

OBJETIVO DESSA APRESENTAÇÃO é a discussão do caso de uma paciente com a Síndrome de von Hippel-Lindau, sob os seus diferentes aspectos clínicos, laboratoriais, radiológicos e terapêuticos. A seguir será apresentado o estudo genético realizado na paciente e serão discutidas as principais alterações gênicas envolvidas no aparecimento dessa síndrome clínica.

Unitermos: Von Hippel-Lindau; Feocromocitoma; Tumor de pâncreas; Angioma de retina; Hemangioblastoma SNC; Tumor de rim

APRESENTAÇÃO DO CASO

Paciente 33 anos, feminina, branca com quadro de cefaléia holocraniana, intensa e constante há 3 anos. A investigação detectou tumor de cerebelo que foi operado e o exame anátomo-patológico revelou se tratar de hemangioblastoma de cerebelo. Com esse diagnóstico, a paciente foi encaminhada para o nosso serviço para investigação de síndrome de von Hippel-Lindau. Negava hipertensão arterial e paroxismos adrenérgicos sugestivos de feocromocitoma. Negava diabetes, distúrbios gastrointestinais, alterações visuais, auditivas e neurológicas. Tabagista de 3 cigarros por dia e etilista social. Negava uso regular de qualquer medicação. Antecedentes familiares: irmã de 31 anos, operada de feocromocitoma unilateral aos 18 anos, com quadro atual de hipertensão arterial; pai diabético, falecido aos 42 anos após quadro súbito de vômitos seguido de coma (provável acidente vascular cerebral); tios paternos cardiopatas, um deles teve morte súbita aos 40 anos durante jogo de futebol e o outro, vivo, teve infarto do miocárdio; mãe com 63 anos é hipertensa leve, controlada com Higtroton®.

Exame físico: bom estado geral, corada, hidratada, eupnéica, acianótica, anictérica, afebril, peso=59kg, altura=1,60m, IMC=23, P (supina)=72bat/min, PA (supina)=120/90mmHg, P (ortostática)=80bat/min, PA (ortostática)=130/90mmHg. Ausculta cardíaca e pulmonar normais. Tireóide não palpável. Ausência de adenomegalias. Abdome sem massas ou visceromegalias. Membros sem edema com pulsos presentes e simétricos. Pele sem alterações. Ausência de déficits motores ou sensitivos. Fundo de olho normal. Mapeamento de 24 horas da pressão arterial revelou ausência do descenso noturno e pressão diurna no limite superior da normalidade.

Avaliação Laboratorial: Determinações em urina de 24horas: VMA=4,4 e 10,2mg/24h (N=2 a 12 mg/24h); Metanefrinas=0,61 e 0,14 µg/mg creatinina (0,05 a 1,2 µg/mgcr); Noradrenalina=233 e 333µg/24h (14 a 80µg/24h); Adrenalina=14µg/24h (0,5 a 20µg/24h); Dopamina=213 e

*Renata Gatti
Maria Adelaide A. Pereira
Daniel Giannella Neto*

*Hospital das Clínicas,
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo,
São Paulo, SP.*

*Recebido em 02/03/99
Revisado em 28/04/99
Aceito em 16/07/99*

*Responsável pela Apresentação do Caso: Renata Gatti
Responsáveis pela Discussão: Renata Gatti e Daniel Giannella Neto
Responsável pela Edição: Maria Adelaide Albergaria Pereira*

Local e Data da Reunião: Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - 02/07/1998

Esta seção é parte de um projeto de educação continuada em Endocrinologia e Metabologia e está sendo publicada graças ao patrocínio e a colaboração da

bioBRÁS

263µg/24h (65 a 400µg/24h); Cortisol=96µg/24h (50 a 230µg/24h). Determinações plasmáticas: Noradrenalina=2734 e 3596pg/mL (40 a 268pg/mL); Adrenalina=16 e 283pg/mL (0 a 75pg/mL); Dopamina=49 e 51pg/mL (0 a 83pg/mL); ACTH=54pg/mL (<82pg/mL); Cortisol=7,5µg/dl (5 a 23µg/dl); Aldosterona=24ng/dL (5 a 30ng/dL); Gastrina=53pg/mL (<115pg/mL); Glicemia=103mg/dL (70 a 110mg/dL); Insulina=35mUI/mL (<20mUI/mL); Relação I/G=0,33; α feto-proteína=3,1ng/mL (<10ng/mL); β HCG=4,3 UI/L (<5UI/L); CEA=0,9ng/mL (<10ng/mL); calcitonina=13ng/L (<30ng/L).

Avaliação radiológica: 1- Tomografia computadorizada (TC) de abdome: massas sólidas com áreas centrais de necrose e calcificações puntiformes de perimeio, medindo 4 X 3,8 cm em supra-renal direita e 4 X 3,5 cm em supra-renal esquerda; processo uncinado do pâncreas aumentado com atenuação homogênea; rins, fígado, baço, aorta e cava inferior normais. 2- Ressonância Nuclear Magnética (RNM) de abdome: lesões nodulares hipointensas em T1 e hiperintensas em T2, de contornos bem definidos, em ambas as adrenais medindo, 4,5 X 3,6 cm à direita e 3,6 X 3,2 cm à esquerda; realce intenso e heterogêneo após contraste com centro hipoatenuante podendo representar necrose central. Lesão semelhante de 4 X 4 X 1 cm entre a porta e a cava inferior em íntima relação com o processo uncinado do pâncreas; rins, fígado e baço normais. Diagnóstico: Feocromocitoma bilateral e tumor pancreático (figura 1). 3- Mapeamento de corpo inteiro com meta-iodobenzilguanidina: área focal de concentração anormal do rádio fármaco em projeção de supra-renal direita; estudo compatível com feocromocitoma de adrenal direita; não havia captação à esquerda (figura 2). 4- RNM de crânio e coluna não revelou anormalidades. 5- Angiografia ocular com fluoresceína mostrou lesão hiperfluorescente, peri papilar, na margem temporal superior da papila direita, com importante vazamento de contraste na fase tardia do angiograma: angioma retiniano peri papilar (figura 3).

Portanto, o diagnóstico de Síndrome de von Hippel-Lindau foi confirmado pois a paciente era portadora de hemangioblastoma de cerebelo, angioma de retina, feocromocitoma bilateral e tumor de pâncreas. A investigação familiar está sendo iniciada na irmã e na mãe.

