O caso 38 com VP germinativa no *SDHA* p.(Arg352\*) teve diagnóstico de paraganglioma de cólon com metástase linfonodal ressecada na cirurgia do tumor primário (sem recidiva até o momento). Dois pacientes (casos 39 e 40) já possuíam diagnóstico clínico de NF1. A variante germinativa em heterozigose p.(Tyr54Ser) do *KIF1B* foi identificada em uma paciente com feocromocitoma adrenérgico e doença localmente avançada após múltiplas cirurgias em outros serviços (caso 42, Tabela 16). Essa variante foi classificada como VUS, mas com um potencial de patogenicidade de **67,5%**. Em virtude disso, optou-se por incluir esse

caso como diagnóstico genético definido. Variantes germinativas inativadoras no gene supressor tumoral *KIF1B* já foram previamente identificadas em pacientes com feocromocitoma, neuroblastoma ou meduloblastoma<sup>77-79</sup>.

**Tabela 16 - Características clínicas e genéticas dos pacientes com feocromocitoma e paraganglioma metastáticos com variantes patogênicas identificadas no painel genético por SPLE**

Caso	Gene	Idade	Sexo	Tumor (cm)	FEO/PGL	PASS	Ki67	Metástase Diagnóstico	Captação <sup>131</sup> I-MIBG	Variante Patogênica	ACMG	Nova
38	<i>SDHA</i> *	56	F	3	PGL	8	até 2%	S	Sem recidiva	c.910C>T p.(Arg352*)	P	N
39	<i>NF1</i>	36	M	12,5	FEO	12	15%	S	S	c.980T>G p.(Leu327Arg)	LP	S
40	<i>NF1</i>	70	F	5	FEO	17		N	ND	c.3892C>T p.(Gln1298*)	P	S
42	<i>KIF1B</i>	35	F	6,8	FEO	14	cerca 10%	N	S	c.161A>C p.(Tyr54Ser)	VUS	S

M: masculino; F: feminino; FEO: feocromocitoma; PGL: paraganglioma; S: sim; N: não; PASS: *Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score*; MIBG: metaiodobenzilguanidina; ND: não disponível; ACMG: *American College of Medical Genetics*; P: patogênica; LP: provavelmente patogênica; VUS: variante de significado incerto; SPLE: sequenciamento paralelo em larga escala.

\*Após ressecção da metástase linfonodal na cirurgia do PGL, a paciente evolui sem evidência de doença. Dessa forma, o MIBG é negativo porque não há recidiva (e não porque as lesões não captam).

Após a investigação por meio painel de genes alvo para PPGL por SPLE, 21 de 37 (56,8%) pacientes com PPGLs metastáticos permanecem sem diagnóstico genético. Dentre os pacientes sem diagnóstico genético, 16 (76%) têm feocromocitoma metastático (um deles associado a paraganglioma abdominal) (Tabela 17). Por outro lado, somente cinco casos de paraganglioma metastático permanecem sem diagnóstico genético definido.

**Tabela 17 - Características clínicas e genéticas dos pacientes com feocromocitomas e paragangliomas metastáticos sem diagnóstico definido após o painel genético por SPLE**

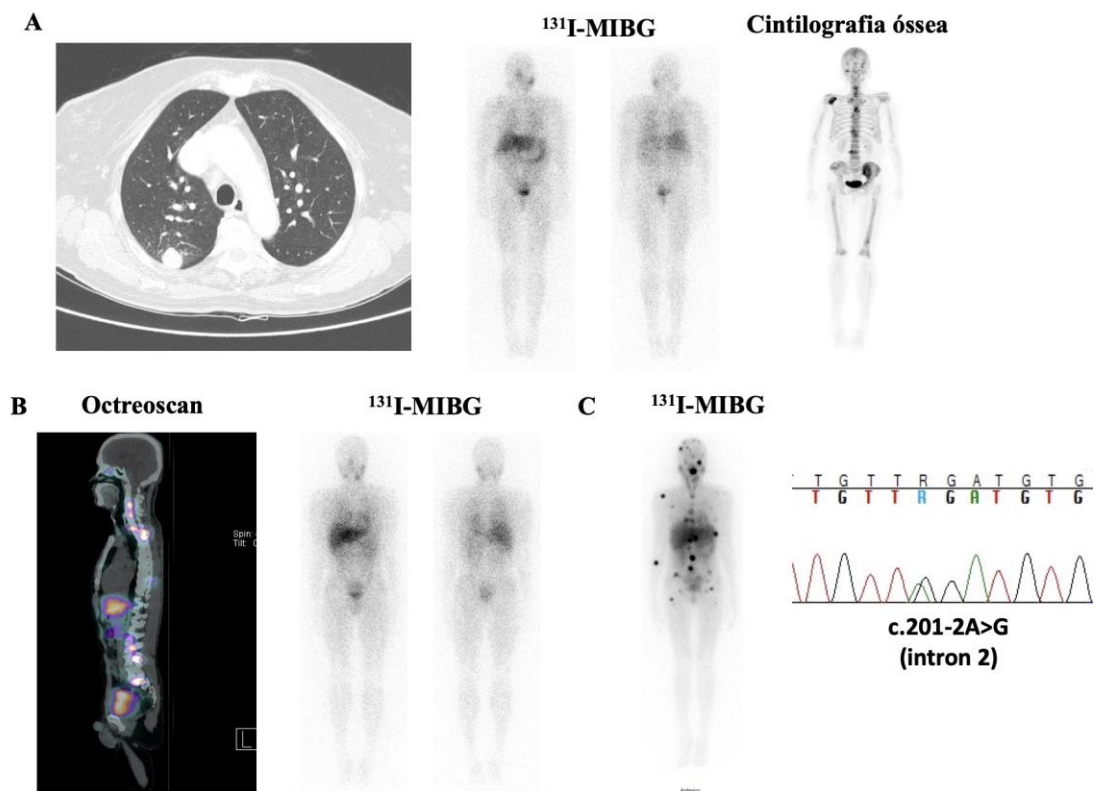
Caso	Idade	Sexo	FEO/ PGL	Tumor (cm)	PASS	Ki67	Metástase Diagnóstico	Sítios de Metástase	Captação <sup>131</sup> I-MIBG
23	11	F	FEO	16			N	Osso, Linfonodo, Fígado	S
25	15	M	FEO	3	8	<1%	N	Linfonodo	S
26	18	F	PGL	4,6			N	Osso, Linfonodo, Pulmão, Fígado Invasão Local	S
41	58	F	PGL	6,5	9		S	Linfonodos	
43	52	F	PGL/FEO	4,8/4,4	4	1-2%	S	Linfonodo	
44	58	F	FEO	2,5	6	<1%	N	Osso, Linfonodo	N
45	41	F	PGL	3,4	2	10-20%	N	Linfonodo, Fígado	N
46	34	M	FEO	9			N	Osso, Linfonodo	S
47	55	M	PGL	2,5	3	<1%	N	Linfonodo, Pulmão	S
48	31	F	FEO	4			N	Osso	S
49	35	M	FEO	9			S	Linfonodo, Pulmão	S
50	28	M	FEO	12	3		S	Osso, Linfonodo, Fígado	S
51	25	F	FEO	4,4			N	Linfonodo	
52	41	F	FEO	ND			N	Osso	S
53	20	F	FEO	5,4	10		N	Osso	S
54	35	F	FEO	3,5	10	<1%	S	Osso, Linfonodo	S
55	43	F	FEO	14	12	10%	S	Osso, Fígado	S
56	25	M	PGL	4,3	9	<1%	N	Osso	S
57	44	F	FEO	ND			N	Osso, Fígado	S
58	47	F	FEO	9	3	5%	N	Linfonodos Invasão local	N
59	23	M	FEO	11	4		N	Linfonodos, Invasão Local	S

S: sim; N: não; M: masculino; F: feminino; FEO: feocromocitoma; PGL: paraganglioma; ND: não disponível; PASS: *Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score*; MIBG: metaiodobenzilguanidina; SPLE: sequenciamento paralelo em larga escala.

### 4.3.3 Correlação do diagnóstico genético com a captação das lesões metastáticas na cintilografia com <sup>131</sup>I-MIBG

A avidéz de captação das lesões metastáticas por <sup>131</sup>I-MIBG foi correlacionada com o genótipo dos pacientes com PPGLs metastáticos, já que isso tem implicações na seleção de pacientes para o tratamento sistêmico com <sup>131</sup>I-MIBG. Nove (24,3%) de 37 pacientes possuíam lesões metastáticas sem captação na cintilografia com <sup>131</sup>I-MIBG. Dentre esses 9 pacientes com captação negativa no <sup>131</sup>I-

MIBG, 5 (56%) são portadores de grandes deleções no *SDHB*, 4 com deleção do exon 1 e um com deleção completa ( $X_2 = 6,39$ ,  $p = 0.012$ ) (Figura 9). Em contraste, todos os pacientes com VPs no *SDHB* apresentavam lesões metastáticas com alta avidéz na cintilografia com  $^{131}\text{I}$ -MIBG.



**Figura 9 -** A, Paciente (caso 32) com deleção do exon 1 no *SDHB* com metástase pulmonar na TC de tórax, metástases ósseas na cintilografia óssea e ausência de captação das lesões metastáticas na cintilografia com  $^{131}\text{I}$ -MIBG. B, Paciente (caso 33) com paraganglioma cervical metastático e deleção do exon 1 do *SDHB* com metástases ósseas e pulmonares evidenciadas no octreoscan, mas sem captação na cintilografia com  $^{131}\text{I}$ -MIBG. C, Paciente (caso 14) com paraganglioma metastático e VP germinativa (c.201-2A>G) no *SDHB* com lesões metastáticas com alta avidéz na cintilografia com  $^{131}\text{I}$ -MIBG

#### 4.3.4 Tratamento sistêmico dos PPGLs metastáticos

Terapia sistêmica com  $^{131}\text{I}$ -MIBG terapêutico foi realizada em 18 (48,6%) de 37 pacientes com PPGLs metastáticos. Doze pacientes receberam uma dose mediana de 304,4 mCi (200 a 328), quatro pacientes realizaram dois ciclos com dose mediana de 200 mCi (105 a 207) e dois pacientes fizeram três ciclos com dose mediana de 208,4 mCi (125 a 309). A resposta da terapia com  $^{131}\text{I}$ -MIBG foi avaliada pela resposta clínica (redução da dose do  $\alpha$ -bloqueador > 50%), resposta bioquímica (se redução das catecolaminas ou metanefrinas > 50%) e resposta estrutural pelos critérios de RECIST 1.1. Resposta clínica e bioquímica foram demonstradas em 3 (17%) e 4 (22%) dos pacientes, respectivamente. Resposta estrutural só pôde ser avaliada em 13 pacientes: 2 (11%) tiveram resposta parcial e 11 (61%) pacientes evoluíram com doença estável. Infelizmente, a natureza retrospectiva desse estudo impossibilitou a avaliação da resposta ao tratamento com  $^{131}\text{I}$ -MIBG em todos os casos em decorrência da falta de padronização do seguimento desses pacientes. Além da terapia com  $^{131}\text{I}$ -MIBG, terapia citotóxica com ciclofosfamida, vincristina e dacarbazina (CVD) foi realizada em oito pacientes.

#### 4.4 Comparação entre PPGLs com e sem diagnóstico genético definido

Pacientes (casos índices) com PPGLs com diagnóstico genético foram diagnosticados em idades mais jovens que pacientes sem diagnóstico genético definido [33 anos (8-70) vs. 46 anos (5-79);  $p = 0,0001$ ] (Tabela 18). Adicionalmente, o diagnóstico dos pacientes com diagnóstico genético definido ocorreu mais frequentemente em estadio I da doença, embora não tenha havido diferença em relação ao tamanho do tumor e frequência de doença metastática entre os pacientes com e sem diagnóstico genético definido.

