DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA DOENÇA DE VON HIPPEL-LINDAU (VHL) EM FAMÍLIAS BRASILEIRAS:

ESTUDO AMPLIADO

José Cláudio Casali da Rocha

Tese de Doutorado apresentada à Fundação Antônio Prudente para obtenção do Grau de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Andrew J. G. Simpson

Co-orientador: Dra. Anamaria A. Camargo

São Paulo

2002

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE BIBLIOTECA

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pe
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Rocha, José Cláudio Casali da
Diagnóstico molecular da doença de Von Hippel-Lindau (Vhl) em famílias brasileiras: estudo ampliado / José Cláudio Casali da Rocha. -- São Paulo, 2002.
105p.
Tese(doutorado)–Fundação Antônio Prudente.
Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.
Orientador: Andrew J. G. Simpson.

Descritores: 1. DOENÇA HIPPEL-LINDAU/diagnostico. 2. DOENÇA HIPPEL-LINDAU/genética. 3. MUTAÇÃO. 4. VHL.

EXEMPLAR ESPECIAL

Aos meus pacientes e seus familiares

À minha família e amigos

EXEMPLAR ESPECIAL

Agradecimentos

Este projeto foi realizado graças ao incentivo dos meus orientadores, ao apoio dos amigos e colaboradores, das instituições de ensino e apoio à pesquisa e dos profissionais de saúde que contribuíram com o encaminhamento de pacientes e deram o suporte para o estudo.

Aos meus mestres e professores de graduação e pós-graduação que me auxiliaram na escolha profissional, alimentaram meus sonhos e me trouxeram a esperança de dias cada vez melhores.

Ao Dr. Andrew Simpson (Andy) que há quatro anos me apoiou nesta investida e abriu a primeira porta para o meu conhecimento do universo da biologia molecular. Aprendi muito com a sua coragem e ousadia em enfrentar grandes obstáculos. Aprendi a transformar os meus medos nos meus maiores desafios e a minha angustia em incentivo para a busca da felicidade. Obrigado.

À Anamaria Aranha Camargo (Ana) que me ensinou as bases da biologia molecular, minha primeira PCR ("esta a gente nunca esquece"), meu primeiro *Southern*. Obrigado pela sua amizade, pela sua simpatia, paciência e doçura.

Ao meu amigo Dr. Décio Brunoni, do Centro de Genética Médica da Escola Paulista de Medicina / UNIFESP pelo incentivo constante e irrestrito apoio. Aprendi com você os valiosos ensinamentos da genética clínica e sou eternamente grato. Seu apoio irrestrito fez-me decidir pela genética como especialidade e mudou o curso da minha história.

Ao Professor Ricardo Brentani pelo enorme incentivo ao projeto e por fazer da Oncogenética não apenas uma especialidade do Hospital do Câncer, mas um Departamento desde 1999.

Ao amigo Benedito Rossi pelo apoio e inúmeros conselhos em momentos delicados de decisão e reflexão.

Ao Ricardo Luis, que mais que um bom amigo, me ergueu nas horas em que tanto precisei, me deu a coragem nos momentos críticos e que também esteve ao meu lado nas horas mais felizes deste projeto.

A minha mãe e ao meu pai pelo amor infinito que me deram, pela criação e o bom exemplo que tive com vocês. As maravilhosas lembranças que vocês deixaram ficaram registradas para sempre na minha vida.

Ao Dr. Torloni, pela sua infinita dose de entusiamo, experiencia e vitalidade que tanto me estimularam em todos os passos durante o desenrolar deste projeto. Obrigado por me fazer sentir parte do time e pelos seus preciosos conselhos.

A todos os médicos que contribuíram para este trabalho encaminhando seus pacientes e familiares, como Jukemura, Berenice, Suemi, Patrícia Prolla, Suzana Malheiros,

Têmix Felix, Raquel Boy, Dra. Iris, Esther, Dr. Pina, Jair, Benjamin, Bia, Ciro, Mônica Schaum, Dr. Miguel Srougi, Estênio, Dr. Fábio Baracat, Dra. Adelaide, e outros.

A Simone, pelas valiosas contribuições para o crescimento e o reconhecimento institucional e nacional do Depto. de Oncogenética do Hospital do Câncer. Obrigado pela sua enorme simpatia e amizade.