Paciente foi submetida a adrenalectomia bilateral, com retirada dos tumores adrenais. Anátomo-patológico: tumor adrenal direito de 3,5 cm e esquerdo de 3 cm. Feocromocitoma bilateral, com extensas áreas hemorrágicas sem invasão vascular ou capsular. Durante o ato cirúrgico, foi realizada ultrasonografia pancreática e solicitada avaliação de um

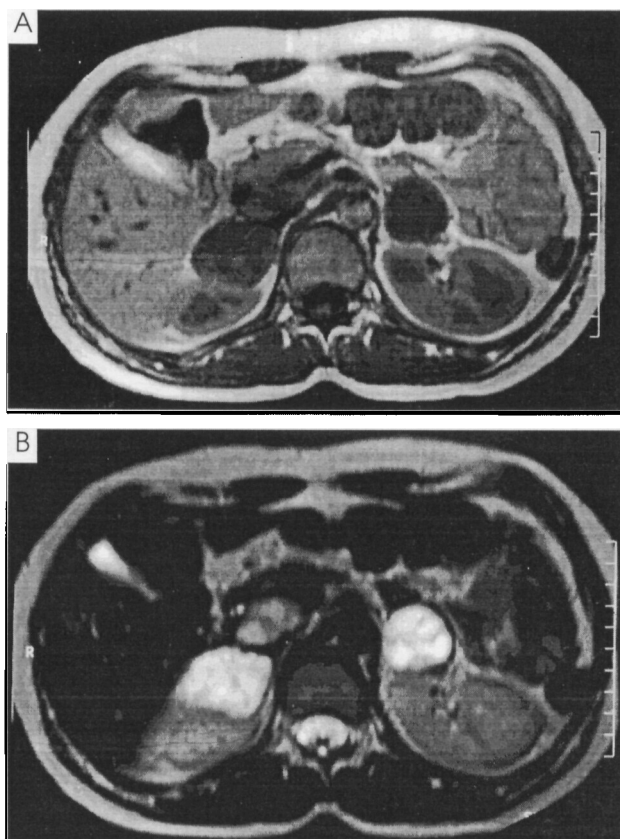


Figura 1: Ressonância Nuclear Magnética de Abdome: A: T1: Lesões nodulares adrenais bilaterais. Lesão semelhante em cabeça do pâncreas. B: T2: Lesões adrenais apresentando aspecto hiperintenso. Lesão pancreática apresenta aspecto discretamente mais intenso

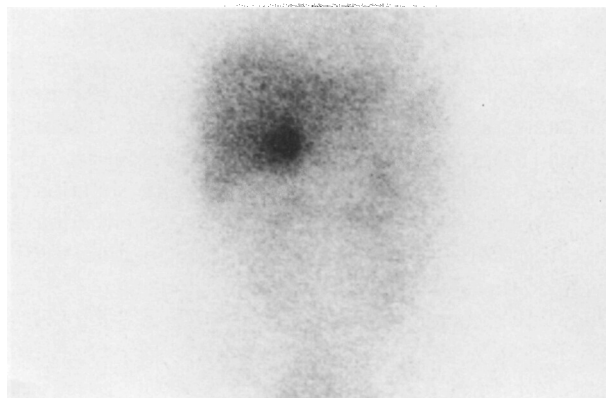


Figura 2: Mapeamento com MIBG (metaiodobenzilguanidina): área focal de concentração anormal do rádio fármaco em projeção de supra-renal direita. Não há captação à esquerda

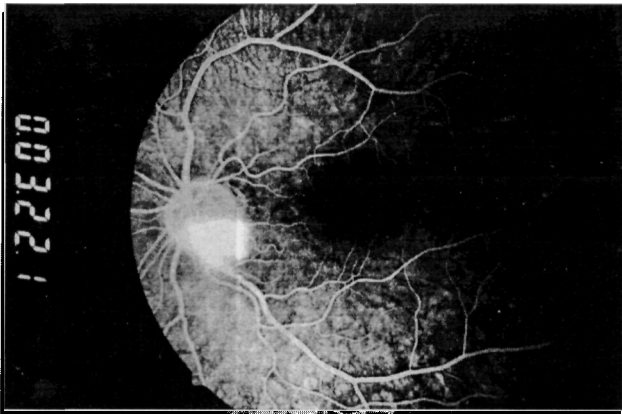


Figura 3: Angiografia com Fluoresceína do olho direito lesão hiperfluorescente peri papilar.

cirurgião de pâncreas. A conclusão foi de que se tratava, provavelmente, de um cisto, sendo recomendado apenas seguimento clínico e observação com imagens de 6 em 6 meses.

Os exames pós-operatórios mostraram normalização dos níveis de noradrenalina plasmática e urinária. A paciente foi mantida com doses substitutivas de acetato de cortisona e alfa-fluor-cortisona. Deverá refazer novas determinações de glicemia e insulina e exames radiológicos para acompanhar crescimento do tumor pancreático. A oftalmologia também recomendou acompanhamento clínico do angioma de retina.

DISCUSSÃO CLÍNICA (Dra. Renata Gatti)

A Síndrome de Von Hippel-Lindau é patologia com herança autossômica dominante de alta penetrância (cerca de 100% aos 65 anos) (1). Trata-se de entidade rara, com prevalência de 1/36.000 pessoas, sendo que a razão entre casos familiares/espóricos é de 11 a 14/1 (2). As principais manifestações são: hemangioblastomas de sistema nervoso central (SNC) e retina, carcinoma renal, cistos renais, feocromocitoma, tumores císticos e sólidos de pâncreas, cistoadenoma de epidídimo e tumores de saco endolinfático.

Os critérios diagnósticos para casos isolados são: existência de 2 hemangioblastomas (de sistema nervoso central ou retina) ou de 1 hemangioblastoma somado a uma manifestação visceral (3). Nos casos familiares só uma manifestação já é suficiente para o diagnóstico.

Newmann em 1991 (4), a partir da análise de 16 famílias com um total de 224 pacientes, classificou a síndrome em 3 tipos, de acordo com a natureza do tumor encontrado: Tipo I: hemangioblastomas de SNC e retina, cistos e carcinomas renais e doença cística pancreática; esses pacientes não apresentam feocromocitoma. É a forma clínica mais comum. Tipo

IIA: hemangioblastomas de SNC e retina, feocromocitoma e tumores de ilhotas pancreáticas; esses pacientes não são portadores de carcinoma de rim e têm melhor prognóstico. Tipo IIB: hemangioblastomas de SNC e retina, feocromocitoma, tumores renais e pancreáticos; esses pacientes têm todas as manifestações da síndrome e constituem a forma mais rara de sua apresentação (tabela 1).

O quadro clínico da Síndrome de von Hippel-Lindau é variável e, raramente, os pacientes têm todas as manifestações da doença. Aproximadamente 50% dos pacientes só terão uma manifestação (3). Não existe diferença entre homens e mulheres na apresentação clínica. As manifestações iniciais mais frequentes são hemangioblastomas de retina e cerebelo, seguidos do carcinoma de rim (2). A expectativa média de vida é de 49 anos (1), sendo as principais causas de morte o carcinoma renal e os tumores de sistema nervoso central (3). Nós vamos discutir agora sobre as diversas manifestações da síndrome.

Hemangioblastomas de sistema nervoso central

Esses tumores correspondem a 2% dos tumores cerebrais e a 7 a 12% daqueles de fossa posterior. São associados à Síndrome de von Hippel-Lindau em 20% e esporádicos em 80% dos casos (5). Ocorrem em 44% dos casos de von Hippel-Lindau. Os tumores são múltiplos em 42% dos casos e, em todas essas ocasiões, sempre estão associados a von Hippel-Lindau. A idade média de diagnóstico é de 39 anos, podendo variar de 12 a 73 anos (6). Esses tumores são frequentemente císticos com componente sólido mural; os puramente sólidos ocorrem em 30% dos casos e têm maior taxa de recorrência local que os císticos (3). Não são tumores malignos e, histologicamente, são formados por uma rede de canais vasculares revestidos por endotélio e células intervasculares estromais claras, de origem ainda não conhecida. O diagnóstico radiológico é feito por TC e RNM. Na TC os tumores captam contraste e na RNM o componente sólido tem isossinal em T1 e hipersinal em T2 e o cístico tem hipossinal em T1 e hipersinal em T2 (7).

