



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JEFFERSON CRESPIGIO

**ANÁLISE CLÍNICA E ANATOMOPATOLÓGICA DOS  
FEOCROMOCITOMAS ESPORÁDICOS EM COMPARAÇÃO  
COM OS ASSOCIADOS À DOENÇA DE VON HIPPEL-  
LINDAU**

**JEFFERSON CRESPIGIO**

**ANÁLISE CLÍNICA E ANATOMOPATOLÓGICA DOS  
FEOCROMOCITOMAS ESPORÁDICOS EM COMPARAÇÃO  
COM OS ASSOCIADOS À DOENÇA DE VON HIPPEL-  
LINDAU**

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Tânia Longo Mazzuco.

Londrina  
2018

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

C921a Crespigio, Jefferson.

Análise clínica e anatomopatológica dos feocromocitomas esporádicos em comparação com os associados à doença de von Hippel-Lindau / Jefferson Crespigio. - Londrina, 2018.  
90 f.: il.

Orientador: Tânia Longo Mazzuco.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Tumores - Teses. 2. Glândulas supra-renais - Teses. 3. Von Hippel-Lindau, Síndrome de - Teses. 4. Anatomia patológica - Teses. I. Mazzuco, Tânia Longo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 616-006.6

JEFFERSON CRESPIGIO

**ANÁLISE CLÍNICA E ANATOMOPATOLÓGICA DOS  
FEOCROMOCITOMAS ESPORÁDICOS EM COMPARAÇÃO COM OS  
ASSOCIADOS À DOENÇA DE VON HIPPEL-LINDAU**

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Longo Mazzuco  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Marco Aurélio Fornazieri  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Silvio Henrique Maia de Almeida  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Duarte Pignatelli  
Universidade do Porto - IPATIMUP

---

Prof. Dr. José Claudio Casali da Rocha  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná -  
PUCPR

Londrina, 29 de maio de 2018.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Tânia Longo Mazzuco, orientadora e amiga, por toda inspiração que nos traz de fazermos sempre o trabalho correto e pelo exemplo de conduta ética e cuidadosa em cada detalhe de meu trabalho.

À banca examinadora, Prof. Dr. Marco Aurélio Fornazieri, Prof. Dr. Sílvio H.M. de Almeida, Prof. Dr. Duarte Pignatelli e Prof. Dr. José Claudio Casali da Rocha, pelas valiosas sugestões e contribuições ao trabalho.

Ao Dr. José Claudio Casali da Rocha pelo apoio e ajuda em conseguir os blocos tumorais de pacientes com a doença de von Hippel-Lindau.

A todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, pela imensa contribuição para minha formação científica.

Aos técnicos Maria Claudia de Souza, Marco Aurélio R. de Souza e Ramom Granssoti do laboratório Logos de Patologia, pela contribuição técnica durante esse trabalho.

Aos colegas do Doutorado e do grupo de pesquisa iEndo - Interações endócrinas, inflamatórias e tumorais, em especial ao Alexandro Marcio da Silva Mattos, pela amizade e companheirismo durante o programa, a Giovanna Outuki e Anna Catarina Gatzk de Arruda, pela imensa contribuição na revisão dos prontuários.

Aos suplentes de meu trabalho, Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa e Profa. Dra. Roberta Losi Guembarovski.

À Sandra Lage e a Emanuella Silveira de Oliveira, nossa amiga “Manu”, (Secretaria da pós-graduação em Ciências da Saúde) pelo auxílio nas questões burocráticas e pelo apoio durante todo o doutorado.

CRESPIGIO, Jefferson. **Análise clínica e anatomopatológica dos feocromocitomas esporádicos em comparação com os associados à doença de von Hippel-Lindau.** 2018. 90 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

**Introdução:** A doença de von Hippel-Lindau (VHL) constitui uma síndrome rara com herança autossômica dominante, caracterizada pela predisposição a múltiplos tumores decorrentes de mutações no gene VHL. Pacientes classificados como VHL do tipo 2 exibem alto risco de desenvolvimento de tumores da medula da adrenal denominados feocromocitomas, os quais apresentam características clínicas e morfológicas distintas dos casos esporádicos de feocromocitomas e de casos presentes em outras síndromes genéticas. Marcadores moleculares, tais como as enzimas da família glutatona S-transferase, caspases, proteína p53, bem como biomarcadores relacionados ao padrão de vascularização e à proliferação celular, têm sido relacionados a fatores prognósticos em diversas neoplasias. Feocromocitomas presentes na doença de VHL são tumores raros, cujos dados histopatológicos são escassos na literatura. **Objetivos:** Descrever as características clínicas e de biomarcadores em feocromocitomas presentes na doença de VHL em comparação aos casos esporádicos de feocromocitomas. **Metodologia:** Foi realizado um estudo observacional descritivo e transversal incluindo casos de feocromocitomas esporádicos (n = 6) e feocromocitomas VHL (n = 3) a partir de dados clínicos e laboratoriais. Foram coletadas dos prontuários médicos as seguintes informações: idade, sexo, lateralidade e maior diâmetro do tumor, presença ou ausência de sintomas e sinais adrenérgicos, excreção urinária de catecolaminas e metanefrinas. Na etapa seguinte, realizou-se revisão anatomopatológica com classificação de PASS (*pheochromocytoma of the adrenal gland scaled score*) de cortes histológicos nos blocos de parafina dos feocromocitomas removidos cirurgicamente. Foi realizado estudo experimental através da técnica imunoistoquímica utilizando os anticorpos primários para cromogranina A, caspase-3, GSTP1, Ki-67, p53, CD34 e S-100. **Resultados:** No momento do diagnóstico os pacientes com feocromocitomas VHL apresentaram média de idade menor (34,6 anos; IC95% 33-36) que os casos esporádicos (57,5 anos, IC95% 50-64) (p=0,0003). O maior diâmetro tumoral nos pacientes com VHL (2,4 cm; IC95% 0,8-4,3) foi significativamente menor do que nos casos esporádicos (6,6 cm; IC95% 5,8-8,0) (p=0,0007). Todos os pacientes apresentaram tumores unilaterais, à exceção de um paciente com doença de VHL que apresentou tumor bilateral. A tríade clássica de sintomas de feocromocitoma esteve presente somente nos casos esporádicos, com todos os pacientes desse grupo exibindo valores elevados de metanefrinas urinárias. Todos os feocromocitomas apresentaram critérios de PASS menor que 4. A densidade vascular, avaliada através da expressão do CD 34, foi 3,5 vezes maior nos feocromocitomas VHL em comparação aos casos esporádicos (p=0,002). Os feocromocitomas presentes na síndrome VHL exibiram menor expressão das proteínas GSTP1 (p=0,0001) e caspase-3 (p=0,02) em relação aos casos esporádicos. Não houve diferenças significativas na imunoexpressão das proteínas p53, S-100 e do índice de proliferação celular (Ki-67). **Conclusão:** Nossos resultados demonstraram que feocromocitomas presentes em

pacientes com doença de VHL apresentam aumento da vascularização com diminuição da apoptose e baixa proliferação celular, estando de acordo com dados da literatura de desregulação da via do HIF (fator induzido pela hipóxia). Houve baixa imunoexpressão de GSTP1 nos feocromocitomas VHL porém não há estudos na literatura referentes ao metabolismo xenobiótico nos casos de feocromocitomas esporádicos ou familiares sendo, portanto, um assunto a ser investigado de forma mais aprofundada. A complementação do estudo anatomopatológico do feocromocitoma, incluindo a avaliação da densidade vascular com a técnica de imunoistoquímica em exame de rotina, poderá auxiliar na suspeita da doença de VHL em pacientes cujo feocromocitoma assintomático (incidentaloma) seria a primeira manifestação da doença. Considerando a raridade destes tumores neuroendócrinos, estudos multicêntricos com aumento da casuística contribuirão para melhor entendimento da fisiopatologia e dos mecanismos moleculares presentes em feocromocitomas na doença de VHL.

**Palavras-chaves:** Feocromocitoma. Doença de von Hippel-Lindau. Glândulas adrenais. Imunoistoquímica.

CRESPIGIO, Jefferson. **Clinical and pathological analysis of pheochromocytomas in von Hippel-Lindau disease compared to the sporadic cases.** 2018. 90 p. Thesis (Doctoral Degree in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

**Introduction:** von Hippel-Lindau disease (VHL) is a rare syndrome with autosomal dominant inheritance, characterized by predisposition to multiple tumors due to mutations in the VHL gene. Patients classified as VHL type 2 exhibit a high risk of developing adrenal medulla tumors called pheochromocytomas, which present clinical and morphological characteristics distinct from sporadic ones and also pheochromocytomas found in other genetic syndromes. Molecular markers, such as the glutathione S-transferase enzymes, caspases, p53 protein, as well as biomarkers related to vascularization pattern and cell proliferation, have been related to prognostic factors in several neoplasms. Pheochromocytomas present in VHL disease are rare tumors with scarce histopathological data in the literature.

**Objectives:** to describe the clinical and biomarker characteristics in pheochromocytomas associated with VHL disease compared to sporadic cases of pheochromocytomas. **Material and methods:** a descriptive and cross-sectional observational study including cases of sporadic pheochromocytomas (n = 6) and VHL pheochromocytomas (n = 3) were performed from clinical and laboratory data. The following information was collected from the medical records: age, sex, laterality and largest tumor diameter, presence or absence of adrenergic signs and symptoms, urinary excretion of catecholamines and metanephrines. In the next step, PASS (pheochromocytoma of the adrenal gland scaled score) was performed with histological sections of the paraffin blocks from surgically removed pheochromocytomas. An immunohistochemical study was performed using the primary antibodies to chromogranin A, caspase-3, GSTP1, Ki-67, p53, CD34 and S-100. **Results:** at the diagnosis, patients with VHL pheochromocytomas presented a mean age lower (34.6 years, 95% CI 33-36) than sporadic cases (57.5 years, 95% CI 50-64) ( $p = 0.0003$ ). The largest tumor diameter in patients with VHL (2.4 cm; 95% CI 0.8-4.3) was smaller than sporadic cases (6.6 cm; 95% CI: 5.8-8.0) ( $p = 0.0007$ ). All patients presented unilateral tumors, except for one patient with VHL disease who presented bilateral tumor. Pheochromocytoma's classical symptoms triad was present only in sporadic cases; all patients in this group exhibited high urinary metanephrine values. All pheochromocytomas had PASS scores lower than 4. Vascular density measured by CD34 expression was 3.5 times higher in VHL pheochromocytomas compared to sporadic cases ( $p = 0.002$ ). VHL-associated pheochromocytomas showed lower expression of GSTP1 ( $p = 0.0001$ ) and caspase-3 ( $p = 0.02$ ) proteins compared to sporadic cases. There was no statistically significant differences in immunoexpression of p53, S-100 and cell proliferation index (Ki-67). **Conclusion:** VHL-associated pheochromocytomas exhibit increased vascularity with decreased apoptosis and low cell proliferation, according to published data regarding HIF (hypoxia induced factor) pathway deregulation. There was a low GSTP1 immunoexpression in cases of VHL pheochromocytomas, however no data are available about xenobiotic metabolism among sporadic and familial pheochromocytomas, so additional studies will be needed. The assessment of

vascular density in conjunction with routine pathology of pheochromocytoma may help in the suspicion of VHL disease in patients whose asymptomatic pheochromocytoma (incidentaloma) would be the first manifestation of the disease. Taking into account the rarity of such a neuroendocrine tumors, multicentric studies with larger sample sizes will contribute to a better understanding of the pathophysiology and molecular mechanisms related to pheochromocytomas in VHL disease.

**Keywords:** Pheochromocytoma. von Hippel-Lindau disease. Adrenal gland. Immunohistochemistry.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.</b> Imagens históricas.....	15
<b>Figura 2.</b> Localização cromossômica do gene VHL.....	18
<b>Figura 3.</b> Estrutura molecular do complexo pVHL-ElonginaB-ElonginaC .....	19
<b>Figura 4.</b> Interação do complexo VCB-Cul2 com o HIF .....	20
<b>Figura 5.</b> Síntese de catecolaminas .....	26

### ARTIGO

<b>Table 1.</b> Clinical and biochemical features and PASS criteria of patients with sporadic and VHL pheochromocytomas .....	60
<b>Table 2.</b> Comparison of clinical, biochemical and tumor characteristics between VHL and sporadic pheochromocytomas .....	61
<b>Figure 1.</b> Tissue expression of chromogranin A .....	62
<b>Figure 2.</b> Histological characteristics of pheochromocytomas .....	63
<b>Figure 3.</b> Capsular and cytoplasmic characteristics.....	64
<b>Figure 4.</b> Necrosis and nuclei atypia.....	65
<b>Figure 5.</b> Tissue expression of CD 34 by immunohistochemistry .....	66
<b>Figure 6.</b> Tissue expression of GSTP1 by immunohistochemistry.....	67
<b>Figure 7.</b> Tissue expression of caspase-3 by immunohistochemistry.....	68
<b>Figure 8.</b> Representative images of p53 expression by immunohistochemistry.....	69
<b>Figure 9.</b> Representative images of Ki-67/MIB-1 expression by immunohistochemistry.....	70
<b>Figure 10.</b> Representative images of S-100 expression by immunohistochemistry.....	71
<b>Supplementary figure 1.</b> Pedigree chart of patients 1 and 2 .....	72

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Correlação genótipo-fenótipo na doença de von Hippel-Lindau .....	23
<b>Quadro 2.</b> Síndromes relacionadas aos feocromocitomas .....	25
<b>Quadro 3.</b> Anticorpos utilizados no estudo imunoistoquímico.....	38

## ABREVIATURAS E SIGLAS

CCR	Carcinoma de células renais
CGA	Campo de grande aumento
c-Jun	Proto-oncogene jun
CUL2	<i>Cullin 2</i>
EPO	Eritropoetina
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FH	<i>Fumarate hydratase</i>
Glut-1	<i>Glucose transporter 1</i>
GST	Glutathione S-transferase
GSTP1	Glutathione S-transferase pi-1
HIF	Fator induzido pela hipóxia
LOX	<i>Lysyl oxidase</i>
MIBG	<i>Metaiodobenzylguanidine</i>
MIM	<i>Mendelian Inheritance in Man.</i>
MMP1	<i>Matrix metalloproteinase 1</i>
NEM2	Neoplasia endócrina múltipla do tipo 2.
NF1	Neurofibromatose do tipo 1.
NF-KB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
PAI1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PFK1	<i>Phosphofructokinase-1</i>
PG1	Síndrome dos paraganglioma tipo 1
PG3	Síndrome dos paraganglioma tipo 3
PG4	Síndrome dos paraganglioma tipo 4
PHD2	<i>Egl-9 family hypoxia inducible factor 1</i>
pVHL	Proteína von Hippel-Lindau
Rbx1	<i>Ring-box 1</i>
SDHAF2	<i>Succinate dehydrogenase complex assembly factor 2</i>

SDHB	Succinato desidrogenase subunidade B
SDHC	Succinato desidrogenase subunidade C
SDHD	Succinato desidrogenase subunidade D
SDHx	<i>Succinato desidrogenase</i>
TGF $\alpha$	<i>Transforming growth factor alpha</i>
TSEL	Tumor do saco endolinfático
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VHL	von Hippel-Lindau.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1</b>	<b>HISTÓRICO</b> .....	<b>14</b>
<b>1.2</b>	<b>CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO</b> .....	<b>16</b>
<b>1.3</b>	<b>EPIDEMIOLOGIA</b> .....	<b>17</b>
<b>1.4</b>	<b>O GENE <i>VHL</i></b> .....	<b>17</b>
<b>1.5</b>	<b>A PROTEÍNA <i>VHL</i></b> .....	<b>18</b>
<b>1.6</b>	<b>TUMOROGÊNESE</b> .....	<b>20</b>
<b>1.7</b>	<b>MECANISMOS DE INATIVAÇÃO DO GENE <i>VHL</i></b> .....	<b>21</b>
<b>1.8</b>	<b>CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO</b> .....	<b>22</b>
<b>1.9</b>	<b>TESTES GENÉTICOS</b> .....	<b>23</b>
<b>1.10</b>	<b>FEOCROMOCITOMAS</b> .....	<b>24</b>
<b>1.10.1</b>	<b>Características gerais</b> .....	<b>24</b>
<b>1.10.2</b>	<b>Características clínicas</b> .....	<b>25</b>
<b>1.10.3</b>	<b>Achados laboratoriais</b> .....	<b>27</b>
<b>1.10.4</b>	<b>Exames de imagem</b> .....	<b>27</b>
<b>1.10.5</b>	<b>Características histológicas dos feocromocitomas</b> .....	<b>29</b>
<b>1.10.6</b>	<b>Determinação da malignidade em feocromocitomas</b> .....	<b>29</b>
<b>1.10.7</b>	<b>Manejo pré e perioperatório</b> .....	<b>31</b>
<b>1.10.8</b>	<b>Tratamento</b> .....	<b>31</b>
<b>1.11</b>	<b>Biologia da célula tumoral</b> .....	<b>32</b>
<b>1.11.1</b>	<b>A superfamília das enzimas Glutathione S-transferases</b> .....	<b>32</b>
<b>1.11.2</b>	<b>Apoptose celular e a via das caspases</b> .....	<b>33</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>GERAL</b> .....	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>ESPECÍFICOS</b> .....	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>DELINEAMENTO</b> .....	<b>36</b>

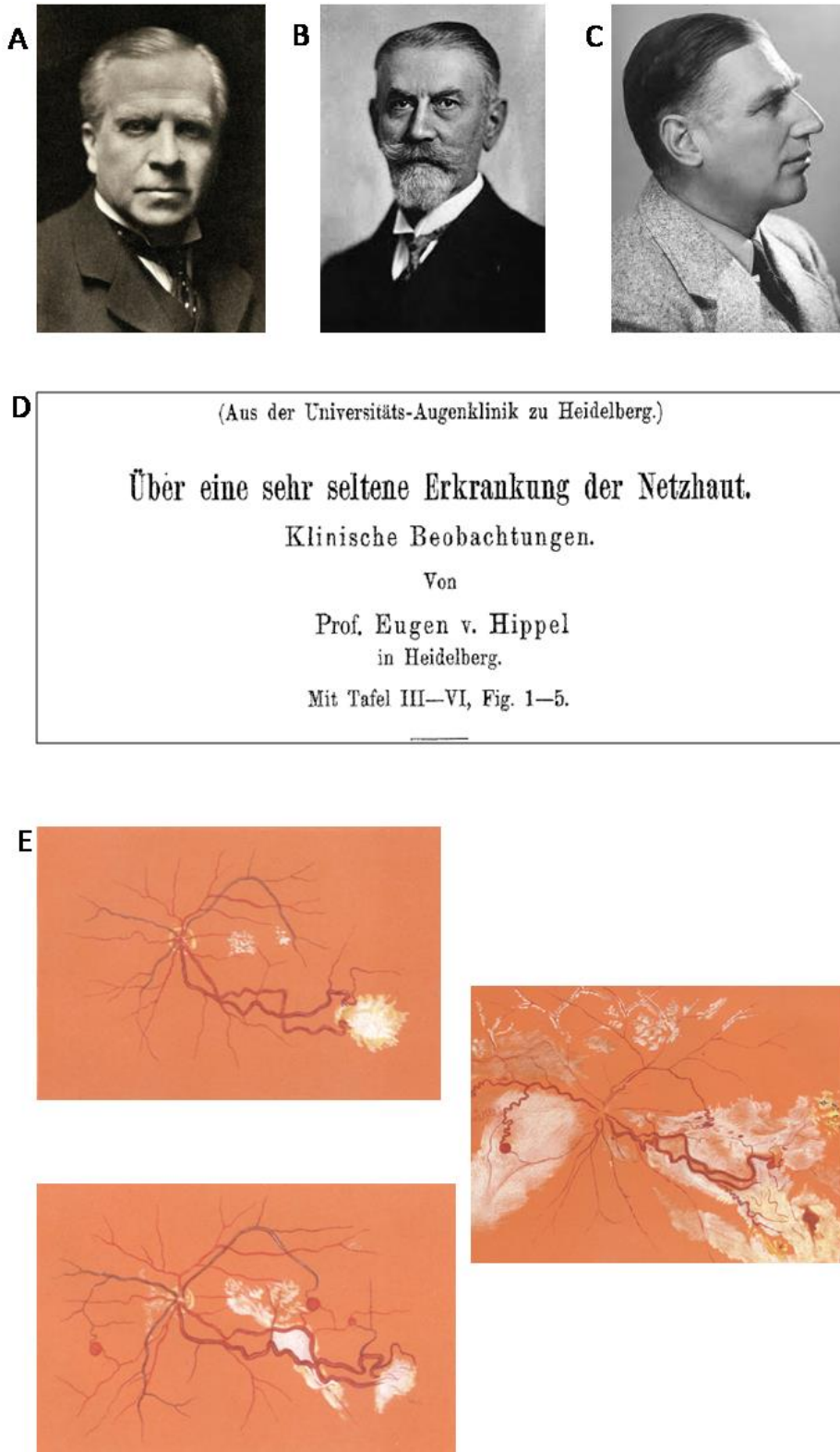
4.2	Avaliação dos critérios do PASS (Pheochromocytoma of the Adrenal gland Scaled Score).....	36
4.3	ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO.....	37
4.4	INTERPRETAÇÃO DAS LÂMINAS E MORFOMETRIA COMPUTADORIZADA.....	38
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	39
4.6	APROVAÇÃO NO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS (CEP) .....	39
5	RESULTADOS.....	40
5.1	Artigo 1- Von Hippel-Lindau disease: a single gene, several hereditary Tumors (Artigo de revisão).....	41
5.2	Artigo 2- Imunoexpressão de marcadores de apoptose, enzimas do metabolismo e proliferação celular em feocromocitomas no doença von Hippel-Lindau (Artigo original).....	52
5.2.1	RESULTADOS .....	52
5.2.2	DISCUSSÃO .....	55
5.2.4	TABELAS E FIGURAS .....	60
6	CONCLUSÃO.....	76
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	78
8	BIBLIOGRAFIA.....	79
9	APÊNDICES.....	85
9.1	Apêndice 1: Ficha para coleta de dados clínicos .....	85
9.2	Apêndice 2: Carta de aprovação do Comitê de ética em pesquisa .....	88
9.3	Apêndice 3: Ata de Defesa de Tese .....	90

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 HISTÓRICO

Foi Edward Treacher Collins, um oftalmologista britânico que em 1894 descreveu os primeiros casos de hemangioblastomas retinianos familiares em peças cirúrgicas provenientes de três enucleações oculares de dois irmãos. Na ocasião, Collins relatou que a proliferação da retina era constituída por vasos de fino calibre permeando espaços císticos. Sua conclusão foi que se tratava de uma nova doença hereditária e a designou de “nevo capilar” (MELMON; ROSEN, 1964). Posteriormente, Eugene von Hippel, um oftalmologista alemão estudou a aparência clínica e a progressão das lesões da retina (HIPPEL, 1904), com desenhos do fundo de olho por um período de três anos e com confirmação histológica de um espécime enucleado de um de seus pacientes, Otto Mayer. Ele citou Collins e nomeou as lesões como *angiomatosis retinae*. Quatro anos depois Mayer morreu e Brandt relatou o resultado da autópsia realizada (BRANDT, 1921), onde evidenciou tumores cerebrais, cistos e tumores renais, bem como cistos epididimais, pancreáticos e múltiplas lesões em costelas e coluna dorsal (LAMIELL; SALAZAR; HSIA, 1989; MELMON; ROSEN, 1964).

Arvid Lindau, um patologista sueco, em 1926 descobriu a associação entre a angiomatose da retina de von Hippel, os hemangioblastomas do sistema nervoso central e as lesões viscerais com base em uma revisão das características clínicas e patológicas de 16 de seus pacientes e 24 pacientes da literatura (LINDAU, 1927). Desde então a doença é conhecida como Doença de von Hippel-Lindau (VHL) (MIM 193300) em reconhecimento às descrições de seus autores (MELMON; ROSEN, 1964).



**Figura 1.** Imagens históricas. A-Edward Treacher Collins; B-Eugene von Hippel; C-Arvid Lindau; D-Artigo publicado pelo prof. von Hippel “Sobre uma doença muito rara da retina. Observações clínicas do Prof. Eugene v. Hippel em Heidelberg”; E-Illustrações do artigo. Fonte: (HIPPEL,1904)

## 1.2 CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO

Melmon e Rosen (MELMON; ROSEN, 1964) foram os primeiros a proporem os critérios clínicos para o diagnóstico da doença de VHL. A doença foi definida como a associação de um hemangioblastoma cerebelar com um dos seguintes tumores: hemangioblastoma retiniano, cisto pancreático, anormalidades renais ou epididimais. Eles reconheceram também a natureza hereditária da doença, com penetrância variável e expressão tardia. Eles propuseram expandir os critérios diagnósticos para incluir pacientes com apenas uma das lesões da doença na presença de hemangioblastomas do sistema nervoso central, em casos familiares. Os critérios diagnósticos clínicos da doença de VHL foram mais tarde refinados por Lamiell e cols. (LAMIELL et al., 1989; LONSER et al., 2003), incluindo com isso outros tumores viscerais associados.

Atualmente para o diagnóstico da doença utiliza-se achados genéticos e características clínicas. As lesões clínicas são:

1. hemangioblastoma do sistema nervoso central.
2. hemangioblastoma da retina.
3. tumores do saco endolinfático (TSEL).
4. carcinoma de células renais (CCR).
5. cistos renais múltiplos.
6. feocromocitoma, paraganglioma e / ou tumor glômico.
7. neoplasia neuroendócrina e / ou cistos múltiplos do pâncreas.
8. cisto do epidídimo e do ligamento redondo.

O diagnóstico da doença de VHL é feito se um indivíduo tiver a seguinte combinação de tumores e fatores genéticos / familiares:

1. pelo menos dois hemangioblastomas do sistema nervoso central.
2. pelo menos um hemangioblastoma do sistema nervoso central e outra manifestação descrita acima.
3. pelo menos uma das manifestações descritas acima, e uma mutação confirmada no gene VHL ou um parente de primeiro grau com a doença de VHL (BINDERUP et al., 2013; MAHER; NEUMANN; RICHARD, 2011).

Atualmente com os avanços dos testes genéticos, incluindo o sequenciamento do DNA, as mutações no gene VHL podem ser evidenciadas em 100% dos

pacientes; visto que o gene VHL é o único relacionado a síndrome, a detecção da mutação permite rastrear pacientes suspeitos mesmo antes das manifestações clínicas (ROCHA et al., 2003; STOLLE et al., 1998).

### **1.3 EPIDEMIOLOGIA**

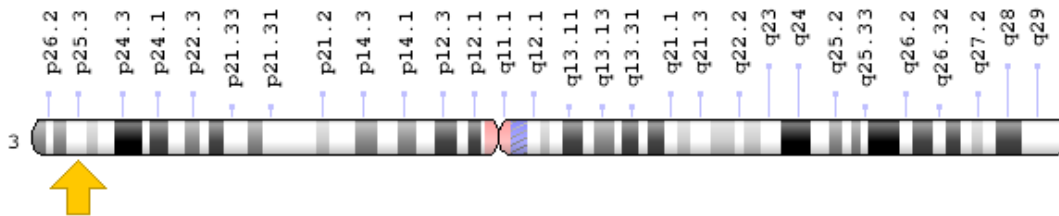
A incidência da doença de VHL varia entre 1:36000 e 1:45000 nascidos vivos (EVANS et al., 2010; MADDOCK et al., 1996). Normalmente, os primeiros sinais e sintomas da doença surgem na segunda década de vida. No momento da detecção, 50% dos pacientes são sintomáticos (POULSEN; BUDTZ-JORGENSEN; BISGAARD, 2010) e a primeira manifestação mais comum da doença é o hemangioblastoma cerebelar (MADDOCK et al., 1996). A penetrância da doença de VHL está completa aos 68 anos de idade (MAHER et al., 1990; POULSEN et al., 2010).

Atualmente, ao contrário da população geral, a expectativa de vida dos homens (59,4 anos) é significativamente maior que a do sexo feminino (48,4 anos) e apesar dos avanços na compreensão da fisiopatologia da doença e no tratamento, a expectativa de vida na doença de VHL continua a ser a mais baixa entre as síndromes de tumores hereditários (WILDING et al., 2012); os hemangioblastomas do sistema nervoso central e suas complicações e as metástases de carcinomas de células renais são as principais causas de mortalidade (ZHUANG et al., 2014).