Ao Dr. Daniel, pelo apoio ao acreditar em uma equipe jovem, que com muita saúde de espírito tem mostrado ser capaz de concretizar boas idéias e fazer do Depto. de Oncogenética uma referência nacional.

À Alessandra Murgia, Cathy Stolle, Gladys Glenn (Gigi), e John Phillips, que colaboraram ativamente neste trabalho com sua experiência em VHL e com suas ótimas sugestões.

Às amigas Sibia e Vitória, que sempre acreditaram em mim, algumas vezes até mais do que eu mesmo. Vocês são a melhor torcida que eu já tive.

Às amigas Milena (minha "prima neta") e Mª Isabel por me fazerem crer que poderemos e seremos melhores do que somos. Obrigado pelas vibrações positivas. À Mariana, Márcia e Tide, por despertarem seus interesses pela genética e por todo carinho que recebo de vocês.

Aos amigos do Laboratório de Genética do Câncer: Anna Christina, Valéria Paixão, Nídia "aliche", Ricardo Moura (Mourinha), Elisângela, Fabrício; aos novos amigos André, Dirce, Rafael, Paula, Fabi; e aos velhos e bons amigos que passaram pelo lab Eloísa, Edina, Silvana, Ricardo Correa e Ana Paula. Vocês todos de alguma forma contribuíram em vários momentos com este projeto.

À Catarina Simpson, que me fez olhar ao redor e ver que construímos nossa própria felicidade profissional com simpatia, tolerancia e muita força de vontade.

Aos amigos do Ludwig: Jane Kaiano, Patrícia Sávio, Carol, Luíza Villa, Vilma, Otávia e lab, Adriana Abalen, Alex, Eduardo Abrantes, Sibele, Ludmila, Bia, Elaine, Walesca, Franco. Obrigado pela amizade.

Aos amigos do Centro de Genética Médica da Escola Paulista de Medicina / UNIFESP, especialmente à Bia, Luiz Alonso, Fernanda, Ana Luíza, Jane, Inês, Ana Martins, Marli, Silvia , Vera e as secretárias Virginia, Carla e Cida.

Às amigas Cristina e Cátia Regina, que me deram um porto seguro e a esperança de dias melhores nas tormentas da vida.

À equipe multidisciplinar do Hospital do Câncer, especialmente aos amigos Beatriz de Camargo e Luis Fernando Lopes (pediatria); Ademar Lopes (pelves); Paulo e Daniel (neurocirurgia); Maria Tereza (psiquiatria); Bachega, Álvaro Sarkis e Gustavo (urologia); Mário Mourão, Socorro e Hirofumi (mastologia); André Montagnini e Marcel (abdome); Luis Paulo Kowalski (C/P), Marcos e Giuliano (estomatologia); Agnaldo

Agnelli (oncologia clínica); Rubens (imagem) e tantos outros, pelo incentivo ao Departamento de Oncogenética e o suporte indispensável aos pacientes e famílias deste estudo.

Ao Fernando Soares, Gilles e Renata (anatomia patológica), pelas discussões clínicas e o enorme aprendizado.

Aos funcionários do Ludwig pelo enorme carinho: secretárias Eliane, Carla, Gisely e Jaqueline, Renata, Juliana (Juju), Roseli, Rubens, Antje, Raquel, que resolveram muitas situações com seu profissionalismo e eficiência. Obrigado também ao Sr. Paulo (administrador) por toda atenção para o bom andamento do projeto.

Ao Dr. Luis Fernando Reis, pela sua enorme dedicação à pós-graduação e principalmente aos alunos e pela sua enorme paciência.

À Ana Maria (Aninha) e Márcia (ou Fernanda) da Secretaria de Pós-Graduação pelo incentivo, torcida e alguns (poucos) puxões de orelha.

À tia Ceça que me estimulou com sua dose generosa de cafeína e bom humor nos momentos de cansaço e fadiga. Ao Sr. Eudes e Sampaio ("Zé Paio") pelo ambiente acolhedor que trabalho que constroem com serrote, martelo, muita dedicação e respeito.

À minha super-secretária Patrícia, "secreta" Luciere e "secretas" do Depto. de Pelves, Ana, Denise, Paula, entre outras, por organizarem minhas atividades diárias e me fazerem o dia render até algumas horas a mais.

Aos amigos do Laboratório clínico, Andréias (as duas), Cláudia e Ary. Obrigado pelas brincadeiras, coletas e muita responsabilidade.