Tabela 1. Classificação da Síndrome de von Hippel-Lindau.

Tipo I:	Hemangioblastomas de sistema nervoso e retina, cistos e/ou carcinomas renais e cistos de pâncreas.
Tipo IIA:	Hemangioblastomas de sistema nervoso e retina, feocromocitoma e tumores de ilhota do pâncreas.
Tipo IIB:	Hemangioblastomas de sistema nervoso e retina, feocromocitoma e doença renal e pancreática.

O hemangioblastomas cerebelares são os hemangioblastomas mais freqüentes do sistema nervoso. Estão presentes em 44 a 72% dos casos de von Hippel-Lindau, e junto com os hemangioblastomas de retina são as manifestações mais comuns dessa patologia. A idade média de aparecimento é de 29 anos (11 a 78 anos) e os sintomas e sinais clínicos mais comuns são: cefaléia, vertigem, distúrbios da marcha e da fala, nistagmo, ptose, dismetria, paralisia do 9º par, hipertensão paroxística (sem feocromocitoma), eritrocitose (em 5 a 20% dos casos, por provável produção de eritropoietina por mastócitos tumorais) (3).

Os hemangioblastomas de medula espinal são menos freqüentes que os cerebelares. Ocorrem em apenas 13% dos casos de von Hippel-Lindau. Entretanto, a maioria deles (80%) está associada a essa síndrome. A idade média de diagnóstico é de 34 anos (11 a 60 anos). O quadro clínico é decorrente de comprometimento medular: dor, déficits sensitivos, alterações proprioceptivas, paraparesia, hipotrofia muscular e hipertonia (3).

Mais raramente, observamos hemangioblastomas supratentoriais (1% dos casos) (6) intraselares (3 casos descritos até 1996) (5) e de nervo óptico (7 casos descritos até 1997) (8,9).

O tratamento desses tumores, em casos sintomáticos ou de crescimento progressivo, é cirúrgico ou radioterápico. A cirurgia leva a remoção completa do tumor, com melhora dos sintomas, em 88% dos casos, sendo que recidiva no mesmo local ocorre em 22% dos pacientes. A radioterapia convencional com aplicação de 4.000 a 5.500 rads é benéfica após extração cirúrgica parcial do tumor. A radiocirurgia esterotáxica, com aplicação de 1.000 a 3.500 rads, é indicada nos tumores solitários pequenos ou múltiplos e, em geral, poupa o parênquima normal adjacente de irradiação [10].

Hemangioblastomas de retina

Estão presentes em 45 a 59% dos casos de von Hippel-Lindau (3). Esses tumores são esporádicos em 65% dos casos e em 35% estão associados a essa síndrome. São múltiplos em 1/3 dos pacientes, e em todos os casos de multiplicidade eles fazem parte da síndrome de von Hippel-Lindau [11]. A idade média de início é de 25 anos (1 a 67 anos), sendo raros em crianças menores de 10 anos, mas podendo ocorrer em 5% dos casos (3). São tumores bilaterais em 30 a 50% dos casos (1,3) localizados, na maioria dos pacientes, na periferia da retina, podendo, entretanto, envolver o disco óptico. No exame de fundo de olho são tumores escuros e, na histologia, verifica-se que são idênticos aos hemangioblastomas de sistema nervoso. Os sintomas mais freqüentes são: déficit visual, descolamento de retina,

edema de mácula, catarata, glaucoma, uveíte, oftalmite (todos esses sintomas são decorrentes de hemorragia). A maioria dos pacientes é assintomática. O diagnóstico é feito pelo fundo de olho e pela angiografia com fluoresceína, que deve ser sempre realizada quando o exame fundoscópico é normal.

O tratamento se baseia na fotocoagulação a laser, crioterapia ou enucleação, nos estágios mais avançados. Nos casos assintomáticos ou com doença ocular menor deve-se fazer apenas acompanhamento clínico da lesão.

Doença renal

As lesões císticas correspondem a 60 a 75% dos tumores e as mistas e sólidas constituem o restante dos casos (12). Os cistos são considerados lesões benignas enquanto os tumores sólidos são, potencialmente, malignos. A grande dúvida é se os cistos evoluem para carcinoma; tem sido relatado que as lesões císticas originárias do epitélio de túbulo proximal podem conter células carcinomatosas enquanto aquelas que se originam do túbulo distal não apresentam transformação maligna (13). Portanto, parece existir dois tipos de cistos, um com e outro sem potencial maligno. A possibilidade de transformação de lesão cística em lesão totalmente sólida é muito baixa, sendo de 1,2%, no máximo (12). É importante chamar a atenção para o fato de que as lesões sólidas e as císticas com componentes sólidos são sempre carcinoma renal. A idade de aparecimento dos tumores de rim é de 37 anos (15 a 67 anos) (3). As lesões renais podem ser isoladas, mas freqüentemente são múltiplas e podem acometer todo o parênquima renal.

O carcinoma renal aparece em torno dos 35 aos 41 anos de idade e é mais precoce que o carcinoma renal esporádico, que se apresenta entre 55 e 60 anos. São unilaterais em 43% e bilaterais em 56% dos casos, em oposição ao carcinoma renal esporádico que é bilateral em apenas 1,8% dos casos (14). O diagnóstico radiológico é feito pela ultra-sonografia e TC de abdome. O primeiro exame é superior na diferenciação entre lesões sólidas e císticas e o segundo é mais sensível, detectando tumores com diâmetros menores que 2cm (3). A RNM não tem oferecido vantagens em relação à TC. O principal diagnóstico diferencial é com a doença renal policística, que tem maior incidência de insuficiência renal crônica, hipertensão secundária e está associada a cistos hepáticos e, mais raramente, a cistos pancreáticos.

O tratamento dos tumores de rim pode ser expectante em lesões suspeitas menores que 2 cm (14), na tentativa de poupar os pacientes de várias explorações cirúrgicas. As lesões renais têm, em geral, crescimento lento (12), e como as metástases de carcinoma

só são reportadas com tumores maiores que 4,5 cm (15), recomenda-se que sejam abordadas apenas lesões maiores que 3 cm (1). A enucleação simples é indicada em lesões totalmente císticas (14) e a nefrectomia parcial pode ser feita em tumores solitários de até 5cm ou em casos de doença múltipla pouco extensa (15). A nefrectomia total está indicada nos casos de tumores grandes e em doença difusa que acomete todo o parênquima. Quando a nefrectomia é bilateral o paciente é colocado em programa de diálise e o transplante renal pode ser realizado 1 ano após a nefrectomia, quando o risco de metástases é menor. Para seguimento, recomenda-se tomografia a cada 6 meses durante dois anos e anual, posteriormente (3). As metástases do carcinoma são para linfonodos, pulmão, fígado, osso e sistema nervoso central.

Feocromocitomas

Ocorrem em 7 a 18% dos casos de von Hippel-Lindau. A idade de início é de 27 ± 19 anos, mais precoce que nos casos de tumores esporádicos. Em oposição a esses últimos, eles são mais freqüentemente bilaterais (50 a 80% dos casos), multifocais e extra-adrenais, sendo raramente malignos. Os pacientes, com relativa freqüência, são assintomáticos e possuem catecolaminas normais (16). A avaliação radiológica é feita por ultra-sonografia, TC e RNM de abdome e mapeamento de corpo inteiro com meta-iodobenzilguanidina (MIBG). O tratamento do feocromocitoma é sempre cirúrgico, com adrenalectomia uni ou bilateral, na maioria das vezes.