### **1.4 O GENE VHL**

O gene da doença de VHL é um gene supressor de tumor localizado no cromossomo 3p25-3. O gene *VHL* foi isolado e sequenciado em 1993 através de um estudo de cooperação internacional (LATIF et al., 1993). Consiste de três exons e possui dois códons de início de transcrição, os quais resultam em um produto proteico, a proteína von Hippel-Lindau (pVHL), com 213 e 160 resíduos de aminoácidos (LATIF et al., 1993). A doença de VHL está em conformidade com o modelo de câncer hereditário originado de acordo com a teoria dos "dois eventos" de Knudson (KNUDSON; STRONG, 1972). Uma mutação germinativa resulta em um

alelo defeituoso em todas as células do corpo (primeiro evento), após isso, um segundo evento somático é necessário para a desenvolvimento dos tumores (perda de heterozigossidade) (KNUDSON, 1986).



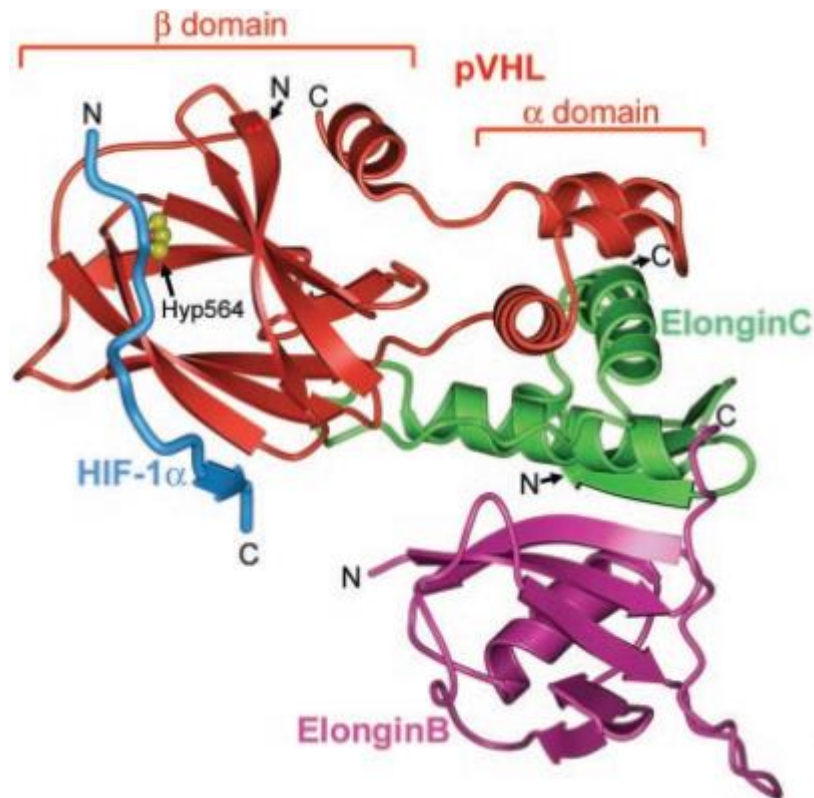
**Figura 2.** Localização cromossômica do gene *VHL*. Braço curto “p”, do cromossomo 3, na banda 25 e sub-banda 3. A localização molecular compreende entre os pares de base 10,141,635 até 10,153,670. Fonte: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/VHL#location>. Acessado em 20/03/2018.

## 1.5 A PROTEÍNA VHL

A doença de VHL ocorre quando as mutações de inativação ocorrem entre o codon 54 e o terminal carboxil, afetando ambas as isoformas da proteína. A pVHL é encontrada tanto no núcleo quanto no citoplasma celular e a movimentação entre esses dois compartimentos é essencial para sua função (LEE et al., 1999).

A proteína pVHL apresenta várias funções, dentre essas podemos citar a inibição da angiogênese, interrupção do ciclo celular, produção de matriz extracelular de fibronectina e proteólise (FREW; KREK, 2008). A pVHL forma um complexo multiproteico constituído juntamente com elonguina B, C, culina 2 (Cul2) e ring box-1 (Rbx1) denominado VCB-CUL2 (MIN et al., 2002) (figura 3).

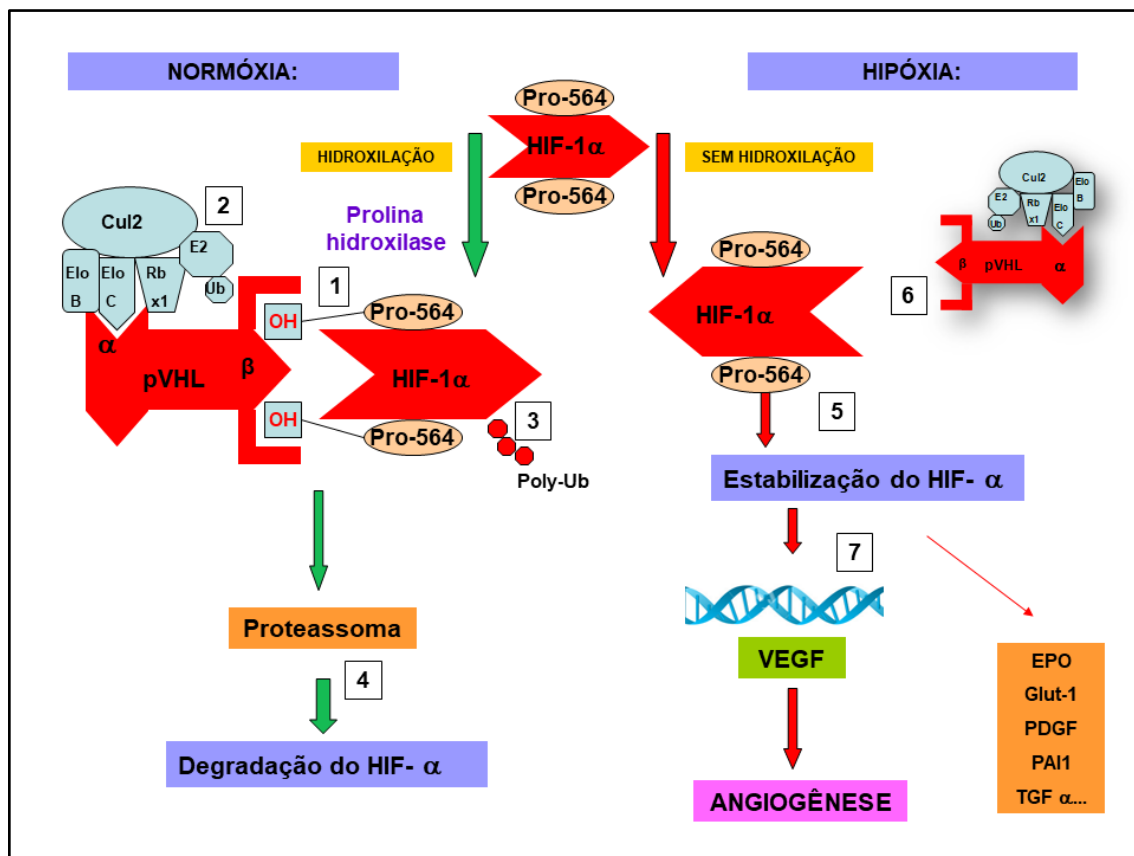
A principal função da pVHL é a marcação do fator induzido por hipóxia, (HIF) para a degradação no sistema proteassomal (LI; KIM, 2011). O HIF é um fator de transcrição heterodimérico constituído por uma subunidade alfa ( $\alpha$ ) controlada pelos níveis de oxigênio e uma subunidade beta ( $\beta$ ) constitutivamente expressa (WANG, G. L. et al., 1995).



**Figura 3.** Estrutura molecular do complexo pVHL-ElonginaB-ElonginaC. Hyp564, corresponde a um resíduo de prolina no domínio de degradação dependente de oxigênio na molécula de HIF-1 $\alpha$  (subunidade 1 $\alpha$  do fator induzido pela hipóxia) (MIN et al., 2002).

Em condições de normóxia, as subunidades HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  são degradadas através da via proteassoma-ubiquitina. A degradação ocorre após hidroxilação de resíduos de prolina com atuação das proteínas da família prolyl hidroxilases. A atuação dessas proteínas é dependente de oxigênio, de modo que em condições de hipóxia a hidroxilação do HIF é suprimida. Uma vez hidroxilados, as subunidades HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  são reconhecidas pelo complexo VHL/elonguinaB/elonguinaC/Cul2, e degradadas pelo proteassoma (KAELIN; RATCLIFFE, 2008).

Sob condições de hipóxia, o HIF- $\alpha$  torna-se estabilizado, heterodimeriza com HIF- $\beta$ , recruta coativadores à exemplo da acetil-transferase p300 e proteínas ligantes do AMPc, liga-se à elementos no DNA responsivos à hipóxia, e inicia a transcrição de genes dependentes do HIF (MOLE et al., 2001) figura 4.



**Figura 4.** Interação do complexo VCB-Cul2 com o fator induzido pela hipóxia (HIF). Quando o gene VHL encontra-se funcional, a proteína vhl (1) forma um complexo denominado VCB-cul2 (2) com o HIF responsável por sua degradação proteossomal após poli-ubiquitinação (3 e 4). Em situações em que o gene encontra-se mutado (6) ou em estados hipóxicos a formação do complexo não ocorre. O HIF torna-se estabilizado (5), transloca-se para o núcleo (7), onde interagindo com outros fatores indutores induz a expressão de diversos genes responsáveis pela progressão tumoral, a exemplo dos relacionados à angiogênese (VEGF) e diminuição da apoptose. Fonte: próprio autor.

## 1.6 TUMOROGÊNESE

A via pVHL / HIF tem sido implicada na tumorigênese dos feocromocitomas, dos CCR (KRIEG et al., 2000), hemangioblastomas da retina e do SNC (VORTMEYER et al., 2006) e em tumores neuroendócrinos do pâncreas (PERIGNY et al., 2009). O papel do HIF na patogênese dos feocromocitomas é descrita há longo tempo, uma vez que a via do HIF apresenta-se disfuncional nesses tumores. A maioria dos feocromocitomas e paragangliomas hereditários estão relacionados à via de sinalização de hipoxia, principalmente através das mutações nos genes *VHL*, *PHD2*, *FH*, *SDHx* e *SDHAF2* (JAFRI; MAHER, 2012). A inativação da pVHL leva ao

aumento da expressão e à estabilização de proteínas ativadas pelo HIF em tumores relacionados à doença de VHL (KRIEG et al., 2000). O HIF pode levar à tumorigênese através da regulação positiva de mais de 50 genes, incluindo genes de fatores de crescimento (*TGF*, *PDGF*), angiogênese (*VEGF*), metabolismo da glicose (*GLUT1*, *PFK1*) e genes que afetam o microambiente do tumor (*LOX*, *MMP1*) (WANG, V. et al., 2005). A perda de atividade da pVHL pode levar a tumorigênese independente do HIF, através da regulação da apoptose (inativação da p53 e aumento da atividade NF-κB), estabilização de microtúbulos e regulação da matriz extracelular (LI; KIM, 2011).

### **1.7 MECANISMOS DE INATIVAÇÃO DO GENE *VHL***

A maioria dos pacientes com VHL herda uma mutação da linhagem germinativa de um dos pais afetados e um alelo do tipo selvagem do pai não afetado (MADDOCK et al., 1996). As mutações da linhagem germinativa mais comum são as mutações do tipo “missense” (27-38%) resultantes da substituição de um par de bases por outro, levando à formação de um codon que codifica um aminoácido diferente do original e as mutações do tipo “nonsense” (13-27%) que resultam da substituição de um par de bases por outro, levando à introdução de um codon finalizador. Grandes (9-20%) ou microdeleções (10%), bem como rearranjos (25%), representam a maioria das mutações da linha germinativa restantes. As inserções e as mutações em locais de “splice” são raras (ROCHA et al., 2003; STOLLE et al., 1998). Os eventos de mutação somática, reconhecidos como o “segundo evento” são freqüentemente perda alélica (49%) ou hipermetilação (35%) do alelo de tipo selvagem (PROWSE et al., 1997).

## 1.8 CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

Há estreita correlação entre fenótipo e genótipo na doença de VHL, visto que as manifestações clínicas da doença dependem do tipo de mutação (NORDSTROM-O'BRIEN et al., 2010).

A doença de VHL do tipo 1 é provavelmente causada por mutações que levam a uma interrupção grave da atividade protéica, incluindo deleções, mutações sem sentido e outras microdeleções / inserções (CHEN, F. et al., 1995). Estudos subsequentes demonstraram que grandes deleções no gene (exon 1 somente, ou exons 1, 2 e 3) conferiam baixa probabilidade de desenvolvimento de carcinoma de células renais, sendo assim subdividido em tipo 1B (MCNEILL et al., 2009).

A doença do tipo 2 está associada a mutações do tipo “*missense*” levando a substituições de aminoácidos na superfície da proteína (ONG et al., 2007). As famílias com a doença VHL tipo 2 da região das Florestas Negras da Alemanha compartilhavam um risco baixo de desenvolvimento de CCR subdivididas em tipo 2A. Essas 16 famílias foram descobertas por compartilhar uma mutação “*missense*” distinta (p.Tyr169His) do gene *VHL* (BRAUCH et al., 1995). As mutações “*missense*” do codon 167 (por exemplo, p. Arg167Gln ou p.Arg167Trp) podem levar a um fenótipo VHL tipo 2B com alto risco de CCR (60% aos 60 anos) e feocromocitomas (82% aos 50 anos) (MAHER et al., 1996). Raras famílias com apenas feocromocitomas apresentaram mutações “*missense*” específicas nos codons 238, 259 e outras mutações pontuais raras, inicialmente diagnosticadas com neoplasia endócrina múltipla (NEM) de tipo 2, foram reclassificadas como doença de VHL tipo 2C (NEUMANN et al., 1995) (quadro1).

**Quadro 1.** Correlação genótipo-fenótipo na doença de von Hippel-Lindau.

Fenótipo	Frequência		Tipo de mutações mais comuns
	Feocromocitoma	Carcinoma renal	
Tipo 1A	-	Alto	Mutações do tipo “nonsense” e deleções, perda total da atividade da proteína.
Tipo 1B	-	Baixo	
Tipo 2A	Alto	Baixo	Mutações do tipo “missense”, atividade da proteína residual.
Tipo 2B	Alto	Alto	
Tipo 2C	Única manifestação		

Fonte: adaptado de Crespigio (2018).

Os feocromocitomas seguido dos tumores neuroendócrinos pancreáticos correspondem aos tumores endócrinas mais comuns na doença de VHL entretanto, outros tumores mais raros podem estar associados à síndrome, por exemplo os tumores neuroendócrinos de células claras da ampola de Vater e da vesícula biliar, tumor neuroendócrino da célula D duodenal funcionante, tumor neuroendócrino do ducto biliar comum, adenoma hipofisário agressivo produtor de prolactina/hormônio do crescimento e adenomas da paratireóide com hiperparatireoidismo (CASSOL; METE, 2015).

## 1.9 TESTES GENÉTICOS

O teste genético é realizado quando a doença de VHL é suspeitada em um paciente em decorrência da apresentação clínica ou história familiar (BINDERUP et al., 2013). Após a obtenção de um histórico médico e história familiar, um exame clínico deve ser realizado antes do teste de mutação. Amostras de sangue periférico são obtidas para testes de mutação. Para identificar casos de mosaicismo, o sangue periférico do pai afetado é preferido. Para detectar duplicações e deleções do gene, utiliza-se a técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), com a utilização de sonda marcada com fluorocromo é capaz de fazer uma análise quantitativa do número de cópias do segmento de DNA estudado (HES et al., 2007). Para análise das mutações, o sequenciamento do gene *VHL* é realizado incluindo os exons e os limites entre introns-exons e as variações de seqüência são comparadas com as 377 mutações intragênicas associadas à doença de VHL (SCHMIDT;

LINEHAN, 2014). Quando não é possível identificar uma mutação no sangue periférico, o estudo do DNA de outros tecidos pode ser necessário para confirmar o diagnóstico (BINDERUP et al., 2013).

## **1.10 FEOCROMOCITOMAS**

### **1.10.1 Características gerais**

Os feocromocitomas e os paragangliomas extra-adrenais são tumores originados de células endócrinas derivadas da crista neural. De acordo com a OMS, o termo feocromocitoma deve ser utilizado para tumores adrenais enquanto em outras localizações é denominado paraganglioma extra-adrenal. Estudos genéticos demonstram que a regra dos 10% (10% familiar, 10% extra-adrenal e 10% maligno), não é mais correta em relação aos feocromocitomas, sendo que mutações germinativas relacionadas à casos familiares estão presentes em até 20% dos pacientes aparentemente classificados como esporádicos (NEUMANN et al., 2002). Dentre as síndromes hereditárias relacionadas ao desenvolvimento dos feocromocitomas podemos citar a Neoplasia Endócrina Múltiplas, a doença de von Hippel-Lindau, a Neurofibromatose do tipo I e mais recentemente as síndromes relacionadas a mutações no gene da enzima succinato-desidrogenase. Há correlação genótipo/fenótipo entre os feocromocitomas presentes nas diversas síndromes com relação à malignidade, distribuição e subtipo de catecolamina secretada (quadro 2) (PILLAI et al., 2016).

**Quadro 2.** Síndromes genéticas relacionadas a feocromocitomas.

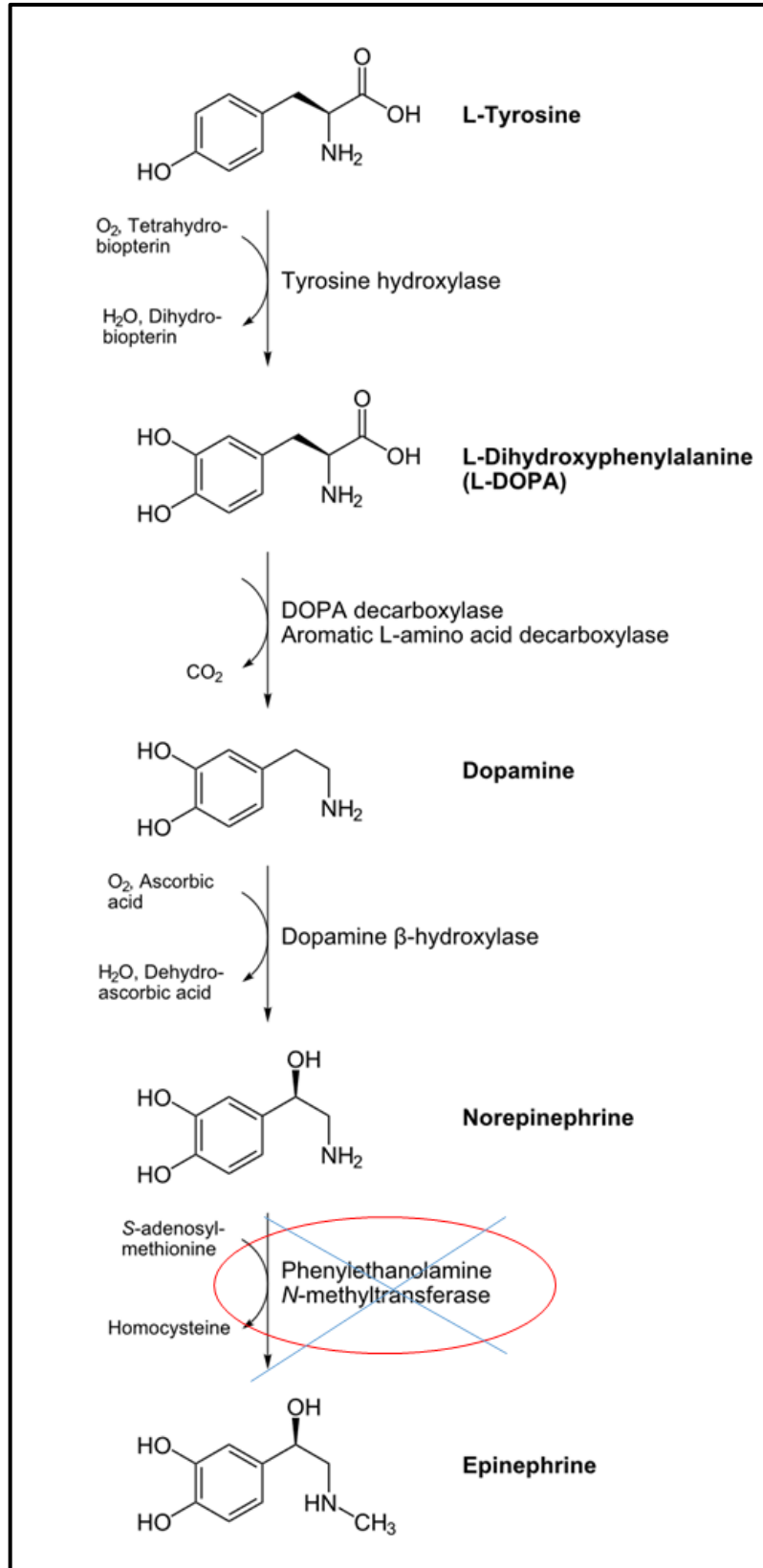
<b>Síndrome</b>	<b>Gene envolvido</b>	<b>Risco de malignidade</b>	<b>Localização</b>	<b>Catecolamina secretada</b>
<b>VHL</b>	VHL (3p25-26)	baixo (1-10%)	adrenal	Noradrenalina
<b>NEM2</b>	RET (10q11)	baixo (1-10%)	adrenal	Adrenalina
<b>NF1</b>	NF1 (17q11)	baixo (1-10%)	adrenal	adrenalina
<b>PG1</b>	SDHD (11q23)	baixo (1-10%)	extra-adrenal	dopam/noradrenalina
<b>PG3</b>	SDHC (1q21-23)	baixo (1-10%)	extra-adrenal	dopam/noradrenalina
<b>PG4</b>	SDHB (1p36)	alto (>50%)	extra-adrenal	dopam/noradrenalina

VHL: síndrome de von Hippel-Lindau; NEM2: neoplasia endócrina múltipla do tipo 2; NF1: neurofibromatose do tipo 1; PG1, PG3, PG4: Síndromes dos paragangliomas tipos 1, 3 e 4 (PILLAI et al., 2016).

Os paragangliomas (feocromocitomas) presentes na doença de VHL surgem mais comumente na medula da adrenal e são encontrados em até 16% dos pacientes, podendo ser bilaterais e ocasionalmente multifocais (LONSER et al., 2003). Os paragangliomas, incluindo os originados no corpo carotídeo, no “*glomus jugulare*” e nos tecidos peri-aórticos, são raros na doença de VHL e são mais relacionados à mutação no gene da enzima succinato desidrogenase (SDH) ou a tumores esporádicos (NEUMANN et al., 2002). Em pacientes com a doença de VHL, a idade de diagnóstico do feocromocitoma varia de 5-64 anos, ocorrendo mais precocemente quando comparada a outras síndromes hereditárias (JOCHMANOVA et al., 2017) e raramente (1-5%) se transformam em tumores malignos (BAUSCH et al., 2014).

### 1.10.2 Características clínicas

Os feocromocitomas associados à doença de VHL são noradrenérgicos devido a diminuição da expressão da enzima fenil-etanolamila-n-metil-transferase responsável pela conversão da noradrenalina em adrenalina. Como resultado, os pacientes podem apresentar aumento nos valores plasmáticos e urinários de normetanefrinas (figura 5) (METE, 2015; METE et al., 2014). A norepinefrina produzida em excesso é responsável pelos sintomas clínicos como hipertensão, palpitações, taquicardias, dores de cabeça, sudorese, palidez e náuseas paroxísticas ou sustentadas (LENDERS et al., 2005).



**Figura 5.** Síntese de catecolaminas (METE et al., 2014).

### 1.10.3 Achados laboratoriais

As medidas das catecolaminas urinárias e plasmáticas, metanefrinas urinárias (normetanefrina e metanefrina) e ácido vanilmandélico urinário (VMA) têm sido utilizadas para o rastreamento de pacientes com suspeita de feocromocitomas. O diagnóstico é estabelecido quando há elevação dos níveis de metanefrinas fracionadas plasmáticas ou metanefrinas urinárias fracionadas em 24 horas (Lenders et al., 2014).

A norepinefrina é a catecolamina predominantemente sintetizada nos gânglios simpáticos. A epinefrina é sintetizada na medula da adrenal após a metilação da norepinefrina pela enzima N-metiltransferase, a qual é restrita às células cromafins da medula e é induzida pelo cortisol sintetizado pelo córtex (Galati et al., 2015).

As catecolaminas sintetizadas são inativadas pela enzima catecol-O-metiltransferase em normetanefrina e metanefrina livres, as quais circulam no plasma em baixas concentrações, apresentando meia vida curta, sofrendo conjugação com sulfatos após atuação das isoenzimas sulfotransferases (Schulz et al., 2004). Ao contrário dos metabólitos livres, as metanefrinas sulfatadas estão presentes em quantidades maiores (cerca de 20-40x), possuem meia vida mais longa e são eliminadas pela excreção urinária (NIH, 2002).

A elevação das metanefrinas plasmáticas, superior a 4 vezes o limite superior da referência, está associada a probabilidade de 100% de presença de feocromocitoma, uma vez que tal aumento implica em excesso de epinefrina, localizando o tumor na medula da adrenal (PAMPORAKI et al., 2013).

### 1.10.4 Exames de imagem

Os exames de imagem são utilizados para localizar o tumor uma vez que há evidência bioquímica para feocromocitomas. As diferentes modalidades dos exames de imagem são complementares para o diagnóstico desses tumores (LEUNG et al., 2013). A tomografia computadorizada com contraste é sugerida como modalidade inicial, sendo um método sensível na detecção de feocromocitomas adrenais e extra-adrenais abdominais. É necessário bloqueio adrenérgico antes da injeção de

contraste para prevenir uma crise hipertensiva ou arritmia cardíaca secundárias à liberação de catecolaminas. Nos exames de tomografia, os feocromocitomas apresentam-se como massas bem delimitadas, com atenuação semelhante a do tecido muscular, sendo comuns áreas císticas e hemorrágicas em tumores de grande tamanho (FARRUGIA et al., 2017).

A glândula adrenal pode ser identificada em todos os pacientes com o exame de ressonância nuclear magnética (RNM), sendo que a realização após a injeção de contraste com utilização de gadolínio possui sensibilidade similar à TC (90-100%) para detectar feocromocitomas abdominais. Os feocromocitomas exibem alta intensidade de sinal nas sequências de imagem em T2, apresentando-se com intensa captação de contraste (ELSAYES et al., 2004). A RNM é muitas vezes a modalidade de imagem preferida, uma vez que o bloqueio adrenérgico utilizado para a realização de tomografias não é necessário (LENDERS et al., 2005).

Em virtude da baixa especificidade das imagens obtidas através dos exames de TC e RNM (70%-80%), pode-se utilizar os testes de imagens funcionais, e dentre os marcadores utilizados podemos citar  $^{131}\text{I}$ - e  $^{123}\text{I}$ -metaiodobenzylguanidina (MIBG),  $^{111}\text{In}$ -pentetretotídeo,  $^{18}\text{F}$ -fluorodopamina,  $^{18}\text{F}$ -fluorodihydroxyphenylalanina,  $^{18}\text{F}$ -fluoro-2-deoxy-D-glicose,  $^{131}\text{I}$ - e  $^{123}\text{I}$ -metaiodobenzylguanidina. Os testes de imagens funcionais utilizando MIBG são os mais comumente utilizados na avaliação dos feocromocitomas; a MIBG é um análogo da norepinefrina que localiza o tecido simpático da medula da adrenal (HAVEKES et al., 2008). O  $^{111}\text{In}$ -pentetretotídeo é um análogo da somatostatina e uma vez que os feocromocitomas apresentam receptores para somatostatina, tal substância pode ser utilizada como marcador complementar para o diagnóstico (LEUNG et al., 2013). As características bioquímicas dos feocromocitomas permitem que várias modalidades de técnicas de imagens funcionais associadas a TC e RNM, possam contribuir em conjunto para o diagnóstico e localização dessas neoplasias (TIMMERS; TAIEB; PACAK, 2012).