**Tabela 18 - Comparação entre pacientes com feocromocitomas e paragangliomas com e sem diagnóstico genético definido**

	PPGLs com diagnóstico genético (n = 72)	PPGLs sem diagnóstico genético (n = 83)	<i>p</i>
Idade* (anos)	33 (8-70)	46 (5-79)	0,0001
Sexo Feminino n (%)	47 (65,2)	53 (63,8)	0,854
Feocromocitoma n (%)	47 (65,2)	64 (77,1)	0,1
Paraganglioma n (%)	29 (40,3)	23 (27,7)	0,098
Tamanho FEO* (cm)	3,9 (1-10)	5,8 (1-16)	0,14
Tamanho PGL (cm)	4,3 (1-15)	5,0 (3-11)	0,1
PASS FEO*	3,5 (0-17)	4,0 (0-12)	0,74
PASS PGL*	4 (0-10)	4,0 (0-10)	0,99
Estadiamento			
Estadio I n (%)	27 (37,5)	16 (19,3)	0,005
Estadio II n (%)	19 (26,4)	36 (43,4)	0,039
Doença metastática n (%)	16 (22,2)	21 (25,3)	0,65
Seguimento* (meses)	95 (2-532)	66 (1-372)	0,08

PPGLs: feocromocitomas e paragangliomas; FEO: feocromocitoma; PGL: paraganglioma; PASS: *Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score*.

\*Mediana (variação).

#### 4.5 Comparação entre PPGLs metastáticos e não metastáticos

Para compararmos as características clínicas e genéticas entre PPGLs metastáticos e não metastáticos, foram incluídos todos os pacientes com PPGLs metastáticos ( $n = 37$ ) e os pacientes com PPGLs não metastáticos e no mínimo 12 meses de seguimento após cirurgia (Tabela 19). Pacientes com PPGLs metastáticos tiveram uma tendência do diagnóstico inicial ocorrer em idades mais jovens em relação aos não metastáticos [34 anos (11-70) vs. 41 anos (8-79),  $p = 0,07$ ]. Paragangliomas foram mais frequentes nos pacientes com doença metastática do que nos casos sem doença metastática (51,4% vs. 27%;  $X_2 = 6,9$ ,  $p = 0,008$ ). Adicionalmente, o escore de PASS foi significativamente maior nos feocromocitomas metastáticos quando comparado aos feocromocitomas não metastáticos [7,0 (3-17) vs. 3,0 (0-12),  $p = 0,003$ ]. Nos paragangliomas, o escore de PASS não foi diferente entre os tumores metastáticos e não metastáticos. O tamanho tumoral (feocromocitoma ou paraganglioma) não foi diferente entre os dois grupos. A frequência de diagnóstico genético positivo não foi diferente entre os dois grupos, mas alterações genéticas no *SDHB* foram mais frequentes nos PPGLs metastático (29,7% vs. 9%,  $p = 0,002$ ).

**Tabela 19 - Comparação entre pacientes com feocromocitomas e paragangliomas metastáticos e não metastáticos (com mais de 12 meses de seguimento)**

	PPGLs não metastáticos (n = 100)	PPGLs metastáticos (n = 37)	<i>p</i>
Idade* (anos)	41 (8-79)	34 (11-70)	0,07
Sexo feminino n (%)	66 (66)	22 (59,4)	0,48
Paraganglioma n (%)	27 (27)	19 (51,4)	0,008
Tamanho FEO* (cm)	5,0 (1,0-12)	5,4 (3-16)	0,187
Tamanho PGL* (cm)	4,3 (1,0-11)	6,1 (3-15)	0,2
PASS FEO*	3,0 (0-12)	7,0 (3,0-17)	0,003
PASS PGL*	4,0 (0-10)	5,0 (2,0-10)	0,59
Diagnóstico genético n (%)	50 (50)	16 (43,2)	0,48
<i>SDHB</i> mutado n (%)	9 (9)	11 (29,7)	0,002
Seguimento* (meses)	86,5 (14-532)	88 (2-372)	0,89

PPGLs: feocromocitomas e paragangliomas; PASS: *Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score*.

\*Mediana (variação).

**Tabela 20 - Análise multivariada por regressão logística dos preditores de doença metastática em pacientes com feocromocitomas e paragangliomas**

	Intervalo de confiança 95%	Risco relativo	<i>p</i>
Idade $\geq$ 35 anos	0,37-3,56	1,14	0,82
PASS $\geq$ 4	1,047-9,69	3,19	0,04
Tamanho $\geq$ 5 cm	0,29-2,77	0,89	0,84
<i>SDHB</i> mutado	1,49-42,38	7,94	0,015

PASS: *Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score*

Na análise multivariada por regressão logística, somente a presença de alteração genética no *SDHB* e escore de PASS  $\geq$  4 foram fatores preditores independentes de doença metastática em pacientes com PPGLs ( $p = 0,015$  e  $0,04$ , respectivamente). Embora um escore de PASS  $\geq$  4 esteja associado a um maior risco de doença metastática, um escore de PASS  $\geq$  4 possui uma sensibilidade de 76% e uma baixa especificidade de 48,5% para PPGLs metastáticos. Quando analisados somente os feocromocitomas, a sensibilidade aumenta para 83%, mas a especificidade continua baixa (47,2%).



## **5 DISCUSSÃO**

No presente estudo, foi realizada a investigação genética de uma grande coorte de pacientes com PPGLs. O diagnóstico genético foi definido em 46,5% dos pacientes com PPGLs, com *SDHB* e *RET* sendo os genes mais frequentemente afetados. Esse achado está de acordo com dados de estudos multicêntricos que demonstraram a presença de defeitos germinativos em aproximadamente 40-50% dos PPGLs<sup>8,57</sup>. O diagnóstico genético tem um impacto positivo na evolução clínica dos pacientes com VPs nos genes *SDHx* e *VHL*<sup>72,80</sup>. Nesta coorte, pacientes com PPGLs e investigação genética positiva foram diagnosticados em idades mais jovens e em estadios mais precoces.

Os genes mais frequentemente afetados são *SDHB*, *SDHD*, *VHL* e *RET*, mas o percentual de acometimento desses genes é bastante variável<sup>8,57</sup>. Na presente coorte, 50 pacientes sem diagnóstico genético após investigação por SANGER e MLPA não realizaram painel. No entanto, VPs ou deleções germinativas nos genes *VHL*, *RET*, *SDHB*, *SDHD*, *SDHC*, *TMEM* e *MAX* (todos investigados por SANGER e/ou MLPA nesse estudo) correspondem a mais de 90% das alterações genéticas dentre os pacientes com PPGLs<sup>81</sup>. Dessa forma, pode-se estimar que menos de cinco pacientes dentre os 50 que não realizaram painel genético têm VP em algum gene de susceptibilidade para PPGLs.

De forma interessante, a deleção do exon 1 foi a alteração genética mais frequente (36,4%) no *SDHB* nesta casuística. Grandes deleções do *SDHB* são raras em pacientes com PPGLs<sup>33,57</sup>. Até o momento, 20 probandos de origem portuguesa e hispânica com PPGL e deleção do exon 1 foram reportados<sup>33,82-86</sup>. De forma interessante, quase todos os pacientes com PPGL e deleção do exon 1 do *SDHB* são provenientes da Península Ibérica<sup>82-85</sup>. Cascón *et al.*<sup>85</sup> demonstraram que a alta frequência dessa deleção do *SDHB* estava provavelmente relacionada a presença de um efeito fundador.

Todos os pacientes com deleção do exon 1 do *SDHB* provenientes da Península Ibérica compartilharam o mesmo ponto de quebra da deleção, o que fortalece a hipótese do efeito fundador. Em contraste, um paciente da França (único caso com deleção do exon 1 descrito fora da Península Ibérica) possuía pontos de quebra da deleção diferentes<sup>85</sup>. Posteriormente, a deleção do exon 1 do *SDHB* foi identificada e 11 de 37 pacientes Portugueses com PPGLs<sup>86</sup>. O fato da deleção do exon 1 do *SDHB* representar o defeito genético mais frequente na presente coorte PPGLs fortalece a hipótese de um efeito fundador para essa deleção e está sendo atualmente investigado nestes pacientes. O espectro das alterações genéticas do *SDHB* em pacientes brasileiros com PPGL está provavelmente relacionada ao histórico de colonização portuguesa.

Nesse estudo, 72% das crianças com PPGLs tiveram investigação genética positiva<sup>87</sup>. Esse achado é similar a frequência de 69%-80% de VPs germinativas em outras coortes de PPGLs pediátricos<sup>88,89</sup>. Adicionalmente, VHL foi o diagnóstico genético mais frequente nas crianças com PPGLs e foi associado mais comumente com feocromocitoma bilateral assincrônico. VPs no *SDHB* e *SDHD* foram identificados somente em crianças com paraganglioma abdominal ou cervical.

A quase totalidade dos genes acometidos nos PPGLs pediátricos pertencem ao *cluster 1*, como previamente demonstrado<sup>57</sup>. Variantes patogênicas no *cluster 2*, que inclui os genes *RET*, *TMEM127*, *NF1* e *MAX*, são mais frequentes em adultos com PPGLs do que em crianças<sup>57</sup>. Os feocromocitomas associados ao *cluster 2* produzem preferencialmente epinefrina e seu metabólito metanefrina. Já os PPGLs associados ao acometimento dos genes do *cluster 1* possuem um perfil de produção hormonal predominantemente noradrenérgico<sup>19</sup>. O *cluster 1A* está associado a um fenótipo mais agressivo com um maior risco de metástase, diagnóstico em idades mais jovens e uma frequência de paragangliomas quando comparado ao *cluster 1B*, representado principalmente pelo gene *VHL*<sup>24</sup>.

A genética dos PPGLs pediátricos foi investigada previamente em poucos estudos<sup>57,90,91</sup>. Em concordância com os presentes achados, um estudo prévio com PPGLs pediátricos da Argentina identificou o *VHL* como o gene mais frequentemente afetado em crianças com PPGLs<sup>90</sup>. Em virtude da predominância de *VHL* nesta coorte e na coorte argentina, a frequência de PPGLs metastáticos não foi elevada, variando de 10%-20%<sup>87,90</sup>. Em contraste com esses dados, um estudo multicêntrico dos EUA e Europa demonstrou que 49,5% das crianças com PPGLs apresentavam doença metastática, o que pode ser explicado pela alta prevalência de VPs no *SDHB* nesse estudo<sup>57</sup>.

A frequência de feocromocitoma bilateral foi mais elevada na presente coorte (67%) quando comparada com dados previamente publicados de PPGLs pediátricos (11,7%-34%)<sup>57,90</sup>. Dentre os pacientes com *VHL*, feocromocitomas bilaterais sincrônicos foram identificados em 36% dos casos. Em pacientes com *VHL*, apresentação sincrônica dos feocromocitomas bilaterais ocorreram em 40% e 60%

dos casos em duas famílias com as VPs p.Tyr112His e p.Tyr98His no *VHL*, respectivamente<sup>92</sup>. Nesta coorte, nenhuma correlação genótipo-fenótipo foi identificada nas crianças com feocromocitoma e *VHL*. Um estudo multicêntrico com 625 pacientes com feocromocitoma hereditário (não somente *VHL*) mostrou que 64% dos pacientes apresentaram feocromocitoma bilateral sincrônico<sup>93</sup>.

*VHL* tipo 2 foi diagnosticado em todas as crianças com *VHL* e feocromocitoma, que é caracterizado pela presença de VPs germinativas *missense* no *VHL* e um risco aumentado de feocromocitoma<sup>50</sup>. Segundo as recomendações para o seguimento dos pacientes com *VHL*, o rastreamento bioquímico para feocromocitoma deve ser iniciado somente após 5 anos<sup>50</sup>. Na presente coorte, o paciente mais jovem com feocromocitoma e *VHL* foi diagnosticado aos 4 anos com um tumor de 4 cm e crises adrenérgicas. Apesar da raridade, recomenda-se que o rastreamento para feocromocitoma com metanefrinas plasmáticas em portadores de VPs *missense* no *VHL* deve ser iniciado logo após o diagnóstico genético (mesmo que esse ocorra antes dos 5 anos)<sup>52</sup>.

A penetrância das VPs germinativas do *SDHB* varia de 15% a 22% até os 50 anos, mas pode atingir 40%-50% em idades mais elevadas<sup>24,94,95</sup>. Em uma grande família com deleção do exon 1 do *SDHB*, a penetrância desse defeito genético foi estimada em 35% até os 40 anos e o risco de malignidade foi comparável a outras VPs no *SDHB*<sup>84</sup>. O *SDHD* apresenta uma maior penetrância de aproximadamente 40%, mas a forma de herança ligada ao *imprinting* materno limita a sua penetrância<sup>94</sup>.