Tumores pancreáticos

Ocorrem em 32% dos casos de von Hippel-Lindau. São, na maioria das vezes (76%), tumores císticos e mais raramente cistoadenoma seroso ou adenoma microcístico (4%). Em cerca de 15% dos pacientes ocorrem tumores da ílhota pancreática (17). Os cistos e cistadenomas ocorrem entre 20 e 40 anos (3) e são lesões benignas, em geral assintomáticas; raramente podem causar dores abdominais, sintomas de obstrução de vias biliares e pancreatite (18). Os tumores constituídos por células da ílhota, embora também sejam assintomáticos na maioria das vezes, podem produzir uma série de substâncias como insulina, gastrina e glucagon e causar síndrome clínica correspondente (3). A idade de aparecimento é em torno dos 40 anos (23 a 56 anos) (1). São malignos em 42% dos casos e as metástases são para fígado e osso (17). O diagnóstico radiológico desses tumores é feito por ultra-sonografia, TC e RNM de abdome. O tratamento é expectante nos pacientes assintomáticos e cirúrgico nos casos de tumores sólidos, com sintomas compressivos ou síndrome funcional.

Outras Lesões

Cistoadenoma papilar de epidídimo ocorre em 10 a 60% dos homens portadores da síndrome de von Hippel-Lindau. São lesões benignas e, na maioria das vezes, bilaterais, palpáveis e assintomáticas. Raramente, podem causar dor ou infertilidade. O diagnóstico é feito por ultra-sonografia e o tratamento é expectante ou cirúrgico (19).

Tumores do saco endolinfático são tumores raros localizados nesta estrutura, que fica no ouvido interno. Estão associados a von Hippel-Lindau em 15% dos casos e nesta síndrome ocorrem em 9% dos pacientes. Embora não sejam tumores malignos eles são localmente invasivos e podem provocar déficit auditivo, vertigens, desequilíbrio da marcha e paresia facial. O diagnóstico radiológico é feito por TC e RNM. O tratamento é cirúrgico (20).

Outras lesões que, mais raramente, podem se associar a síndrome de von Hippel-Lindau são: cistoadenoma de ligamento largo, hemangiomas cavernosos e hemangioblastomas hepáticos, hemangioblastomas pulmonares, cistos de omento, hemangiomas de esqueleto, cistos e hemangiomas de ovário, carcinoma medular e papilar de tireóide, hemangiomas de derme, nevus pigmentares, cistos e angiomas esplênicos, angioma e adenoma da córtex adrenal, adenocarcinoma e hemangioblastoma de pâncreas (3).

Concluindo, a Síndrome de von Hippel-Lindau deve ser investigada nos parentes próximos de pacientes portadores da síndrome e em todos os casos de hemangioblastoma de SNC e retina, de feocromocitoma, de carcinoma de rim em paciente jovem, de carcinoma renal múltiplo ou bilateral, de cistos pancreáticos múltiplos, de cistos de epidídimo bilaterais e de tumores de saco endolinfático. Existem vários protocolos propostos para *screening* da síndrome. Os mais utilizados são aqueles recomendados pelo NIH e pela Universidade de Cambridge e estão na tabela 2 (3).

ESTUDO GENÉTICO

(Prof. Dr. Daniel Giannella Neto)

A doença de von Hippel-Lindau (VHL) é herdada de maneira autossômica dominante e sua mortalidade está relacionada, principalmente, ao desenvolvimento de carcinoma de rim e tumores do SNC.

Quando não se tem um gene determinado, envolvido em uma doença genética, é possível lançar-se mão dos marcadores genéticos com o objetivo de identificar os prováveis genes candidatos. Existem 3 tipos de marcadores de DNA que segregam de acordo com as leis de Mendel, se forem suficientemente polimórficos. Estes

Tabela 2. Protocolos para investigação da Síndrome de von Hippel-Lindau.

Teste	NIH	Cambridge
Catecolaminas urinárias	A partir dos 2 anos, a cada 1 a 2 anos	Anualmente
Fundo de Olho	Anualmente, desde a infância	Anualmente, desde os 5 anos
Fluoresceína	Não é rotina	Anualmente, desde os 10 anos
RNM SNC e Medula	Desde os 11 anos, a cada 2 anos	Desde a adolescência, a cada 3 anos
TC ou USG de abdome	Após os 60 anos, a cada 3 a 5 anos	Após os 50 anos, a cada 5 anos
	Dos 11 aos 20 anos, USG anual	Desde a adolescência USG anual e
	Após os 20 anos, TC anual	TC a cada 3 anos.
	Após os 60 anos, a cada 2 anos	

marcadores podem ser utilizados nos estudos de prospecção gênica, na elaboração de mapas genéticos utilizados no isolamento de genes e na identificação de perda de heterozigidade (LOH: *loss of heterozygosity*).

Os primeiros marcadores desenvolvidos foram os RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*). A cada 200 bp, ao longo do comprimento dos cromossomos, a seqüência de DNA varia de indivíduo para indivíduo sendo essa alteração, geralmente, de uma só base. Se estas alterações forem coincidentes a sítios de restrição (locais passíveis de serem clivados por enzimas específicas para determinada seqüência de DNA), elas poderão ser detectadas por enzimas de restrição. A presença ou ausência de um determinado sítio varia na população, daí o termo polimorfismo e pode ser detectada pela análise dos RFLPs. Estas variações não conferem, em geral, um determinado efeito fenotípico, já que são normalmente encontradas em introns e não em regiões codificadoras de proteínas (exons). Aproximadamente, 100.000 RFLPs estão distribuídos por todo genoma humano.

O segundo grupo de marcadores compreende um conjunto de pequenas seqüências repetidas arranjadas uma após a outra ou em tandem, em que cada alelo contem um número diferente destas seqüências repetidas. Estes marcadores são denominados minissatélites ou VNTRs (*variable number of tandem repeats*) e cerca de 10.000 deles podem ser identificados em todo genoma.

O terceiro tipo compreende aqueles que, atualmente, são os mais utilizados em análises genéticas. Denominados de microssatélites, os mais comuns são as repetições de dinucleotídeos CA (citosina e adenina). Outros microssatélites, marcadores tri- ou tetranucleotídicos, podem ser utilizados com alguma vantagem técnica sobre os dinucleotídeos repetitivos. São encontrados no genoma humano com a mesma freqüência que os VNTRs.

Os dois últimos grupos de marcadores são mais informativos e, em função disso, são mais úteis que os

RFLPs. Os microssatélites podem ser analisados por técnicas de PCR e os primeiros dois grupos são estudados por *Southern blot*, uma técnica mais trabalhosa e demorada.

A prospecção gênica é um método pelo qual os cromossomos podem ser rastreados em membros de uma família na qual um ou dois destes cromossomos segregam com o gene da doença. Sua execução depende de se conhecer o cromossomo envolvido na gênese da doença, o local aproximado do gene neste cromossomo e, também, se algum marcador polimórfico, situado na mesma região, poderá ser empregado como identificador ou etiqueta da região que contem o gene candidato. Tradicionalmente, vinha-se utilizando a análise dos RFLPs mas, atualmente, o método mais empregado é a análise dos marcadores polimórficos de microssatélites.