### **1.10.5 Características histológicas dos feocromocitomas**

Os paragangliomas simpáticos e parassimpáticos e os feocromocitomas apresentam características morfológicas semelhantes, apresentando uma variedade de padrões morfológicos e citológicos. Os paragangliomas simpáticos e os feocromocitomas são constituídos por células cromafins com citoplasma basofílico enquanto os tumores parassimpáticos são formados por células com citoplasma mais claro, denominadas células “chefes”. Semelhante à outros tumores endócrinos, alterações oncocíticas, células com citoplasma alongado, padrão fusocelular, e degeneração lipídica podem também ser encontradas. O padrão morfológico clássico descrito na literatura como “zellballen”, constituído por ninho uniforme de células poligonais raramente está presente nos feocromocitomas onde frequentemente observamos arquitetura difusa, células fusocelulares, ninhos grandes e pequenos com a presença de atipias citológicas pronunciada (DELELLIS, 2004).

Os feocromocitomas presentes na doença de von Hippel-Lindau geralmente apresentam-se com cápsula espessa, estroma mixóide e hialinizado e células redondas com citoplasma claro e anfófilico, ausência de glóbulos hialinos intracitoplasmáticos, degeneração lipídica e ausência de atipias nucleares e mitoses (LINNOILA et al., 1990; RAMSAY et al., 1987).

### **1.10.6 Determinação da malignidade em feocromocitomas**

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a malignidade em feocromocitomas é definida com a presença de metástases e não a invasão local. Apesar de alto grau de letalidade, a invasão local é um preditor fraco de metástase. A metástase deve ser definida como a presença de tecido paraganglionar onde o mesmo não está normalmente presente, à exemplo de fígado e ossos, evitando assim confusão com o diagnóstico radiológico de tumores primários múltiplos (DELELLIS, 2004).

Determinar se um feocromocitoma é maligno antes da ocorrência de metástase é extremamente difícil e um dos grandes obstáculos é que feocromocitomas raramente metastatizam e quando o fazem isso ocorre em um longo período de tempo, dificultando com isso a elaboração de estudos de coorte.

Até o presente momento nenhuma característica histológica isolada é capaz de identificar o potencial metastático dos feocromocitomas. Algumas evidências demonstram que sistemas de escore podem ajudar a discriminar os tumores que apresentam este potencial. Dentre esses podemos citar o estudo de Linnoila e colaboradores que relacionou a maior probabilidade de malignidade com tumores que apresentavam localização extra-adrenal, nodularidade, presença de necrose e ausência de glóbulos hialinos (LINNOILA et al., 1990). Em 2002, Thompson propôs o sistema PASS (*"pheochromocytoma of adrenal scaled score"*) relacionando achados microscópicos com o potencial de malignidade. Nesse escore, tumores com 4 pontos ou mais apresentariam maior risco de malignidade (THOMPSON, 2002).

O estudo imunoistoquímico tem sido utilizado como técnica auxiliar para avaliar risco de malignidade em feocromocitomas. O marcador mais utilizado tem sido o Ki-67, realizado em blocos de parafina utilizando o anticorpo monoclonal MIB-1. O antígeno está expresso no núcleo durante as fases G1, S, G2 e M do ciclo celular sendo capaz de identificar as células em proliferação (AUGUST et al., 2004). As opiniões são divergentes quanto a utilização desse marcador, as discrepâncias entre os estudos que utilizaram o índice de proliferação pode ter resultado de diferentes protocolos da maneira de contagem a exemplo de contagens em campos aleatórios, campos consecutivos e campos com maior marcação. A expressão nuclear da proteína p53 está presente em alguns feocromocitomas malignos, entretanto não tem sido relacionada à evolução clínica dos pacientes (LAM et al., 2001; THOMPSON, 2002).

Em 2005, um grupo japonês propôs um sistema de escore para feocromocitomas e paragangliomas levando em consideração características histológicas, imunohistoquímicas e bioquímicas capazes de predizerem o potencial metastático e o prognóstico de pacientes com tumores que metastatizaram (KIMURA et al., 2005).

### **1.10.7 Manejo pré e perioperatório**

Em pacientes com doença de VHL, os feocromocitomas podem levar a complicações induzidas pela secreção de catecolaminas, potencialmente fatais, incluindo crises hipertensivas, arritmias cardíacas, edema pulmonar e isquemia miocárdica / infarto. As cirurgias eletivas nesses pacientes podem necessitar de bloqueio  $\alpha$ -adrenérgico pré-operatório. O bloqueio pode ser alcançado com fenoxibenzamina (bloqueador adrenérgico  $\alpha$  não seletivo), prazosina, doxazosina ou urapidil por 10 a 14 dias. Em pacientes com taquiarritmias, um bloqueador  $\beta$  pode ser adicionado após alguns dias de bloqueio  $\alpha$ . No pós-operatório, os pacientes com bloqueio adrenérgico são monitorados quanto à hipotensão e hipoglicemia (CHEN, H. et al., 2010).

### **1.10.8 Tratamento**

A adrenalectomia é o tratamento preconizado para os feocromocitomas. Dentre as diversas modalidades podemos citar a adrenalectomia transperitoneal aberta, transperitoneal laparoscópica lateral, retroperitoneal laparoscópica posterior e a cirurgia robótica (Pavan et al., 2017).

A cirurgia laparoscópica deve ser considerada primeira opção para o tratamento de feocromocitomas. Ambas as vias transperitoneal e retroperitoneal para a cirurgia laparoscópica são seguras, a depender da experiência e treinamento do cirurgião. As cirurgias laparoscópicas com acesso único e a adrenalectomia robótica podem ser consideradas como técnicas alternativas mas requerem ainda estudos futuros (BALL et al., 2016).

Chai e cols. (2014) comparando as diferentes técnicas através de revisão sistemática, conclui que a adrenalectomia retroperitoneal posterior laparoscópica foi mais efetiva que a transperitoneal laparoscópica, em reduzir o tempo cirúrgico e tempo de internação, não havendo evidências de que a cirurgia robótica seja superior à laparoscópica.

Em pacientes com a doença de VHL, as adrenalectomias parciais podem ser realizadas por laparoscopia, preservando a função adrenal, sendo que os pacientes precisam de acompanhamento em longo prazo para avaliar possível recorrência tumoral na glândula adrenal remanescente (CHEN, H. et al., 2010).

## **1.11 BIOLOGIA DA CÉLULA TUMORAL**

### **1.11.1 A superfamília das enzimas Glutathione S-transferases**

As glutathione s-transferases (GST) são enzimas multifuncionais, solúveis e associadas à membrana celular, cuja principal função metabólica é a transferência da glutathione (GSH) para uma variedade de moléculas genotóxicas, gerando com essa reação um produto menos tóxico e hidrossolúvel, favorecendo a exportação do mesmo para fora da célula, e contribuindo assim com prevenção de dano ao DNA e integridade celular. Os produtos da reação com a glutathione geralmente são exportados por transportadores denominados proteínas de resistência à multidrogas e então processados à ácidos mercaptúricos e excretados na urina e na bile (JOSEPHY, 2010).

As glutathionas s-transferases humanas incluem 8 classes de enzimas, designadas pelas letras do alfabeto grego Alfa ( $\alpha$ ), Mu ( $\mu$ ), Pi ( $\pi$ ), Theta ( $\theta$ ), Kappa ( $\kappa$ ), Zeta ( $\zeta$ ), Omega ( $\Omega$ ) e Sigma ( $\Sigma$ ) que são assim classificadas de acordo com a especificidade aos substratos, sensibilidade à inibidores, ponto isoelétrico, reatividade imunológica cruzada e a composição e sequência dos aminoácidos (TERRIER et al., 1990). A enzima glutathione s-transferase  $\pi$  (GSTP1) é expressa na maioria das células, em especial nas do trato urinário, digestivo e respiratório correlacionando assim com seu importante papel na detoxificação. O aumento da expressão de GSTP1 é detectado em neoplasias da mama, cólon, estômago, pâncreas, bexiga, pulmão, dentre outros, estando associado ao aumento da atividade de detoxificação, protegendo assim as células tumorais de drogas citostáticas e citotóxicas (JARDIM et al., 2012). Estudos têm demonstrado diminuição da expressão gênica e dos níveis protéicos da GSTP1 em tumores poucos diferenciados da cavidade oral (MA et al., 2015). A GSTP1 também está

envolvida na regulação da morte celular interagindo com componentes de vias de apoptose, a exemplo de c-Jun e ERK1/ERK. Alterações epigenéticas, de hipermetilação do promotor do gene, levando à inativação do mesmo, têm sido descritas em diversos tipos de tumores a exemplo de cânceres de próstata, mama, fígado e hematológicos (SCHNEKENBURGER; KARIUS; DIEDERICH, 2014).

### **1.11.2 Apoptose celular e a via das caspases**

A apoptose é uma forma de morte celular geneticamente regulada com importante papel na eliminação de células infectadas ou danificadas. Defeitos na apoptose podem contribuir ao desenvolvimento de cânceres (WONG, 2011).

Diversos estímulos intra e extracelulares podem desencadear apoptose resultando na ativação de um grupo de proteases denominadas caspases. Aproximadamente 14 caspases foram descritas em mamíferos, sendo divididas em dois grupos, de acordo com seu papel na apoptose: as caspases iniciadoras, 8, 9 e 10 que são ativadas pelos sinais apoptóticos e levam à ativação das caspases efetoras, 3, 6 e 7, responsáveis pela degradação de múltiplas proteínas celulares e pelas alterações morfológicas vistas na apoptose como vesículas apoptóticas, condensação da cromatina e fragmentação do DNA (DEVARAJAN et al., 2002).

A caspase-3 apresenta importante papel tanto na via de apoptose intrínseca envolvendo receptores celulares de morte iniciada pela caspase 8 como a via mitocondrial envolvendo a caspase 9, servindo como um marcador de morte celular programada (STRASSER; CORY; ADAMS, 2011).

Estudos apresentam resultados divergentes quanto à expressão gênica e protéica da caspase-3, segundo Devarajan (2002), a diminuição dos níveis de caspase-3 podem representar importante mecanismo de sobrevivência de células de câncer de mama. Donovan (2003) demonstrou que a expressão de caspase-3 foi maior nos casos de câncer de mama quando comparados a lesões benignas e ao tecido normal.

## 2 JUSTIFICATIVA

A doença de von Hippel-Lindau é uma síndrome rara, com expressão genotípica variável que resulta em diferentes fenótipos e afeta múltiplos órgãos e sistemas com o desenvolvimento de tumores malignos e benignos. Cerca de 20% dos casos se originam por mutações “de novo” não relacionadas a casos familiares. A alta taxa de mortalidade e morbidade dos indivíduos portadores desta síndrome tumoral justifica a relevância da investigação dos fatores genéticos envolvidos na patogenia do feocromocitoma.

Poucos dados são encontrados na literatura a respeito das características morfológicas e imunoistoquímica dos feocromocitomas na doença de VHL em comparação aos casos desses tumores em indivíduos sem a doença. Recentes estudos demonstraram ser possível identificar mutações germinativas em genes relacionados ao desenvolvimento dos feocromocitomas, como os genes da succinato desidrogenase (SDHB, SDHC e SDHD) através do estudo de imunoistoquímica, no qual os tumores esporádicos seriam marcados positivamente e os hereditários apresentariam ausência da expressão proteica (LLOYD, 2011).

Apesar da apresentação benigna dos feocromocitomas em mais de 80% dos casos, uma proporção significativa cursa com metástases à distância e até então não foi identificado marcador efetivo *à priori* capaz de detectar o risco de recorrência e de malignidade desses feocromocitomas (HARARI; INABNET, 2011). Não há relatos na literatura envolvendo a expressão da GSTP1 em feocromocitomas. Portanto, tanto a sua detecção quanto a sua caracterização dentro do contexto clínico contribuirão para o aperfeiçoamento do conhecimento sobre a carcinogênese da medula adrenal na doença de VHL.

A caspase-3 é um importante componente nas vias de apoptose, sendo um marcador de morte celular programada, resultados na literatura são divergentes quanto aos níveis de expressão em diferentes tipos de tumores (OLSSON; ZHIVOTOVSKY, 2011). Não há relatos na literatura de estudo de casos comparando os níveis dessa protease entre casos esporádicos e familiares de feocromocitomas.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL**

Correlacionar as características clínicas e de biomarcadores em feocromocitomas presentes na síndrome de VHL e em casos esporádicos.

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

1. Descrever as características clínicas de pacientes portadores da doença de von Hippel-Lindau com feocromocitomas, comparando-os aos casos de feocromocitomas esporádicos.
2. Estudar um grupo de tumores operados do tipo feocromocitoma de pacientes portadores de VHL, comparativamente a feocromocitomas esporádicos, a fim de classificar os tumores conforme os critérios histológicos da escala de escore do feocromocitoma da glândula adrenal.
3. Avaliar através de imunoistoquímica a expressão de proteínas relacionadas à maior agressividade tumoral, como a proteína p53 e o índice de proliferação celular Ki-67
4. Avaliar a taxa de apoptose celular com estudo imunoistoquímico através da imuno-expressão da proteína caspase-3.
5. Avaliar a imunoexpressão da enzima antioxidante GSTP1.
6. Avaliar a proliferação vascular através do estudo imunoistoquímico para a proteína endotelial CD34.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 DELINEAMENTO**

Realizou-se um estudo observacional, descritivo e transversal. Inicialmente buscou-se nos registros do serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário do Norte do Paraná, o diagnóstico de feocromocitomas, no período entre janeiro de 2000 e dezembro de 2017, sendo identificados 10 pacientes. Os dados clínicos (idade, sexo, diagnóstico, presença de síndrome, hipertensão arterial, padrão da secreção de catecolamina, ocorrência ou não de metástase) e resultados dos exames anatomopatológicos foram coletados retrospectivamente a partir da consulta aos prontuários médicos no Serviço de Arquivos Médicos (SAME) e do livro de registros anatomopatológicos do HU/UEL.

### **4.2 AVALIAÇÃO DOS CRITÉRIOS DO PASS (PHEOCHROMOCYTOMA OF THE ADRENAL GLAND SCALED SCORE)**

O risco de malignidade foi avaliado através dos critérios do PASS. Para a quantificação, foi utilizado cortes dos tecidos tumorais presentes em blocos em parafina, com espessura de 4µm, corados pelo método tradicional de hematoxilina-eosina e analisados ao microscópio óptico, classificando-os conforme os parâmetros morfológicos descritos abaixo:

<b>Score do PASS</b>	<b>Pontos</b>
Invasão vascular	1
Invasão capsular	1
Acentuado pleomorfismo nuclear	1
Hipercromasia	1
Invasão do tecido adiposo periadrenal	2
Crescimento difuso	2
Necrose	2
Alta celularidade	2
Células fusiformes	2
Monotonia celular	2
Mais que 4 mitoses/10 CGA	2
Mitoses atípicas	2

De 0 a 3 pontos tumores benignos, maior ou igual a 4 pontos tumores com potencial de malignidade

### **4.3 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO**

O estudo imunoistoquímico dos tumores emblocados em parafina foi realizado em cortes histológicos de 4µm de espessura, suspensos em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão, com as lâminas imersas em solução tampão EDTA a 4% durante 1 minuto e 12 segundos, após o que se resfriaram as lâminas em temperatura ambiente por pelo menos 20 minutos. Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se o peróxido de hidrogênio a 10%, imergindo as lâminas durante 10 minutos e após lavagem em solução salina tamponada de fosfatos (PBS, pH 7,4). Foram utilizados anticorpos primários (quadro 3), diluídos em soro albumina bovina (BSA) a 1%, sendo

incubados pernoite em câmara úmida a 4%. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS por 30 minutos. Para o anticorpo secundário, utilizou-se o polímero (Polydector, Biosb, R205) por 30 minutos. A reação final foi revelada imergindo as lâminas em 3,3-diaminobenzidina tetra-hidroclorido (DAB) e posteriormente contracoradas pela hematoxilina de Harris por 5 minutos, desidratadas em concentrações crescentes de álcool, imersas em xilol e montadas utilizando lamínulas. Como controle positivo, utilizamos tecido de amígdala; para controle negativo, utilizou-se a omissão do anticorpo primário.

**Quadro 3.** Anticorpos utilizados no estudo de imunoistoquímica

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Empresa</b>	<b>Diluição</b>	<b>Tampão de recuperação</b>
Cromogranina	DAK-A3	DAKO	1/200	EDTA
GSTP1	3F2C2	Santa Cruz	1/100	EDTA
CD34	QBEnd10	DAKO	1/100	EDTA
Ki-67	MIB-1	DAKO	1/200	EDTA
p53	D07	Cell marque	1/200	EDTA
Caspase-3	ab4051	Abcam	1/100	EDTA

#### **4.4 INTERPRETAÇÃO DAS LÂMINAS E MORFOMETRIA COMPUTADORIZADA**

As lâminas preparadas com a coloração de HE e as da reação imunoistoquímica dos tumores, foram avaliadas em microscópio óptico (NIKON E-400) quanto a morfologia dos tecidos e fotografadas com uma câmera (CCD – Samsung), acoplada ao microscópio.

O tumor foi considerado positivo para proteína p53 quando mais que 10% dos núcleos apresentarem marcação forte e difusa. A intensidade de proliferação celular será demonstrada pela porcentagem de células positivas para o Ki-67, pela contagem de aproximadamente 1000 células (índice de marcação do Ki-67) (ADSAY, 2012). Para a quantificação das proteínas caspase-3, GSTP1 e CD34, escolheu-se a área de maior positividade dos anticorpos, a qual foi fotografada. Utilizando método de morfometria computadorizada, foi realizada extração do background, cálculo de área total do tecido e determinação da coloração marrom (DAB/peroxidase) para captura de imagem contendo células com imunomarcação

positiva, quantificada em pixels<sup>2</sup> (programa Image J, NIH, Bethesda, MD). Foi realizado o cálculo da área marcada relativa à área total e os valores foram expressos em porcentagem de pixels (pixels das células positivas/pixel total do tecido).

#### **4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todos os dados foram analisados através de estatística descritiva e a proporção de pacientes em cada grupo foi avaliada por análise bivariada utilizando teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher a depender do tamanho da amostra, além do teste de correlação de Spearman quando apropriado. As variáveis contínuas foram analisadas utilizando o teste de Mann-Whitney. O nível de significância estatística foi determinado como  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas utilizando o software IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM®, Nova Iorque, EUA) e o GraphPad Prism 5.0.

#### **4.6 APROVAÇÃO NO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS (CEP)**

Esta pesquisa foi aprovada no CEP/UEL sob o número de parecer 2.400.064, CAAE: 77225917.5.0000.5231 (apêndice 2).

## 5 RESULTADOS

Para o projeto desta tese foi adotado o modelo que apresenta seus resultados para análise a partir da redação de artigos científicos. Portanto, a seção “resultados” foi composta por dois artigos científicos, conduzidos dentro do grupo de pesquisa Interações endócrinas, Inflamatórias e tumorais – iEndo, da Universidade Estadual de Londrina – UEL.

O Artigo 1 intitulado “von Hippel–Lindau disease: a single gene, several hereditary tumors” foi publicado na forma de um artigo de revisão, no periódico “Journal of Endocrinological Investigation” em Janeiro de 2018, com fator de impacto JCR 2.34, classificado no estrato Qualis B2 da CAPES – Medicina I.

O Artigo 2 é apresentado como uma versão preliminar contendo resultados e discussão para compor um artigo original que será submetido ao periódico “Journal of Endocrinology”, classificado no estrato Qualis A1 da CAPES – Medicina I, de acordo com a normatização exigida.

## 5.1 ARTIGO 1- VON HIPPEL-LINDAU DISEASE: A SINGLE GENE, SEVERAL HEREDITARY TUMORS (ARTIGO DE REVISÃO).

J Endocrinol Invest  
DOI 10.1007/s40618-017-0683-1



REVIEW

### Von Hippel–Lindau disease: a single gene, several hereditary tumors

J. Crespigio<sup>1,2</sup> · L. C. L. Berbel<sup>1,2,3</sup> · M. A. Dias<sup>1</sup> · R. F. Berbel<sup>2</sup> · S. S. Pereira<sup>4,5,6</sup> · D. Pignatelli<sup>1,4,5,7</sup> · T. L. Mazzuco<sup>1,2,3</sup>

Received: 13 September 2016 / Accepted: 30 April 2017  
© Italian Society of Endocrinology (SIE) 2017

**Abstract** The Von Hippel–Lindau (VHL) disease is an autosomal dominant disorder characterized by the predisposition for multiple tumors caused by germline mutations in the tumor suppressor gene *VHL*. This disease is associated with a high morbidity and mortality and presents a variable expression, with different phenotypes from family to family, affecting different organs during the lifetime. The main manifestations of VHL are hemangioblastomas of the central nervous system and retina, renal carcinomas and cysts, bilateral pheochromocytomas, cystic and solid tumors of the pancreas, cystadenomas of the epididymis, and endolymphatic sac tumors. The discovery of any of the syndrome components should raise suspicion of this disease and other stigmas must then be investigated. Due to the complexities associated with management of the various VHL manifestation, the diagnosis and the follow-up of this syndrome is a challenge in the clinical practice and a multidisciplinary

approach is needed. The particular relevance to endocrinologists is the detection of pheochromocytomas in 35% and islet cell tumors in 17% of VHL patients, which can be associated with hypertension, hypoglycemia, cardiac arrhythmias, and carcinoid syndrome. The purpose of this review is to define the Von Hippel–Lindau syndrome addressing its clinical aspects and classification, the importance of genetic counseling and to propose a protocol for clinical follow-up.

**Keywords** Von Hippel–Lindau · Adrenal medulla · Pheochromocytomas · Hemangioblastomas · VHL tumor suppressor gene

#### Introduction

The Von Hippel–Lindau (VHL) disease is an autosomal dominant syndrome, first reported in the twentieth century, characterized by the predisposition for multiple tumors caused by mutations in the *VHL* gene [1].

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s40618-017-0683-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ D. Pignatelli  
dpignatelli@ipatimup.pt

J. Crespigio  
crespigio@hotmail.com

L. C. L. Berbel  
lulazari@gmail.com

M. A. Dias  
diasma@gmail.com

T. L. Mazzuco  
tmazzuco@uel.br  
http://dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/3624171025464377

<sup>1</sup> Endocrine Interactions Research Group, Diretório dos Grupos de Pesquisa no Brasil (DGP/CNPq), Londrina, Brazil

<sup>2</sup> Post-graduation Program of Health Sciences, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Brazil

<sup>3</sup> Division of Endocrinology of Medical Clinical Department, University Hospital, UEL, Londrina, Brazil

<sup>4</sup> Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (I3S), Universidade do Porto, Porto, Portugal

<sup>5</sup> Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal

<sup>6</sup> Clinical and Experimental Endocrinology, Department of Anatomy, Multidisciplinary Unit for Biomedical Research (UMIB), ICBAS, University of Porto, Porto, Portugal

<sup>7</sup> Department of Endocrinology, Hospital S.João, Porto, Portugal

In 1904, Eugene von Hippel, a German ophthalmologist, described some cases of retinal angiomas. After 20 more years, in 1926, Lindau, a Swedish pathologist, established the relationship between the cerebellar and retinal lesions. In the coming reports, the full spectrum of the disease was established including retinal, visceral, and central nervous system (CNS) manifestations, under the eponym of Von Hippel–Lindau disease.

This is a rare disease, nowadays, perfectly established as having a genetic origin, with an incidence of 1/36,000 in the general population, but with a high penetrance in the affected families, reaching 90% at 65 years of age [2, 3], which justifies the high risk of developing its related diseases in the individuals that carry the mutation.

The Von Hippel–Lindau disease is an autosomal dominant disorder that implies a genetic alteration consisting in the loss of the tumor suppressor function of the *VHL* gene [4, 5] located in chromosome 3 (3p25.3). The protein encoded by this gene participates in the oxygen-sensing system. It takes hypoxia-inducible factors (HIF) for degradation when oxygen attains normal levels [6]. In normal situations, the VHL protein is activated only when there is hypoxia. However, when mutated it becomes inactive. When hypoxic conditions take place (or when the VHL protein is not active due to mutations or deletion) HIF-1 accumulates and translocates to the nucleus where they activate the transcription of angiogenic and erythropoietic factors. It is a simple adaptation process to hypoxia [7]. When this process becomes active in response to other conditions that are not hypoxia, it may start a tumorigenic process.

Besides this HIF-dependent mechanism of action, the VHL protein participates in tumorigenesis by other processes: cell senescence control, microtubule stabilization, and maintenance of ciliar structure and function [8–10]. One recognized function of the VHL protein is to maintain Mad2 which is a key regulator of mitotic progression [11]. Mad2 prevents the formation of chromosomal instability that is responsible for aneuploidy (abnormal chromosomal numbers). When the *VHL* gene is mutated, cells have low levels of Mad2 [12].

Mutations in the *VHL* gene increase the risk of tumor formation in several organs. Usually, the mutation process affects only one allele. It is necessary that the other allele is inactivated (loss of heterozygosity or deletion) for the VHL disease to occur.

The disease presents a variable expression, with different phenotypes from family to family, affecting many different organs and systems during the lifetime, including malignant and benign tumors. Approximately 20% of the cases are caused by de novo mutations and hence do not have family history [13]. It is a syndrome associated with

high morbidity and mortality, which justifies the importance of genetic screening [14].

The purpose of this review is to define the Von Hippel–Lindau syndrome, addressing its clinical aspects and classification, the importance of genetic counseling, and to propose a protocol for clinical follow-up.

## Clinical presentation and management

The clinical presentation of this syndrome is variable with different phenotypes in different families or even in the same family. The main manifestations are: hemangioblastomas of the CNS and retina, renal carcinomas, renal cysts, bilateral pheochromocytomas, cystic and solid tumors of the pancreas, cystadenomas of the epididymis, and endolymphatic sac tumors. It is rare to find all of the manifestations of the disease in one patient; in familial cases, up to 50% of patients have only one manifestation of the syndrome. Clinical manifestations depend on the type of mutation [15]; patients with truncating mutations or deletions usually have type 1 VHL disease (without pheochromocytoma), whereas in type 2 VHL disease (the type with pheochromocytomas) missense mutations are the rule [16]. Patients with nonsense or frameshift mutations have a higher risk of clear-cell renal cell carcinomas (ccRCC) and hemangioblastomas. The disease phenotype is age dependent, with an almost complete penetrance at 65 years [2, 17].

VHL disease is a syndrome associated with high morbidity and mortality, having a median life expectancy of 50 years. The most frequent causes of death are complications of cerebellar hemangioblastomas (53%) and renal cell carcinoma metastases (32%) [2]. The diagnostic criteria for isolated cases are the existence of two hemangioblastomas (CNS or retina) or a hemangioblastoma coupled with a visceral manifestation. In familial cases, the presence of only one manifestation is enough for the diagnosis [17].

## Hemangioblastomas in the central nervous system

The hemangioblastomas of the CNS are the most frequent lesions in VHL disease. It presents between 60 and 84% of the cases [13]. The average age of diagnosis is 29 years, mostly presented as single tumor (58%) [2]. Multiple tumors are always associated with the VHL syndrome [18]. The lesions are almost exclusively limited to the brainstem, cerebellum, and spinal cord. In a study of 225 patients with VHL syndrome presenting hemangioblastomas, 1921 tumors were identified, of which 36% were present in the spinal cord, 12% in the cauda equina, 44% in the cerebellum, 7% in the brainstem, and 1% were

supratentorial. No reliable threshold for tumor size could predict symptom development and need for treatment [19]. The diagnosis of central nervous system lesions is usually obtained by computerized tomography (CT) and preferably by magnetic resonance imaging (MRI). The signs and symptoms are variable, depending on the location of the tumor. If cerebellar, the patient may experience headache, dizziness, gait and speech disturbances, nystagmus, diplopia, ptosis, dysmetria, ninth cranial nerve palsy, and paroxysmal hypertension. Erythrocytosis is a rare condition that may be present in a subset of patients secondary to constitutive activation of erythropoietin caused by impaired degradation of the hypoxia-inducible factor (HIF) [20]. If a spinal cord involvement exists, symptoms may include neurogenic pain, multiple sensory deficits, proprioceptive changes, paraparesis, paresthesia, muscle atrophy, and medullar hypertonicity [17].