Wong *et al.*<sup>96</sup> recomendaram que o rastreamento e seguimento dos portadores assintomáticos de VPs nos genes *SDHx* deve ser individualizado pelo gene acometido. Dessa forma, o rastreamento bioquímico e clínico deve começar aos 5 anos para indivíduos com alterações genéticas no *SDHB* e aos 10 anos para os portadores de defeitos genéticos nos genes *SDHD*, *SDHC* e *SDHA*. Em relação ao rastreamento com imagem, RM de abdômen e cervical deve ser solicitada desde os 10 anos para os portadores de alterações no *SDHB* e aos 15 anos para aqueles com acometimento dos genes *SDHD*, *SDHC* e *SDHA*. O intervalo para repetir a imagem é de 2-3 anos para todos os genes, caso o rastreamento bioquímico anual com metanefrinas plasmáticas ou urinárias se mantenha negativo<sup>96</sup>. Contudo, não há ainda consenso sobre a idade para iniciar o rastreamento com imagem em portadores assintomáticos com alterações no *SDHB*. Um estudo recente recomendou que tanto o rastreamento bioquímico como o seguimento com imagem devem começar aos 5 anos, com a possibilidade de realizar ultrassom em crianças que não toleram a RM<sup>97</sup>.

A prevalência de doença metastática foi semelhante a dados previamente publicados, sendo significativamente mais frequente em pacientes com paraganglioma<sup>7</sup>. O gene mais frequentemente acometido nesta coorte de pacientes com PPGLs metastáticos foi o *SDHB*, conforme previamente estabelecido. No entanto, a frequência de pacientes com VPs ou deleções no *SDHB* no presente estudo (30%) foi menor quando comparada a uma prevalência média de 40-50% em estudos prévios<sup>7,33,60,63</sup>. A menor prevalência de alterações genéticas no *SDHB* nesta coorte se correlaciona com uma alta frequência (57%) de PPGLs metastáticos sem diagnóstico genético definido após investigação por meio de um painel de genes alvo por SPLE.

A maioria dos pacientes nesta coorte apresentou metástases assincrônicas com um tempo médio de 54 meses para o diagnóstico. Os sítios mais frequentes de metástases foram ossos e linfonodos<sup>98</sup>. Os presentes dados estão em concordância com séries previamente publicadas que mostraram que 65% dos pacientes desenvolvem metástases após um tempo de seguimento médio de 5,5 anos. Os principais sítios de metástases são ossos (59%) e linfonodos (47%)<sup>7,11</sup>. Os PPGLs metastáticos são em geral indolentes com uma sobrevida média global superior a 5 anos<sup>7</sup>.

Os PPGLs somente são classificados em metastáticos após o diagnóstico de lesões secundárias em tecidos não cromafins. Dessa forma, a identificação de fatores preditores de doença metastática tem grande importância para identificar pacientes de alto risco. VPs germinativas no *SDHB* são o fator de risco mais bem estabelecido para o desenvolvimento de doença metastática (40-50% dos casos)<sup>7,33,60,63</sup>. Um escore de PASS  $\geq 4$  é útil para excluir o risco de malignidade, mas possui uma baixa especificidade de 68%<sup>26</sup>. Adicionalmente, paraganglioma de qualquer tamanho e feocromocitomas  $> 5$  cm constituem preditores de PPGLs metastáticos<sup>5</sup>. Na presente coorte, o diagnóstico de paraganglioma, escore de PASS  $\geq 4$  e presença de alterações genéticas no *SDHB* foram associados com PPGLs metastáticos, mas somente escore de PASS  $\geq 4$  e *status* do *SDHB* foram preditores independentes de doença metastática. Apesar disso, um escore de PASS  $\geq 4$  isoladamente teve uma baixa especificidade para o diagnóstico de doença metastática.

Neste estudo, a presença de grandes deleções do *SDHB* (principalmente deleção do exon 1) foi associado a ausência de captação das lesões metastáticas na cintilografia com <sup>131</sup>I-MIBG<sup>98</sup>. A associação da presença da deleção do exon 1 do *SDHB* e a ausência de captação das lesões metastáticas na cintilografia com <sup>131</sup>I-

MIBG em pacientes com PPGLs metastáticos não havia sido previamente reportada. Ausência de captação no  $^{123}\text{I}$ -MIBG foi previamente associado com PPGLs metastáticos e hipersecreção de normetanefrina ou norepinefrina<sup>99</sup>. Na presente coorte, a maioria dos pacientes com PPGL metastáticos têm um perfil de secreção noradrenérgico.

Esse achado tem relevante implicações na prática clínica, já que pacientes com deleções do *SDHB* e doença metastática sem avidéz no MIBG não são candidatos a terapia sistêmica com  $^{131}\text{I}$ -MIBG e devem ser tratados com outras modalidades de terapias com radionuclídeos, quimioterapia citotóxica ou inibidores de tirosina quinase. Corroborando essa hipótese, pacientes com VPs no *SDHB* se beneficiam mais da terapia com ciclofosfamida, vincristina e dacarbazina quando comparados a pacientes com PPGLs metastáticos sem acometimento do *SDHB*<sup>100</sup>.

A maioria dos pacientes com PPGLs metastáticos da presente coorte permaneceu sem diagnóstico genético mesmo após a investigação com SANGER, MLPA e painel genético por SPLE. Em estudos posteriores, a etiologia genética desses casos será investigada pelo sequenciamento completo do exoma (pareado DNA germinativo e tumoral, quando disponível). Embora nenhum dos pacientes com investigação negativa possua história familiar de PPGLs e sejam “aparentemente esporádicos”, isso não exclui a possibilidade de um defeito germinativo em novos genes de susceptibilidade, já que a penetrância dos defeitos genéticos associados a PPGLs é bastante variável<sup>24</sup>. A análise do espectro de alterações somáticas é também importante para identificar novos genes “*drivers*” com importância prognóstica e terapêutica<sup>101</sup>.



## **6 CONCLUSÕES**

- O diagnóstico genético foi definido em 47% dos pacientes com PPGLs, com *SDHB* e *RET* sendo os genes mais frequentemente afetados.
- A deleção completa do exon 1 foi a alteração genética mais frequente do *SDHB*, sendo identificada em 36% dos casos.
- O diagnóstico genético foi definido em 72% dos PPGLs pediátricos, com o *VHL* sendo o gene mais comumente mutado.
- A frequência de doença metastática nesta coorte foi 24%. A frequência de diagnóstico genético foi 43%, com *SDHB* sendo o gene mais afetado.
- Pacientes com PPGLs e investigação genética positiva foram diagnosticados em idades mais jovens e em estádios mais precoces.
- A deleção completa do exon 1 do *SDHB* foi associada a ausência de captação das lesões metastáticas na cintilografia com <sup>131</sup>I-MIBG.
- A presença de alterações genéticas do *SDHB* e um escore de PASS  $\geq 4$  foram preditores independentes de doença metastática.



**Anexo A - Escore de PASS para classificação anatomopatológica dos feocromocitomas e paragangliomas**

<b>Parâmetros</b>	<b>Escore</b>
Hipercromasia nuclear	1
Pleomorfismo nuclear profundo	1
Invasão Capsular	1
Invasão Vascular	1
Extensão para tecido adiposo	2
Crescimento difuso ou nichos volumosos	2
Necrose focal ou difusa	2
Alta celularidade	2
Tumor de células espiculadas	2
Monotonia celular	2
Índice mitótico (> 3/10)	2
Mitoses atípicas	2
<b>Total</b>	<b>20</b>

**Anexo B - Estadiamento TNM para os feocromocitomas e paragangliomas**

<b>Tumor primário</b>			
TX	O tumor primário não pode ser avaliado		
T1	Tumor < 5 cm na maior dimensão, sem invasão extra-adrenal		
T2	Tumor ≥ 5 cm ou paraganglioma simpático de qualquer tamanho, sem invasão extra-adrenal		
T3	Tumor de qualquer tamanho com invasão nos tecidos adjacentes (fígado, pâncreas, baço e rins)		
<b>Linfonodos regionais</b>			
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados		
NO	Sem metástase linfonodal		
N1	Metástase de linfonodos regionais		
<b>Metástase a distância</b>			
MO	Sem metástase a distância		
M1	Metástase a distância		
	M1a: metástase a distância apenas para osso		
	M1b: metástase a distância apenas para linfonodos distantes/fígado ou pulmão		
	M1c: metástase a distância para o osso e vários outros locais		
<b>Estadiamento</b>			
I	T1	N0	MO
II	T2	N0	M0
III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	Qualquer N	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

**Anexo C - Genes avaliados por painel pelo método de sequenciamento paralelo em larga escala<sup>62</sup>**

Gene	Painel	Áreas alvo do gene
<i>FH</i>	Básico	Codificação todo exon – intron limites
<i>MAX</i>	Básico	Codificação todo exon – intron limites
<i>NF1</i>	Básico	Codificação todo exon – intron limites
<i>RET</i>	Básico	Exons 8,10,11,13-16
<i>SDHA</i>	Básico	Codificação todo exon – intron limites
<i>SDHB</i>	Básico	Codificação todo exon – intron limites
<i>SDHC</i>	Básico	Codificação todo exon – intron limites
<i>SDHD</i>	Básico	Codificação todo exon – intron limites
<i>TMEM127</i>	Básico	Codificação todo exon – intron limites
<i>VHL</i>	Básico	Codificação todo exon – intron limites
<i>EGLN1/PHD2</i>	Expandido	Codificação todo exon – intron limites
<i>EPAS1</i>	Expandido	Exons 9,12
<i>KIF1B</i>	Expandido	Codificação todo exon – intron limites
<i>MET</i>	Expandido	Codificação todo exon – intron limites
<i>SDHAF2</i>	Expandido	Codificação todo exon – intron limites
<i>ATRX</i>	Abrangente	Codificação todo exon – intron limites
<i>BRAF</i>	Abrangente	Codificação todo exon – intron limites
<i>CDKN2A</i>	Abrangente	Codificação todo exon – intron limites
<i>EGLN2/PHD1</i>	Abrangente	Codificação todo exon – intron limites
<i>FGFR1</i>	Abrangente	Exons 11,13
<i>H3F3A</i>	Abrangente	Codificação todo exon – intron limites
<i>HRAS</i>	Abrangente	Codificação todo exon – intron limites
<i>IDH2</i>	Abrangente	Codificação todo exon – intron limites
<i>KMT2D</i>	Abrangente	Codificação todo exon – intron limites
<i>MDH2</i>	Abrangente	Codificação todo exon – intron limites
<i>MERTK</i>	Abrangente	Codificação todo exon – intron limites
<i>TP53</i>	Abrangente	Codificação todo exon – intron limites

## Anexo D - Parecer Consubstanciado do CEP do Hospital das Clínicas da FMUSP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Investigação Genética de Feocromocitomas e Paragangliomas por Sequenciamento Paralelo em Larga Escala

**Pesquisador:** Madson Almeida

**Área Temática:** Genética Humana:  
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 1

**CAAE:** 06194919.1.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.158.427

#### Apresentação do Projeto:

O projeto apresentado pretende realizar um estudo genético através de um painel contendo 27 genes em 32 pacientes com paraganglioma e/ou feocromocitoma (PPGLs) e idade ao diagnóstico menor 40 anos e/ou doença multifocal, e em 16 pacientes com PPGLs malignos. Após essa etapa, a análise do exoma será realizada em 12 pacientes (pareado DNA germinativo e tumor) a serem selecionados após o resultado do rastreamento do painel.

#### Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desse projeto é expandir a investigação genética dos pacientes com feocromocitomas e paragangliomas (PPGLs). Para tanto estudaremos os subgrupos de maior risco para presença de variantes patogênicas: Pacientes com PPGLs diagnosticados antes dos 40 anos e/ou doença multifocal, e pacientes com PPGLs malignos. Os pacientes serão rastreados inicialmente através de um painel de genes de susceptibilidade (que incluirá os genes dos 3 painéis citados acima).

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há benefícios diretos e os riscos serão mínimos da coleta normal de sangue periférico.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante cientificamente, e o pesquisador informa que está solicitando recursos para a FAPESP.

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SÃO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 3.158.427

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequados, o TCLE pergunta se o paciente autoriza pesquisas futuras.