Esta técnica têm sido empregada no diagnóstico de várias doenças monogênicas, como a distrofia muscular de Duchenne, fibrose cística e, nas pesquisas do câncer, em genes defeituosos em famílias com neoplasias hereditárias, von Hippel-Lindau, cânceres de mama e colo.

No exemplo mostrado na figura 4A, se o DNA dos indivíduos com diferentes polimorfismos for digerido com uma enzima de restrição e submetido ao Southern blot, verifica-se que os indivíduos que herdaram o cromossomo A apresentam um fragmento de 5 kb detectado pela sonda e os indivíduos com o cromossomo B apresentam um fragmento de 3 kb detectado pela mesma sonda. O fragmento de 5 kb pode ser arbitrariamente denominado de alelo 1 e o fragmento de 3 kb de alelo 2. Na detecção de doenças hereditárias, o teste se baseia na identificação do genótipo correspondente ao alelo presente em um ou outro cromossomo em cada indivíduo da família. A figura 4B mostra o resultado para 3 indivíduos usando a sonda da figura 4A. O indivíduo 1 é homocigoto para o alelo 1, isto é apresenta 2 cópias do cromossomo A. O indivíduo 3 é, também, homocigoto, mas desta vez, para

o cromossomo B. O indivíduo ao centro é heterozigoto, isto é, apresenta uma cópia do cromossomo A e uma cópia do cromossomo B. Inserindo estes resultados nos diferentes membros do pedigree da família é possível determinar-se qual o alelo que corresponde a um particular comprimento dos fragmentos de restrição que segrega com o alelo doente (figura 4C). Neste pedigree, de uma dada doença autossômica dominante, os resultados sugerem que o alelo 2 segrega com a doença, pois o indivíduo afetado (II-3) herdou o cromossomo com o alelo 2 de sua mãe afetada, enquanto seu irmão e irmã normais herdaram o cromossomo normal que carrega o alelo 1 de sua mãe. Assim, a ausência ou presença de um alelo particular não significa, por si só, que um indivíduo é normal ou afetado. O indivíduo I-3 apresenta duas cópias do alelo 2 e é normal. O RFLP é considerado, meramente, um marcador que pode ser usado para a caracterização de um padrão de herança de um dado cromossomo em uma família. Ademais, muitos RFLPs estão localizados próximos ao gene doente e não exatamente albergado nele.

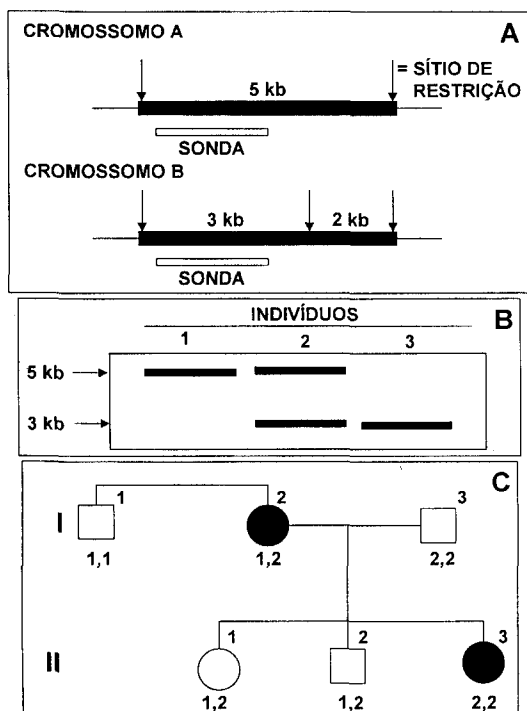


Figura 4. A: Exemplo da técnica de RFLP mostrando cromossomos (A e B) com fragmentos de 5 e 3 kb, respectivamente, reconhecidos por uma mesma sonda **B:** Padrão das bandas no *Southern blot* após hibridização com a sonda do painel A nos 3 indivíduos (I-1; I-2 e I-3) do pedigree do painel **C:** (I-1 e I-3: homocigotos e I-2: heterocigoto).

Inicialmente, a análise com marcadores genéticos de famílias de pacientes com a doença de VHL permitiu verificar perda de heterozigosidade (LOH: *Loss of heterozygosity*) de regiões associadas ao braço curto do cromossomo 3. Os estudos em feocromocitoma esporádico revelaram LOH do braço curto do cromossomo 3 em 45% dos casos informativos.

Estudos posteriores revelaram que o gene VHL desempenha sua função como um gene supressor, semelhante ao gene do retinoblastoma (Rb1) e situa-se, telomericamente, na região mapeada como 3p26-p25. A variabilidade no tamanho e seqüência do telômero pode, também, ser observada em pacientes susceptíveis ou acometidos por outros tumores mediante a aumento da atividade da telomerase.

O mecanismo oncogênico da doença de VHL é semelhante ao que se observa no retinoblastoma e neurofibromatose onde existe a perda alélica de um gene supressor de neoplasia. Knudson (21) propôs a hipótese dos dois eventos, onde os indivíduos predispostos a desenvolver uma destas neoplasias herdariam, primeiramente, o gene de um alelo advindo da mãe ou do pai e eventos genéticos posteriores levariam a perda de parte do outro alelo não herdado nos tecidos acometidos pela neoplasia. A falta dos dois alelos de um gene supressor leva ao desenvolvimento neoplásico. Nos casos esporádicos, um dos alelos sofre, primeiramente, uma mutação e, em seguida, outra mutação no outro alelo, facilitada ou não pela primeira mutação (figura 5).

Acredita-se que o gene VHL codifica uma proteína, elongina, envolvida nos mecanismos de replicação de DNA. Existem, entretanto, algumas evidências que demonstram o papel do gene VHL nos mecanismos de transdução de sinal. Outros estudos advogam que o produto do gene VHL poderia estar envolvido na regulação da produção de componentes da matriz extracelular ou, também, na ligação das células à matriz.

É possível evidenciar a perda do alelo do gene VHL mediante técnicas de hibridização *in situ* com marcadores fluorescentes (FISH: *Fluorescent in situ hybridization*). A figura 6 mostra a localização do gene na região telomérica do cromossomo 3 (3p26-p25), região de baixa densidade gênica demonstrada pelo histograma à esquerda. A figura 7 exemplifica outra aplicação desta técnica, onde é possível identificar tanto a presença dos dois alelos como ausência de um deles, no núcleo de células isoladas.

As mutações no gene VHL foram identificadas por vários autores. O estudo realizado por Zbar e cols. (22) em 496 famílias advindas da América, Europa e Ásia revelou mutações em 300 (63%) destas famílias.