The tumors of the CNS are benign tumors that can remain latent for indefinite time. Whenever accelerated growth occurs with the consequent mass effect, the appropriate treatment consists of either stereotactic radiosurgery or craniospinal radiation surgery [13, 18, 19]. Radiation therapy is indicated for the treatment of lesions not amenable to complete excision and also as an attempt to avoid multiple surgeries [21–23]. Surgery can provide the complete remission of the tumor or at least improvement of the symptoms in 88% of the cases. The presence of a peritumoral cyst, adjacent to the CNS hemangioblastoma, underlies significant neurologic morbidity and even mortality [24]. So, the development of such peritumoral cysts in VHL patients frequently requires surgical intervention. The hemangioblastomas' burden in VHL and particularly the contribution of peritumoral cysts for that burden is generally associated with germline partial VHL gene deletions [24].

### Hemangioblastomas in the retina

Retinal capillary hemangiomas are also very frequent and probably the most common alteration recognized in the VHL syndrome being present in more than 70% of the cases by age 60 years. The ocular alterations in the anterior segment are only secondary to changes in the retina and optic nerve. Cataracts, iris neovascularization, and neovascular glaucoma are the most common [25].

The hemangiomas are usually circumscribed, round, red–orange in color and may be classified according to [25]: location (39% in the superior temporal quadrant and 27% in the lower temporal quadrant); morphology (endophytic, exophytic, and sessile); and finally, retinal effects (exudative or tractional). They can cause secondary retinal effects such as macular exudates and cause vitreous or retinal hemorrhage in about 3% of the cases, sometimes with retinal detachment [26].

The diagnosis is usually performed, on average, at 25 years of age, with the lesion presenting as a solid tumor. About one-third of the patients have multiple hemangiomas and a half have bilateral involvement. Although considered a hamartomatous abnormal formation, the capillary hemangioma does not commonly have congenital presentation; the risk of progressive growth is of 38% at 30 years and 70% at 50 years [26].

The diagnosis is performed through fundoscopic examination, in which the image of the hemangioma is typical. Differential diagnoses include the vasoproliferative tumors, Coats disease, macroaneurysms, cavernous hemangiomas, choroiditis, and choroidal neovascularization. Although the use of fluorescent angiography is not essential, the test is important in some special situations to improve treatment outcomes. Patients at risk for retinal hemangioblastoma should have routine screening by imaging with fundus photography, fluorescein angiography, and enhanced depth imaging optical coherence tomography for subclinical detection of asymptomatic tumors [27]. Echography is also important for the detection and the definition of tumor dimensions, particularly in cases associated with hemorrhage and opacity of the ocular medium. The nuclear magnetic resonance may have some advantage to detect hemangiomas starting at 2 mm in thickness [26].

In general, the decision to treat capillary hemangiomas takes into account the size, location, and associated findings, such as subretinal fluid, retinal traction, and potential threat to the vision. Among the options, laser photocoagulation (ideal for smaller lesions), cryotherapy (preferable in the larger ones), transpupillary thermal therapy, radiotherapy, photodynamic therapy, and vitreoretinal surgery can all be used. Recently, the use of anti-angiogenic molecules applied intravitreously was introduced, especially for advanced cases with more exudate and increased risk of visual loss [28].

More than 25% of the patients show some degree of permanent visual loss having visual acuity inferior to 20/40 and an additional 20% having an acuity of lower than 20/100. The severity of the loss depends on the age of the patient. 43% of the visual acuity loss occurs in the first 30 years of disease evolution. Therefore, early detection is associated with a good outcome which is a consequence of subsequent early treatment [25].

### Renal tumors

Renal cell carcinomas correspond to 3% of all cancers in adults, with the highest incidence between 50 and 70 years of age. Approximately 4% of renal carcinomas are hereditary, and these cases tend to be multifocal, bilateral, and affecting younger individuals [29]. Cysts and renal cell

carcinomas are present in about two-thirds of patients affected by VHL syndrome, with a cumulative incidence of 5% at 30 years of age and 69% in the sixth decade of life [2]. The cysts are benign lesions, but the coexistence of mutations in both cysts and carcinomas suggests that the cysts may be precursors of carcinomas. Corroborating this hypothesis, 1.2% of the cysts present areas of malignant transformation [30–32].

Renal cell carcinomas are solid lesions with malignant behavior and, when associated with VHL disease, they are always of the clear-cell subtype [13]. RCCs are the most frequent VHL-associated metastasizing tumors. Most cases, however, are asymptomatic; when present, the most common symptoms are hematuria and flank pain, drawing attention to the importance of screening protocols [33].

The radiologic diagnosis is made by ultrasound, which differentiates the solid from the cystic lesions, and CT of the abdomen which is more sensitive to detect tumors smaller than 2 cm. MRI offers no advantage over the CT [17].

Kidney lesions often grow slowly [34]. Therefore, tumors smaller than 2 cm can be clinically followed up with the purpose of avoiding multiple surgical explorations [35]. Surgery is recommended in lesions greater than 3 cm [36]; metastases are usually present when the tumor is greater than 4.5 cm. Lymph nodes, lung, liver, bone, and central nervous system are the most common sites of metastases [37].

The surgical approach seeks to preserve the kidney function as much as possible. Simple enucleation is indicated in cystic lesions [35]. In solid tumors smaller than 5 cm or multiple disease of limited extension, a partial nephrectomy can be performed [37]. In cases of larger tumors and lesions which affect the entire renal parenchyma, total nephrectomy should be performed and if it is bilateral, the patient will be started on dialysis treatment and renal transplantation may be performed 1 year after the surgery, when the chance of occurrence of metastases becomes lower [38]. The follow-up is performed by abdomen CT every six months for 2 years, and then annually [17].

### **Pheochromocytoma**

Among the catecholamine-secreting tumors originating from chromaffin cells, pheochromocytomas, from the adrenal medulla, are the most common in the VHL syndrome, whereas paragangliomas, from sympathetic ganglia cells are rare in this syndrome. Up to one-fifth of patients with apparently sporadic pheochromocytoma may carry the VHL disease. Characteristically, the histology of these tumors shows a thick capsule and increased vascularization. In contrast to MEN-2 pheos, in VHL cases there is not adrenal medulla hyperplasia

[39]. In some cases, pheochromocytomas associated with VHL syndrome express proteins related to the hypoxic response, like carbonic anhydrase IX [40]. In contrast, about 20–35% of the cases with VHL syndrome have pheochromocytomas, and these are frequently bilateral and affect patients at younger ages [41, 42]. In the retrospective analysis of patients with VHL enrolled at the National Cancer Institute, the earliest age at diagnosis was 5.5 years [43]. The presence or absence of pheochromocytoma is the basis of the classification of VHL syndrome by the National Cancer Institute [13]. Type 1 disease is related to gene deletion or nonsense mutation and patients do not suffer from pheochromocytomas while type 2 disease is characterized by the presence of pheochromocytomas and is associated with missense mutations [44].

About 40% of the families with VHL syndrome and pheochromocytomas have a mutation in codon 238 of the *VHL* gene [45].

Patients are often asymptomatic since in many cases there is no excessive catecholamine production by the tumor, unlike the sporadic pheochromocytoma cases [46]. When present, the most common symptoms are palpitations, sweating, headache, and paroxysmal hypertension [47] but other nonspecific signs may also be present, leading to a delay from the onset of the symptoms to the diagnosis. The lack of a pheochromocytoma diagnosis can lead to complications such as hypertensive crisis, heart failure, and stroke [48]. Furthermore, the possibility of an occult pheochromocytoma should be considered in syndrome carriers that need surgery, since there is a real risk of sympathetic hyperactivity and severe arterial hypertension during surgery with a significant increase in surgical risk and anesthetic implications [41].

Diagnosis is based on biochemical tests and radiological imaging of the abdomen by ultrasonography, CT or MRI of the abdomen, and whole body scanning with meta-iodobenzylguanidine. Biochemical evaluation consists in the determination of the catecholamines and their metabolites in the plasma or in the urine. For a blood sample, patients should be supine for 20–30 min from the time the needle is inserted and when blood is drawn, the blood sample analysis should use reference standards from supine tests, not seated tests. Urine collection should be over a 24-h period [49].

The measurement of fractionated plasma-free metanephrines is the most sensitive method for the diagnosis of pheochromocytoma, but it has lower specificity when compared with the determination of urinary catecholamines and metanephrines. Therefore, the measurement of fractionated plasma-free metanephrines should be done in patients with high level of suspicion for pheochromocytoma, since in these conditions, a highly sensitive test is fully justified. In patients with low probability of pheochromocytoma,

urinary determinations of catecholamines and metanephrines are sufficient. Recently, it has been shown that increased plasma normetanephrine concentrations are usually present in the case of VHL patients with pheochromocytoma, indicating the production of the norepinephrine by the tumor [46]. Paragangliomas that have been rarely associated with VHL disease are usually parasympathetic, and do not secrete significant amounts of catecholamines [50].

Benign pheochromocytomas are commonly found, while malignant tumor with distant metastasis has been reported in about 3% of VHL patients [46]. Moreover, the risk of malignant transformation in pheochromocytomas associated with the VHL disease is not elevated. The treatment is surgical, through unilateral or bilateral adrenalectomy, depending on the form of presentation [42]. These patients should be followed up for their entire life due to the increased risk of recurrence.

### Pancreatic tumors

Pancreatic lesions associated with the VHL disease occur in up to 77% of the patients [51]. They can be classified as non-secretory (cysts and cystadenomas) and secretory (islet tumors/neuroendocrine tumors—NETs). Pancreatic cysts are the most common form of presentation in the VHL syndrome. Simple cysts and serous cystadenomas are usually discovered incidentally because they are asymptomatic. They do not normally require intervention. They could be the sole manifestation of pancreatic disease in about 50% of VHL patients [52].

Cysts and cystadenomas affect young individuals, and the diagnosis is carried out between the ages of 20 and 40 years. Both are benign lesions and generally asymptomatic although epigastric pain may be referred in some cases [17]. Diagnosis is performed through imaging procedures that should be performed in every carrier of the VHL disease. Pancreatitis and pancreatic insufficiency are rare complications; it must also be stressed that there is not an increased risk of adenocarcinoma of the pancreas [52], they may coexist with pheochromocytomas [17, 51].

Pancreatic secreting or neuroendocrine tumors are constituted by cells of the Langerhans islets, and affect individuals at around 40 years of age [36]. Such tumors occur in 11–17% of the patients with the VHL disease [53]. They are usually multiple and are frequently associated with precursor lesions like nesidioblastosis or islet dysplasia [54]. These are tumors with a slow growth that are asymptomatic in most of the patients; their detection occurs at a younger age than in sporadic cases probably due to a periodic screening of family members of affected patients. Malignant behavior, however, is observed in a significant number of the cases and they can metastasize, primarily to the liver and bones.

When they become symptomatic, the symptoms are related either to the production of insulin or glucagon. Patients with neuroglycopenic symptoms should have biochemical proof of endogenous hyperinsulinemic hypoglycemia to diagnose insulinoma. On the other hand, carcinoid syndrome produces nonspecific elevations in glucagon levels. Contrary to MEN-1 pancreatic NETs, these tumors in VHL patients rarely produce gastrin [55] and in some cases produce inhibin [56].

The diagnosis is made through any abdominal imaging examination: ultrasound, CT, or MRI [17]. Somatostatin receptor scintigraphy is positive in 60% of the cases [53]. The choice of treatment is based on tumor location, size, and presence or absence of metastatic disease. Locoregional disease can be treated with tumor resection with or without lymphadenectomy. Lesions larger than 3 cm in diameter or even those larger than 2 cm, if located in the pancreas body or head should always be removed. Minor and asymptomatic lesions must be annually evaluated [57]. Approximately 80% of the neuroendocrine pancreatic tumors express somatostatin receptors, their function is to decrease the activity of calcium channels, thereby decreasing hormone secretion. Somatostatin analogs (SSA) such as octreotide, lanreotide, and pasireotide are indicated for symptom reduction in advanced disease. The responses may vary by tumor type and some patients may become desensitized over time [58]. Although tumor size and growth rates support current indications for surgical treatment, no absolute criteria are available for selecting patients who have pre-malignant or malignant disease [57, 59].

### Endolymphatic sac tumors of the middle ear (ELST)

Tumors of endolymphatic sac were recently recognized as belonging to this syndrome and may be more frequent than previously believed. Whenever bilateral, ELST are considered pathognomonic of the VHL disease. They are present in about 15% of the patients affected by the disease. They are usually benign cystadenomas, but can be locally invasive, leading to hearing loss, tinnitus, dizziness, gait imbalance, and paralysis of facial muscles [60]. Three mechanisms have been described to explain the hearing loss and other symptoms [61]:

1. Otic capsule invasion by the tumor, resulting in destruction of the membranous labyrinth and interruption of the endolymphatic flow;
2. Labyrinthine hemorrhage causing sudden loss of hearing which may be irreversible;
3. Block of the reabsorption of the endolymphatic sac fluid leading to gradual onset of hearing loss, tinnitus, and vertigo.

VHL syndrome patients should be asked annually about auditory and vestibular symptoms and evaluated with routine audiometry. Any detected abnormalities must be screened for the presence of tumors by high-resolution CT or MRI of the skull base with thin sliced sequences [60]. The treatment is surgical and may prevent deafness, but is not always mandatory in asymptomatic patients, considering the slow tumor growth and the possible complications associated with surgery [62, 63]. Stereotactic radiotherapy can be used in cases of recurrent disease [64]. The cochlear implant may be an option for patients with bilateral hearing loss [65].

### Other tumoral manifestations in the VHL syndrome

Papillary cystadenoma of the epididymis is a benign palpable lesion that is present in 10–60% of patients with VHL syndrome. Unilateral cysts are common in the general population and, therefore, only the bilateral cases should be taken as an indication of a possible VHL diagnosis. They are usually asymptomatic and rarely cause pain or infertility. The diagnosis is made by ultrasound; it does not require treatment, but in symptomatic cases, it can be removed by surgery [17].

The cystadenoma of the broad ligament of the uterus is a benign and asymptomatic lesion in most of the cases; its true incidence in the VHL syndrome is unknown. Some patients may experience pain, dyspareunia, and menorrhagia [66].

Cavernous hemangiomas and hepatic hemangioblastomas, pulmonary hemangioblastomas, omentum cysts, vertebral hemangiomas, cysts and hemangiomas of the ovaries, medullary thyroid carcinomas, papillary thyroid carcinomas, dermal hemangiomas, pigmented nevus, splenic cysts and angiomas, angiomas and adenomas of the adrenal cortex, and pancreatic hemangioblastomas have also been reported [17].

### Classification and diagnosis

The diagnosis is based on the assessment of three criteria: retinal or CNS hemangioma, visceral lesions, and family history. If the patient has a family history of VHL disease, only one hemangioma or visceral lesion, confirms the disease. In the cases with no family history of VHL disease, the presence of two or more hemangiomas, or a hemangioma and a visceral lesion are needed for the diagnosis [57].

The Von Hippel–Lindau syndrome is then classified according to the nature of the tumors, based on the presence or absence of pheochromocytomas (Table 1). Type 1 does not develop pheochromocytomas, but presents a high

**Table 1** Manifestations of the Von Hippel–Lindau syndrome, classified according to the absence (type 1) or the presence (type 2) of pheochromocytoma

VHL type	HAB retina	HAB CNS	RCC	PHEO
1	+	+	+	–
2A	+	+	Low risk	+
2B	+	+	High risk	+
2C	–	–	–	+

+ present, – absent, *HAB* hemangioblastoma, *CNS* central nervous system, *RCC* renal cell carcinoma, *PHEO* pheochromocytoma

risk for other VHL lesions; it is the most common type of presentation (80%). In the type 2, there is a high risk of developing pheochromocytomas; it is further subdivided according to the presence or absence of renal cell carcinoma. The type 2A, without RCC, has the best prognosis, and the type 2B, having a high incidence of RCC, is the rarest form but it is the one that has all the manifestations of the VHL. Pheochromocytomas are the single clinical manifestation in the type 2C.

However, accurate classification can only be made in large kindred because of the variability of *VHL* gene mutation [67]. Genotype–phenotype correlations have been identified from analysis of the *VHL* mutations. Families with an increased risk of pheochromocytoma (Type 2 VHL disease) displayed missense type mutations, whereas true null *VHL* alleles are associated with a low risk of pheochromocytoma (Type 1 VHL disease) [5].

Several lines of evidence suggest additional pVHL functions and recognizing how *VHL* gene is mutated might provide new opportunities for therapeutic intervention

### Genetic counseling

In the recent years, the prognosis has improved significantly, initially due to the progress in the surgical technique and in post-surgical care. This was also due to the early detection that became possible, consequent to genetic testing in asymptomatic family members (Table 2) [67]. The diagnosis in asymptomatic patients has social, psychological, and economic implications, but the benefits of its early identification outweigh the negative consequences. This has led to a clear screening protocol indication since childhood [1].

Genetic counseling is important because germline mutations in the *VHL* gene are virtually detected in all families with one or more affected members. Germline mutations are also identified in 4% of patients with sporadic hemangioblastomas, 1.6% of renal cell carcinomas, and 3–9% of pheochromocytomas [67].

Approximately 80% of the individuals with VHL have at least one parent affected by the syndrome. Both patients

**Table 2** Screening recommendations to study *VHL* germline mutations

Patient with VHL disease and/or first-degree family members
Asymptomatic individual from a family with identified VHL mutation
Patients with VHL suspicion:
Multifocal VHL tumor in one organ
Bilateral VHL tumor
Two or more organs with bilateral VHL
A VHL tumor in young (<50 years for hemangioblastoma and pheochromocytoma and <30 years for renal cell carcinoma)
Patient from a family with hemangioblastoma, renal cell carcinoma, and pheochromocytoma only

and their families should be correctly genotyped and referred for genetic counseling in conjunction with other medical consultations and performing of the appropriate tests to identify *VHL* clinical manifestations [68].

Affected subjects have a 50% chance of transmitting the mutation to their children, because VHL is an autosomal dominant disease. For patients with mosaicism, the risk may be as high as 50% if the germinative cells carry the mutation. The diagnosis can be made in the prenatal period through amniocentesis or chorionic villus biopsy. Parents should be informed about reproductive technologies such as egg or sperm donation. There is also the possibility of genetic diagnosis, in the pre-implantation stage of in vitro fertilized embryos [69]. An extensive review on genetic counseling was recently published by Nielsen et al. [70]

## Follow-up

There are several protocols for monitoring the VHL syndrome such as the protocol of the University of Cambridge [71] and of the American National Institute of Health [13] (Supplemental Table 1).

Overall, the ophthalmologic exam of the retina should be performed annually and started before the fifth year of age. The blood pressure monitoring should be performed routinely, at least once a year, associated with urinary catecholamine determination starting from the fifth year of age, mainly in families with a high incidence of pheochromocytoma. Abdominal ultrasound and/or CT or MRI should be performed annually, starting at 16/20 years of age [17]. It is also important that the audiological evaluation is conducted in patients with known hearing loss, followed by temporal bone resonance, if there are any changes.

In spite of its rarity, this disease is so complex that it can only be well managed in referral centers. Diagnostic delay is a very important issue as it impedes implementation of

a prophylactic screening program necessary for improving median overall survival. Follow-up should be life-long and we recommend an inter-disciplinary approach (Fig. 1). Modifications of screening plan may sometimes be done with individual patients and their family history, since VHL surveillance guidelines are based on expert medical opinion, but limited evidence is available regarding the optimal initiation and frequency of surveillance regimes.

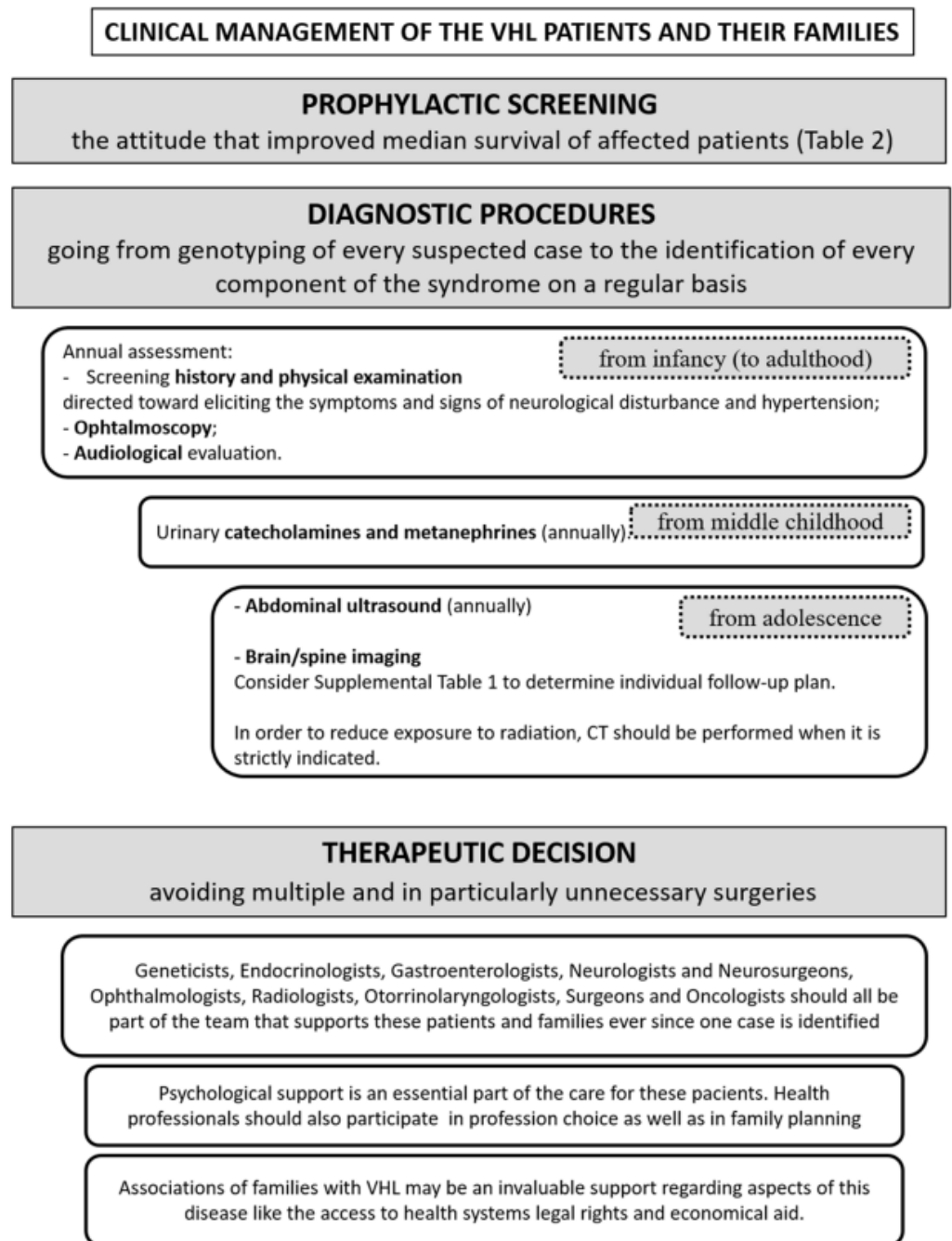
## Therapeutic implications of the recent molecular understanding of VHL disease

Drugs developed to change the downstream consequences of VHL inactivation, mainly to decrease the rich vascularization observed in tumors of VHL patients, have already demonstrated significant efficacy in these patients [72]. These drugs include small molecule inhibitors of VEGFRs (sorafenib, sunitinib, valatinib, and pazopanib) and anti-VEGFR antibodies (bevacizumab) [72–75]. The effects seem to differ between the VHL types and this was suggested to be due to the differential endothelial VEGFR expression observed in the different tumors [74].

In patients with pancreatic neuroendocrine lesions, the VEGFR inhibitor, sunitinib, was able to lead to a stabilization of the disease and a phase II clinical trial was already performed, but the results were not yet released (NCT01168440) [72]. In VHL renal lesions, sunitinib led to a partial response in 33% of the patients, but contrary to this none of the hemangioblastomas responded to sunitinib [74]. Still, other anti-angiogenic drugs were tested in VHL-associated hemangioblastomas with good results. A case report reported a patient treated with pazopanib which resulted in a significant neurologic improvement and decrease of the hemangioblastoma volume [75]. Besides that, a long-term treatment with intravitreal bevacizumab, improved the visual acuity and the optical coherence tomography thickness in a patient with VHL-associated hemangioblastoma [76]. Vatalanib is actually under investigation in a phase II clinical trial for the treatment of hemangioblastomas in patients with VHL (NCT00052013).

mTOR inhibitors (everolimus and temsirolimus) have also shown favorable clinical results in advanced renal cell carcinoma and in pancreatic neuroendocrine tumors. However, studies with VHL patients are still missing despite of mTOR inhibitors being considered as promising therapies [72, 77–79]. Actually, a study of mutation-targeted therapy with sunitinib or everolimus in patients with neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and pancreas is recruiting, and it includes VHL patients (NCT02315625).

**Fig. 1** Inter-disciplinary approach for screening, treatment, and follow-up of VHL syndrome, both in the index cases and the family members carrying the same mutation



## Conclusion

In this article, we reviewed the VHL disease, a familiar syndrome of multiple benign and malignant tumors, which affects individuals since childhood and presents various forms of clinical manifestations. The discovery of any of the syndrome components, especially of heman-gioblastomas of the retina and CNS, and also pheochromocytomas, should raise suspicion of this disease and other stigmas must then be investigated.

The identification of the syndrome is important due to its high risk of serious complications, which can be

avoided with a proper diagnosis and early treatment. Early recognition, made possible through the genetic testing in asymptomatic members of the affected families has contributed to the improved prognosis of these patients.

For the monitoring of VHL disease, a multidisciplinary approach is needed, with professionals in the areas of endocrinology, nephrology, neurology, pathology, ophthalmology, otolaryngology, and urology, among others. The diagnosis and the follow-up of this syndrome is a challenge in the clinical practice, and the aim of this review is also to aid in the treatment of these patients.

**Acknowledgements** We are grateful to Milaydis Sosa for proofreading.

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** This article does not contain any studies with human subjects performed by any of the authors

**Informed consent** No informed consent.

**Grants** This study was supported by the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) through a PhD grant to Sofia S. Pereira (SFRH/BD/89308/2012).