Aos amigos oncologistas do Rio, Nelson Teich, Mônica, Mauro, Hélio Noronha, Mário Alberto, Salete, entre tantos outros que me incentivaram ao novo desafio da genética.

Aos amigos geneticistas e biologistas moleculares Itamar, Silvia Rogatto, Lúcia Marteli, Eloísa Tajara, Mª Apda. Nagai, Berenice Mendonça, Suemi, Patrícia Prolla, Lígia Pereira, Fernando Vargas, Mª Rita Passos-Bueno, pelo enorme aprendizado que adquiri convivendo e me espelhando em vocês.

À Sra. Terezinha (fotógrafa), Rutinéia, bibliotecária Suely e auxiliar Francyne, Inês, Rosário, Karina e Sra. Hirdes. Com o seus suportes tudo fica mais fácil e prazeroso, mesmo as tarefas mais exaustivas.

Aos amigos Márcia Karla, Ivan e Regina Romeira pelo apoio e glorioso suporte psicológico.

À Joyce Graff, da VHL Family Alliance, pelo enorme carinho e dedicação e respeito às famílias com VHL do mundo inteiro.

Às sociedades médicas que contribuiram para a divulgação deste projeto: Sociedade Brasileira de Genética, Sociedade Brasileira de Genética Clínica, Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica, Sociedade Brasileira de Cancerologia, Associação Médica Brasileira, Associação Paulista de Medicina, Sociedade Brasileira de Urologia.

Às voluntárias da Rede Feminina do Hospital do Câncer, que contribuíram para a realização do 1° Encontro Brasileiro de Famílias com VHL; e também à Claudete do Centro de Estudos e à Escola de Cancerologia do Hospital do Câncer.

À FAPESP pelo suporte financeiro, e aos meus assessores pelas valiosas sugestões.

RESUMO

A doença de von Hippel-Lindau (VHL) é uma doença hereditária multissistêmica, causada por mutação no gene *VHL* que predispõe o portador a manifestações benignas e malignas em diversos órgãos. O início dos sintomas pode ocorrer a partir dos primeiros anos de vida e inclui entre outros, angioma de retina, hemangioblastoma (HB) de sistema nervoso central (SNC), feocromocitoma (FE), carcinoma renal do tipo células claras (CR) e cistos múltiplos renais, pancreáticos, hepáticos e de epidídimo. O diagnóstico clínico baseia-se em critérios que consideram a história familial e a apresentação clínica das lesões. Muitas vezes o diagnóstico é dificultado ou retardado até que estes critérios sejam preenchidos. O aconselhamento genético e avanços dos métodos de diagnóstico e de tratamento vêm mudando o curso desta enfermidade com a diminuição da morbidade e da mortalidade, contribuindo para a melhoria da qualidade de vida das famílias afetadas por esse mal e para o entendimento da doença. O diagnóstico molecular da doença baseia-se na aplicação de técnicas de biologia molecular que visam a detecção de mutações germinativas no gene *VHL*. O teste genético em pacientes com VHL permite avaliar a amplitude do fenótipo da doença baseado no estudo de outras famílias com a mesma mutação. Também pode ser utilizado como teste preditivo, selecionando os indivíduos considerados como de alto risco e, portanto candidatos ao programa de rastreamento clínico de lesões. A pesquisa de mutação no gene *VHL* é particularmente importante nos indivíduos com lesões relacionadas a VHL sem história familial. Até o momento foram registradas 224 mutações germinativas no banco de mutações do *The Human Gene Mutation Database - Cardiff* (http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/120488.html) caracterizadas na América do Norte, Europa e Japão, sendo 210 destas associadas com a doença. Este é o primeiro estudo brasileiro, e possivelmente Sul-americano, que tem como objetivo desenvolver o suporte clínico e laboratorial para o paciente portador de VHL e seus familiares.