**Recomendações:**

Não há recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1246207.pdf	22/01/2019 16:48:28		Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	22/01/2019 16:47:11	Madson Almeida	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PPGLs.doc	22/01/2019 16:44:26	Madson Almeida	Aceito
Outros	Compromisso.pdf	07/01/2019 15:47:06	Madson Almeida	Aceito
Outros	Departamento.pdf	07/01/2019 15:45:26	Madson Almeida	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	REGULAMENTO_BIORREPOSITORIO.doc	07/01/2019 15:37:03	Madson Almeida	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	07/01/2019 15:15:37	Madson Almeida	Aceito
Projeto Detalhado	Projeto_PPGLs.pdf	01/11/2018	Madson Almeida	Aceito

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br





Continuação do Parecer: 3.158.427

/ Brochura Investigador	Projeto_PPGLs.pdf	10:17:06	Madson Almeida	Aceito
----------------------------	-------------------	----------	----------------	--------

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 21 de Fevereiro de 2019

---

**Assinado por:**  
**ALFREDO JOSE MANSUR**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

## Anexo E - Parecer Consubstanciado do CEP do Instituto do Câncer do Estado de SP (ICESP)



**INSTITUTO DO  
CÂNCER  
DO ESTADO DE  
SÃO PAULO**  
APARTAMENTO DE SAÚDE



**FUNDAÇÃO  
FACULDADE DE MEDICINA**

**PARECER DE AVALIAÇÃO**

**Registro: NP 1448/19**

Referente à solicitação de execução de estudo: **"Investigação Genética de Feocromocitomas e Paragangliomas por Sequenciamento paralelo em larga escala"**.

Pesquisador Responsável: **Dr. Madson Queiroz de Almeida**  
Pesquisador Executante: **Janaina Pefenuci**

**APRESENTAÇÃO DO PROJETO**

Trata-se de um estudo experimental/laboratorial, com a finalidade de obter título de Doutor, que visa expandir a investigação genética dos pacientes com Paragangliomas (PPGLs) a fim de ampliar a compreensão de sua patogênese. Os pacientes serão rastreados inicialmente através de três painéis de genes de susceptibilidade: painel diagnóstico básica, painel expandido e painel compreensivo. O projeto pretende incluir 32 pacientes com PPGLs e idade ao diagnóstico <40 anos e/ou doença multifocal, e 16 pacientes com PPGLs malignas. Adicionalmente, realizará uma investigação genética de 04 pacientes com Feocromocitoma e Adenoma Cortical Adrenal Contralateral.

**CONSIDERAÇÕES SOBRE A AVALIAÇÃO**

As avaliações hormonais e os estudos moleculares serão realizadas no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular - LIM 42, Divisão de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da FMUSP, conforme carta de anuência do Setor. Todos os custos de coleta e análise serão cobertos por fomento FAPESP.

**RESPONSABILIDADES DO PESQUISADOR**

Conforme a Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde e as diretrizes de Boas Práticas Clínicas, recomendamos:

- Antes do início das atividades do projeto, submeter para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FMUSP; Compartilhar o parecer do CEP – FMUSP com o Núcleo de Pesquisa – ICESP;
- Antes do início das atividades do projeto, enviar ao Núcleo de Pesquisa – ICESP a carta de aprovação de financiamento do estudo;
- Comunicar o Núcleo de Pesquisa – ICESP e CEP – FMUSP diante de quaisquer alterações no projeto;
- Semestralmente, submeter para apreciação do CEP – FMUSP um relatório de acompanhamento do estudo; Compartilhar o relatório e o parecer do CEP – FMUSP com o Núcleo de Pesquisa – ICESP;
- Ao final do estudo, enviar o relatório final, assim como resultados que se tornarem públicos (artigos, defesa de tese, apresentação em congressos, entre outros) para o CEP – FMUSP; Compartilhar o relatório final, os resultados e o parecer do CEP – FMUSP com o Núcleo de Pesquisa – ICESP;

**Informamos que sua solicitação foi DEFERIDA**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Vanderson Rocha  
Professor Titular  
Diretor do Serviço de Hematologia e Hematopatologia  
Divisão de Clínica Médica e Hematologia



**Comissão Científica de Ensino e Pesquisa  
CCEP**

São Paulo, 12 de 03 de 2019



**HC**  
HOSPITAL DAS CLÍNICAS



**FUNDAÇÃO  
FACULDADE DE MEDICINA**



**MEDICINA**  
FMUSP



**GOVERNO DO ESTADO  
SÃO PAULO**  
Secretaria de Saúde

Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP - 01246-000 - Tel.: 11 3893.2000 - www.icesp.org.br

**Anexo F - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido****HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:.....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M  F   
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....  
BAIRRO:.....CIDADE.....  
CEP:.....TELEFONE:DDD(.....).....
2. RESPONSÁVEL LEGAL.....  
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M  F   
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....  
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....  
BAIRRO:.....CIDADE:.....  
CEP:.....TELEFONE:DDD(.....).....

**DADOS SOBRE A PESQUISA**

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **Investigação Genética de Feocromocitomas e Paragangliomas por Sequenciamento Paralelo em Larga Escala**  
PESQUISADOR: **Dr. Madson Queiroz de Almeida**  
CARGO/FUNÇÃO: **Médico INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 102257**  
UNIDADE DO HCFMUSP: **Unidade de Suprarrenal - Laboratório de Hormônios LIM-42**
2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:  
RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO   
RISCO BAIXO  RISCO MAIOR
3. DURAÇÃO DA PESQUISA : **48 meses**

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

**1 - Justificativa e os objetivos da pesquisa:** O Sr. (a) é portador de um tumor na glândula suprarrenal (uma pequena glândula localizada acima do rim). O Sr. (a) está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é pesquisar genes (que são estruturas presentes em todas as células do corpo e que dão as características às pessoas) que estão envolvidos no desenvolvimento desses tumores (chamados feocromocitomas e paragangliomas). Gostaríamos de consultar se o Sr. (a) concordariam em participar do estudo através da doação de amostras do tumor, que serão obtidas durante ato cirúrgico. A participação neste estudo é voluntária (não obrigatória) e o seu tratamento será realizado mesmo que o Sr. (a) decida não participar da pesquisa.

**2 - Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:** Para que seja feita a avaliação do gene, será necessário a coleta do material (tecido tumoral) obtido durante o ato cirúrgico para ressecção tumoral (retirada do tumor) e também a coleta de 5 ml de sangue (correspondente a 1 colher de sopa), através de uma picada com agulha estéril, descartável. Os desconfortos relacionados a coleta de sangue são principalmente dor e possível formação de hematoma. Será isolado DNA (material genético) do sangue e do fragmento tumoral para realizar o mapeamento de alterações em genes que possam estar relacionadas com a formação dos tumores da glândula suprarrenal. As amostras de DNA e os fragmentos tumorais serão devidamente armazenados no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM42, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

**3 - Desconfortos e riscos esperados:** Conforme explicado acima, a coleta de pequenos fragmentos do tumor será realizada após a retirada do tumor durante a cirurgia e não trará desconforto ou riscos ao Sr. (a).

**4 - Benefícios que poderão ser obtidos:** Não há benefícios diretos ou imediatos para participação na pesquisa. Esta pesquisa poderá identificar alterações de genes que possam ser responsáveis pela doença em questão. Este fato poderá ajudar no acompanhamento e no tratamento futuro da doença.

**5 - Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:** A descoberta de defeitos de genes envolvidos no desenvolvimento de tumores da glândula supra-renal poderá permitir o diagnóstico precoce de outros casos que possam existir na família.

**6 - Garantia de acesso:** em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o **Dr. Madson Queiroz de Almeida**, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 2 andar, Bloco 6, São Paulo, SP, 05403-900, Telefone (s) (0xx11-2661-7512). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnnet.usp.br

**8 -** É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

**09 -** Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

**10 -** Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

**11 -** Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

**12 -** O material coletado neste projeto será armazenado no laboratório e não será descartado após o fim desta pesquisa. O tempo de armazenamento do material será autorizado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq). Futuras pesquisas serão realizadas com o objetivo de compreender melhor a formação dos tumores adrenais e tentar descobrir novas formas de tratamento:

*Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas?*

*(.....) SIM. Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.*

*(.....) NÃO. Eu dispenso a autorização para cada pesquisa e estou informado(a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.*

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**Investigação Genética de Feocromocitomas e Paragangliomas por Sequenciamento Paralelo em Larga Escala**”.

Eu discuti com o **Dr. Madson Queiroz de Almeida** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal                      1)              Data    \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

-----

Assinatura da testemunha    2)              Data    \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

*(Somente para o responsável do projeto)*

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.



Assinatura do responsável pelo estudo                      3)              Data: 23/10/2018

### **Anexo G - Protocolo de extração de DNA genômico de leucócitos de sangue periférico**

Quinze mL de sangue venoso são colhidos de veia periférica e colocados em ácido etileno diaminotetracético (EDTA 25 mM) e submetidos ao método de extração com NaCl saturado. Esta técnica possui duas etapas: na primeira é feita a lise de hemácias (NH<sub>4</sub>Cl 114 mM; NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 1 mM) e na segunda etapa a lise de leucócitos (NaCl 150 mM; Tris- HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0) utilizando solução de dodecilsulfato de sódio (SDS 0,2%) e proteinase K (160 mg/mL). A precipitação do DNA é feita com etanol absoluto gelado seguida de lavagem com etanol 70%, finalizando com sua suspensão em tampão TE (10:0,1) (10 mM TrisHCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0).

A concentração do DNA extraído é obtida por leitura em nanofotometro (Implen:GmbH, Schatzbogen, Alemanha) no comprimento de onda de 260 nm (1 unidade DO 260= 50 µg/mL). A relação ideal entre as leituras em 260 e 280 nm para a caracterização da pureza do material é superior a 1,75.

As amostras de DNA são submetidas à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 1% em tampão TAE (Tris 0,004 M; Ácido Acético Glacial; EDTA 0,001M pH 8,0) contendo o corante SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) na concentração de 1x e observadas em um transiluminador com luz ultravioleta a fim de verificar sua integridade. Como padrões de massa são utilizados 500 ng do marcador de peso molecular λ HindIII (250 ng/µL) e 20 ng do λ DNA (10 ng/µL).

## Anexo H - Critérios de classificação de patogenicidade das ferramentas *in silico* utilizadas na VCF

Ferramenta	Classificação	Critérios patogênicos	Endereço eletrônico
Modelo de predição de patogenicidade			
SIFT	T: tolerado; D: deletério	D	<a href="https://sift.jcvi.org/www/SIFT_chr_coords_submit.html">https://sift.jcvi.org/www/SIFT_chr_coords_submit.html</a>
CADD	Numérico	$\geq 15$	<a href="http://cadd.gs.washington.edu/">http://cadd.gs.washington.edu/</a>
Mutation Acessor	L: efeito leve; M: moderado; H: alto	M e H	<a href="http://mutationassessor.org/">http://mutationassessor.org/</a>
Mutation Taster	N e P: não deletério/ polimorfismo; A e D: deletério	A e D	<a href="http://www.mutationtaster.org/">http://www.mutationtaster.org/</a>
PROVEAN	N: neutro; D: deletério	D	<a href="http://provean.jcvi.org/genome_submit_2.php">http://provean.jcvi.org/genome_submit_2.php</a>
Polyphen2	B: benigno; P: possivelmente patogênico; D: deletério.	P e D	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/</a>
FATHMM	T: tolerado; D: deletério	D	<a href="http://fathmm.biocompute.org.uk/">http://fathmm.biocompute.org.uk/</a>
MetaSVM	T: tolerado; D: deletério	D	<a href="https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP">https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP</a>
MetaLR	T: tolerado; D: deletério	D	<a href="https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP">https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP</a>
Modelo para grau de conservação do aminoácido envolvido			
GERP	Numérico	$\geq 2$	<a href="http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/gerp/">http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/gerp/</a>

**Anexo I - Dados clínicos e genéticos dos casos índices adultos com feocromocitomas e paragangliomas não metastáticos com diagnóstico genético definido**