## References

- Rasmussen A, Alonso E, Ochoa A, De Biase I, Familiar I, Yescas P, Sosa AL, Rodriguez Y, Chavez M, Lopez-Lopez M, Bidichandani SI (2010) Uptake of genetic testing and long-term tumor surveillance in Von Hippel–Lindau disease. *BMC Med Genet* 11:4. doi:10.1186/1471-2350-11-4
- Maher ER, Yates JR, Harries R, Benjamin C, Harris R, Moore AT, Ferguson-Smith MA (1990) Clinical features and natural history of Von Hippel–Lindau disease. *Q J Med* 77(283):1151–1163
- Maher ER, Neumann HP, Richard S (2011) Von Hippel–Lindau disease: a clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet* 19(6):617–623. doi:10.1038/ejhg.2010.175
- Friedrich CA (1999) Von Hippel–Lindau syndrome. A pleomorphic condition. *Cancer* 86(11 Suppl):2478–2482
- Kaelin WG (2007) Von Hippel–Lindau disease. *Annu Rev Pathol* 2:145–173. doi:10.1146/annurev.pathol.2.010506.092049
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399(6733):271–275. doi:10.1038/20459
- Semenza GL (2011) Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med* 365(6):537–547. doi:10.1056/NEJMr1011165
- Frew IJ, Krek W (2008) pVHL: a multipurpose adaptor protein. *Sci Signal* 1(24):pe30. doi:10.1126/scisignal.124pe30
- Gerdes JM, Davis EE, Katsanis N (2009) The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell* 137(1):32–45. doi:10.1016/j.cell.2009.03.023
- Barontini M, Dahia PL (2010) VHL disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24(3):401–413. doi:10.1016/j.beem.2010.01.002
- Musacchio A, Salmon ED (2007) The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(5):379–393. doi:10.1038/nrm2163
- Thoma CR, Toso A, Gutbrodt KL, Reggi SP, Frew IJ, Schraml P, Hergovich A, Moch H, Meraldi P, Krek W (2009) VHL loss causes spindle misorientation and chromosome instability. *Nat Cell Biol* 11(8):994–1001. doi:10.1038/ncb1912
- Lonser RR, Glenn GM, Walther M, Chew EY, Libutti SK, Linehan WM, Oldfield EH (2003) Von Hippel–Lindau disease. *Lancet* 361(9374):2059–2067. doi:10.1016/S0140-6736(03)13643-4
- Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L et al (1993) Identification of the Von Hippel–Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 260(5112):1317–1320
- Couch V, Lindor NM, Karnes PS, Michels VV (2000) Von Hippel–Lindau disease. *Mayo Clin Proc* 75(3):265–272
- Nordstrom-O'Brien M, van der Luijt RB, van Rooijen E, van den Ouweland AM, Majoor-Krakauer DF, Lolkema MP, van Brussel A, Voest EE, Giles RH (2010) Genetic analysis of Von Hippel–Lindau disease. *Hum Mutat* 31(5):521–537. doi:10.1002/humu.21219
- Choyke PL, Glenn GM, Walther MM, Patronas NJ, Linehan WM, Zbar B (1995) Von Hippel–Lindau disease: genetic, clinical, and imaging features. *Radiology* 194(3):629–642
- Neumann HP, Eggert HR, Scheremet R, Schumacher M, Mohadjer M, Wakhloo AK, Volk B, Hettmannsperger U, Riegler P, Schollmeyer P et al (1992) Central nervous system lesions in Von Hippel–Lindau syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55(10):898–901
- Lonser RR, Butman JA, Huntoon K, Asthagiri AR, Wu T, Bakhtian KD, Chew EY, Zhuang Z, Linehan WM, Oldfield EH (2014) Prospective natural history study of central nervous system hemangioblastomas in Von Hippel–Lindau disease. *J Neurosurg* 120(5):1055–1062. doi:10.3171/2014.1.JNS131431
- Wiesener MS, Seyfarth M, Warnecke C, Jurgensen JS, Rosenberger C, Morgan NV, Maher ER, Frei U, Eckardt KU (2002) Paraneoplastic erythrocytosis associated with an inactivating point mutation of the Von Hippel–Lindau gene in a renal cell carcinoma. *Blood* 99(10):3562–3565
- Asthagiri AR, Mehta GU, Zach L, Li X, Butman JA, Camphausen KA, Lonser RR (2010) Prospective evaluation of radiosurgery for hemangioblastomas in Von Hippel–Lindau disease. *Neuro Oncol* 12(1):80–86. doi:10.1093/neuonc/nop018
- Patrice SJ, Sneed PK, Flickinger JC, Shrieve DC, Pollock BE, Alexander E 3rd, Larson DA, Kondziolka DS, Gutin PH, Wara WM, McDermott MW, Lunsford LD, Loeffler JS (1996) Radiosurgery for hemangioblastoma: results of a multiinstitutional experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 35(3):493–499
- Wanebo JE, Lonser RR, Glenn GM, Oldfield EH (2003) The natural history of hemangioblastomas of the central nervous system in patients with Von Hippel–Lindau disease. *J Neurosurg* 98(1):82–94. doi:10.3171/jns.2003.98.1.0082
- Huntoon K, Wu T, Elder JB, Butman JA, Chew EY, Linehan WM, Oldfield EH, Lonser RR (2016) Biological and clinical impact of hemangioblastoma-associated peritumoral cysts in Von Hippel–Lindau disease. *J Neurosurg* 124(4):971–976. doi:10.3171/2015.4.JNS1533
- Kreusel KM (2005) Ophthalmological manifestations in VHL and NF 1: pathological and diagnostic implications. *Fam Cancer* 4(1):43–47. doi:10.1007/s10689-004-1327-0
- Singh AD, Nouri M, Shields CL, Shields JA, Smith AF (2001) Retinal capillary hemangioma: a comparison of sporadic cases and cases associated with Von Hippel–Lindau disease. *Ophthalmology* 108(10):1907–1911
- Schoen MA, Shields CL, Say EA, Douglass AM, Shields JA, Jampol LM (2016) Clinically invisible retinal hemangioblastomas detected by spectral domain optical coherence tomography and fluorescein angiography in twins. *Retin Cases Brief Rep*. doi:10.1097/ICB.0000000000000382
- Singh AD, Nouri M, Shields CL, Shields JA, Perez N (2002) Treatment of retinal capillary hemangioma. *Ophthalmology* 109(10):1799–1806

29. Linehan WM, Walther MM, Zbar B (2003) The genetic basis of cancer of the kidney. *J Urol* 170(6 Pt 1):2163–2172. doi:10.1097/01.ju.0000096060.92397.ed
30. Kragel PJ, Walther MM, Pestaner JP, Filling-Katz MR (1991) Simple renal cysts, atypical renal cysts, and renal cell carcinoma in Von Hippel–Lindau disease: a lectin and immunohistochemical study in six patients. *Mod Pathol* 4(2):210–214
31. Neumann HP, Zbar B (1997) Renal cysts, renal cancer and Von Hippel–Lindau disease. *Kidney Int* 51(1):16–26
32. Montani M, Heinimann K, von Teichman A, Rudolph T, Perren A, Moch H (2010) VHL-gene deletion in single renal tubular epithelial cells and renal tubular cysts: further evidence for a cyst-dependent progression pathway of clear cell renal carcinoma in Von Hippel–Lindau disease. *Am J Surg Pathol* 34(6):806–815. doi:10.1097/PAS.0b013e3181dddf54d
33. Malek RS, Omess PJ, Benson RC Jr, Zincke H (1987) Renal cell carcinoma in Von Hippel–Lindau syndrome. *Am J Med* 82(2):236–238
34. Choyke PL, Glenn GM, Walther MM, Zbar B, Weiss GH, Alexander RB, Hayes WS, Long JP, Thakore KN, Linehan WM (1992) The natural history of renal lesions in Von Hippel–Lindau disease: a serial CT study in 28 patients. *AJR Am J Roentgenol* 159(6):1229–1234
35. Nelson JB, Oyasu R, Dalton DP (1994) The clinical and pathological manifestations of renal tumors in Von Hippel–Lindau disease. *J Urol* 152(6 Pt 2):2221–2226
36. Karsdorp N, Elderson A, Wittebol-Post D, Hene RJ, Vos J, Feldberg MA, van Gils AP, Jansen-Schillhorn van Veen JM, Vroom TM, Hoppener JW et al (1994) Von Hippel–Lindau disease: new strategies in early detection and treatment. *Am J Med* 97(2):158–168
37. Chauveau D, Duvic C, Chretien Y, Paraf F, Droz D, Melki P, Helenon O, Richard S, Grunfeld JP (1996) Renal involvement in Von Hippel–Lindau disease. *Kidney Int* 50(3):944–951
38. Steinbach F, Novick AC, Zincke H, Miller DP, Williams RD, Lund G, Skinner DG, Esrig D, Richie JP, deKernion JB et al (1995) Treatment of renal cell carcinoma in Von Hippel–Lindau disease: a multicenter study. *J Urol* 153(6):1812–1816
39. Koch CA, Mauro D, Walther MM, Linehan WM, Vortmeyer AO, Jaffe R, Pacak K, Chrousos GP, Zhuang Z, Lubensky IA (2002) Pheochromocytoma in Von Hippel–Lindau disease: distinct histopathologic phenotype compared to pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2. *Endocr Pathol* 13(1):17–27
40. Pinato DJ, Ramachandran R, Toussi ST, Vergine M, Ngo N, Sharma R, Lloyd T, Meeran K, Palazzo F, Martin N, Khoo B, Dina R, Tan TM (2013) Immunohistochemical markers of the hypoxic response can identify malignancy in pheochromocytomas and paragangliomas and optimize the detection of tumours with VHL germline mutations. *Br J Cancer* 108(2):429–437. doi:10.1038/bjc.2012.538
41. Baghai M, Thompson GB, Young WF Jr, Grant CS, Michels VV, van Heerden JA (2002) Pheochromocytomas and paragangliomas in Von Hippel–Lindau disease: a role for laparoscopic and cortical-sparing surgery. *Arch Surg* 137(6):682–688 (discussion 688–689)
42. Neumann HP, Berger DP, Sigmund G, Blum U, Schmidt D, Parmer RJ, Volk B, Kirste G (1993) Pheochromocytomas, multiple endocrine neoplasia type 2, and Von Hippel–Lindau disease. *N Engl J Med* 329(21):1531–1538. doi:10.1056/NEJM199311183292103
43. Aufforth RD, Ramakant P, Sadowski SM, Mehta A, Trebska-McGowan K, Nilubol N, Pacak K, Kebebew E (2015) Pheochromocytoma screening initiation and frequency in Von Hippel–Lindau syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 100(12):4498–4504. doi:10.1210/jc.2015-3045
44. Cassol C, Mete O (2015) Endocrine manifestations of Von Hippel–Lindau disease. *Arch Pathol Lab Med* 139(2):263–268. doi:10.5858/arpa.2013-0520-RS
45. Chen F, Kishida T, Yao M, Hustad T, Glavac D, Dean M, Gnarr JR, Orcutt ML, Duh FM, Glenn G et al (1995) Germline mutations in the Von Hippel–Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype. *Hum Mutat* 5(1):66–75. doi:10.1002/humu.1380050109
46. Eisenhofer G, Walther MM, Huynh TT, Li ST, Bornstein SR, Vortmeyer A, Mannelli M, Goldstein DS, Linehan WM, Lenders JW, Pacak K (2001) Pheochromocytomas in Von Hippel–Lindau syndrome and multiple endocrine neoplasia type 2 display distinct biochemical and clinical phenotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 86(5):1999–2008
47. Baguet JP, Hammer L, Mazzucco TL, Chabre O, Mallion JM, Sturm N, Chaffanjon P (2004) Circumstances of discovery of pheochromocytoma: a retrospective study of 41 consecutive patients. *Eur J Endocrinol* 150(5):681–686
48. Green JS, Bowmer MI, Johnson GJ (1986) Von Hippel–Lindau disease in a Newfoundland kindred. *CMAJ* 134(2):133–138, 146
49. Lenders JW, Duh QY, Eisenhofer G, Gimenez-Roqueplo AP, Grebe SK, Murad MH, Naruse M, Pacak K, Young WF Jr, Endocrine S (2014) Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 99(6):1915–1942. doi:10.1210/jc.2014-1498
50. Gaal J, van Nederveen FH, Erlic Z, Korpershoek E, Oldenburg R, Boedeker CC, Kontny U, Neumann HP, Dinjens WN, de Krijger RR (2009) Parasympathetic paragangliomas are part of the Von Hippel–Lindau syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 94(11):4367–4371. doi:10.1210/jc.2009-1479
51. Hammel PR, Vilgrain V, Terris B, Penfornis A, Sauvanet A, Correas JM, Chauveau D, Balian A, Beigelman C, O’Toole D, Bernades P, Ruzsiewicz P, Richard S (2000) Pancreatic involvement in Von Hippel–Lindau disease. The Groupe Francophone d’Etude de la Maladie de Von Hippel–Lindau. *Gastroenterology* 119(4):1087–1095
52. Charlesworth M, Verbeke CS, Falk GA, Walsh M, Smith AM, Morris-Stiff G (2012) Pancreatic lesions in Von Hippel–Lindau disease? A systematic review and meta-synthesis of the literature. *J Gastrointest Surg* 16(7):1422–1428. doi:10.1007/s11605-012-1847-0
53. Corcos O, Couvelard A, Giraud S, Vullierme MP, Dermot OT, Rebours V, Stievenart JL, Penfornis A, Niccoli-Sire P, Baudin E, Sauvanet A, Levy P, Ruzsiewicz P, Richard S, Hammel P (2008) Endocrine pancreatic tumors in Von Hippel–Lindau disease: clinical, histological, and genetic features. *Pancreas* 37(1):85–93. doi:10.1097/MPA.0b013e31815f394a
54. Mete O, Asa SL (2013) Precursor lesions of endocrine system neoplasms. *Pathology* 45(3):316–330. doi:10.1097/PAT.0b013e32835f45c5
55. Lubensky IA, Pack S, Ault D, Vortmeyer AO, Libutti SK, Choyke PL, Walther MM, Linehan WM, Zhuang Z (1998) Multiple neuroendocrine tumors of the pancreas in Von Hippel–Lindau disease patients: histopathological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 153(1):223–231. doi:10.1016/S0002-9440(10)65563-0
56. Gucer H, Szentgyorgyi E, Ezzat S, Asa SL, Mete O (2013) Inhibin-expressing clear cell neuroendocrine tumor of the ampulla: an unusual presentation of Von Hippel–Lindau disease. *Virchows Arch* 463(4):593–597. doi:10.1007/s00428-013-1465-6
57. Keutgen XM, Hammel P, Choyke PL, Libutti SK, Jonasch E, Kebebew E (2016) Evaluation and management of pancreatic lesions in patients with Von Hippel–Lindau disease. *Nat Rev Clin Oncol* 13(9):537–549. doi:10.1038/nrclinonc.2016.37
58. Vinik AI, Raymond E (2013) Pancreatic neuroendocrine tumors: approach to treatment with focus on sunitinib. *Therap Adv Gastroenterol* 6(5):396–411. doi:10.1177/1756283X13493878

59. Blansfield JA, Choyke L, Morita SY, Choyke PL, Pingpank JF, Alexander HR, Seidel G, Shutack Y, Yuldasheva N, Eugeni M, Bartlett DL, Glenn GM, Middleton L, Linehan WM, Libutti SK (2007) Clinical, genetic and radiographic analysis of 108 patients with Von Hippel–Lindau disease (VHL) manifested by pancreatic neuroendocrine neoplasms (PNETs). *Surgery* 142(6):814–818. doi:10.1016/j.surg.2007.09.012 (**discussion 818 e811–e812**)
60. Manski TJ, Heffner DK, Glenn GM, Patronas NJ, Pikus AT, Katz D, Lebovics R, Sledjeski K, Choyke PL, Zbar B, Linehan WM, Oldfield EH (1997) Endolymphatic sac tumors. A source of morbid hearing loss in Von Hippel–Lindau disease. *JAMA* 277(18):1461–1466
61. Butman JA, Kim HJ, Baggenstos M, Ammerman JM, Dambrosia J, Patsalides A, Patronas NJ, Oldfield EH, Lonser RR (2007) Mechanisms of morbid hearing loss associated with tumors of the endolymphatic sac in Von Hippel–Lindau disease. *JAMA* 298(1):41–48. doi:10.1001/jama.298.1.41
62. Hansen MR, Luxford WM (2004) Surgical outcomes in patients with endolymphatic sac tumors. *Laryngoscope* 114(8):1470–1474. doi:10.1097/00005537-200408000-00028
63. Kim HJ, Butman JA, Brewer C, Zalewski C, Vortmeyer AO, Glenn G, Oldfield EH, Lonser RR (2005) Tumors of the endolymphatic sac in patients with Von Hippel–Lindau disease: implications for their natural history, diagnosis, and treatment. *J Neurosurg* 102(3):503–512. doi:10.3171/jns.2005.102.3.0503
64. Safatle PP, Farage L, Sampaio A, Ferreira FA, Safatle HP, Oliveira CA, Ferrari I (2009) Endolymphatic sac tumor and Von Hippel–Lindau disease in a single family. *Arq Neuropsiquiatr* 67(4):1097–1099
65. Jagannathan J, Lonser RR, Stanger RA, Butman JA, Vortmeyer AO, Zalewski CK, Brewer C, Surowicz C, Kim HJ (2007) Cochlear implantation for hearing loss associated with bilateral endolymphatic sac tumors in Von Hippel–Lindau disease. *Otol Neurotol* 28(7):927–930. doi:10.1097/MAO.0b013e31805c7506
66. Gersell DJ, King TC (1988) Papillary cystadenoma of the mesosalpinx in Von Hippel–Lindau disease. *Am J Surg Pathol* 12(2):145–149
67. Hes FJ, Hoppener JW, Luijt RB, Lips CJ (2005) Von Hippel–Lindau disease. *Hered Cancer Clin Pract* 3(4):171–178. doi:10.1186/1897-4287-3-4-171
68. Schmid S, Gillissen S, Binet I, Brandle M, Engeler D, Greiner J, Hader C, Heinemann K, Kloos P, Krek W, Krull I, Stoeckli SJ, Sulz MC, van Leyen K, Weber J, Rothermundt C, Hundsberger T (2014) Management of Von Hippel–Lindau disease: an interdisciplinary review. *Oncol Res Treat* 37(12):761–771. doi:10.1159/000369362
69. Obradors A, Fernandez E, Rius M, Oliver-Bonet M, Martinez-Fresno M, Benet J, Navarro J (2009) Outcome of twin babies free of Von Hippel–Lindau disease after a double-factor preimplantation genetic diagnosis: monogenetic mutation analysis and comprehensive aneuploidy screening. *Fertil Steril* 91(3):933, e931–937. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.11.013
70. Nielsen SM, Rhodes L, Blanco I, Chung WK, Eng C, Maher ER, Richard S, Giles RH (2016) Von Hippel–Lindau disease: genetics and role of genetic counseling in a multiple neoplasia syndrome. *J Clin Oncol* 34(18):2172–2181. doi:10.1200/JCO.2015.65.6140
71. Maher ER, Bentley E, Payne SJ, Latif F, Richards FM, Chiano M, Hosoe S, Yates JR, Linehan M, Barton DE et al (1992) Presymptomatic diagnosis of Von Hippel–Lindau disease with flanking DNA markers. *J Med Genet* 29(12):902–905
72. Agarwal R, Liebe S, Turski ML, Vidwans SJ, Janku F, Garrido-Laguna I, Munoz J, Schwab R, Rodon J, Kurzrock R, Subbiah V, Pan-Cancer Working G (2015) Targeted therapy for genetic cancer syndromes: Von Hippel–Lindau disease, Cowden syndrome, and Proteus syndrome. *Discov Med* 19(103):109–116
73. Escudier B, Bellmunt J, Negrier S, Bajetta E, Melichar B, Braccarda S, Ravaud A, Golding S, Jethwa S, Sneller V (2010) Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival. *J Clin Oncol* 28(13):2144–2150. doi:10.1200/JCO.2009.26.7849
74. Jonasch E, McCutcheon IE, Waguespack SG, Wen S, Davis DW, Smith LA, Tannir NM, Gombos DS, Fuller GN, Matin SF (2011) Pilot trial of sunitinib therapy in patients with Von Hippel–Lindau disease. *Ann Oncol* 22(12):2661–2666. doi:10.1093/annonc/mdr011
75. Kim BY, Jonasch E, McCutcheon IE (2012) Pazopanib therapy for cerebellar hemangioblastomas in Von Hippel–Lindau disease: case report. *Target Oncol* 7(2):145–149. doi:10.1007/s11523-012-0214-0
76. Hrisomalos FN, Maturi RK, Pata V (2010) Long-term use of intravitreal bevacizumab (avastin) for the treatment of Von Hippel–Lindau associated retinal hemangioblastomas. *Open Ophthalmol J* 4:66–69. doi:10.2174/1874364101004010066
77. Battelli C, Cho DC (2011) mTOR inhibitors in renal cell carcinoma. *Therapy* 8(4):359–367. doi:10.2217/thy.11.32
78. Faivre S, Kroemer G, Raymond E (2006) Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov* 5(8):671–688. doi:10.1038/nrd2062
79. Yim KL (2012) Everolimus and mTOR inhibition in pancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer Manag Res* 4:207–214. doi:10.2147/CMAR.S25979

## **5.2 ARTIGO 2- IMUNOEXPRESSÃO DE MARCADORES DE APOPTOSE, ENZIMAS DO METABOLISMO E PROLIFERAÇÃO CELULAR EM FEOCROMOCITOMAS NO DOENÇA VON HIPPEL-LINDAU (ARTIGO ORIGINAL).**

### **5.2.1 RESULTADOS**

Um total de 9 pacientes foram incluídos em nossa pesquisa (Tabela 1); três pacientes sendo dois irmãos (figura suplementar 1) apresentaram doença de VHL e feocromocitoma, constituindo os casos familiares, os demais pacientes não apresentavam história familiar ou outros tumores relacionados à síndrome. A idade média dos pacientes ao diagnóstico do feocromocitoma foi menor nos casos familiares (34,6 anos) em relação aos casos esporádicos (57,5 anos) (tabela 1). Todos os pacientes com a doença de VHL eram do sexo masculino; nos casos esporádicos, a prevalência dos feocromocitomas foi a mesma em ambos os sexos. Um paciente com a doença de VHL apresentou tumor bilateral. A média dos maiores diâmetros dos feocromocitomas presentes nos casos esporádicos foi 175% maior que os presentes nos pacientes com a doença de VHL ( $p=0,0007$ ) (Tabela 2).

Em relação à apresentação tumoral, além de feocromocitoma o paciente nº 1 com doença de VHL desenvolveu carcinoma de células claras renal, com metástases, cistos renais, no epidídimo e no pâncreas. O paciente nº 2 apresentou além de feocromocitoma, carcinoma renal de células claras com cistos renais e nódulo hipervascularizado na cabeça do pâncreas. O paciente nº 3 apresentou hemangioblastomas cerebral e retiniano, carcinoma de células renais e feocromocitomas bilaterais. Quanto aos sintomas clínicos, 83% dos casos esporádicos apresentaram a tríade clássica de sintomas (cefaleia, sudorese e palpitação); os casos familiares apresentaram somente cefaleia. Os pacientes com a doença de VHL apresentaram catecolaminas e metanefrinas urinárias dentro dos limites da normalidade; todos os casos esporádicos apresentaram valores elevados de metanefrinas urinárias e somente um paciente nesse grupo apresentou valores elevados de catecolaminas urinárias (tabelas 1 e 2).

Quanto ao tratamento dos casos com doença de VHL, o paciente nº 1 foi submetido à nefrectomia parcial com adrenalectomia à esquerda por carcinoma de

células claras renal e adrenalectomia à direita por feocromocitoma em tempos diferentes, o paciente nº 2 foi submetido a nefrectomia total com adrenalectomia por apresentar carcinoma de células claras renal e feocromocitoma ipsilateral. O paciente nº 3 foi submetido a nefrectomia parcial e adrenalectomia ipsilateral por feocromocitoma e carcinoma de células renais e adrenalectomia contralateral por feocromocitoma. Em todos os casos esporádicos, o tratamento cirúrgico optado foi a adrenalectomia.

Todos os tumores foram examinados ao microscópio óptico, de acordo com os critérios de PASS, descrito anteriormente. Para confirmar inicialmente o diagnóstico de FEO realizamos estudo imunoistoquímico com o anticorpo anti-cromogranina; todos os tumores exibiram marcação citoplasmática difusa e intensa (figura 1). Em relação ao padrão de crescimento tumoral, os tumores presentes em pacientes com a doença de VHL apresentaram áreas com crescimento difuso, constituídos por células com a presença de citoplasma claro e nos casos esporádicos predominou a arquitetura em ninhos “zellballen”, típica dos feocromocitomas com células exibindo citoplasma basofílico (figura 2). Infiltração capsular com lipidização citoplasmática esteve presente em um caso de paciente com a doença de VHL (paciente nº 2) e em um paciente com doença esporádica (paciente nº 10) (figura 3). Necrose confluyente esteve presente em somente um caso esporádico (paciente nº 6) (figura 4A). Não foi observada diferença na espessura da cápsula de casos familiares em comparação aos esporádicos. Atipias nucleares foram vistas em todos os casos, em menor ou maior quantidade (figura 4B).

Para avaliar o padrão de distribuição dos vasos sanguíneos e a densidade vascular, utilizou-se o anticorpo CD34, que reconhece o endotélio vascular. Observou-se diferença na distribuição dos vasos, sendo que os tumores de pacientes com a doença de VHL apresentaram proliferação de vasos de menor calibre quando comparados aos casos esporádicos. A densidade vascular foi significativamente maior ( $p=0,002$ ), apresentando aumento de 300% nos tumores de pacientes com a síndrome em relação aos casos esporádicos (figura 5).

Observou-se diminuição de 280% na expressão da enzima de metabolização GSTP1 nos tumores de pacientes com a doença de VHL em relação aos casos esporádicos ( $p=0,001$ ). A expressão da enzima também foi menor (67%) ( $p=0,67$ ) no tecido de adrenal normal, adjacente ao feocromocitoma VHL (figura 6).

A apoptose foi avaliada utilizando-se o anticorpo anti caspase-3. Houve diminuição de 300% na imunexpressão da enzima caspase 3 nos tumores familiares em relação aos casos esporádicos ( $p=0,02$ ) (figura 7).

A proteína p53 demonstrou raras células com núcleos positivos tanto no grupo esporádico quanto nos pacientes com a doença de VHL, menor que 1%. Não se observou correlação entre a positividade da proteína com a atipia nuclear ou divisão celular (figura 8).

Quanto ao índice de proliferação celular (Ki-67) avaliado através do anticorpo MIB-1, observaram-se escassas células positivas, menor que 1% em ambos os grupos (figura 9).

Em relação à imunexpressão da proteína S-100 identificando as células sustentaculares, houve distribuição de maneira heterogênea na marcação, com áreas apresentando maior e menor densidade em um mesmo tumor, não havendo diferença nessa distribuição entre os casos familiares e esporádicos. As células sustentaculares foram facilmente identificadas em tumores com padrão de crescimento clássico, em ninhos, apresentando densidade diminuída em áreas de crescimento tumoral com padrão difuso (figura 10).

### 5.2.2 DISCUSSÃO

Realizamos um estudo comparativo dos feocromocitomas presentes na doença de von Hippel-Lindau com casos esporádicos, com avaliação de características clínicas, morfológicas e moleculares através de estudo imunoistoquímico. Aproximadamente 25% dos pacientes com feocromocitomas aparentemente esporádicos, apresentam mutações de genes relacionados a síndromes genéticas, VHL, RET, SDHD e SDHB (NEUMANN et al., 2002), entretanto o estudo genético não é um exame realizado de rotina em todo paciente com o diagnóstico de feocromocitoma. Há escassos relatos na literatura comparando casos esporádicos aos casos familiares na doença de von Hippel-Lindau. Em nosso estudo, os feocromocitomas presentes em pacientes com VHL apresentaram menor diâmetro tumoral, com ausência de sintomatologia clássica e ausência de alterações nos níveis de catecolaminas e metanefrinas urinárias. A densidade vascular foi estatisticamente maior e os níveis de GSTP-1 e caspase-3 menor que os casos esporádicos.

Os feocromocitomas presentes nos casos familiares em nossa série foram diagnosticados em idade mais precoce em relação aos casos esporádicos, em conformidade com dados da literatura onde a idade média dos casos familiares é inferior a 40 anos (NEUMANN et al., 1993). Os casos familiares na presente casuística, de acordo com a apresentação tumoral, foram classificados como portadores de doença de VHL do tipo 2B, frente à presença de feocromocitoma e carcinoma de célula renal. Nenhum deles apresentou hemangioblastomas cerebrais e retinianos, tumores mais frequentes na síndrome, presentes em até 72% e 60% dos pacientes, respectivamente (LONSER et al., 2003). Apesar dos avanços nos métodos de diagnóstico, ainda há atraso de 3 anos entre os sintomas iniciais e o diagnóstico final (MANNELLI et al., 1999). A principal razão para este tempo de latência é a inespecificidade dos sintomas, a exemplo da cefaleia, palpitação e sudorese entretanto, se todos os 3 sintomas estiverem presentes, a especificidade da combinação atinge mais de 90% (PLOUIN et al., 1981). Em nosso estudo, os feocromocitomas em pacientes com a doença de VHL foram diagnosticados através de um protocolo de rastreio familiar o que possivelmente explica achados de tamanhos tumorais menores, com níveis normais de catecolaminas e metanefrinas

urinárias. Nenhuma característica histológica isolada é capaz de identificar o potencial metastático dos feocromocitomas entretanto, algumas evidências sugerem que sistemas de escores podem predizer o risco de malignidade. Thompson (2002) propôs o sistema do PASS onde tumores com escore maior ou igual a 4 se correlacionaram com potencial metastático. Em nosso estudo nenhum paciente apresentou escore maior ou igual a 4, compatível com a evolução clínica benigna. Além do risco para malignidade estimado pelo sistema do PASS, há um risco para doença bilateral. Os pacientes com doença de VHL apresentam risco aumentado para tumores adrenais bilaterais. O tratamento com adrenalectomia bilateral nesses pacientes acarretará necessidade de suplementação por toda vida com glicocorticoide e mineralocorticoide. Em uma série de 33 pacientes com feocromocitomas familiares conduzidos com adrenalectomia parcial, no instituto nacional de câncer americano, somente 5 pacientes necessitaram suplementação com glicocorticoide (DINER et al., 2005). Na nossa casuística, dois pacientes com doença de VHL foram submetidos a adrenalectomia total bilateral, dependendo desde então de suplementação hormonal.