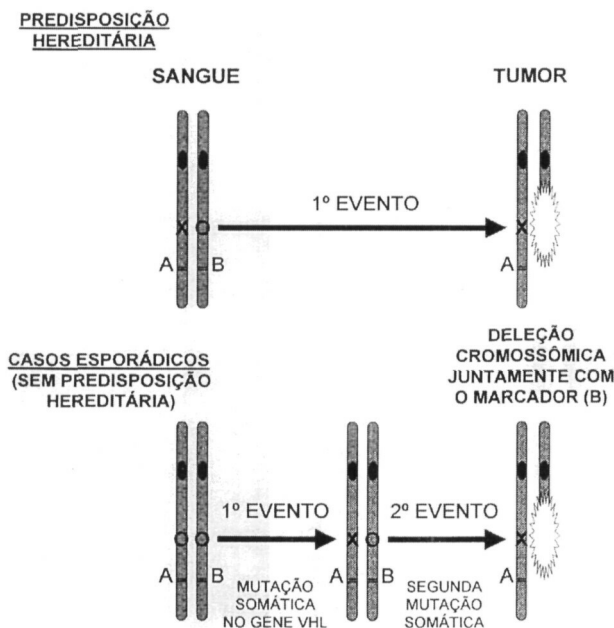


Figura 5: Hipótese de Knudson (21) ou dois eventos onde os indivíduos predispostos a desenvolver uma das neoplasias associadas à perda de genes supressores, herdariam, primeiramente, o gene de um alelo advindo da mãe ou do pai e eventos genéticos posteriores levariam a perda do outro alelo não herdado nos tecidos acometidos pela neoplasia. A falta dos dois alelos de um gene supressor leva ao desenvolvimento neoplásico. Nos casos esporádicos, um dos alelos sofre, primeiramente, uma mutação e, em seguida, outra mutação no outro alelo, facilitada ou não pela primeira mutação.

Foram detectadas 137 mutações germinativas distintas em regiões codificadoras. A maioria das mutações (124-137) ocorreu em 1 ou 2 famílias e outras poucas em 4 ou mais famílias. Foi possível, através deste estudo, comparar os efeitos de mutações germinativas idênticas em diferentes populações. Assim, mutações germinativas no gene VHL produzem neoplasias fenotipicamente semelhantes em famílias caucasianas e japonesas.

As mutações germinativas no gene VHL produzem 3 fenótipos diferentes: (1) carcinoma renal sem feocromocitoma; (2) carcinoma renal com feocromocitoma e (3) feocromocitoma somente (figura 8). O banco de dados (*Universal VHL-Mutation Database*) com as mutações no gene VHL reúne informações referentes à frequência de 507 casos registrados. Alterações nos resíduos 167, 161 e 98 ocorrem em cerca de 19% dos casos. As famílias portadoras, apenas, de feocromocitoma apresentam, em 96% dos casos, um só tipo mutação.

O gene VHL compreende, ao todo, 14.500 pares de bases (bp). A região codificadora, relacionada com a proteína, tem 3 exons. O primeiro exon, compreendendo 553 bp, é seguido pelo curto exon 2 de 123 bp e pelo exon 3 de 176 bp. Assim, das 14.500

bp, somente, 852 bp codificam a proteína. A maioria das mutações foi identificada no exon 3.

O gene VHL da paciente em estudo foi, inicialmente, rastreado pela técnica do SSCP (*single-strand conformational polymorphism*) com o emprego de ampliceros intrônicos que limitaram cada um dos 3 exons. Essa técnica revelou alteração na migração de banda dos fragmentos amplificados do exon 3 do DNA isolado do sangue e tumor da paciente em comparação ao controle.

O seqüenciamento de 650-700 bases das 852 bases de todo gene foi realizado em nosso laboratório e iniciado a partir do exon 3. Primeiramente, toda região codificadora do gene foi seqüenciada com exceção de uma pequena parte inicial do exon 3. Posteriormente, foi possível evidenciar mutação em ponto, heterozigótica, missense na posição 167 onde o aminoácido arginina foi substituído por triptofano (figura 9). Esta mutação, denominada R167W, é encontrada em 8,9% de todos os pacientes com VHL, sendo a mais freqüente dentre os 125 tipos já identificados neste gene. Seria, entretanto, de se esperar a presença de uma mutação em heterozigose no sangue da paciente e em homozigose no tumor. Muito provavelmente a amostra de tumor analisado apresentou-se contaminado com células periféricas ou restos de tecido normal não acometido.

DISCUSSÃO ABERTA

Prof. Dr. Alfredo Halpern (Professor Livre Docente do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da FMUSP):

Homozigosidade no tumor e heterozigosidade no sangue seria o que esperaríamos encontrar, nesta paciente?

Prof. Dr. Daniel Giannella Neto (Professor Livre Docente do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da FMUSP):

Sim. Como preconizado por Knudson, nos indivíduos com predisposição familiar à doença, a primeira mutação é germinativa e ocorre em todas as células do organismo. O indivíduo acometido apresenta, no tecido tumoral, o segundo evento oncogênico que é a perda do outro alelo do gene supressor do tumor.

Prof. Dr. Bernardo Léo Wajchenberg (Professor Emérito da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia da FMUSP):

Que porcentagem dos feocromocitomas não tem mutação gênica?

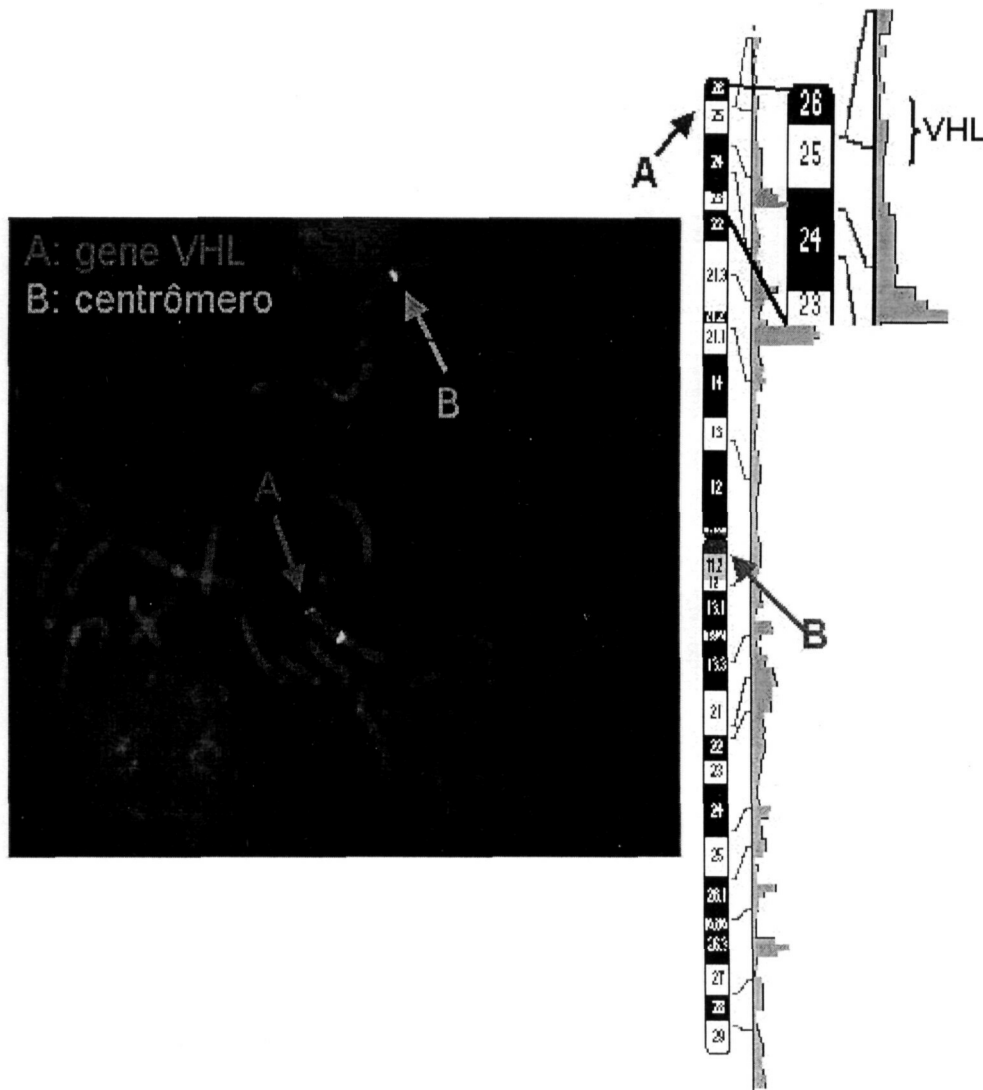


Figura 6: Mostra a localização do gene na região telomérica do cromossomo 3 (3p26-p25) pela técnica de FISH. Esta região é de baixa densidade gênica como demonstrado pelo histograma à esquerda.