Caso	Idade (ano)	Gênero	Produção hormonal	PGL (cm)	PGL localização	Metastático	FEO	PASS	Seguimento (meses)	Gene	Variante Patogênica	ACMG
60	21	F	ND	3,4	Abdominal	N	N		103	<i>SDHB</i>	del exon 1	P
61	45	F	Noradrenergica	1,5	Abdominal	N	N		64	<i>SDHB</i>	c.206G>A p.(Gly69Asp)	VUS
62	31	M	ND	7,9	Abdominal	N	N		201	<i>SDHB</i>	del exon 1	P
63	25	M	Noradrenergica	8,2	Abdominal	N	N	5	51	<i>SDHB</i>	c.688C>T p.(Arg230Cys)	P
64	34	M	NF	4,8	Cervical	N	N		16	<i>SDHB</i>	c.136C>T p.(Arg46*)	P
65	32	F	ND	4,9	Abdominal + torácico	N	N		119	<i>SDHB</i>	deleção exon 1	P
66	45	M	ND	2,9	Cervical	N	N		97	<i>SDHD</i>	c.341A>G p.(Tyr114Cys)	P
67	30	M	NF	6,7	Cervical	N	N		225	<i>SDHD</i>	c.242C>T p.(Pro81Leu)	P
68	24	F	Noradrenérgica			N	S (8cm)	5	27	<i>SDHA</i>	c.328G>C p.Ala110Pro	VUS
69	29	F	ND			N	S		240	<i>VHL</i>	c.500G>A p.(Arg167Gln)	P
70	54	F	ND			N	S		215	<i>MAX</i>	c.97C>T p.(Arg33*)	P
71	47	F	Mista			N	S (7,3cm)	12/6	10	<i>MAX</i>	c.97C>T p.(Arg33*)	P
72	48	F	Mista			N	S (10 cm)	4/2	33	<i>H3F3A</i> <sup>#</sup>	c.103G>T p.(Gly35Trp)	P
73	34	F	ND			N	S		336	<i>TMEM 127</i>	c.410-2 A>C	P

continua



continuação

Caso	Idade (ano)	Gênero	Produção hormonal	PGL (cm)	PGL localização	Metastático	FEO	PASS	Seguimento (meses)	Gene	Variante Patogênica	ACMG
74	39	F	Noradrenérgica			N	S (3,6cm)	6/4	36	<i>NFI*</i>		
75	44	F	ND			N	S (2cm)	4	109	<i>RET</i>	c.1858T>C p.(Cys620Arg)	P
76	45	M	Adrenérgica			N	S (2cm)	0	59	<i>RET</i>	c.1901G>A p.(Cys634Tyr)	P
77	44	F	ND			N	S(0,5cm)		94	<i>RET</i>	c.1901G>A p.(Cys634Tyr)	P
78	44	F	Mista			N	S (2,5cm)	3	26	<i>RET</i>	c.1901G>A p.(Cys634Tyr)	P
79	46	F	Dopaminérgica			N	S(0,9cm)	2	84	<i>RET</i>	c.1901G>A p.(Cys634Tyr)	P
80	52	F	ND			N	S(2cm)		3	<i>TMEM127</i>	c.117_120delGTCT p.(Ile41fs)	P
81	47	F	ND			N	S(9cm)			<i>RET</i>		
82	50	M	ND			N	S(3,1cm)		148	<i>RET</i>	c.1901G>A p.(Cys634Tyr)	P
83	61	F	ND			N	S(4cm)		292	<i>RET</i>	c.1833C>G p.(Cys611Trp)	LP
84	31	F	ND			N	S (0,8cm)		195	<i>RET</i>	c.1900T>C p.(Cys634Arg)	P
85	27	F	ND			N	S(7,5cm)	1	72	<i>VHL</i>	c.499C>T p.(Arg167Trp)	P
86	36	M	NF	2,3	Abdominal	N	N	1	3	<i>SDHB</i>	del exon 1	P
87	44	M	ND			N	S		255	<i>RET</i>	c.1900T>C p.(Cys634Arg)	P
88	34	F	NF			N	S (1,8cm)	0	118	<i>RET</i>	c.1900T>C p.(Cys634Arg)	P

continua

conclusão

Caso	Idade (ano)	Gênero	Produção hormonal	PGL (cm)	PGL localização	Metastático	FEO	PASS	Seguimento (meses)	Gene	Variante Patogênica	ACMG
90	25	F	ND			N	S(4cm)		158	<i>RET</i>	c.1900T>C p.(Cys634Arg)	P
91	35	F	ND			N	S		48	<i>RET</i>	c.1900T>C p.(Cys634Arg)	P
92	24	F	ND			N	S	0	144	<i>RET</i>	c.1900T>C (p.Cys634Arg)	P
93	36	F	ND			N	S	4/1	125	<i>VHL</i>	c.499C>T p.(Arg167Trp)	P
94	25	F	NF			N	S (2,5 cm)	6	131	<i>RET</i>	c.1901G>A p.(Cys634Tyr)	P
95	36	F	ND			N	S(3,5cm)	1	30	<i>NF1</i> *		
96	67	F	Mista			N	S(2,4cm)	2/5	62	<i>RET</i>	c.1901G>A p.(Cys634Tyr)	P
97	34	M	ND			N	S(5cm)		96	<i>RET</i>	c.1901G>A p.(Cys634Tyr)	P
98	56	F	ND			N	S (2,5cm)	0	153	<i>RET</i>	c.1901G>A p.(Cys634Tyr)	P
99	36	F	ND			N	S (2,5cm)		262	<i>RET</i>	c.1901G>A p.(Cys634Tyr)	P
100	22	F	ND			N	S (2cm)	2	96	<i>RET</i>	c.2753T>C p.(Met918Thr)	P
101	33	F	ND			N	S (3,8cm)		282	<i>VHL</i>	c.499C>T p.(Arg167Trp)	P
102	38	F	ND			N	S (4,5cm)	6	85	<i>VHL</i>	c.340G>A p.(Gly114Ser)	P

# Mosaicismo; F, Feminino; M, Masculino; ND, Não disponível; PGL, paraganglioma; S, sim; N, Não; FEO, Feocromocitoma; PGL, paraganglioma; PASS, *Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score*; ACMG, *American College of Medical Genetics*; P, patogênica; LP, provavelmente patogênica; VUS, variante de significado incerto. \*Diagnóstico Síndromico de Neurofibromatose tipo 1.

## **8 REFERÊNCIAS**

1. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE Jr, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, DePalma SM, Gidding S, Jamerson KA, Jones DW, MacLaughlin EJ, Muntner P, Ovbiagele B, Smith SC Jr, Spencer CC, Stafford RS, Taler SJ, Thomas RJ, Williams KA Sr, Williamson JD, Wright JT Jr. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on clinical practice guidelines. *Hypertension*. 2018 Jun;71(6):e13-e115.
2. Malachias M, Plavnik FL, Machado CA, Malta D, Scala LCN, Fuchs S. 7th Brazilian guideline of arterial hypertension: chapter 1 - concept, epidemiology and primary prevention. *Arq Bras Cardiol*. 2016;107(3 Suppl 3):1-6.
3. Almeida MQ, Silva GV, Drager LF. What is the most common cause of secondary hypertension?: An interdisciplinary discussion. *Curr Hypertens Rep*. 2020;22(12):101.
4. Lam AK. Update on adrenal tumours in 2017 World Health Organization (WHO) of endocrine tumours. *Endocr Pathol*. 2017;28(3):213-27.

5. Lenders JW, Duh QY, Eisenhofer G, Gimenez-Roqueplo AP, Grebe SK, Murad MH, Naruse M, Pacak K, Young WF Jr; Endocrine Society. Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(6):1915-42.
6. Roman-Gonzalez A, Jimenez C. Malignant pheochromocytoma-paraganglioma: pathogenesis, TNM staging, and current clinical trials. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2017;24(3):174-83.
7. Hescot S, Curras-Freixes M, Deutschbein T, van Berkel A, Vezzosi D, Amar L, de la Fouchardière C, Valdes N, Riccardi F, Do Cao C, Bertherat J, Goichot B, Beuschlein F, Drui D, Canu L, Niccoli P, Laboureau S, Tabarin A, Leboulleux S, Calsina B, Libé R, Faggiano A, Schlumberger M, Borson-Chazot F, Mannelli M, Gimenez-Roqueplo AP, Caron P, Timmers HJLM, Fassnacht M, Robledo M, Borget I, Baudin E; European Network for the Study of Adrenal Tumors (ENS@T). Prognosis of malignant pheochromocytoma and paraganglioma (MAPP-Prono Study): a european network for the study of adrenal tumors retrospective study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(6):2367-74.
8. Neumann HPH, Young WF, Eng C. Pheochromocytoma and paraganglioma. *N Engl J Med.* 2019;381(6):552-65.
9. Pacak K. Preoperative management of the pheochromocytoma patient. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(11):4069-79.

10. Geroula A, Deutschbein T, Langton K, Masjkur J, Pamporaki C, Peitzsch M, Fliedner S, Timmers HJLM, Bornstein SR, Beuschlein F, Stell A, Januszewicz A, Prejbisz A, Fassnacht M, Lenders JWM, Eisenhofer G. Pheochromocytoma and paraganglioma: clinical feature-based disease probability in relation to catecholamine biochemistry and reason for disease suspicion. *Eur J Endocrinol*. 2019;181(4):409-20.
11. Hamidi O, Young WF Jr, Iñiguez-Ariza NM, Kittah NE, Gruber L, Bancos C, Tamhane S, Bancos I. Malignant pheochromocytoma and paraganglioma: 272 patients over 55 years. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(9):3296-305.
12. Lenders JWM, Kerstens MN, Amar L, Prejbisz A, Robledo M, Taieb D, Pacak K, Crona J, Zelinka T, Mannelli M, Deutschbein T, Timmers HJLM, Castinetti F, Dralle H, Widimský J, Gimenez-Roqueplo AP, Eisenhofer G. Genetics, diagnosis, management and future directions of research of phaeochromocytoma and paraganglioma: a position statement and consensus of the Working Group on Endocrine Hypertension of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2020;38(8):1443-56.
13. Lenders JW, Willemsen JJ, Eisenhofer G, Ross HA, Pacak K, Timmers HJ, Sweep CG. Is supine rest necessary before blood sampling for plasma metanephrines? *Clin Chem*. 2007;53(2):352-4.
14. Sbardella E, Grossman AB. Pheochromocytoma: An approach to diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2020;34(2):101346.

15. Eisenhofer G, Deutschbein T, Constantinescu G, Langton K, Pamporaki C, Calsina B, Monteagudo M, Peitzsch M, Fliedner S, Timmers HJLM, Bechmann N, Fankhauser M, Nölting S, Beuschlein F, Stell A, Fassnacht M, Prejbisz A, Lenders JWM, Robledo M. Plasma metanephrines and prospective prediction of tumor location, size and mutation type in patients with pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin Chem Lab Med.* 2020;59(2):353-63.
16. Lenders JW, Pacak K, Walther MM, Linehan WM, Mannelli M, Friberg P, Keiser HR, Goldstein DS, Eisenhofer G. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best? *JAMA.* 2002;287(11):1427-34.
17. Eisenhofer G, Prejbisz A, Peitzsch M, Pamporaki C, Masjkur J, Rogowski-Lehmann N, Langton K, Tsourdi E, Pęczkowska M, Fliedner S, Deutschbein T, Megerle F, Timmers HJLM, Sinnott R, Beuschlein F, Fassnacht M, Januszewicz A, Lenders JWM. Biochemical diagnosis of chromaffin cell tumors in patients at high and low risk of disease: plasma versus urinary free or deconjugated o-methylated catecholamine metabolites. *Clin Chem.* 2018;64(11):1646-56.
18. Eisenhofer G, Goldstein DS, Walther MM, Friberg P, Lenders JW, Keiser HR, Pacak K. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: how to distinguish true- from false-positive test results. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jun;88(6):2656-66.

19. Eisenhofer G, Pacak K, Huynh TT, Qin N, Bratslavsky G, Linehan WM, Mannelli M, Friberg P, Grebe SK, Timmers HJ, Bornstein SR, Lenders JW. Catecholamine metabolomic and secretory phenotypes in pheochromocytoma. *Endocr Relat Cancer*. 2010 Dec 21;18(1):97-111.
20. Bhatia KS, Ismail MM, Sahdev A, Rockall AG, Hogarth K, Canizales A, Avril N, Monson JP, Grossman AB, Reznik RH. 123I-metaiodobenzylguanidine (MIBG) scintigraphy for the detection of adrenal and extra-adrenal pheochromocytomas: CT and MRI correlation. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;69(2):181-8.
21. Wiseman GA, Pacak K, O'Dorisio MS, Neumann DR, Waxman AD, Mankoff DA, Heiba SI, Serafini AN, Tumeh SS, Khutoryansky N, Jacobson AF. Usefulness of 123I-MIBG scintigraphy in the evaluation of patients with known or suspected primary or metastatic pheochromocytoma or paraganglioma: results from a prospective multicenter trial. *J Nucl Med*. 2009;50(9):1448-54.
22. Janssen I, Blanchet EM, Adams K, Chen CC, Millo CM, Herscovitch P, Taieb D, Kebebew E, Lehnert H, Fojo AT, Pacak K. Superiority of [68Ga]-DOTATATE PET/CT to Other Functional Imaging Modalities in the Localization of SDHB-Associated Metastatic Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Clin Cancer Res*. 2015;21(17):3888-95.