O gene VHL está mutado na doença de VHL e em casos de CCR esporádicos, estando associado a níveis elevados de HIF e ao desenvolvimento de tumores altamente vascularizados (MIN et al., 2002). Os feocromocitomas presentes na doença de VHL demonstram aumento da densidade vascular e na expressão de VEGF. Seu principal mecanismo é o aumento da expressão de VEGF e a desregulação do HIF é uma característica presente em todos os tumores da síndrome (POLLARD et al., 2006). Para a avaliação do padrão vascular dos feocromocitomas, utiliza-se o anticorpo anti-CD34, específico para o endotélio vascular; o aumento significativo na densidade vascular nos casos familiares em comparação aos esporádicos encontrados em nosso estudo está de acordo com desregulação no HIF com consequente ativação de genes relacionados à angiogênese. A densidade da microvasculatura tumoral apresenta fator prognóstico em tumores da mama, colo do útero e neoplasias malignas urológicas. A contagem maior de vasos sanguíneos está associada à pior sobrevida nesses pacientes pois, além de suprir o tumor com quantidade maior de oxigênio e nutrientes, propicia possível via de metástases (OHJI et al., 2001). Interessantemente, raros casos de feocromocitomas presentes na doença de VHL apresentam comportamento maligno

(BAUSCH et al., 2014; WALTHER et al., 1999) porém, nenhum dos pacientes do nosso estudo apresentou metástases durante o acompanhamento.

As glutatonas são importantes enzimas que participam do metabolismo de fase II de xenobióticos, exibindo polimorfismos genéticos relacionados à ausência ou diminuição de sua atividade (YU et al., 2016; CAMPOS et al., 2017). A hipermetilação do DNA é o principal mecanismo de inativação do gene GSTP-1 nos tumores de próstata (LIN et al., 2001). A hipermetilação da região promotora do gene GSTP-1 está associada à perda da expressão da proteína em cânceres de mama (SAXENA et al., 2012). Em tumores de endométrio, a diminuição da expressão proteica da enzima avaliada através de imunistoquímica se correlacionou com diminuição da expressão gênica e com pior prognóstico dos tumores (CHAN et al., 2005). Estudos têm demonstrado o envolvimento de enzimas do metabolismo xenobiótico em proteger genes supressores tumorais, a exemplo do TP53 contra mutações em diversos tipos de tumores (NEDELICHEVA KRISTENSEN et al., 1998). A diminuição da expressão da GSTP-1 em feocromocitomas presentes em pacientes com a doença de VHL poderiam modular a expressão de genes relacionados à doença de VHL. Detectamos a diminuição da expressão da proteína GSTP1 através de estudo imunistoquímico, porém não foi avaliado qual o evento genético responsável pela diminuição da atividade da enzima, a exemplo de possível polimorfismo ou possível hipermetilação.

A desregulação das vias de apoptose é frequentemente observada em células tumorais, o gene supressor tumoral *TP53* se encontra inativado em mais de 50% das neoplasias malignas humanas, resultando em perda de função de um importante “sensor” de dano ao DNA capaz de induzir a cascata de apoptose (HARRIS, 1996). Enzimas responsáveis por sinais anti-apoptóticos, a exemplo de bcl-2, bcl-x, ras, e c-abl, apresentam frequente aumento de expressão em células malignas (MARTIN et al., 1995). Diminuição da expressão da enzima caspase-3 está associada à piora da sobrevida em pacientes com câncer de mama e alterações somáticas, genéticas e epigenéticas, a exemplo de hipermetilação de promotores do gene da caspase-3, podem ser responsáveis pela resistência desses tumores a agentes quimioterápicos (DEVARAJAN et al., 2002; PU et al., 2017). A apoptose ou morte celular programada é importante em tumores por duas razões principais: 1) a supressão da apoptose parece ser evento crucial no desenvolvimento de tumores; 2)

a maioria dos medicamentos citotóxicos levam à regressão tumoral através da indução da apoptose. Em nosso estudo observamos diminuição da expressão proteica de caspase-3 em feocromocitomas presentes em pacientes com a síndrome de VHL em comparação aos casos esporádicos. Este é um dos mecanismos pelos quais as células tumorais podem diminuir a apoptose; outros mecanismos foram descritos, incluindo desequilíbrio entre os fatores apoptóticos/anti-apoptóticos, redução na função das caspases e desregulação no receptor de morte celular (WONG, 2011). O oncogene *Bcl-2* está expresso em feocromocitomas esporádicos e familiares atuando como inibidor da apoptose. Com a expressão do *Bcl-2*, ocorreria diminuição da taxa de morte celular, contribuindo para uma “vantagem” do crescimento tumoral com consequente aquisição lenta de defeitos genéticos. Além disso, a proliferação celular nos feocromocitomas é baixa, avaliada por exemplo através do Ki-67, explicando assim o crescimento indolente desses tumores (WANG et al., 1997). Os tumores presentes na doença de VHL apresentam ativação constitutiva das proteínas HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  frente à inativação da proteína pVHL, apesar da similaridade entre ambas as isoformas, estudos demonstram que há ativação de diferentes vias de crescimento e apoptose celular quando há predomínio de uma ou outra isoforma, em CCR. Enquanto a isoforma HIF-1 $\alpha$  regula positivamente o gene *BNip3* (*Bcl-2 interacting protein 3*) sem efeito sobre *ciclina-D1*, *TGF- $\alpha$* , e *VEGF*, a isoforma HIF-2 $\alpha$  regula negativamente *BNip3* e positivamente a *ciclina-D1*, *TGF- $\alpha$* , e *VEGF* (RAVAL et al., 2005). *BNip3* é um membro da família *Bcl-2*, das proteínas reguladoras de apoptose e está relacionado à ativação das caspases, a diminuição de sua expressão via HIF-2 $\alpha$  poderia explicar a diminuição da imunexpressão da caspase-3 dos casos familiares em comparação aos esporádicos em nosso experimento.

A p53 é uma proteína supressora tumoral, com importante papel na regulação do ciclo celular, reparo e indução de apoptose, em resposta à diversos estímulos de estresse celular. A proteína selvagem possui meia vida curta, não sendo detectada através de estudo imunistoquímico. Quando o gene *p53* encontra-se mutado, a proteína transcrita apresenta aumento de sua meia vida permitindo sua translocação para o núcleo e detecção através da técnica de citoquímica. A principal função da p53 é a interrupção do ciclo celular em células com DNA danificado para que o mesmo possa ser reparado. Em condições irreversíveis de reparo, a célula progride

para apoptose (HARRIS, 1996). Estudos têm demonstrado resultados contraditórios quanto à imunexpressão da p53 em feocromocitomas. Krijger e cols. (1999) demonstraram aumento da expressão proteica em casos malignos, não havendo diferença entre os casos esporádicos e familiares. Outros estudos não evidenciaram diferenças na imunexpressão da proteína p53 entre casos benignos e malignos (DAHIA et al., 1995; GUPTA et al., 2000). Em nosso trabalho, a imunexpressão da proteína ocorreu em raros núcleos possivelmente, decorrente da natureza benigna desses tumores.

A taxa de crescimento tumoral é uma importante característica de tumores malignos, podendo ser avaliada através da contagem de mitose ou por estudo imunoistoquímico usando os marcadores de proliferação celular (Ki-67/MIB-1). Em muitos tumores endócrinos, a proliferação celular avaliada através do Ki-67 está relacionada à malignidade entretanto, a contagem de mitoses em feocromocitomas não tem sido considerada preditor de malignidade (LINNOILA et al., 1990). No entanto, alguns estudos relatam aumento do índice Ki-67 em feocromocitomas malignos (OHJI et al., 2001; VAN DER HARST et al., 2000). Em nosso estudo, a evolução benigna dos tumores está de acordo com a baixa proliferação celular avaliada através de estudo imunoistoquímico.

A diminuição na quantidade de células sustentaculares avaliada através de estudo imunoistoquímico com marcação para a proteína S-100 tem sido relacionado à feocromocitomas malignos em alguns estudos (UNGER et al., 1991; VAN DER HARST et al., 2000). Em nosso estudo, observamos marcação heterogênea dentro de um mesmo tumor, com diferentes densidades de células sustentaculares tanto nos pacientes portadores de tumores familiares quanto no grupo esporádico.

## 5.2.4 TABELAS E FIGURAS

Table 1. Clinical and biochemical features and PASS criteria of patients with sporadic and VHL pheochromocytomas.

L=left adrenal; R=right adrenal; UC=urinary catecholamines; UM=urinary metanephrines.

Tumor Type	Case	Age	Sex	Laterality	Largest tumor size (cm)	Chronic Hypertension	Paroxysmal Hypertension	Headache	Palpitation	Sweting	UC ( $\mu\text{g}/24\text{h}$ )	UM (mg/24h)	PASS score
VHL	1	36	M	Unilateral	3.5	NO	NO	YES	NO	NO	74.1 (80-500)	0.28 (<1.0)	2
	2	33	M	Unilateral	4.3	NO	NO	YES	NO	NO	182.0 (80-500)	0.05 (<1.0)	3
	3	35	M	Bilateral	0.8 (L)/1.3 (R)	NO	NO	YES	NO	NO	110.0 (80-500)	0.18 (<1.0)	2 (L)/0 (R)
Sporadic	4	63	M	Unilateral	6.0	YES	YES	YES	NO	YES	55.9 (80-500)	1.3 (<1.0)	2
	5	64	M	Unilateral	6.4	YES	NO	YES	YES	YES	110.0 (80-500)	1.2 (<1.0)	2
	6	50	F	Unilateral	7.4	YES	NO	YES	YES	YES	1513.0 (80-500)	3.5 (<1.0)	2
	7	53	F	Unilateral	8.0	YES	YES	YES	YES	YES	220.0 (80-500)	1.9 (<1.0)	0
	8	55	F	Unilateral	5,8	YES	YES	YES	YES	YES	154,0 (80-500)	1.3 (<1.0)	2
	9	60	M	Unilateral	6,5	YES	NO	YES	YES	YES	174.0 (80-500)	1.6 (<1.0)	2

Table 2. Comparison of clinical, biochemical and tumor characteristics between VHL and sporadic pheochromocytomas.

	Total (n=9)	VHL (n=3) 33%	Sporadic (n=6) 66%
Gender (M/F)		3/0	3/3
Age at diagnosis: Mean (95% CI)		34.6 (33-36)	57.5 (50-64)*
Classical triad of symptoms		0	5(83.3%)
Chronic hypertension		0	8(100%)
Paroxistic hypertension		0	3(37%)
Elevated urinary chatecolamines		0	1(16.6%)
Elevated urinary metanephrines		0	6(100%)
Unilateral tumor		2(66.6%)	6(100%)
Bilateral tumor		1(33.3%)	0
Extra adrenal		0	0
Largest tumor diameter (cm)		2.4 (0.8-4.3)	6.6 (5.8-8.0)#
PASS < 4 (benign)		3(100%)	6(100%)
PASS ≥ 4 (malignant)		0	0

\*p=0,0003; #p=0,0007 (Student's *t*-test)

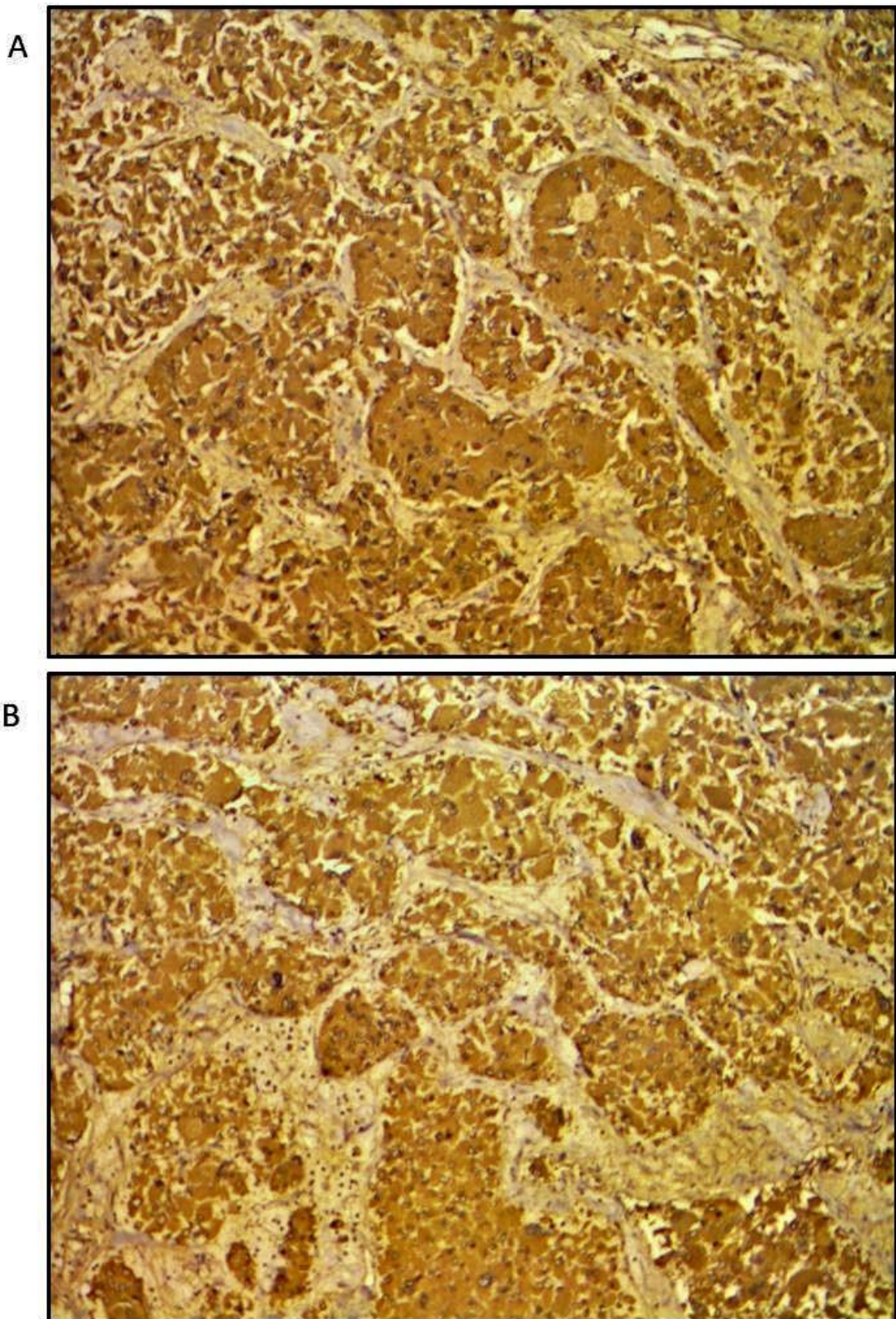


Figure 1. Tissue expression of chromogranin A. Representative images of VHL (A) and sporadic pheochromocytomas (B) (brown area, original magnification x100; polymer peroxidase-based method).

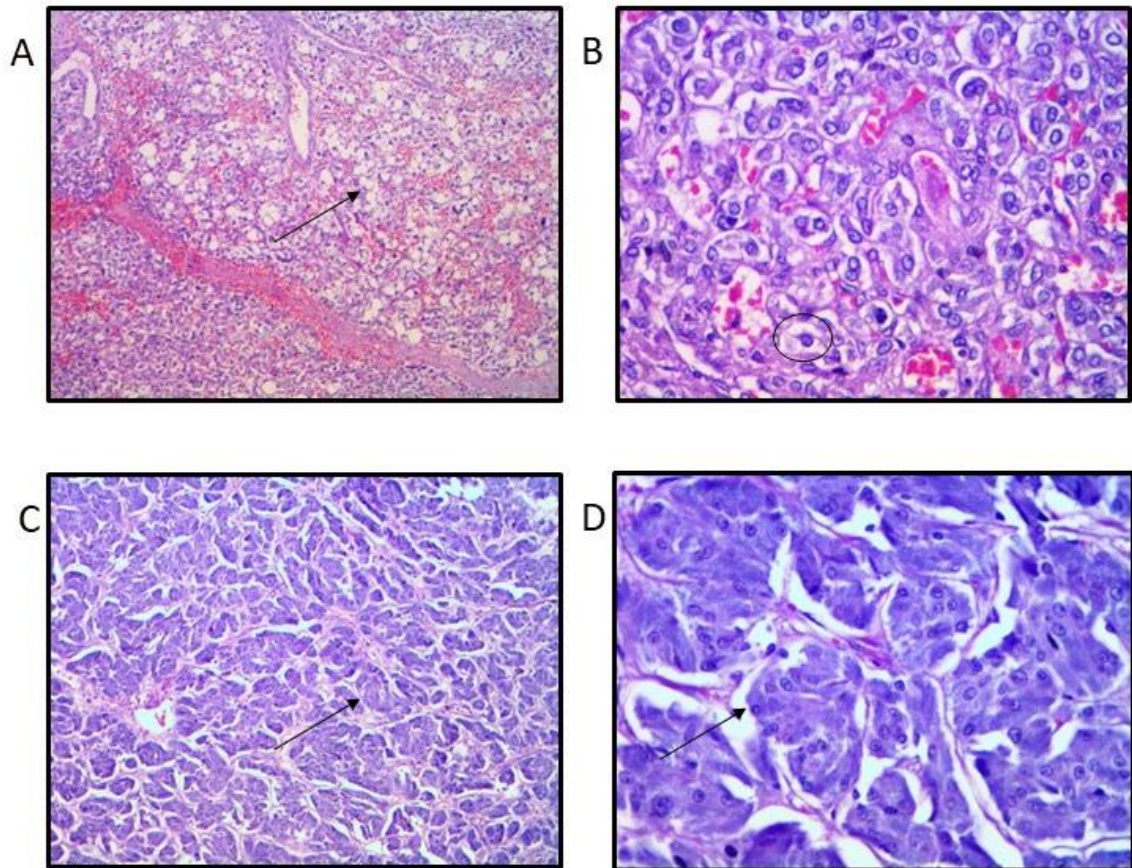


Figure 2. Histological characteristics of pheochromocytomas. A and B, representative images of VHL pheochromocytomas with diffuse growth pattern and clear cytoplasm. C and D, representative images of sporadic pheochromocytomas with classical “Zellballen pattern and abundant basophilic cytoplasm. (HE, A and C, original magnification x100; B and D, original magnification x400).

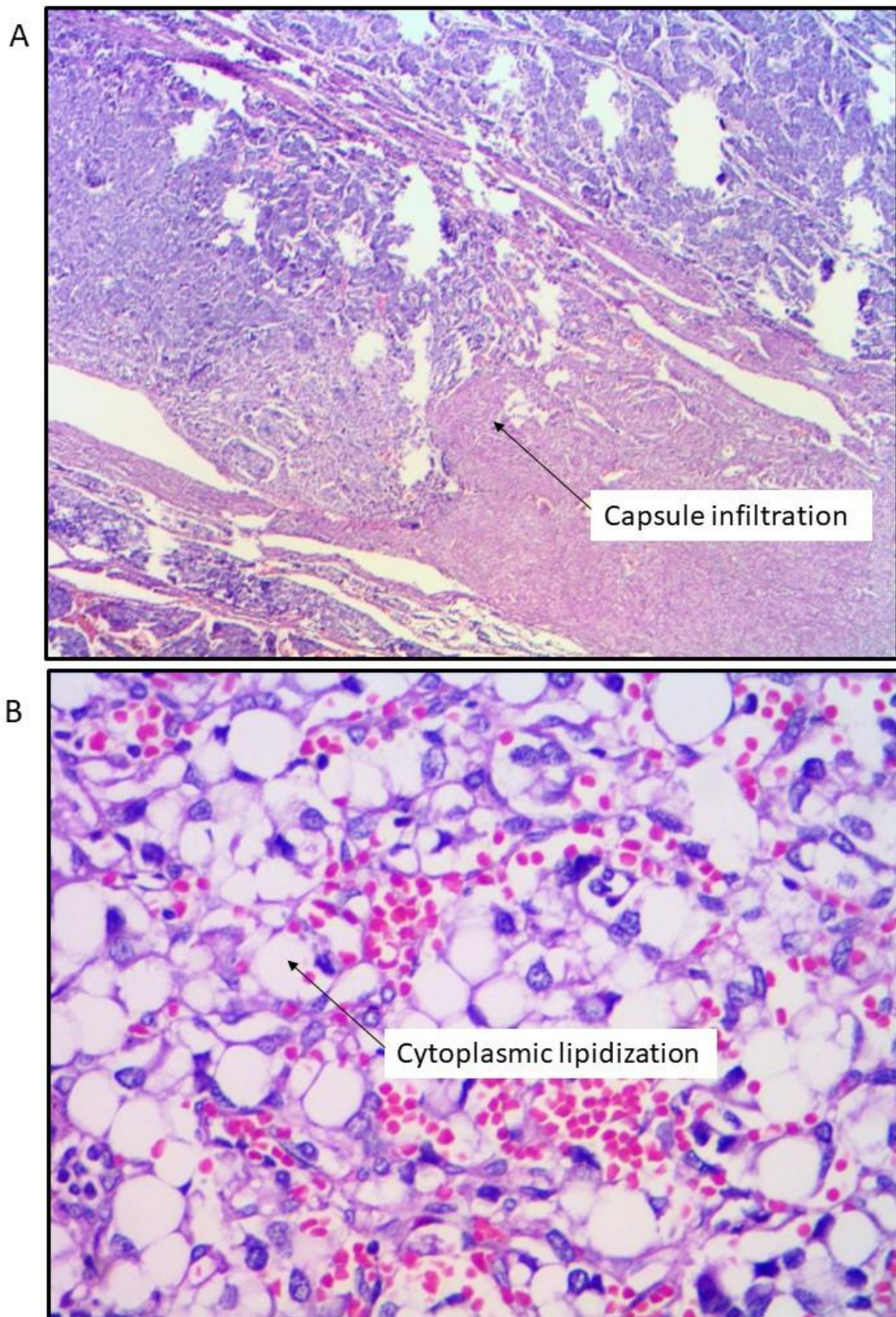


Figure 3. A, representative image of capsular invasion. B, representative image of cytoplasmic lipidization (patient no 2) (HE, A, original magnification x100; B, original magnification x400).

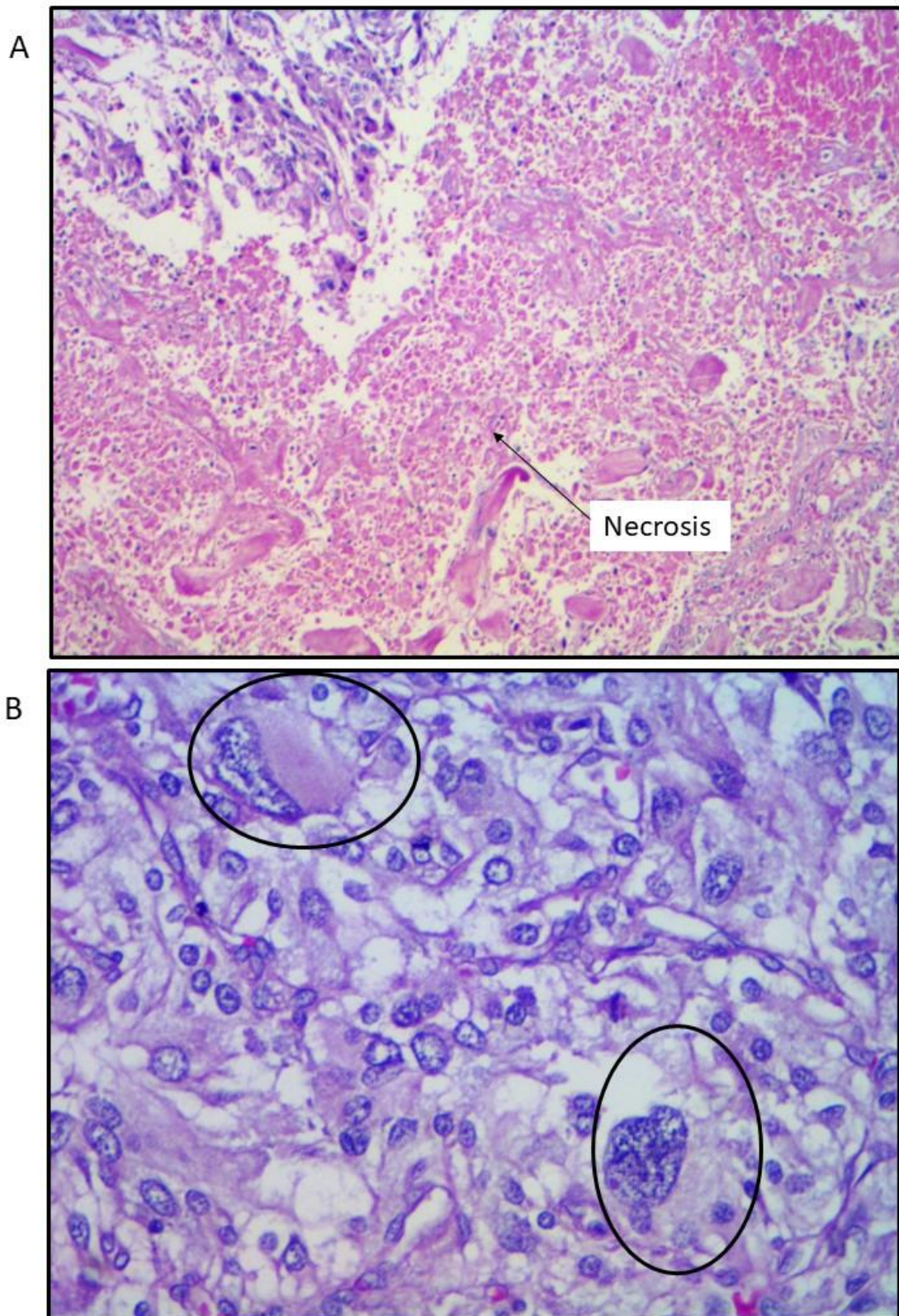


Figure 4. A, representative image of necrosis (patient n<sup>o</sup> 6). B-representative image of atypical nuclei (patient n<sup>o</sup> 9); both sporadic tumors (HE, A, original magnification x100; B, original magnification x400).