Prof. Dr. Daniel Giannella Neto:

Cerca de 20%. Portanto, o encontro de uma mutação não é obrigatório. É provável que haja outras mutações que não puderam ser identificadas por este estudo ou em outros genes que pudessem estar envolvidos no processo neoplásico.

Prof. Dr. Bernardo Léo Wajchenberg:

Você só poderá afirmar que não ocorreu mutação após seqüenciar todo o gene?

Prof. Dr. Daniel Giannella Neto:

Certamente. Já foram descritas mutações em regiões intrônicas associadas ao VHL, porém com frequência menor que 0,2%. As técnicas de rastreamento

por SSCP ou DGGE pode facilitar o estudo molecular nestes casos.

Prof. Dr. Bernardo Liberman (Professor Associado da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da FMUSP):

Essa é uma doença associada a cistos em diversos órgãos. Existe alguma proteína que faz isso?

Prof. Dr. Daniel Giannella Neto:

A proteína VHL parece estar envolvida em mecanismos que regulam a relação célula-matriz extracelular. Se assim for, o aparecimento de um grande número de cistos poderia estar relacionado a algum defeito na formação da matriz extracelular ou na regulação da síntese de proteínas componentes da matriz.

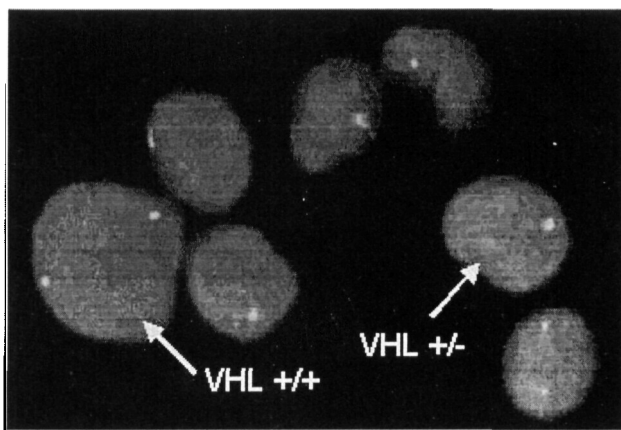


Figura 7: Perda alélica do gene VHL. Esta figura exemplifica outra técnica de FISH, onde é possível identificar tanto a presença dos dois alelos como ausência de um deles no núcleo de células isoladas

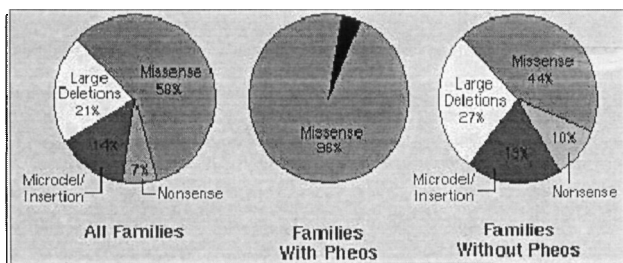


Figura 8: Mutações no gene VHL de acordo com Zbar e cols. (2). As mutações germinativas no gene VHL produzem 3 fenótipos diferentes: (1) carcinoma renal sem feocromocitoma; (2) carcinoma renal com feocromocitoma e (3) feocromocitoma somente.

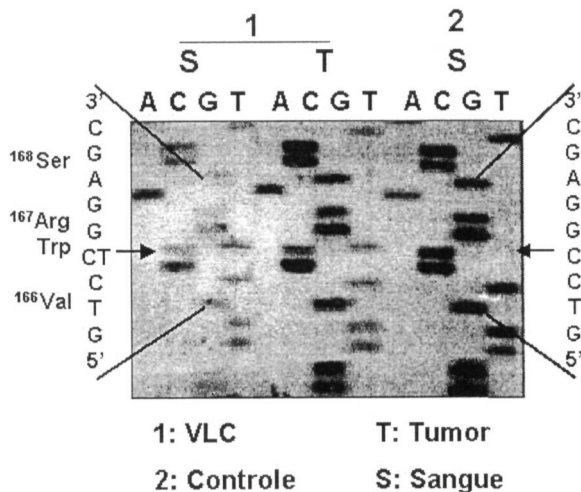


Figura 9: Mutações *R167W* no exon 3 do gene VHL identificada em amostra do tumor e sangue da paciente VLC

Prof. Dr. Bernardo Liberman:

Essa proteína é vista em outras patologias císticas?

Prof. Dr. Daniel Giannella Neto:

Não tenho conhecimento do envolvimento desta proteína em outras patologias.

Prof. Dr. Bernardo Liberman:

A aspecto do tumor na RNM, nas imagens em T2, sugere a possibilidade de feocromocitoma. Entretanto, não poderia ser apenas um cisto, com hipossinal em T1 e hipersinal em T2?

Dra. Maria Adelaide Albergaria Pereira (Médica Assistente Doutora do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da FMUSP):

Esta paciente não apresentava cistos nas adrenais. A TC e a RNM mostravam tumores sólidos, com componente cístico decorrente, provavelmente, de necrose tumoral, muito comum no feocromocitoma. O anátomo-patológico do tumor foi de feocromocitoma e não de cisto. Gostaria de lembrar, também, que na síndrome de von Hippel-Lindau não são descritos cistos adrenais e sim feocromocitoma.

Prof. Dr. Bernardo Liberman:

A paciente era hipertensa?

Dra. Maria Adelaide Albergaria Pereira:

Nas medidas rotineiras ela não apresentava hipertensão. O mapeamento de 24 horas da pressão arterial revelou perda do descenso noturno, sugerindo alguma anormalidade hemodinâmica que não se exprime clinicamente.

Prof. Dr. Alfredo Halpern:

Essa doença é, relativamente, freqüente já que ocorre em 1 para cada 36.000 pessoas. O que preocupa é o diagnóstico nos outros membros da família. Todos podem ser identificados do ponto de vista genético? Se for assim, podemos propor investigação dos tumores, apenas nos familiares portadores do gene?

Prof. Dr. Daniel Giannella Neto:

A necessidade de seguimento de indivíduos predispostos a desenvolver doenças genéticas de expressão tardia deve ser baseada em aspectos clínicos e éticos, que permitam qualidade de vida compatível com a normalidade. Muitos indivíduos com predisposição genética para doenças até mais fatais que o VHL, negam-se a qualquer acompanhamento ou qualquer

outro método de rastreamento genético ou não. Na NEM tipo 2, associada a tumores medulares da tireóide, a identificação de heterozigotos pode ser feita mediante testes dinâmicos com pentagastrina, por exemplo, muito mais econômicos e, ainda, mais eficientes que os métodos moleculares.