23. Janssen I, Chen CC, Millo CM, Ling A, Taieb D, Lin FI, Adams KT, Wolf KI, Herscovitch P, Fojo AT, Buchmann I, Kebebew E, Pacak K. PET/CT comparing (68)Ga-DOTATATE and other radiopharmaceuticals and in comparison with CT/MRI for the localization of sporadic metastatic pheochromocytoma and paraganglioma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2016;43(10):1784-91.
24. Nölting S, Bechmann N, Taieb D, Beuschlein F, Fassnacht M, Kroiss M, Eisenhofer G, Grossman A, Pacak K. Personalized management of pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocr Rev*. 2022;43(2):199-239.
25. Taïeb D, Hicks RJ, Hindié E, Guillet BA, Avram A, Ghedini P, Timmers HJ, Scott AT, Elojeimy S, Rubello D, Virgolini IJ, Fanti S, Balogova S, Pandit-Taskar N, Pacak K. European Association of Nuclear Medicine Practice Guideline/Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Procedure Standard 2019 for radionuclide imaging of phaeochromocytoma and paraganglioma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2019;46(10):2112-37.
26. Stenman A, Zedenius J, Juhlin CC. The value of histological algorithms to predict the malignancy potential of pheochromocytomas and abdominal paragangliomas-a meta-analysis and systematic review of the literature. *Cancers (Basel)*. 2019;11(2):225.

27. Plouin PF, Amar L, Dekkers OM, Fassnacht M, Gimenez-Roqueplo AP, Lenders JW, Lussey-Lepoutre C, Steichen O; Guideline Working Group. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline for long-term follow-up of patients operated on for a pheochromocytoma or a paraganglioma. *Eur J Endocrinol*. 2016 May;174(5):G1-G10.
28. Kimura N, Takekoshi K, Naruse M. Risk stratification on pheochromocytoma and paraganglioma from laboratory and clinical medicine. *J Clin Med*. 2018;7(9):242.
29. Corssmit EPM, Snel M, Kapiteijn E. Malignant pheochromocytoma and paraganglioma: management options. *Curr Opin Oncol*. 2020;32(1):20-6.
30. Thompson LD. 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.
31. Fishbein L, Del Rivero J, Else T, Howe JR, Asa SL, Cohen DL, Dahia PLM, Fraker DL, Goodman KA, Hope TA, Kunz PL, Perez K, Perrier ND, Pryma DA, Ryder M, Sasson AR, Soulen MC, Jimenez C. The North American Neuroendocrine Tumor Society Consensus Guidelines for surveillance and management of metastatic and/or unresectable pheochromocytoma and paraganglioma. *Pancreas*. 2021;50(4):469-93.

32. Dhir M, Li W, Hogg ME, Bartlett DL, Carty SE, McCoy KL, Challinor SM, Yip L. Clinical predictors of malignancy in patients with pheochromocytoma and paraganglioma. *Ann Surg Oncol*. 2017;24(12):362-30.
33. Amar L, Baudin E, Burnichon N, Peyrard S, Silvera S, Bertherat J, Bertagna X, Schlumberger M, Jeunemaitre X, Gimenez-Roqueplo AP, Plouin PF. Succinate dehydrogenase B gene mutations predict survival in patients with malignant pheochromocytomas or paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(10):3822-8.
34. Ayala-Ramirez M, Palmer JL, Hofmann MC, de la Cruz M, Moon BS, Waguespack SG, Habra MA, Jimenez C. Bone metastases and skeletal-related events in patients with malignant pheochromocytoma and sympathetic paraganglioma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(4):1492-7.
35. Fagundes GFC, Almeida MQ. Perioperative management of pheochromocytomas and sympathetic paragangliomas. *J Endocr Soc*. 2022;6(2):bvac004.
36. Maharjan R, Backman S, Åkerström T, Hellman P, Björklund P. Comprehensive analysis of CTNNB1 in adrenocortical carcinomas: Identification of novel mutations and correlation to survival. *Sci Rep*. 2018;8(1):8610.

37. Gonas S, Goldsby R, Matthay KK, Hawkins R, Price D, Huberty J, Damon L, Linker C, Sznewajs A, Shiboski S, Fitzgerald P. Phase II study of high-dose [131I]metaiodobenzylguanidine therapy for patients with metastatic pheochromocytoma and paraganglioma. *J Clin Oncol*. 2009;27(25):4162-8.
38. Pryma DA, Chin BB, Noto RB, Dillon JS, Perkins S, Solnes L, Kostakoglu L, Serafini AN, Pampaloni MH, Jensen J, Armor T, Lin T, White T, Stambler N, Apfel S, DiPippo VA, Mahmood S, Wong V, Jimenez C. Efficacy and safety of high-specific-activity 131I-MIBG therapy in patients with advanced pheochromocytoma or paraganglioma. *J Nucl Med*. 2019;60(5):623-30.
39. Zandee WT, Feelders RA, Smit Duijzentkunst DA, Hofland J, Metselaar RM, Oldenburg RA, van Linge A, Kam BLR, Teunissen JJM, Korpershoek E, Hendriks JM, Abusaris H, Slagter C, Franssen GJH, Brabander T, De Herder WW. Treatment of inoperable or metastatic paragangliomas and pheochromocytomas with peptide receptor radionuclide therapy using 177Lu-DOTATATE. *Eur J Endocrinol*. 2019;181(1):45-53.
40. Ayala-Ramirez M, Feng L, Habra MA, Rich T, Dickson PV, Perrier N, Phan A, Waguespack S, Patel S, Jimenez C. Clinical benefits of systemic chemotherapy for patients with metastatic pheochromocytomas or sympathetic extra-adrenal paragangliomas: insights from the largest single-institutional experience. *Cancer*. 2012;118(11):2804-12.

41. Hadoux J, Favier J, Scoazec JY, Leboulleux S, Al Ghuzlan A, Caramella C, Déandreis D, Borget I, Loriot C, Chougnet C, Letouzé E, Young J, Amar L, Bertherat J, Libé R, Dumont F, Deschamps F, Schlumberger M, Gimenez-Roqueplo AP, Baudin E. SDHB mutations are associated with response to temozolomide in patients with metastatic pheochromocytoma or paraganglioma. *Int J Cancer*. 2014;135(11):2711-20.
42. Oh DY, Kim TW, Park YS, Shin SJ, Shin SH, Song EK, Lee HJ, Lee KW, Bang YJ. Phase 2 study of everolimus monotherapy in patients with nonfunctioning neuroendocrine tumors or pheochromocytomas/paragangliomas. *Cancer*. 2012;118(24):6162-70.
43. Ayala-Ramirez M, Chougnet CN, Habra MA, Palmer JL, Leboulleux S, Cabanillas ME, Caramella C, Anderson P, Al Ghuzlan A, Waguespack SG, Deandreis D, Baudin E, Jimenez C. Treatment with sunitinib for patients with progressive metastatic pheochromocytomas and sympathetic paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(11):4040-50.
44. Jasim S, Suman VJ, Jimenez C, Harris P, Sideras K, Burton JK, Worden FP, Auchus RJ, Bible KC. Phase II trial of pazopanib in advanced/progressive malignant pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocrine*. 2017;57(2):220-5.
45. Tanabe A, Naruse M, Nomura K, Tsuiki M, Tsumagari A, Ichihara A. Combination chemotherapy with cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine in patients with malignant pheochromocytoma and paraganglioma. *Horm Cancer*. 2013;4(2):103-10.

- 
46. Niemeijer ND, Alblas G, van Hulsteijn LT, Dekkers OM, Corssmit EP. Chemotherapy with cyclophosphamide, vincristine and dacarbazine for malignant paraganglioma and pheochromocytoma: systematic review and meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014;81(5):642-51.
  47. Dahia PLM, Clifton-Bligh R, Gimenez-Roqueplo AP, Robledo M, Jimenez C. Hereditary endocrine tumours: current state-of-the-art and research opportunities: metastatic pheochromocytomas and paragangliomas: proceedings of the MEN2019 workshop. *Endocr Relat Cancer*. 2020;27(8):T41-T52.
  48. Baudin E, Habra MA, Deschamps F, Cote G, Dumont F, Cabanillas M, Arfi-Roufe J, Berdelou A, Moon B, Al Ghuzlan A, Patel S, Leboulleux S, Jimenez C. Therapy of endocrine disease: treatment of malignant pheochromocytoma and paraganglioma. *Eur J Endocrinol*. 2014;171(3):R111-22.
  49. Kong G, Grozinsky-Glasberg S, Hofman MS, Callahan J, Meirovitz A, Maimon O, Pattison DA, Gross DJ, Hicks RJ. Efficacy of Peptide Receptor Radionuclide Therapy for Functional Metastatic Paraganglioma and Pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(9):3278-87.
  50. Nielsen SM, Rhodes L, Blanco I, Chung WK, Eng C, Maher ER, Richard S, Giles RH. Von Hippel-Lindau disease: genetics and role of genetic counseling in a multiple neoplasia syndrome. *J Clin Oncol*. 2016;34(18):2172-81.

51. Dahia PL. Pheochromocytoma and paraganglioma pathogenesis: learning from genetic heterogeneity. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(2):108-19.
52. Fagundes GFC, Petenuci J, Lourenco DM Jr, Trarbach EB, Pereira MAA, Correa D'Eur JE, Hoff AO, Lerario AM, Zerbini MCN, Siqueira S, Yamauchi F, Srougi V, Tanno FY, Chambo JL, Latronico AC, Mendonca BB, Fragoso MCBV, Almeida MQ. New insights into pheochromocytoma surveillance of young patients with VHL missense mutations. *J Endocr Soc*. 2019;3(9):1682-92.
53. Gossage L, Eisen T, Maher ER. VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(1):55-64.
54. Favier J, Gimenez-Roqueplo AP. Pheochromocytomas: the (pseudo)-hypoxia hypothesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2010;24(6):957-68.
55. Shen MH, Harper PS, Upadhyaya M. Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1). *J Med Genet*. 1996;33(1):2-17.
56. Bausch B, Borozdin W, Neumann HP, Group E-APS. Clinical and genetic characteristics of patients with neurofibromatosis type 1 and pheochromocytoma. *N Engl J Med*. 2006;354(25):2729-31.
57. Pamporaki C, Hamplova B, Peitzsch M, Prejbisz A, Beuschlein F, Timmers HJLM, Fassnacht M, Klink B, Lodish M, Stratakis CA, Huebner A, Fliedner S, Robledo M, Sinnott RO, Januszewicz A, Pacak K, Eisenhofer G. Characteristics of Pediatric vs Adult Pheochromocytomas and Paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(4):1122-32.

- 
58. Erlic Z, Rybicki L, Peczkowska M, Golcher H, Kann PH, Brauckhoff M, Müssig K, Muresan M, Schäffler A, Reisch N, Schott M, Fassnacht M, Opocher G, Klose S, Fottner C, Forrer F, Plöckinger U, Petersenn S, Zabolotny D, Kollukch O, Yaremchuk S, Januszewicz A, Walz MK, Eng C, Neumann HP; European-American Pheochromocytoma Study Group. Clinical predictors and algorithm for the genetic diagnosis of pheochromocytoma patients. *Clin Cancer Res.* 2009;15(20):6378-85.
59. Currás-Freixes M, Piñeiro-Yañez E, Montero-Conde C, Apellániz-Ruiz M, Calsina B, Mancikova V, Remacha L, Richter S, Ercolino T, Rogowski-Lehmann N, Deutschbein T, Calatayud M, Guadalix S, Álvarez-Escolá C, Lamas C, Aller J, Sastre-Marcos J, Lázaro C, Galofré JC, Patiño-García A, Meoro-Avilés A, Balmaña-Gelpi J, De Miguel-Novoa P, Balbín M, Matías-Guiu X, Letón R, Inglada-Pérez L, Torres-Pérez R, Roldán-Romero JM, Rodríguez-Antona C, Fliedner SMJ, Opocher G, Pacak K, Korpershoek E, de Krijger RR, Vroonen L, Mannelli M, Fassnacht M, Beuschlein F, Eisenhofer G, Cascón A, Al-Shahrour F, Robledo M. PheoSeq: A Targeted Next-Generation Sequencing Assay for Pheochromocytoma and Paraganglioma Diagnostics. *J Mol Diagn.* 2017;19(4):575-88.