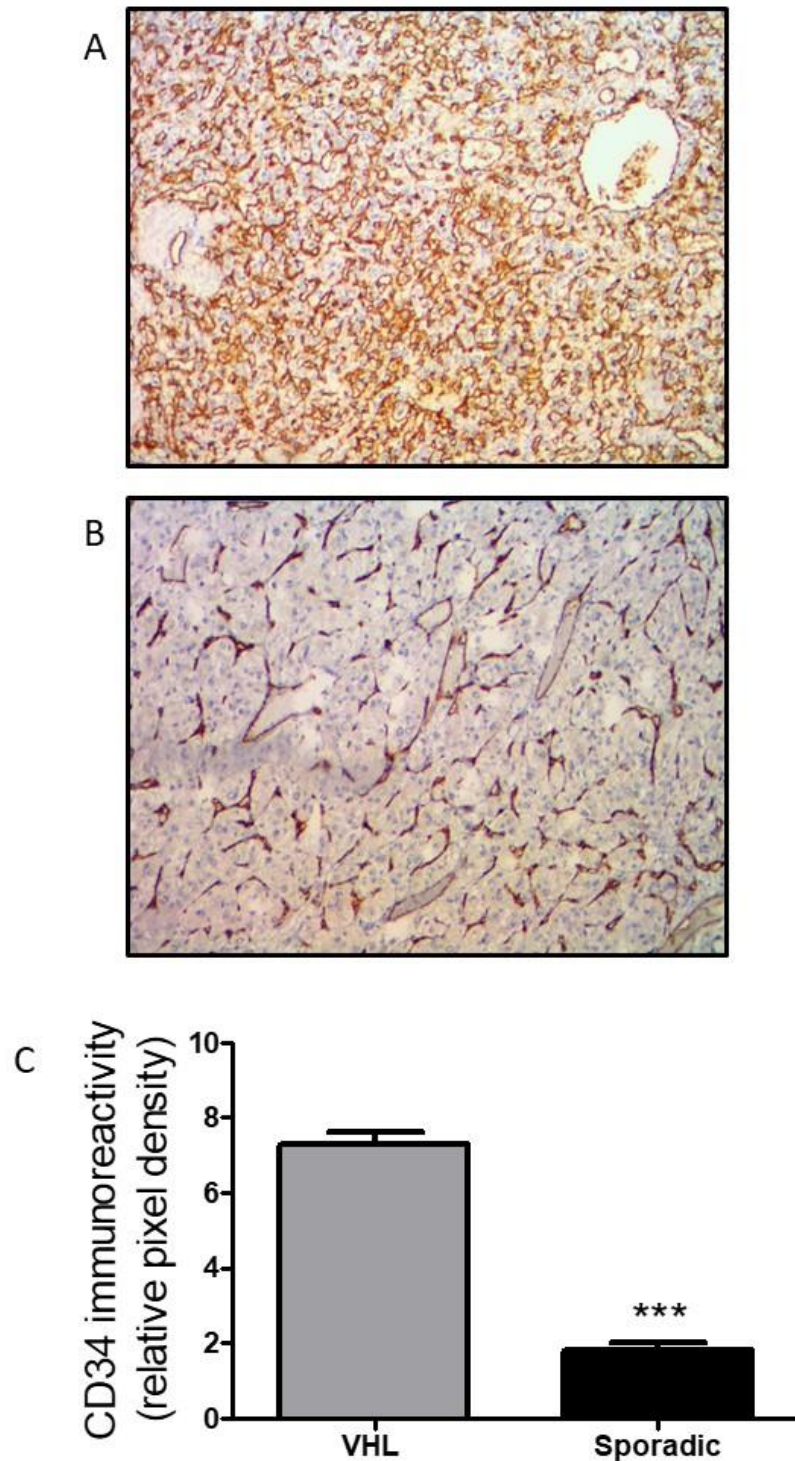


Figure 5. Tissue expression of CD 34 by immunohistochemistry. Representative images of VHL (A) and sporadic pheochromocytomas (B) (brown area, original magnification X 100; polymer peroxidase-based method). C, Stained area relative to total tissue area for CD 34 immunostaining in VHL tumoral tissue and sporadic cases. Each bar represents mean $\pm$ SEM of 3 areas/tumor in VHL and sporadic group (\*\* $P=0.0002$ ); Student's t-test.

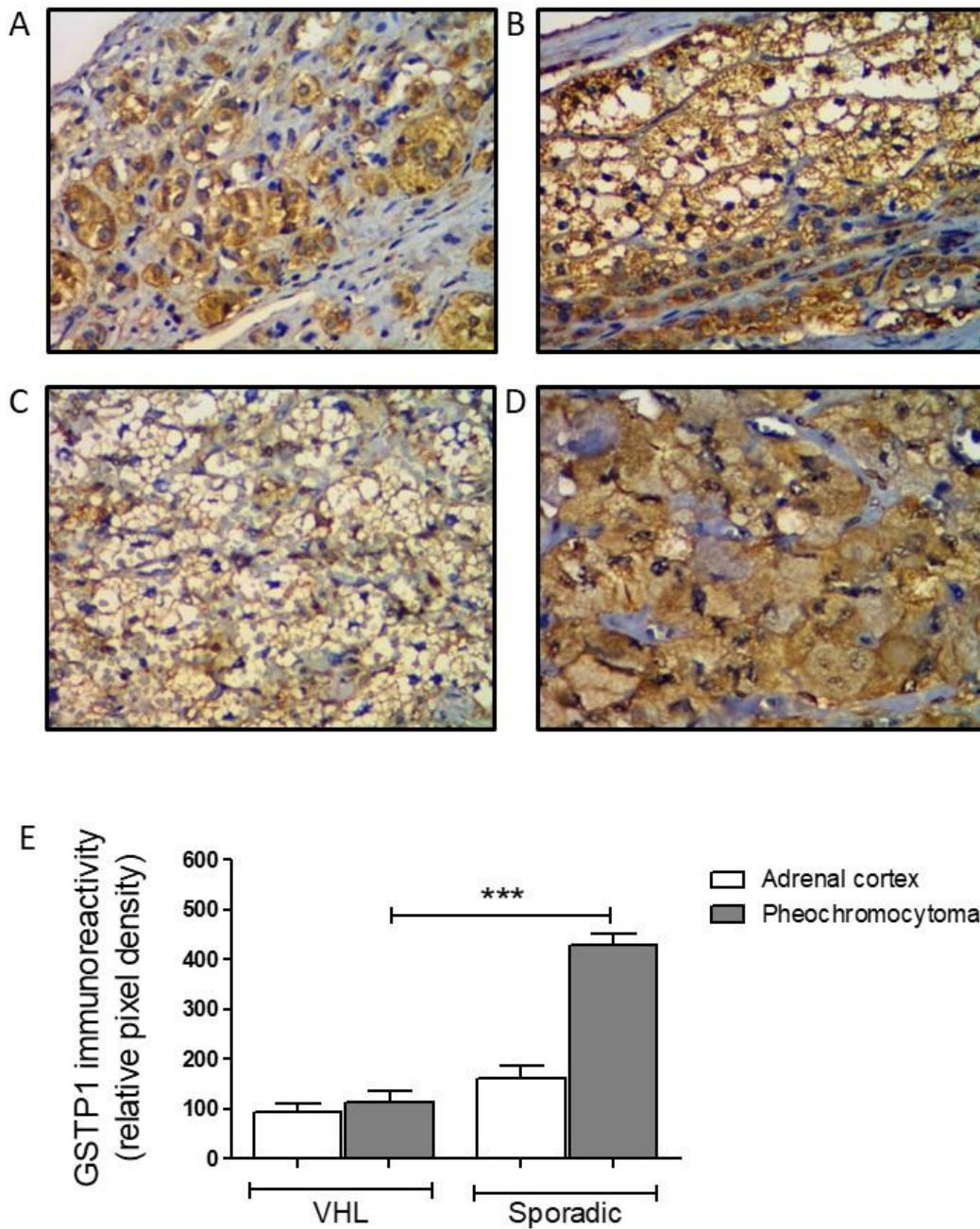


Figure 6. Tissue expression of GSTP1 by immunohistochemistry. Representative images of normal adrenal gland in VHL (A) and sporadic pheochromocytomas (B). Representative images of tumoral tissue in VHL (C) and sporadic pheochromocytomas (D) (brown area, original magnification X 400; polymer peroxidase-based method). E. Stained area relative to total tissue for GSTP1 immunostaining in normal gland and tumoral tissue in VHL and sporadic cases. Each bar represents mean $\pm$ SEM of 3 areas/tumor or 3 areas/normal adrenal gland in VHL and sporadic group (\*\*P=0.0001); ANOVA.

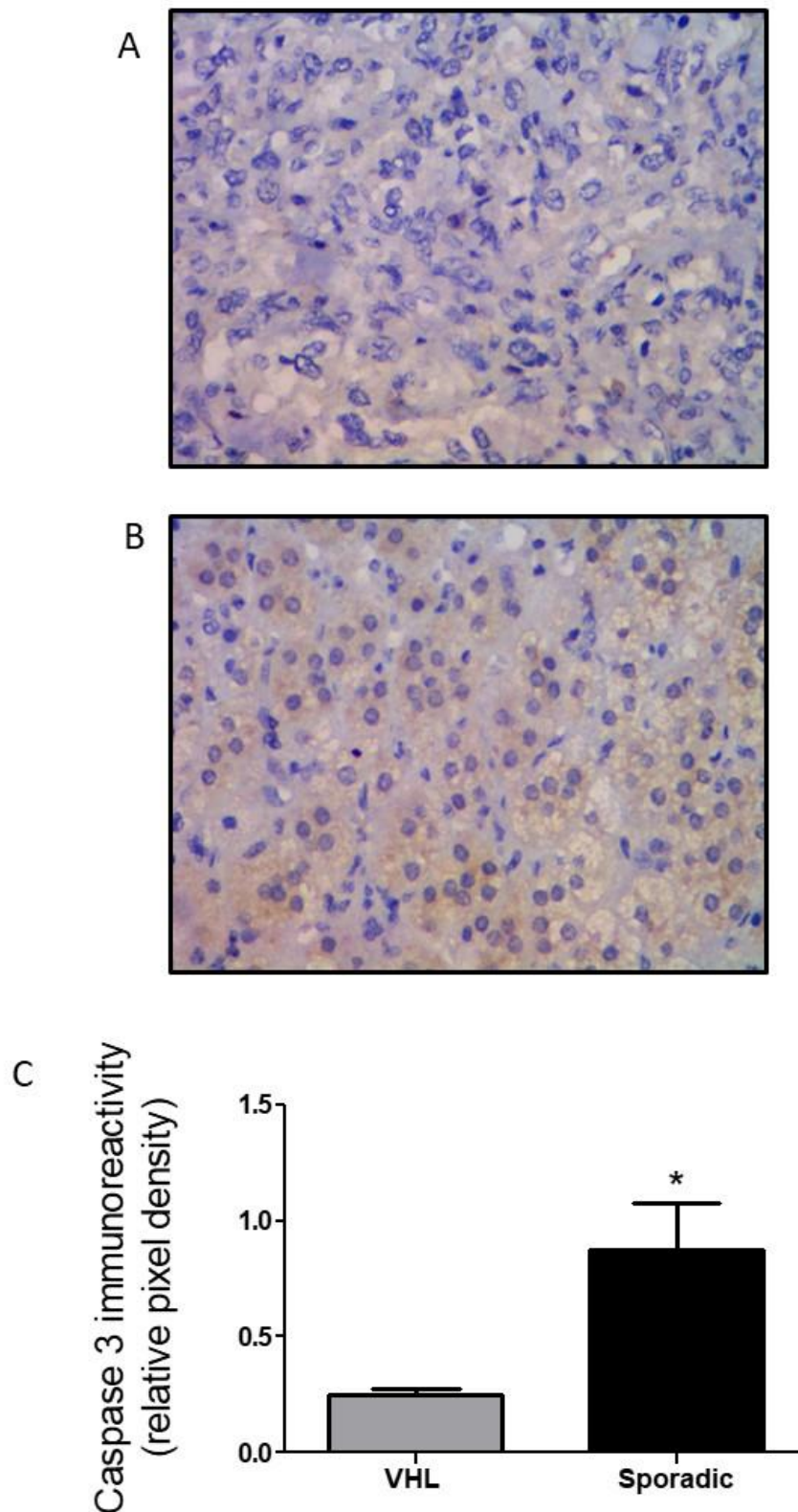


Figure 7. Tissue expression of caspase-3 by immunohistochemistry. Representative images of VHL (A) and sporadic pheochromocytomas (B) (brown area, original magnification X 400; polymer peroxidase-based method). C, Stained area relative to total tissue area for caspase-3 immunostaining in VHL tumoral tissue and sporadic cases. Each bar represents mean $\pm$ SEM of 3 areas/tumor in VHL and sporadic group (\*P=0.02); Student's t-test.

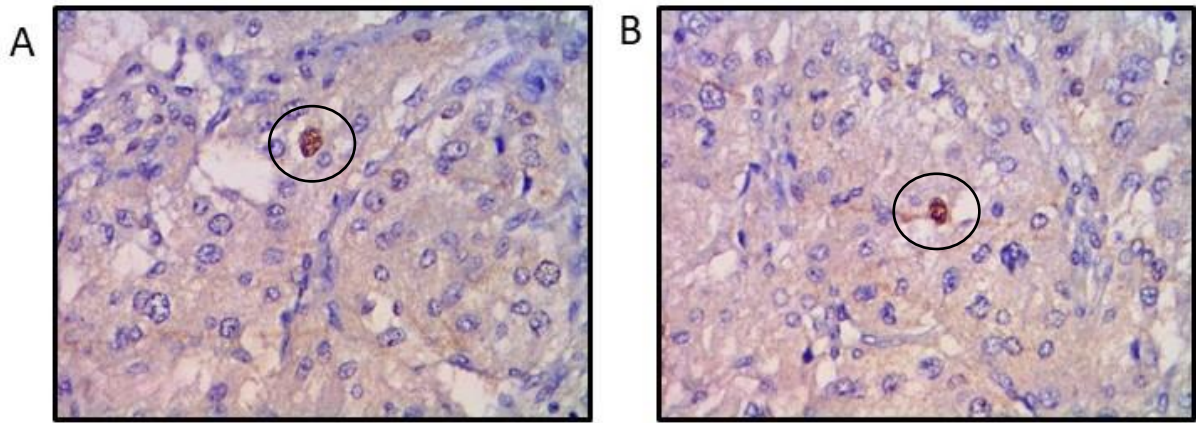


Figure 8. Representative images of p53 expression by immunohistochemistry. Representative images of VHL (A) and sporadic pheochromocytomas (B) (brown area, original magnification X 400; polymer peroxidase-based method).

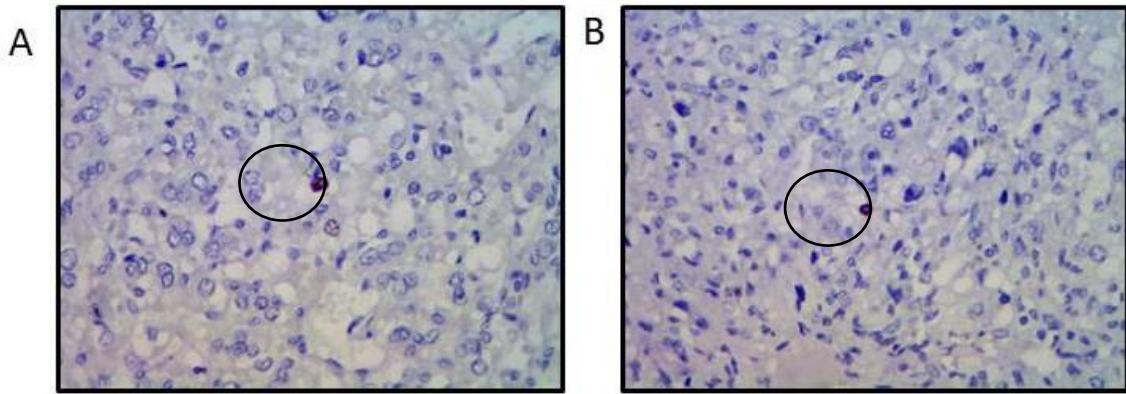


Figure 9. Representative images of Ki-67/MIB-1 expression by immunohistochemistry. Representative images of VHL (A) and sporadic pheochromocytomas (B) (brown area, original magnification X 400; polymer peroxidase-based method).

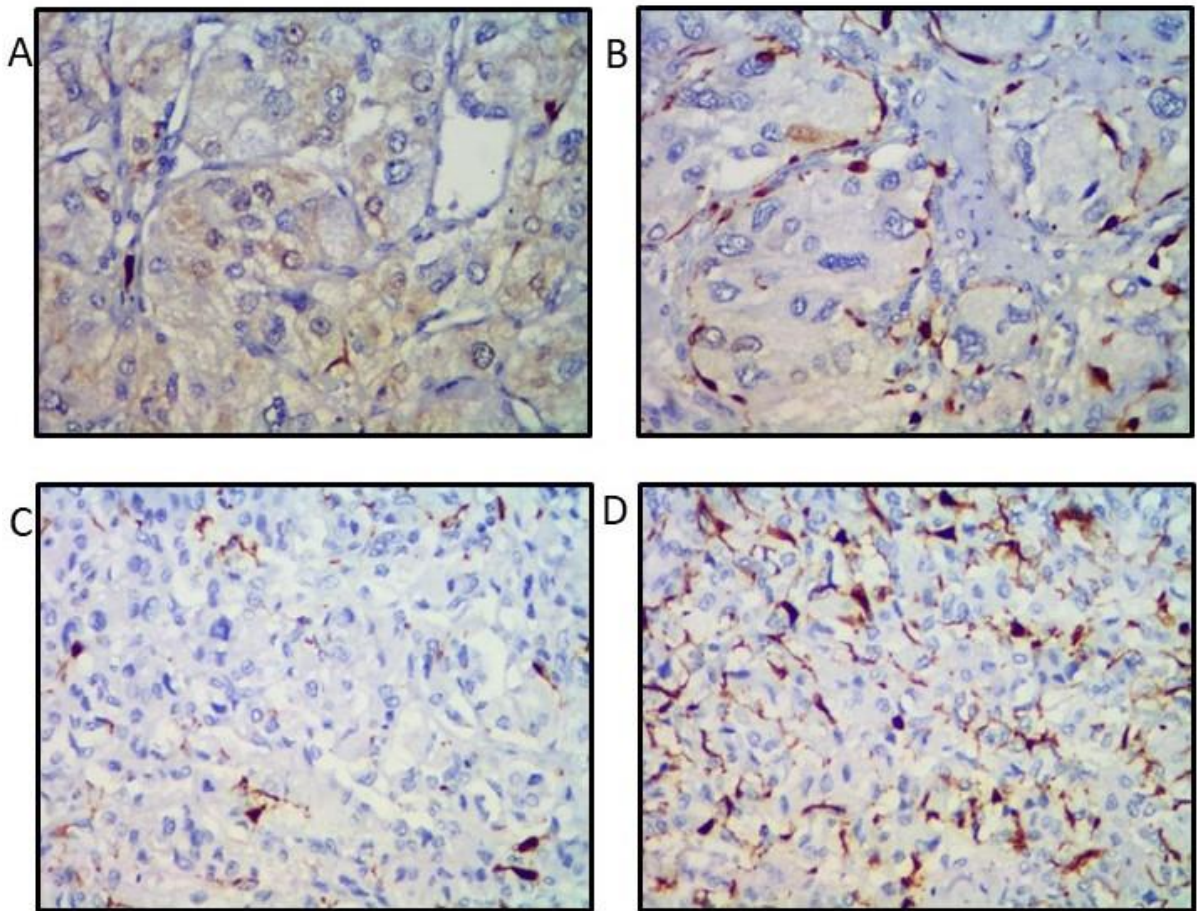
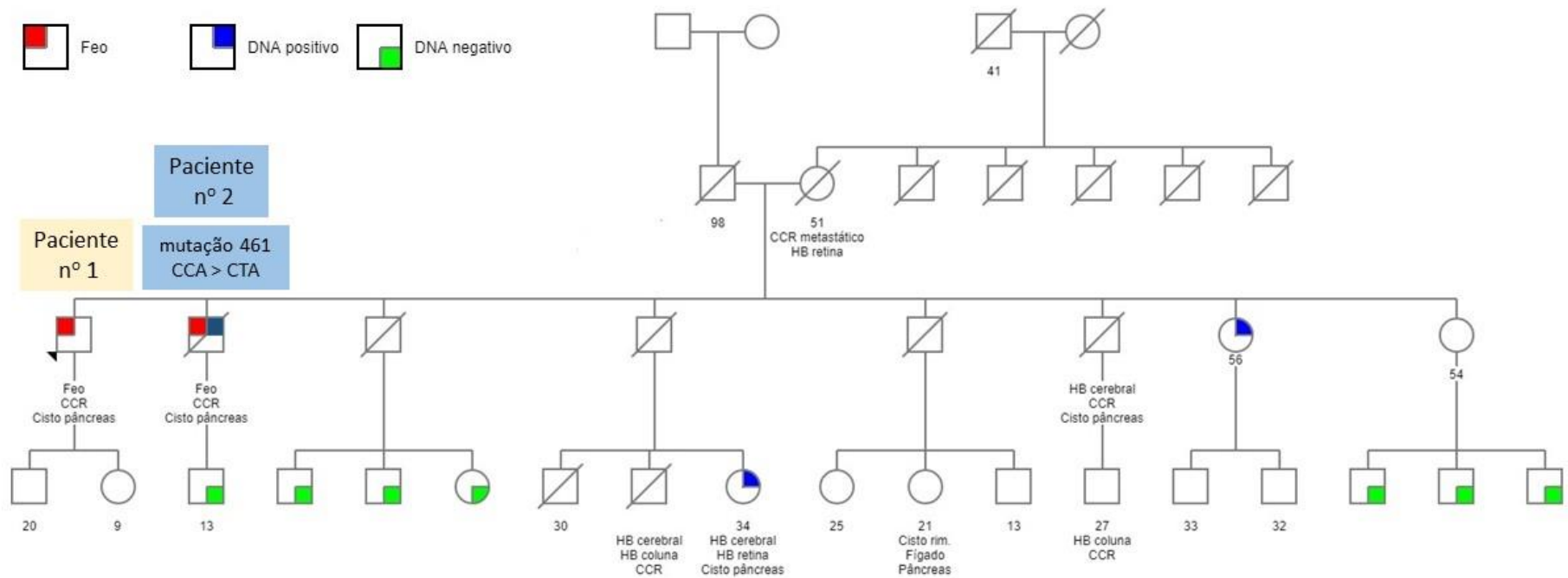


Figure 10. A- Representative images of S-100 expression by immunohistochemistry. (brown area, A and B, sporadic pheochromocytoma C and D, VHL pheochromocytoma, different areas in the same tumor, original magnification x400; polymer peroxidase-based method).



Supplementary figure 1.pedigree chart of patients 1 and 2.

## BIBLIOGRAFIA

BARONTINI, M.; LEVIN, G.; SANSONO, G. Characteristics of pheochromocytoma in a 4- to 20-year-old population. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1073, p. 30-7, Aug 2006.

BAUSCH, B. et al. Long-term prognosis of patients with pediatric pheochromocytoma. **Endocr Relat Cancer**, v. 21, n. 1, p. 17-25, Feb 2014.

CAMPOS, C. Z. et al. Glutathione S-transferases deletions may act as prognosis and therapeutic markers in breast cancer. **Clin Exp Med**, v. 18, n. 1, p. 27-35, Feb 2018.

CHAN, Q. K. et al. Promoter methylation and differential expression of pi-class glutathione S-transferase in endometrial carcinoma. **J Mol Diagn**, v. 7, n. 1, p. 8-16, Feb 2005.

DAHIA, P. L. et al. Molecular and immunohistochemical analysis of P53 in pheochromocytoma. **Br J Cancer**, v. 72, n. 5, p. 1211-3, Nov 1995.

DE KRIJGER, R. R. et al. Prognostic value of p53, bcl-2, and c-erbB-2 protein expression in pheochromocytomas. **J Pathol**, v. 188, n. 1, p. 51-5, May 1999.

DEVARAJAN, E. et al. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. **Oncogene**, v. 21, n. 57, p. 8843-51, Dec 12 2002.

DINER, E. K. et al. Partial adrenalectomy: the National Cancer Institute experience. **Urology**, v. 66, n. 1, p. 19-23, Jul 2005.

GALLOU, C. et al. Association of GSTT1 non-null and NAT1 slow/rapid genotypes with von Hippel-Lindau tumour suppressor gene transversions in sporadic renal cell carcinoma. **Pharmacogenetics**, v. 11, n. 6, p. 521-35, Aug 2001.

GUPTA, D. et al. Prognostic value of immunohistochemical expression of topoisomerase alpha II, MIB-1, p53, E-cadherin, retinoblastoma gene protein product, and HER-2/neu in adrenal and extra-adrenal pheochromocytomas. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v. 8, n. 4, p. 267-74, Dec 2000.

HARRIS, C. C. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. **J Natl Cancer Inst**, v. 88, n. 20, p. 1442-55, Oct 16 1996.

LIN, X. et al. GSTP1 CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells. **Am J Pathol**, v. 159, n. 5, p. 1815-26, Nov 2001.

LINNOILA, R. I. et al. Histopathology of benign versus malignant sympathoadrenal paragangliomas: clinicopathologic study of 120 cases including unusual histologic features. **Hum Pathol**, v. 21, n. 11, p. 1168-80, Nov 1990.

LONSER, R. R. et al. von Hippel-Lindau disease. **Lancet**, v. 361, n. 9374, p. 2059-67, Jun 14 2003.

MANNELLI, M. et al. Pheochromocytoma in Italy: a multicentric retrospective study. **Eur J Endocrinol**, v. 141, n. 6, p. 619-24, Dec 1999.

MARTIN, S. J. et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **J Exp Med**, v. 182, n. 5, p. 1545-56, Nov 1 1995.

MIN, J. H. et al. Structure of an HIF-1 $\alpha$ -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. **Science**, v. 296, n. 5574, p. 1886-9, Jun 7 2002.

NEDELICHEVA KRISTENSEN, V. et al. Single tube multiplex polymerase chain reaction genotype analysis of GSTM1, GSTT1 and GSTP1: relation of genotypes to TP53 tumor status and clinicopathological variables in breast cancer patients. **Pharmacogenetics**, v. 8, n. 5, p. 441-7, Oct 1998.

NELSON, W. G. et al. Preneoplastic prostate lesions: an opportunity for prostate cancer prevention. **Ann N Y Acad Sci**, v. 952, p. 135-44, Dec 2001.

NEUMANN, H. P. et al. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. **N Engl J Med**, v. 346, n. 19, p. 1459-66, May 9 2002.

NEUMANN, H. P. et al. Pheochromocytomas, multiple endocrine neoplasia type 2, and von Hippel-Lindau disease. **N Engl J Med**, v. 329, n. 21, p. 1531-8, Nov 18 1993.

OHJI, H. et al. Tumour angiogenesis and Ki-67 expression in pheochromocytoma. **BJU Int**, v. 87, n. 4, p. 381-5, Mar 2001.

PAVLOVICH, C. P.; LINEHAN, W. M.; WALTHER, M. M. Partial adrenalectomy in patients with multiple adrenal tumors. **Curr Urol Rep**, v. 2, n. 1, p. 19-23, Feb 2001.

PLOUIN, P. F. et al. [Screening for pheochromocytoma : in which hypertensive patients? A semiological study of 2585 patients, including 11 with pheochromocytoma (author's transl)]. **Nouv Presse Med**, v. 10, n. 11, p. 869-72, Mar 7 1981.

POLLARD, P. J. et al. Expression of HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  (EPAS1), and their target genes in paraganglioma and pheochromocytoma with VHL and SDH mutations. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, n. 11, p. 4593-8, Nov 2006.

PU, X. et al. Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival. **Apoptosis**, v. 22, n. 3, p. 357-368, Mar 2017.

RAVAL, R. R. et al. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 13, p. 5675-86, Jul 2005.

SAXENA, A. et al. GSTP1 methylation and polymorphism increase the risk of breast cancer and the effects of diet and lifestyle in breast cancer patients. **Exp Ther Med**, v. 4, n. 6, p. 1097-1103, Dec 2012.

THOMPSON, L. D. 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**, v. 26, n. 5, p. 551-66, May 2002.

TISCHLER, A. S. Pheochromocytoma and extra-adrenal paraganglioma: updates. **Arch Pathol Lab Med**, v. 132, n. 8, p. 1272-84, Aug 2008.

UNGER, P. et al. S100 protein-positive sustentacular cells in malignant and locally aggressive adrenal pheochromocytomas. **Arch Pathol Lab Med**, v. 115, n. 5, p. 484-7, May 1991.

VAN DER HARST, E. et al. Proliferative index in phaeochromocytomas: does it predict the occurrence of metastases? **J Pathol**, v. 191, n. 2, p. 175-80, Jun 2000.

WALTHER, M. M. et al. Clinical and genetic characterization of pheochromocytoma in von Hippel-Lindau families: comparison with sporadic pheochromocytoma gives insight into natural history of pheochromocytoma. **J Urol**, v. 162, n. 3 Pt 1, p. 659-64, Sep 1999.

WANG, D. G. et al. Expression of the apoptosis-suppressing gene BCL-2 in pheochromocytoma is associated with the expression of C-MYC. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, n. 6, p. 1949-52, Jun 1997.

WONG, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 30, p. 87, Sep 26 2011.

YU, Y. et al. The relationship between GSTA1, GSTM1, GSTP1, and GSTT1 genetic polymorphisms and bladder cancer susceptibility: A meta-analysis. **Medicine (Baltimore)**, v. 95, n. 37, p. e4900, Sep 2016.