Prof. Dr. Bernardo Léo Wajchenberg:

Existe alguma relação genética entre o NEM do tipo 2 e von Hippel-Lindau?

Prof. Dr. Daniel Giannella Neto:

Na literatura, há descrições de estudos moleculares em pacientes com feocromocitoma, tanto esporádicos como associados a NEM ou von Hippel-Lindau. Em um estudo prospectivo, 38% dos casos de feocromocitoma estavam associados ao VHL e 24% ao NEM do tipo 2. No VHL com feocromocitoma somente, foi possível observar, aproximadamente, 96% de pacientes com mutações no gene VHL. A frequência de mutação nos casos de feocromocitoma associada a outras síndrome não é tão alta.

Dra. Karla Fabiana Fagundes (Médica Pós-Graduada da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da FMUSP):

Você não poderia comparar, apenas, o padrão do sangue que é heterozigoto com o padrão do tumor que seria homozigoto para a mutação?

Prof. Dr. Daniel Giannella Neto:

É isso que se faz normalmente. Nosso controle foi, na verdade, o sangue de um indivíduo normal.

Dra. Karla Fabiana Fagundes:

No SSCP é necessário um controle normal no mesmo gel ou não?

Prof. Dr. Daniel Giannella Neto:

Não é tão necessário assim. Coloca-se sempre o controle normal para se evitar que polimorfismos, exibindo padrões eletroforéticos alterados, possam ser considerados mutações.

Dra. Sandra Mara Villares (Médica Assistente Doutora do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da FMUSP):

Se você fizer um *linkage analysis*, usando microssatélites na região que você imagina no cromossomo 3, você não teria um estudo de associação dessa alteração no cromossomo que iria segregar com a família?

Prof. Dr. Daniel Giannella Neto:

A análise de associação ou *linkage analysis* é utilizada na identificação de genes candidatos. No VHL o gene já foi identificado, não havendo necessidade de se achar qualquer associação entre o fenótipo da doença nos membros da família e a segregação de marcadores genéticos específicos, tais como os microssatélites.

Prof. Dr. Sergio Toledo (Professor Associado da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da FMUSP):

Apesar de sabermos que o feocromocitoma ocorre em pequena porcentagem dos pacientes com von Hippel-Lindau, eu considero que a investigação clínica, bioquímica e radiológica dessa patologia é obrigatória nesta síndrome. Tivemos a oportunidade de acompanhar de acompanhar pacientes de uma família com von Hippel-Lindau nos quais o diagnóstico clínico e bioquímico eram duvidosos mas a RNM mostrava a presença do tumor. Portanto, nessas síndromes genéticas a investigação radiológica está indicada mesmo nos casos com avaliação clínica e laboratorial negativas.

REFERÊNCIAS

1. Karsdorp N, Elderson A, Wittebol-Post D, Hene RJ, Vos J, Feldberg MA, et al. Von Hippel-Lindau disease: new strategies in early detection and treatment. *Am J Med* 1994;97(2):158-68.
2. Maher ER, Yates JRW, Harries R, e col. Clinical features and natural history of von Hippel-Lindau disease. *Q J Med* 1990;77:1151-63.
3. Choyke PL, Glenn GM, Walther MM, Patronas NJ, Linehan WM, Zbar B. Von-Hippel-Lindau disease: genetic, clinical, and imaging features. *Radiology* 1995;194(3):629-42.
4. Neumann HPH, Wiestler OD. Clustering of features of von Hippel-Lindau syndrome: evidence for a complex genetic locus. *Lancet* 1991;337:1052-4.
5. Sawin PD, Follett KA, Wen BC, Laws ER Jr. Symptomatic intrasellar hemangioblastoma in a child treated with subtotal resection and adjuvant radiosurgery. *Case report. J Neurosurg* 1996;84(6):1046-50.
6. Neumann HP, Eggert HR, Scheremet R, Schumacher M, Mohadjer M, Wakhloo AK, et al. Central nervous system lesions in von Hippel-Lindau syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55(10):898-901.
7. Lee SR, Sanches J, Mark AS, Dillon WP, Norman D, Newton TH. Posterior fossa haemangioblastomas: MR imaging. *Radiology* 1989;171:463-8.
8. Kerr DJ, Scheithauer BW, Miller GM, Ebersold MJ, McPhee TJ. *Neurosurgery* 1995;36(3):573-80.
9. Raila FA, Zimmerman J, Azordegan P, Fratkin J, Parent AD. Successful surgical removal of an asymptomatic

- optic nerve hemangioblastoma in von Hippel-Lindau disease. **J Neuroimaging** 1997;7(1):48-50.
10. Patrice SJ, Sneed PK, Flickinger JC, Shrieve DC, Pollock BE, Alexander E 3rd, et al. Radiosurgery for hemangioblastoma: results of a multiinstitutional experience. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1996;35(3):493-9.
 11. Bleggi-Torres LF, De Noronha L, Fillus Neto J, Telles JE, Madalazzo LE. Von Hippel-Lindau's disease: report of three cases and review of the literature. **Arq Neuropsiquiatr** 1995;53(4):782-8.
 12. Choyke PL, Glenn GM, Walther MM, Zbar B, Weiss GH, Alexander RB, et al. The natural history of renal lesions in von Hippel-Lindau disease: a serial CT study in 28 patients. **Am J Roentgenol** 1992;159(6):1229-34.
 13. Kragel PJ, Walther MM, Pestaner JP, Filling-Katz MR. 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** 1991;4:210-4.
 14. Nelson JB, Oyasu R, Dalton DP. The clinical and pathological manifestations of renal tumors in von Hippel-Lindau disease. **J Urol** 1994;152(6 pt 2):2221-6.
 15. Chauveau D, Duvic C, Chretien Y, Paraf F, Droz D, Melki P, et al. Renal involvement in von Hippel-Lindau disease. **Kidney Int** 1996;50(3):944-51.
 16. Neumann HP, Berger DP, Sigmund G, Blum U, Schmidt D, Parmer RJ, et al. Pheochromocytomas, multiple endocrine neoplasia type 2, and von Hippel-Lindau disease. **N Engl J Med** 1993;329(21):1531-8.
 17. Cheng TY, Su CH, Shyr YM, Lui WY. Management of pancreatic lesions in von Hippel-Lindau disease. **World J Surg** 1997;21(3):307-12.
 18. Girelli R, Bassi C, Falconi M, De Santis L. Pancreatic cystic manifestations in von Hippel-Lindau disease. **Int J Pancreatol** 1997;22(2):101.
 19. Choyke PL, Glenn GM, Wagner JP, Lubensky IA. Epididymal cystadenomas in von Hippel-Lindau disease. **Urology** 1997;49(6):926.
 20. Manski TJ, Heffner DK, Glenn GM, Patronas NJ, Pikus AT, Katz D, et al. Endolymphatic sac tumors. A source of morbid hearing loss in von Hippel-Lindau disease. **JAMA** 1997;277(18):1461-6.
 21. Knudson AG Jr. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. **Cancer Res** 1985;45:1437-43.
 22. Zbar B, Kishida T, Chen F, Schmidt L, Maher ER, Richards FM, et al. Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in families from North America, Europe, and Japan. **Hum Mutat** 1996;8:348-57.