- 
60. Fishbein L, Leshchiner I, Walter V, Danilova L, Robertson AG, Johnson AR, Lichtenberg TM, Murray BA, Ghayee HK, Else T, Ling S, Jefferys SR, de Cubas AA, Wenz B, Korpershoek E, Amelio AL, Makowski L, Rathmell WK, Gimenez-Roqueplo AP, Giordano TJ, Asa SL, Tischler AS; Cancer Genome Atlas Research Network, Pacak K, Nathanson KL, Wilkerson MD. Comprehensive molecular characterization of pheochromocytoma and paraganglioma. *Cancer Cell*. 2017;31(2):181-93.
61. Fishbein L, Leshchiner I, Walter V, Danilova L, Robertson AG, Johnson AR, Lichtenberg TM, Murray BA, Ghayee HK, Else T, Ling S, Jefferys SR, de Cubas AA, Wenz B, Korpershoek E, Amelio AL, Makowski L, Rathmell WK, Gimenez-Roqueplo AP, Giordano TJ, Asa SL, Tischler AS; Cancer Genome Atlas Research Network, Pacak K, Nathanson KL, Wilkerson MD. Comprehensive molecular characterization of pheochromocytoma and paraganglioma. *Cancer Cell*. 2017;31(2):181-93.
62. NGS in PPGL (NGSnPPGL) Study Group, Toledo RA, Burnichon N, Cascon A, Benn DE, Bayley JP, Welander J, Tops CM, Firth H, Dwight T, Ercolino T, Mannelli M, Opocher G, Clifton-Bligh R, Gimm O, Maher ER, Robledo M, Gimenez-Roqueplo AP, Dahia PL. Consensus Statement on next-generation-sequencing-based diagnostic testing of hereditary phaeochromocytomas and paragangliomas. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(4):233-47.

- 
63. Ayala-Ramirez M, Feng L, Johnson MM, Ejaz S, Habra MA, Rich T, Busaidy N, Cote GJ, Perrier N, Phan A, Patel S, Waguespack S, Jimenez C. Clinical risk factors for malignancy and overall survival in patients with pheochromocytomas and sympathetic paragangliomas: primary tumor size and primary tumor location as prognostic indicators. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(3):717-25.
64. Bausch B, Schiavi F, Ni Y, Welander J, Patocs A, Ngeow J, Wellner U, Malinoc A, Taschin E, Barbon G, Lanza V, Söderkvist P, Stenman A, Larsson C, Svahn F, Chen JL, Marquard J, Fraenkel M, Walter MA, Peczkowska M, Prejbisz A, Jarzab B, Hasse-Lazar K, Petersenn S, Moeller LC, Meyer A, Reisch N, Trupka A, Brase C, Galiano M, Preuss SF, Kwok P, Lendvai N, Berisha G, Makay Ö, Boedeker CC, Weryha G, Racz K, Januszewicz A, Walz MK, Gimm O, Opocher G, Eng C, Neumann HPH; European-American-Asian Pheochromocytoma-Paraganglioma Registry Study Group. Clinical characterization of the pheochromocytoma and paraganglioma susceptibility genes SDHA, TMEM127, MAX, and SDHAF2 for Gene-Informed Prevention. *JAMA Oncol.* 2017;3(9):1204-12.

- 
65. Papathomas TG, Oudijk L, Persu A, Gill AJ, van Nederveen F, Tischler AS, Tissier F, Volante M, Matias-Guiu X, Smid M, Favier J, Rapizzi E, Libe R, Currás-Freixes M, Aydin S, Huynh T, Lichtenauer U, van Berkel A, Canu L, Domingues R, Clifton-Bligh RJ, Bialas M, Vikkula M, Baretton G, Papotti M, Nesi G, Badoual C, Pacak K, Eisenhofer G, Timmers HJ, Beuschlein F, Bertherat J, Mannelli M, Robledo M, Gimenez-Roqueplo AP, Dinjens WN, Korpershoek E, de Krijger RR. SDHB/SDHA immunohistochemistry in pheochromocytomas and paragangliomas: a multicenter interobserver variation analysis using virtual microscopy: a Multinational Study of the European Network for the Study of Adrenal Tumors (ENS@T). *Mod Pathol*. 2015;28(6):807-21.
66. Castro-Vega LJ, Buffet A, De Cubas AA, Cascón A, Menara M, Khalifa E, Amar L, Azriel S, Bourdeau I, Chabre O, Currás-Freixes M, Franco-Vidal V, Guillaud-Bataille M, Simian C, Morin A, Letón R, Gómez-Graña A, Pollard PJ, Rustin P, Robledo M, Favier J, Gimenez-Roqueplo AP. Germline mutations in FH confer predisposition to malignant pheochromocytomas and paragangliomas. *Hum Mol Genet*. 2014;23(9):2440-6.
67. Buffet A, Morin A, Castro-Vega LJ, Habarou F, Lussey-Lepoutre C, Letouzé E, Lefebvre H, Guilhem I, Haissaguerre M, Raingeard I, Padilla-Girola M, Tran T, Tchara L, Bertherat J, Amar L, Ottolenghi C, Burnichon N, Gimenez-Roqueplo AP, Favier J. Germline Mutations in the Mitochondrial 2-Oxoglutarate/Malate Carrier SLC25A11 Gene Confer a Predisposition to Metastatic Paragangliomas. *Cancer Res*. 2018;78(8):1914-22.

- 
68. Fishbein L, Khare S, Wubbenhorst B, DeSloover D, D'Andrea K, Merrill S, Cho NW, Greenberg RA, Else T, Montone K, LiVolsi V, Fraker D, Daber R, Cohen DL, Nathanson KL. Whole-exome sequencing identifies somatic ATRX mutations in pheochromocytomas and paragangliomas. *Nat Commun*. 2015 Jan 21;6:6140.
69. Liu T, Brown TC, Juhlin CC, Andreasson A, Wang N, Bäckdahl M, Healy JM, Prasad ML, Korah R, Carling T, Xu D, Larsson C. The activating TERT promoter mutation C228T is recurrent in subsets of adrenal tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(3):427-34.
70. Dwight T, Flynn A, Amarasinghe K, Benn DE, Lupat R, Li J, Cameron DL, Hogg A, Balachander S, Candiloro ILM, Wong SQ, Robinson BG, Papenfuss AT, Gill AJ, Dobrovic A, Hicks RJ, Clifton-Bligh RJ, Tothill RW. TERT structural rearrangements in metastatic pheochromocytomas. *Endocr Relat Cancer*. 2018;25(1):1-9.
71. Job S, Draskovic I, Burnichon N, Buffet A, Cros J, Lépine C, Venisse A, Robidel E, Verkarre V, Meatchi T, Sibony M, Amar L, Bertherat J, de Reyniès A, Londoño-Vallejo A, Favier J, Castro-Vega LJ, Gimenez-Roqueplo AP. Telomerase activation and ATRX mutations are independent risk factors for metastatic pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin Cancer Res*. 2019;25(2):760-70.

72. Buffet A, Ben Aim L, Leboulleux S, Drui D, Vezzosi D, Libé R, Ajzenberg C, Bernardeschi D, Cariou B, Chabolle F, Chabre O, Darrouzet V, Delemer B, Desailloud R, Goichot B, Esvant A, Offredo L, Herman P, Laboureau S, Lefebvre H, Pierre P, Raingeard I, Reznik Y, Sadoul JL, Hadoux J, Tabarin A, Tauveron I, Zenaty D, Favier J, Bertherat J, Baudin E, Amar L, Gimenez-Roqueplo AP; French Group of Endocrine Tumors (GTE) and COMETE Network. Positive impact of genetic test on the management and outcome of patients with paraganglioma and/or pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(4):1109-18.
73. De Luca A, Bottillo I, Dasdia MC, Morella A, Lanari V, Bernardini L, Divona L, Giustini S, Sinibaldi L, Novelli A, Torrente I, Schirinzi A, Dallapiccola B. Deletions of NF1 gene and exons detected by multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet.* 2007;44(12):800-8.
74. Lerario AM, Mohan DR, Montenegro LR, Funari MFA, Nishi MY, Narcizo AM, Benedetti AFF, Oba-Shinjo SM, Vitorino AJ, Santos RASXD, Jorge AAL, Onuchic LF, Marie SKN, Mendonca BB. SELAdb: A database of exonic variants in a Brazilian population referred to a quaternary medical center in São Paulo. *Clinics (Sao Paulo).* 2020;75:e1913.

75. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.
76. Toledo RA, Qin Y, Cheng ZM, Gao Q, Iwata S, Silva GM, Prasad ML, Ocal IT, Rao S, Aronin N, Barontini M, Bruder J, Reddick RL, Chen Y, Aguiar RC, Dahia PL. Recurrent Mutations of Chromatin-Remodeling Genes and Kinase Receptors in Pheochromocytomas and Paragangliomas. *Clin Cancer Res*. 2016;22(9):2301-10.
77. Seo SH, Kim JH, Kim MJ, Cho SI, Kim SJ, Kang H, Shin CS, Park SS, Lee KE, Seong MW. Whole Exome Sequencing Identifies Novel Genetic Alterations in Patients with Pheochromocytoma/Paraganglioma. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2020 Dec;35(4):909-17.
78. Schlisio S, Kenchappa RS, Vredeveld LC, George RE, Stewart R, Greulich H, Shahriari K, Nguyen NV, Pigny P, Dahia PL, Pomeroy SL, Maris JM, Look AT, Meyerson M, Peeper DS, Carter BD, Kaelin WG Jr. The kinesin KIF1Bbeta acts downstream from EglN3 to induce apoptosis and is a potential 1p36 tumor suppressor. *Genes Dev*. 2008;22(7):884-93.

- 
79. Yeh IT, Lenci RE, Qin Y, Buddavarapu K, Ligon AH, Leteurtre E, Do Cao C, Cardot-Bauters C, Pigny P, Dahia PL. A germline mutation of the KIF1B beta gene on 1p36 in a family with neural and nonneural tumors. *Hum Genet.* 2008;124(3):279-85.
80. Martins RG, Cunha N, Simões H, Matos MJ, Silva J, Torres I, Rodrigues F, Leite V, Teixeira MR, Bugalho MJ. Surveillance of succinate dehydrogenase gene mutation carriers: Insights from a nationwide cohort. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2020;92(6):545-53.
81. NGS in PPGL (NGSnPPGL) Study Group, Toledo RA, Burnichon N, Cascon A, Benn DE, Bayley JP, Welander J, Tops CM, Firth H, Dwight T, Ercolino T, Mannelli M, Opocher G, Clifton-Bligh R, Gimm O, Maher ER, Robledo M, Gimenez-Roqueplo AP, Dahia PL. Consensus Statement on next-generation-sequencing-based diagnostic testing of hereditary pheochromocytomas and paragangliomas. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(4):233-47.
82. McWhinney SR, Pilarski RT, Forrester SR, Schneider MC, Sarquis MM, Dias EP, Eng C. Large germline deletions of mitochondrial complex II subunits SDHB and SDHD in hereditary paraganglioma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(11):5694-9.
83. Cascón A, Montero-Conde C, Ruiz-Llorente S, Mercadillo F, Letón R, Rodríguez-Antona C, Martínez-Delgado B, Delgado M, Díez A, Rovira A, Díaz JA, Robledo M. Gross SDHB deletions in patients with paraganglioma detected by multiplex PCR: a possible hot spot? *Genes Chromosomes Cancer.* 2006;45(3):213-9.