## 6 CONCLUSÃO

1. Os feocromocitomas presentes em pacientes com a doença de von Hippel-Lindau foram diagnosticados com diâmetro tumoral menor que os casos esporádicos, além de cursar com ausência de sintomatologia específica, visto que os pacientes fazem parte de um rastreio familiar, no qual a doença já foi diagnosticada previamente.
2. Todos os casos de feocromocitomas esporádicos e familiares exibiram critérios de PASS menor do que 4, compatível com a evolução benigna em nossa casuística.
3. Marcadores imunoistoquímicos relacionados à maior agressividade tumoral em outras neoplasias à exemplo da proteína mutada p53 e o índice de proliferação celular avaliado através do Ki-67/MIB-1 foram positivos em raras células, nos casos familiares e esporádicos, compatíveis com neoplasias de crescimento indolente com preservação da integridade e da função da proteína p53.
4. Os feocromocitomas presentes em pacientes com doença de VHL apresentaram diminuição na imunoexpressão da caspase-3, caracterizando tumores com diminuição da taxa de apoptose, possivelmente relacionado à baixa taxa de dano celular, caracterizada pela baixa expressão nuclear da proteína p53.
5. Os feocromocitomas VHL apresentaram diminuição da imunoexpressão da enzima GSTP1, indicando diminuição do metabolismo de xenobióticos em comparação aos casos esporádicos. A diminuição da GSTP1 torna os Feos VHL mais susceptíveis a danos oxidativos; polimorfismos genéticos ou hipermetilação do gene GSTP-1 podem ser responsáveis por essa diminuição da atividade proteica.
6. Observou-se em nossos casos de feocromocitomas em pacientes com a doença de VHL importante aumento da vascularização, caracterizando desregulação do HIF (fator induzido pela hipóxia). A vascularização pode ser avaliada através do estudo imunoistoquímico, procedimento diagnóstico já padronizado em diversos laboratórios de patologia, servindo como técnica adicional na predição de possíveis tumores hereditários visto que a hiperexpressão de genes relacionados à angiogênese, a exemplo do VEGF, é uma das características moleculares na doença de VHL.

7. A combinação de tumores pequenos, em pacientes com ausência de sintomatologia clássica, com baixos valores nos critérios histológicos do PASS, baixa proliferação celular e expressão da proteína P53, diminuição da apoptose e dos níveis da proteína GSTP1 e alta vascularização em feocromocitomas, esteve relacionada a tumores familiares em nossa casuística.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Demonstrarmos diferenças na apresentação clínica e nos marcadores moleculares em feocromocitomas esporádicos em comparação aos encontrados em pacientes com VHL. A expressiva diferença na vascularização presente nos feocromocitomas de pacientes com a doença de VHL, avaliada com estudo imunoistoquímico, contribui ao patologista na suspeita de doença de VHL em pacientes cujo feocromocitoma seria a primeira manifestação da doença. Outros genes relacionados à angiogênese podem ser avaliados futuramente a exemplo do VEGF e HIF. Este estudo ocorre com a participação de outros centros de pesquisa, no Brasil e no exterior, os quais contribuirão para o aumento da casuística.

## 8 BIBLIOGRAFIA

ADSAY, V. Ki67 labeling index in neuroendocrine tumors of the gastrointestinal and pancreatobiliary tract: to count or not to count is not the question, but rather how to count. **Am J Surg Pathol**, v. 36, n. 12, p. 1743-6, Dec 2012.

AUGUST, C. et al. CGH and CD 44/MIB-1 immunohistochemistry are helpful to distinguish metastasized from nonmetastasized sporadic pheochromocytomas. **Mod Pathol**, v. 17, n. 9, p. 1119-28, Sep 2004.

BALL, M. W.; HEMAL, A. K.; ALLAF, M. E. International Consultation on Urological Diseases and European Association of Urology International Consultation on Minimally Invasive Surgery in Urology: laparoscopic and robotic adrenalectomy. **BJU international**, v. 119, n. 1, p. 13-21, 2017.

BAUSCH, B. et al. Long-term prognosis of patients with pediatric pheochromocytoma. **Endocr Relat Cancer**, v. 21, n. 1, p. 17-25, Feb 2014.

BINDERUP, M. L. et al. von Hippel-Lindau disease (vHL). National clinical guideline for diagnosis and surveillance in Denmark. 3rd edition. **Dan Med J**, v. 60, n. 12, p. B4763, Dec 2013.

BRANDT, R. Zur Frage der Angiomatosis retinae. **Albrecht von Graefes Archiv für Ophthalmologie**, v. 106, n. 1-2, p. 127-165, 1921.

BRAUCH, H. et al. von Hippel-Lindau (VHL) disease with pheochromocytoma in the Black Forest region of Germany: evidence for a founder effect. **Hum Genet**, v. 95, n. 5, p. 551-6, May 1995.

CASSOL, C.; METE, O. Endocrine manifestations of von Hippel-Lindau disease. **Arch Pathol Lab Med**, v. 139, n. 2, p. 263-8, Feb 2015.

CHAI, Y. J. et al. Systematic Review of Surgical Approaches for Adrenal Tumors: Lateral Transperitoneal versus Posterior Retroperitoneal and Laparoscopic versus Robotic Adrenalectomy. **Int J Endocrinol**, v. 2014, p. 918346, 2014.

CHEN, F. et al. Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype. **Hum Mutat**, v. 5, n. 1, p. 66-75, 1995.

CHEN, H. et al. The North American Neuroendocrine Tumor Society consensus guideline for the diagnosis and management of neuroendocrine tumors: pheochromocytoma, paraganglioma, and medullary thyroid cancer. **Pancreas**, v. 39, n. 6, p. 775-83, Aug 2010.

CRESPIGIO, J. et al. Von Hippel-Lindau disease: a single gene, several hereditary tumors. **J Endocrinol Invest**, v. 41, n. 1, p. 21-31, Jan 2018.

DELELLIS, R. A. **Pathology and genetics of tumours of endocrine organs.** IARC, 2004. ISBN 9283224167.

DEVARAJAN, E. et al. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. **Oncogene**, v. 21, n. 57, p. 8843-51, Dec 12 2002.

EVANS, D. G. et al. Birth incidence and prevalence of tumor-prone syndromes: estimates from a UK family genetic register service. **Am J Med Genet A**, v. 152A, n. 2, p. 327-32, Feb 2010.

FARRUGIA, F. A. et al. Pheochromocytoma, diagnosis and treatment: Review of the literature. **Endocr Regul**, v. 51, n. 3, p. 168-181, Jul 1 2017.

FREW, I. J.; KREK, W. pVHL: a multipurpose adaptor protein. **Sci Signal**, v. 1, n. 24, p. pe30, Jun 17 2008.

GALATI, S. J. et al. The Mount Sinai clinical pathway for the management of pheochromocytoma. **Endocr Pract**, v. 21, n. 4, p. 368-82, Apr 2015.

HARARI, A.; INABNET, W. B., 3RD. Malignant pheochromocytoma: a review. **Am J Surg**, v. 201, n. 5, p. 700-8, May 2011.

HAVEKES, B. et al. Detection and treatment of pheochromocytomas and paragangliomas: current standing of MIBG scintigraphy and future role of PET imaging. **Q J Nucl Med Mol Imaging**, v. 52, n. 4, p. 419-29, Dec 2008.

HES, F. J. et al. Frequency of Von Hippel-Lindau germline mutations in classic and non-classic Von Hippel-Lindau disease identified by DNA sequencing, Southern blot analysis and multiplex ligation-dependent probe amplification. **Clin Genet**, v. 72, n. 2, p. 122-9, Aug 2007.

HIPPEL, E. V. Ueber eine sehr seltene Erkrankung der Netzhaut. **Albrecht von Graefes Archiv für Ophthalmologie**, v. 59, n. 1, p. 83-106, 1904.

JAFRI, M.; MAHER, E. R. The genetics of phaeochromocytoma: using clinical features to guide genetic testing. **Eur J Endocrinol**, v. 166, n. 2, p. 151-8, Feb 2012.

JARDIM, B. V. et al. Glutathione transferase pi (GSTpi) expression in breast cancer: an immunohistochemical and molecular study. **Acta Histochem**, v. 114, n. 5, p. 510-7, Sep 2012.

JOCHMANOVA, I. et al. SDHB-related pheochromocytoma and paraganglioma penetrance and genotype-phenotype correlations. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 143, n. 8, p. 1421-1435, Aug 2017.

JOSEPHY, P. D. Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. **Hum Genomics Proteomics**, v. 2010, p. 876940, Jun 13 2010.

KAELIN, W. G., JR.; RATCLIFFE, P. J. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. **Mol Cell**, v. 30, n. 4, p. 393-402, May 23 2008.

KIMURA, N. et al. Histological grading of adrenal and extra-adrenal pheochromocytomas and relationship to prognosis: a clinicopathological analysis of 116 adrenal pheochromocytomas and 30 extra-adrenal sympathetic paragangliomas including 38 malignant tumors. **Endocr Pathol**, v. 16, n. 1, p. 23-32, Spring 2005.

KNUDSON, A. G., JR. Genetics of human cancer. **Annu Rev Genet**, v. 20, p. 231-51, 1986.

KNUDSON, A. G., JR.; STRONG, L. C. Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma. **Am J Hum Genet**, v. 24, n. 5, p. 514-32, Sep 1972.

KRIEG, M. et al. Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. **Oncogene**, v. 19, n. 48, p. 5435-43, Nov 16 2000.

LAM, K. Y. et al. The clinicopathological features and importance of p53, Rb, and mdm2 expression in pheochromocytomas and paragangliomas. **J Clin Pathol**, v. 54, n. 6, p. 443-8, Jun 2001.

LAMIELL, J. M.; SALAZAR, F. G.; HSIA, Y. E. von Hippel-Lindau disease affecting 43 members of a single kindred. **Medicine (Baltimore)**, v. 68, n. 1, p. 1-29, Jan 1989.

LATIF, F. et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. **Science**, v. 260, n. 5112, p. 1317-20, May 28 1993.

LEE, S. et al. Transcription-dependent nuclear-cytoplasmic trafficking is required for the function of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 2, p. 1486-97, Feb 1999.

LENDERS, J. W. et al. Pheochromocytoma. **Lancet**, v. 366, n. 9486, p. 665-75, Aug 20-26 2005.

LENDERS, J. W. et al. Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 99, n. 6, p. 1915-42, Jun 2014.

LEUNG, K. et al. Pheochromocytoma: the range of appearances on ultrasound, CT, MRI, and functional imaging. **AJR Am J Roentgenol**, v. 200, n. 2, p. 370-8, Feb 2013.

LI, M.; KIM, W. Y. Two sides to every story: the HIF-dependent and HIF-independent functions of pVHL. **J Cell Mol Med**, v. 15, n. 2, p. 187-95, Feb 2011.

LINDAU, A. Angiomatosis of retina with brain complications. **Acta Ophth.**, v. 4, p. 193-227, 1927.

LINNOILA, R. I. et al. Histopathology of benign versus malignant sympathoadrenal paragangliomas: clinicopathologic study of 120 cases including unusual histologic features. **Hum Pathol**, v. 21, n. 11, p. 1168-80, Nov 1990.

LLOYD, R. V. Adrenal cortical tumors, pheochromocytomas and paragangliomas. **Mod Pathol**, v. 24 Suppl 2, p. S58-65, Apr 2011.

LONSER, R. R. et al. von Hippel-Lindau disease. **Lancet**, v. 361, n. 9374, p. 2059-67, Jun 14 2003.

MA, H. L. et al. Decreased expression of glutathione S-transferase pi correlates with poorly differentiated grade in patients with oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 44, n. 3, p. 193-200, Mar 2015.

MADDOCK, I. R. et al. A genetic register for von Hippel-Lindau disease. **J Med Genet**, v. 33, n. 2, p. 120-7, Feb 1996.

MAHER, E. R.; NEUMANN, H. P.; RICHARD, S. von Hippel-Lindau disease: a clinical and scientific review. **Eur J Hum Genet**, v. 19, n. 6, p. 617-23, Jun 2011.

MAHER, E. R. et al. Phenotypic expression in von Hippel-Lindau disease: correlations with germline VHL gene mutations. **J Med Genet**, v. 33, n. 4, p. 328-32, Apr 1996.

MAHER, E. R. et al. Clinical features and natural history of von Hippel-Lindau disease. **Q J Med**, v. 77, n. 283, p. 1151-63, Nov 1990.

MARTUCCI, V. L.; PACAK, K. Pheochromocytoma and paraganglioma: diagnosis, genetics, management, and treatment. **Curr Probl Cancer**, v. 38, n. 1, p. 7-41, Jan-Feb 2014.

MCNEILL, A. et al. Genotype-phenotype correlations in VHL exon deletions. **Am J Med Genet A**, v. 149A, n. 10, p. 2147-51, Oct 2009.

MELMON, K. L.; ROSEN, S. W. Lindau's Disease. Review of the Literature and Study of a Large Kindred. **Am J Med**, v. 36, p. 595-617, Apr 1964.

METE, O. et al. Protocol for the examination of specimens from patients with pheochromocytomas and extra-adrenal paragangliomas. **Arch Pathol Lab Med**, v. 138, n. 2, p. 182-8, Feb 2014.

MIN, J. H. et al. Structure of an HIF-1 $\alpha$  -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. **Science**, v. 296, n. 5574, p. 1886-9, Jun 7 2002.

MOLE, D. R. et al. Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing. **IUBMB Life**, v. 52, n. 1-2, p. 43-7, Jul 2001.

NEUMANN, H. P. et al. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. **N Engl J Med**, v. 346, n. 19, p. 1459-66, May 9 2002.

NEUMANN, H. P. et al. Consequences of direct genetic testing for germline mutations in the clinical management of families with multiple endocrine neoplasia, type II. **JAMA**, v. 274, n. 14, p. 1149-51, Oct 11 1995.

NIH state-of-the-science statement on management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma"). NIH Consens State Sci Statements, v. 19, n. 2, p. 1-25, Feb 4-6 2002.

NORDSTROM-O'BRIEN, M. et al. Genetic analysis of von Hippel-Lindau disease. **Hum Mutat**, v. 31, n. 5, p. 521-37, May 2010.

O'DONOVAN, N. et al. Caspase 3 in breast cancer. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 2, p. 738-42, Feb 2003.

OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Caspases and cancer. **Cell Death Differ**, v. 18, n. 9, p. 1441-9, Sep 2011.

ONG, K. R. et al. Genotype-phenotype correlations in von Hippel-Lindau disease. **Hum Mutat**, v. 28, n. 2, p. 143-9, Feb 2007.

PAMPORAKI, C. et al. Plasma-free vs deconjugated metanephrines for diagnosis of pheochromocytoma. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 79, n. 4, p. 476-83, Oct 2013.

PAVAN, N. et al. Contemporary minimally invasive surgery for adrenal masses: it's not all about (pure) laparoscopy. **BJU Int**, v. 119, n. 2, p. 201-203, Feb 2017.

PERIGNY, M. et al. Pancreatic endocrine microadenomatosis in patients with von Hippel-Lindau disease: characterization by VHL/HIF pathway proteins expression. **Am J Surg Pathol**, v. 33, n. 5, p. 739-48, May 2009.

PILLAI, S. et al. Updates on the genetics and the clinical impacts on pheochromocytoma and paraganglioma in the new era. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 100, p. 190-208, Apr 2016.

POULSEN, M. L.; BUDTZ-JORGENSEN, E.; BISGAARD, M. L. Surveillance in von Hippel-Lindau disease (vHL). **Clin Genet**, v. 77, n. 1, p. 49-59, Jan 2010.

PROWSE, A. H. et al. Somatic inactivation of the VHL gene in von Hippel-Lindau disease tumors. **Am J Hum Genet**, v. 60, n. 4, p. 765-71, Apr 1997.

RAMSAY, J. A. et al. Lipid degeneration in pheochromocytomas mimicking adrenal cortical tumors. **Am J Surg Pathol**, v. 11, n. 6, p. 480-6, Jun 1987.

ROCHA, J. C. et al. High frequency of novel germline mutations in the VHL gene in the heterogeneous population of Brazil. **J Med Genet**, v. 40, n. 3, p. e31, Mar 2003.

SCHMIDT, L. S.; LINEHAN, W. M. Editorial comment. **Urology**, v. 83, n. 3, p. 675 e5; discussion 675 e5-6, Mar 2014.

SCHNEKENBURGER, M.; KARIUS, T.; DIEDERICH, M. Regulation of epigenetic traits of the glutathione S-transferase P1 gene: from detoxification toward cancer prevention and diagnosis. **Front Pharmacol**, v. 5, p. 170, 2014.

SCHULZ, C.; EISENHOFER, G.; LEHNERT, H. Principles of catecholamine biosynthesis, metabolism and release. **Front Horm Res**, v. 31, p. 1-25, 2004.

SHAPIRO, B. et al. Iodine-131 metaiodobenzylguanidine for the locating of suspected pheochromocytoma: experience in 400 cases. **J Nucl Med**, v. 26, n. 6, p. 576-85, Jun 1985.

STOLLE, C. et al. Improved detection of germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. **Hum Mutat**, v. 12, n. 6, p. 417-23, 1998.

STRASSER, A.; CORY, S.; ADAMS, J. M. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. **EMBO J**, v. 30, n. 18, p. 3667-83, Aug 23 2011.

TERRIER, P. et al. An immunohistochemical study of pi class glutathione S-transferase expression in normal human tissue. **Am J Pathol**, v. 137, n. 4, p. 845-53, Oct 1990.

THOMPSON, L. D. Pheochromocytoma of the Adrenal gland Scaled Score (PASS) to separate benign from malignant neoplasms: a clinicopathologic and immunophenotypic study of 100 cases. **The American journal of surgical pathology**, v. 26, n. 5, p. 551-566, 2002.

TIMMERS, H. J.; TAIEB, D.; PACAK, K. Current and future anatomical and functional imaging approaches to pheochromocytoma and paraganglioma. **Horm Metab Res**, v. 44, n. 5, p. 367-72, May 2012.

VORTMEYER, A. O. et al. Evolution of VHL tumourigenesis in nerve root tissue. **J Pathol**, v. 210, n. 3, p. 374-82, Nov 2006.

WANG, G. L. et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 12, p. 5510-4, Jun 6 1995.

WANG, V. et al. Differential gene up-regulation by hypoxia-inducible factor-1alpha and hypoxia-inducible factor-2alpha in HEK293T cells. **Cancer Res**, v. 65, n. 8, p. 3299-306, Apr 15 2005.

WILDING, A. et al. Life expectancy in hereditary cancer predisposing diseases: an observational study. **J Med Genet**, v. 49, n. 4, p. 264-9, Apr 2012.

WONG, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 30, p. 87, Sep 26 2011.

ZHUANG, Z. et al. Tumor derived vasculogenesis in von Hippel-Lindau disease-associated tumors. **Sci Rep**, v. 4, p. 4102, Feb 17 2014.

## 9 APÊNDICES

### 9.1 APÊNDICE 1: FICHA PARA COLETA DE DADOS CLÍNICOS.

#### FICHA PARA COLETA DE DADOS - PROJETO VHL

Nome: \_\_\_\_\_

Número do prontuário: \_\_\_\_\_ Gênero: F  M

Idade ao diagnóstico: \_\_\_\_\_

Motivo da suspeita do diagnóstico de feocromocitoma: \_\_\_\_\_

Data do diagnóstico: \_\_\_\_\_

Esporádico  Familiar  Presença de síndrome genética  NÃO  SIM, qual? -

Recidiva de feocromocitoma: NÃO  SIM

História familiar de feocromocitoma: NÃO  SIM

Antecedentes pessoais: \_\_\_\_\_

Antecedentes familiares: \_\_\_\_\_

#### Sintomas ao diagnóstico

Cefaleia

Calafrios

Palpitação

Dispnéia

Sudorese

Dor abdominal

Palidez

Náusea e vômito

Tremor

Dor torácica

#### Sinais ao diagnóstico

Hipertensão paroxística

Hipotensão postural

Hipertensão crônica

Taquicardia

Hipertensão tratada

Frequência cardíaca \_\_\_\_\_

Pressão arterial \_\_\_\_\_

**Exames Laboratoriais**

Catecolaminas urinárias em 24h \_\_\_\_\_

Metanefrinas urinárias em 24h: \_\_\_\_\_

Catecolaminas plasmáticas

Norepinefrina: \_\_\_\_\_

Epinefrina: \_\_\_\_\_

Dopamina: \_\_\_\_\_

Tumor secretor de:

Norepinefrina  Epinefrina  Dopamina  nenhum 

Cortisol basal: \_\_\_\_\_ C Cortisol urinário: \_\_\_\_\_

Data da TC de abdome: \_\_\_\_\_

Data da cirurgia: \_\_\_\_\_

Dimensões do tumor: \_\_\_\_\_

Unilateral  Bilateral Presença de metástase: Não  Sim 

Qual? \_\_\_\_\_

Presença de outros tumores: Não  Sim  Qual? \_\_\_\_\_Localização: Adrenal  Outra 

Qual \_\_\_\_\_

Presença da Doença de von Hippel-Lindau: Não  Sim Tipo 1  Tipo 2A  Tipo 2B  Tipo 2C 

Idade ao diagnóstico: \_\_\_\_\_

Data do diagnóstico: \_\_\_\_\_

O que levou à suspeita do diagnóstico?  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_História familiar: Não  Sim ,

Quem: \_\_\_\_\_

Teste genético: Não  Sim ,

Mutação: \_\_\_\_\_

Cromogranina A sérica: Negativa  Positiva , valor: \_\_\_\_\_

**Outras manifestações neoplásicas da doença de VHL:**

Carcinoma renal de células claras

Cistoadenoma do epidídimo

Cisto renal

Cisto hepático

Cisto pancreático

Feocromocitoma

Hemangioblastoma de cerebelo

Hemangioblastoma de medula

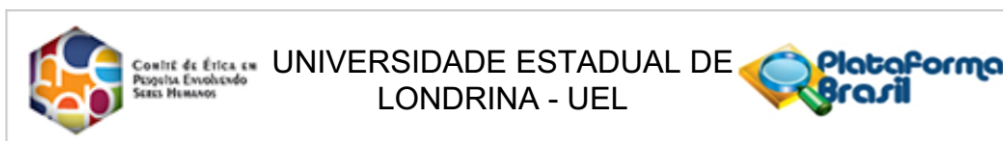
Hemangioblastoma de retina

Paraganglioma

Tumor do saco endolinfático

Tumor pancreático

## 9.2 APÊNDICE 2: CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** FEOCROMOCITOMAS NA DOENÇA DE VON HIPPEL-LINDAU

**Pesquisador:** Tânia Longo Mazzuco

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 77225917.5.0000.5231

**Instituição Proponente:** CCS - Departamento de Clínica Médica

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.400.064

#### Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa sobre avaliação de polimorfismos associados ao desenvolvimento de feocromocitomas na doença de Von Hippel-Lindau

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a presença de polimorfismos genéticos associados ao desenvolvimento de feocromocitomas

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos para os pacientes, pois serão utilizadas amostras de biópsias incluídas em parafina utilizadas em diagnóstico dos pacientes

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa apresentará grande contribuição para a prevenção, diagnóstico e estudo do prognóstico do feocromocitoma e doença de Von-Hippel Lindau.

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

Apresenta todos os termos obrigatórios.

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

Não há pendências

#### Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador (a),

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

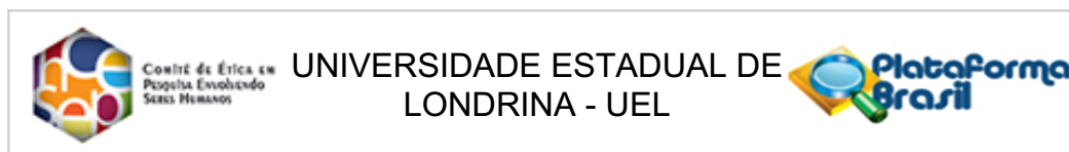
**CEP:** 86.057-970

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-5455

**E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.400.064

Este é seu parecer final de aprovação, vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. É sua responsabilidade imprimi-lo para apresentação aos órgãos e/ou instituições pertinentes.

Coordenação CEP/UEL.

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_949244.pdf	14/11/2017 14:24:55		Aceito
Outros	TERMO_DE_CONFIDENCIALIDADE_E_SIGILO.pdf	14/11/2017 14:24:14	JEFFERSON CRESPICIO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_de_responsabilidade_de_usuario_de_banco_de_material_biologico_humano.pdf	06/11/2017 17:05:37	JEFFERSON CRESPICIO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	respostaDeclaracaoHU.pdf	08/10/2017 23:49:44	Tânia Longo Mazzuco	Aceito
Outros	DeclaracaoHU_FEO.pdf	22/09/2017 08:26:27	Tânia Longo Mazzuco	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Feocromocitomas_na_doenca_de_VHL_detalhado_brochura.docx	23/07/2017 20:45:55	JEFFERSON CRESPICIO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_pdf.pdf	23/07/2017 17:20:14	JEFFERSON CRESPICIO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

LONDRINA, 27 de Novembro de 2017

Assinado por:  
Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli  
(Coordenador)

**Endereço:** LABESC - Sala 14  
**Bairro:** Campus Universitário **CEP:** 86.057-970  
**UF:** PR **Município:** LONDRINA  
**Telefone:** (43)3371-5455 **E-mail:** cep268@uel.br

## 9.3 APÊNDICE 3: ATA DE DEFESA DE TESE



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

201312980102

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

## ATA DE DEFESA DE TESE

Aos 29 dias do mês de maio do ano de 2018, na sala de VIDEOCONFERÊNCIA / HEMOCENTRO, desta Universidade, às 09:00 horas, reuniu-se a Banca Examinadora homologada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, composta por Dra. Tânia Longo Mazzuco (orientadora, como presidente da banca), Dr. Marco Aurelio Fornazieri, Dr. Silvio Henrique Maia de Almeida, Dr. José Claudio Casali da Rocha e Dr. Duarte Pignatelli na condição de membro remoto. A reunião teve por objetivo julgar o trabalho do estudante JEFFERSON CRESPIGIO sob o título: "ANÁLISE CLÍNICA E ANATOMOPATOLÓGICA DOS FEOCROMOCITOMAS ESPORÁDICOS EM COMPARAÇÃO COM A DOENÇA DE VON HIPPEL LINDAU". Os trabalhos foram abertos pela professora Dra. Tânia Longo Mazzuco. A seguir, foi dada a palavra ao estudante para apresentação do trabalho. Cada examinador arguiu o Doutorando, com tempos iguais de arguição e resposta. Terminadas as arguições, procedeu-se o julgamento do trabalho, sendo que o professor Dr. Duarte Pignatelli (membro remoto) enviou simultaneamente o formulário de avaliação o qual foi impresso e anexado à presente ata. A Banca Examinadora concluiu pela aprovação (aprovação ou reprovação) do trabalho. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos demais membros da Banca Examinadora.

O estudante deverá reformular seu trabalho no prazo de.....dias: ( ) SIM  NÃO  
Se houver alteração no título do trabalho, informar o novo título abaixo:

Análise clínica e anatomopatológica dos feocromocitomas esporádicos em comparação com os associados à doença de Von Hippel-Lindau.

OBS.: Este documento não deve conter rasuras ou corretivo e deve ser preenchido de forma legível.

Londrina, 29 de maio de 2018.

## PRESIDENTE

Dra. TÂNIA LONGO MAZZUCO

UEL

## TITULARES

Dr. MARCO AURELIO FORNAZIERI

UEL

DR. SILVIO HENRIQUE MAIA DE ALMEIDA

UEL

DR. DUARTE PIGNATELLI

U.PORTO

DR. JOSÉ CLAUDIO CASALI DA ROCHA

PUC

Campus Universitário - Rodovia Celso Garcia Cid (PR 451), km 380 - Fone (41) 3371-4000 - FAX - Fax 3328-4449 - Caixa Postal 6001 - CEP 86052-990 - JORNADA

<http://www.uel.br>

Hospital Universitário/Centro de Ciências da Saúde - Av. Robert Koch, 55 - Via Operária - Fone (41) 3371-2000 - FAX - Fax 3327-4041 - Caixa Postal 761 - CEP 86033-940

LONDRINA - PARANÁ - BRASIL