- 
84. Solis DC, Burnichon N, Timmers HJ, Raygada MJ, Kozupa A, Merino MJ, Makey D, Adams KT, Venisse A, Gimenez-Roqueplo AP, Pacak K. Penetrance and clinical consequences of a gross SDHB deletion in a large family. *Clin Genet.* 2009;75(4):354-63.
85. Cascón A, Landa I, López-Jiménez E, Díez-Hernández A, Buchta M, Montero-Conde C, Leskelä S, Leandro-García LJ, Letón R, Rodríguez-Antona C, Eng C, Neumann HP, Robledo M. Molecular characterisation of a common SDHB deletion in paraganglioma patients. *J Med Genet.* 2008;45(4):233-8.
86. Martins RG, Nunes JB, Máximo V, Soares P, Peixoto J, Catarino T, Rito T, Soares P, Pereira L, Sobrinho-Simões M, Santos AP, Couto J, Henrique R, Matos-Loureiro J, Dias P, Torres I, Lima J. A founder SDHB mutation in Portuguese paraganglioma patients. *Endocr Relat Cancer.* 2013;20(6):L23-6.
87. Petenuci J, Guimaraes AG, Fagundes GFC, Benedetti AFF, Afonso ACF, Pereira MAA, Zerbini MCN, Siqueira S, Yamauchi F, Soares SC, Srougi V, Tanno FY, Chambo JL, Lopes RI, Denes FT, Hoff AO, Latronico AC, Mendonca BB, Fragoso MCBV, Almeida MQ. Genetic and clinical aspects of paediatric pheochromocytomas and paragangliomas. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2021 Jul;95(1):117-24.
88. Cascón A, Inglada-Pérez L, Comino-Méndez I, de Cubas AA, Letón R, Mora J, Marazuela M, Galofré JC, Quesada-Charneco M, Robledo M. Genetics of pheochromocytoma and paraganglioma in Spanish pediatric patients. *Endocr Relat Cancer.* 2013;20(3):L1-6.



89. Bausch B, Wellner U, Bausch D, Schiavi F, Barontini M, Sanso G, Walz MK, Peczkowska M, Weryha G, Dall'igna P, Cecchetto G, Bisogno G, Moeller LC, Bockenhauer D, Patocs A, Rácz K, Zabolotnyi D, Yaremchuk S, Dzivite-Krisane I, Castinetti F, Taieb D, Malinoc A, von Dobschuetz E, Roessler J, Schmid KW, Opocher G, Eng C, Neumann HP. Long-term prognosis of patients with pediatric pheochromocytoma. *Endocr Relat Cancer*. 2013;21(1):17-25.
90. Barontini M, Levin G, Sanso G. Characteristics of pheochromocytoma in a 4- to 20-year-old population. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1073:30-7.
91. De Krijger RR, Petri BJ, Van Nederveen FH, Korpershoek E, De Herder WW, De Muinck Keizer-Schrama SM, Dinjens WN. Frequent genetic changes in childhood pheochromocytomas. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1073:166-76.
92. Nielsen SM, Rubinstein WS, Thull DL, Armstrong MJ, Feingold E, Stang MT, Gnarr JR, Carty SE. Genotype-phenotype correlations of pheochromocytoma in two large von Hippel-Lindau (VHL) type 2A kindreds with different missense mutations. *Am J Med Genet A*. 2011;155A(1):168-73.


- 
93. Neumann HPH, Tsoy U, Bancos I, Amodru V, Walz MK, Tirosh A, Kaur RJ, McKenzie T, Qi X, Bandgar T, Petrov R, Yukina MY, Roslyakova A, van der Horst-Schrivers ANA, Berends AMA, Hoff AO, Castroneves LA, Ferrara AM, Rizzati S, Mian C, Dvorakova S, Hasse-Lazar K, Kvachenyuk A, Peczkowska M, Loli P, Erenler F, Krauss T, Almeida MQ, Liu L, Zhu F, Recasens M, Wohllk N, Corssmit EPM, Shafigullina Z, Calissendorff J, Grozinsky-Glasberg S, Kunavisarut T, Schalin-Jäntti C, Castinetti F, Vlcek P, Beltsevich D, Egorov VI, Schiavi F, Links TP, Lechan RM, Bausch B, Young WF Jr, Eng C; International Bilateral-Pheochromocytoma-Registry Group. Comparison of Pheochromocytoma-specific morbidity and mortality among adults with bilateral pheochromocytomas undergoing total adrenalectomy vs cortical-sparing adrenalectomy. *JAMA Netw Open*. 2019;2(8):e198898.
94. Greenberg SE, Jacobs MF, Wachtel H, Anson A, Buchmann L, Cohen DL, Bonanni M, Bennett B, Naumer A, Schaefer AM, Kohlmann W, Nathanson KL, Else T, Fishbein L. Tumor detection rates in screening of individuals with SDHx-related hereditary paraganglioma-pheochromocytoma syndrome. *Genet Med*. 2020;22(12):2101-7.
95. Andrews KA, Ascher DB, Pires DEV, Barnes DR, Vialard L, Casey RT, Bradshaw N, Adlard J, Aylwin S, Brennan P, Brewer C, Cole T, Cook JA, Davidson R, Donaldson A, Fryer A, Greenhalgh L, Hodgson SV, Irving R, Laloo F, McConachie M, McConnell VPM, Morrison PJ, Murday V, Park SM, Simpson HL, Snape K, Stewart S, Tomkins SE, Wallis Y, Izatt L, Goudie D, Lindsay RS, Perry CG, Woodward ER, Antoniou AC, Maher ER. Tumour risks and genotype-phenotype correlations associated with germline variants in succinate dehydrogenase subunit genes SDHB, SDHC and SDHD. *J Med Genet*. 2018;55(6):384-94.


96. Wong MY, Andrews KA, Challis BG, Park SM, Acerini CL, Maher ER, Casey RT. Clinical Practice Guidance: Surveillance for pheochromocytoma and paraganglioma in paediatric succinate dehydrogenase gene mutation carriers. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2019;90(4):499-505.
97. Tufton N, Shapiro L, Sahdev A, Kumar AV, Martin L, Drake WM, Akker SA, Storr HL. An analysis of surveillance screening for SDHB-related disease in childhood and adolescence. *Endocr Connect*. 2019;8(3):162-72.
98. Petenuci J, Fagundes GFC, Benedetti AFF, Guimaraes AG, Afonso ACF, Mota FT, Magalhães ALF, Coura-Filho GB, Zerbini MCN, Siqueira S, Montenegro FLM, Srougi V, Tanno FY, Chambo JL, Ferrari MSS, Bezerra Neto JE, Pereira MAA, Latronico AC, Fragoso MCBV, Mendonca BB, Hoff AO, Almeida MQ. SDHB large deletions are associated with absence of MIBG uptake in metastatic lesions of malignant paragangliomas. *Endocrine*. 2021;72(2):586-90.
99. Fonte JS, Robles JF, Chen CC, Reynolds J, Whatley M, Ling A, Mercado-Asis LB, Adams KT, Martucci V, Fojo T, Pacak K. False-negative <sup>123</sup>I-MIBG SPECT is most commonly found in SDHB-related pheochromocytoma or paraganglioma with high frequency to develop metastatic disease. *Endocr Relat Cancer*. 2012;19(1):83-93.
100. Fishbein L, Ben-Maimon S, Keefe S, Cengel K, Pryma DA, Loaiza-Bonilla A, Fraker DL, Nathanson KL, Cohen DL. SDHB mutation carriers with malignant pheochromocytoma respond better to CVD. *Endocr Relat Cancer*. 2017;24(8):L51-L55.

101. Watson IR, Takahashi K, Futreal PA, Chin L. Emerging patterns of somatic mutations in cancer. *Nat Rev Genet.* 2013;14(10):703-18.

## **APÊNDICES**

## Apêndice A - Artigos publicados


National Library of Medicine  
National Center for Biotechnology Information
Log in



Search

Advanced
User Guide

Search results

Save
Email
Send to
Display options

> Endocrine. 2021 May;72(2):586-590. doi: 10.1007/s12020-020-02594-w. Epub 2021 Jan 9.

### SDHB large deletions are associated with absence of MIBG uptake in metastatic lesions of malignant paragangliomas

Janaina Petenuci <sup>1</sup>, Gustavo F C Fagundes <sup>1</sup>, Anna Flavia F Benedetti <sup>1</sup>, Augusto G Guimaraes <sup>1</sup>, Ana Caroline F Afonso <sup>1</sup>, Flavia T Mota <sup>1</sup>, Aurea Luiza F Magalhães <sup>1</sup>, George B Coura-Filho <sup>2</sup>, Maria Claudia N Zerbini <sup>3</sup>, Sheila Siqueira <sup>3</sup>, Fabio L M Montenegro <sup>4</sup>, Victor Srougi <sup>5</sup>, Fabio Y Tanno <sup>5</sup>, Jose Luis Chambo <sup>5</sup>, Marcela S S Ferrari <sup>6 7</sup>, Joao Evangelista Bezerra Neto <sup>6 7</sup>, Maria Adelaide A Pereira <sup>8</sup>, Ana Claudia Latronico <sup>1</sup>, Maria Candida B V Fragoso <sup>1 9</sup>, Berenice B Mendonca <sup>1</sup>, Ana O Hoff <sup>7 9</sup>, Madson Q Almeida <sup>10 11</sup>

Affiliations [+ expand](#)

PMID: 33420946 DOI: 10.1007/s12020-020-02594-w

*No abstract available*

FULL TEXT LINKS



ACTIONS

Cite

Favorites


SHARE




PAGE NAVIGATION

< Title & authors

> Full text


 **National Library of Medicine**  
National Center for Biotechnology Information
Log in



Search

Advanced
User Guide

Search results

Save
Email
Send to
Display options 

> Clin Endocrinol (Oxf). 2021 Jul;95(1):117-124. doi: 10.1111/cen.14467. Epub 2021 Mar 28.

## Genetic and clinical aspects of paediatric pheochromocytomas and paragangliomas

Janaina Petenuci <sup>1</sup>, Augusto G Guimaraes <sup>1</sup>, Gustavo F C Fagundes <sup>1</sup>, Anna Flavia F Benedetti <sup>1</sup>, Ana Caroline F Afonso <sup>1</sup>, Maria Adelaide A Pereira <sup>2</sup>, Maria Claudia N Zerbini <sup>3</sup>, Sheila Siqueira <sup>3</sup>, Fernando Yamauchi <sup>4</sup>, Silvia C Soares <sup>5</sup>, Victor Srougi <sup>6</sup>, Fabio Y Tanno <sup>6</sup>, Jose L Chambo <sup>6</sup>, Roberto I Lopes <sup>6</sup>, Francisco T Denes <sup>6</sup>, Ana O Hoff <sup>7</sup>, Ana Claudia Latronico <sup>1</sup>, Berenice B Mendonca <sup>1</sup>, Maria Candida B V Fragoso <sup>1, 7</sup>, Madson Q Almeida <sup>1, 7</sup>

Affiliations [+ expand](#)

PMID: 33745191 DOI: 10.1111/cen.14467

### Abstract

**Objective:** Few and conflicting reports have characterized the genetics of paediatric pheochromocytomas and paragangliomas (PPGLs). This study aimed to investigate the clinical and genetic features of Brazilian children with PPGL.

**Patients and methods:** This study included 25 children (52% girls) with PPGL. The median age at diagnosis was 15 years (4-19). The median time of follow-up was 145 months. The genetic investigation was performed by Sanger DNA sequencing, multiplex ligation-dependent probe amplification and/or target next-generation sequencing panel.

**Results:** Of the 25 children with PPGL, 11 (44%), 4 (16%), 2 (8%), 1 (4%) and 7 (28%) had germline VHL pathogenic variants, SDHB, SDHD, RET and negative genetic investigation, respectively. Children with germline VHL missense pathogenic variants were younger than those with SDHB or SDHD genetic defects [median (range), 12 (4-16) vs. 15.5 (14-19) years; P = .027]. Moreover, 10 of 11 cases with VHL pathogenic variants had bilateral pheochromocytoma (six asynchronous and four synchronous). All children with germline SDHB pathogenic variants presented with abdominal paraganglioma (one of them malignant). The two cases with SDHD pathogenic variants presented with head and neck paraganglioma. Among the cases without a genetic diagnosis, 6 and 2 had pheochromocytoma and paraganglioma, respectively. Furthermore, metastatic PPGL was diagnosed in four (16%) of 25 PPGL.

**Conclusions:** Most of the paediatric PPGL were hereditary and multifocal. The majority of the affected genes belong to pseudohypoxic cluster 1, with VHL being the most frequently mutated. Therefore, our findings impact surgical management and surveillance of children with PPGL.

**Keywords:** children; genetics; paraganglioma; pheochromocytoma.

© 2021 John Wiley & Sons Ltd.

#### FULL TEXT LINKS



#### ACTIONS



#### SHARE



#### PAGE NAVIGATION

< Title & authors

Abstract

Similar articles

Cited by

References

Publication types

MeSH terms

Substances

Related information

Grant support

LinkOut - more resources