Neste estudo, foram analisados 100 indivíduos, sendo 83 indivíduos pertencentes a 20 famílias com diagnóstico de VHL; sete indivíduos pertencentes a duas famílias em que VHL era um diagnóstico diferencial; oito pacientes com tumores relacionados a VHL aparentemente esporádicos, além de dois familiares de uma

paciente com HB aparentemente esporádico na qual foi identificada mutação germinativa no gene *VHL*. A taxa de 100% de detecção de mutação foi alcançada no estudo das 20 famílias com VHL através da combinação das técnicas de seqüenciamento direto e de *Southern-blot* quantitativo. Das mutações deletérias encontradas, oito nunca haviam sido descritas anteriormente em outras populações e correspondem a 50% das mutações pontuais. Três variantes polimórficas intragênicos não associadas à doença foram encontrados em quatro famílias distintas. Para caracterização das mutações novas e das variantes polimórficas foi realizado um estudo populacional para avaliação da sua freqüência alélica. O método de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) foi padronizado para detecção de rearranjos gênicos, porém não mostrou vantagens sobre a técnica de *Soutern-blot*.

A correlação entre o genótipo e o fenótipo apresentado pelas famílias reforça algumas observações descritas na literatura. O fenótipo de VHL tipo 1 foi associado com mutações potencialmente deletérias à proteína VHL e o fenótipo VHL tipo 2 foi associado a mutações do tipo *missense*. Especificamente, a mutação no códon 167 do gene *VHL* se correlacionou com um alto risco para o desenvolvimento de feocromocitoma apresentado em duas famílias com VHL. O perfil clínico da doença de VHL no Brasil mostra semelhanças de incidência e idade de apresentação com outros países onde a doença foi estudada. No entanto, 12 famílias (60%) podem ser caracterizadas como de alto risco para o desenvolvimento de CR, baseado na ocorrência familial e nas características intrínsecas das mutações. Três das quarto famílias com grandes deleções apresentavam alta incidência de HB do SNC. Também foi observada uma tendência das mutações concentrarem-se principalmente nos exons 1 e 2 do gene *VHL* incluindo as regiões de emenda (85,5%). Os diagnósticos finais de ataxia espino-cerebelar e de síndrome de hemangioma cavernoso familial nas duas famílias encaminhadas com suspeita de VHL revelaram dois importantes diagnósticos diferenciais de VHL.

Este estudo contribuiu para o entendimento da doença de von Hippel-Lindau no Brasil, possibilitou o diagnóstico precoce através do teste molecular, bem como interveio na história natural da doença nas famílias com VHL através do aconselhamento genético oncológico e do programa de rastreamento de lesões.

SUMMARY

von Hippel-Lindau (VHL) disease [MIN 193300] is a heritable monogenetic disorder transmitted in a autosomal dominant pattern that predisposes affected individuals to the development to many typical lesions, including retinal angiomas, hemangioblastomas of the central nervous system, multiple cysts of the kidneys and pancreas, pheochromocytoma (PHE), renal cell carcinoma (RCC), and pancreatic tumors. The molecular basis of the disease is the presence of germline mutations in the *VHL* tumor suppressor gene. A total of 17 consecutive families with VHL (15 from Brazil, one from Portugal, and one from Equator) and three Brazilian VHL patients without family history were included in this study. Genetic counseling with signed informed consent was offered to all participants. The mutation detection strategy consisted in direct sequencing of the coding regions of the *VHL* gene and quantitative Southern-blotting. We identify germline mutations in all probands, giving rise to a 100% mutation detection rate. These consisted in 16-point mutations (9 missense, 3 frameshift, 1 in-frame deletion, 2 splice defect, 1 non-sense), 3 partial deletions and 1 complete deletion of the *VHL* gene. As observed in other studies, mutations in the codon 167 confer a high risk for PHE and RCC, and mutations that predicted a truncated protein were related to VHL type 1. Twelve families (60%) could be characterized as having a high risk to renal carcinoma based on the family occurrence or characteristics of the mutations. Three out four families with large deletions had a high incidence of HB of the SNC. Also, we observed a tendency of the germline point mutations to concentrate among exons 1 and 2 of the *VHL* gene, including boundaries (87.5%). In addition, eight novel *VHL* gene mutations and two polymorphisms (one novel) are described. We concluded that the combination of direct sequencing and quantitative Southern-blotting represented a good strategy for germline mutation detection in the *VHL* gene and can be considered the gold standard when 100% mutation detection is needed. This preliminary study suggests that VHL families in Brazil, which are mostly of Portuguese origin, may have unique features in respect to VHL mutations and risk of malignancies, and this may be considered in the approach of genetic counseling and screening for patients of Portuguese descendents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Manifestações clínicas da doença de VHL	4
Figura 2 -	Gráfico da incidência cumulativa das lesões associadas à VHL	5
Figura 3 -	O gene *VHL*	10
Figura 4 -	Controle da elongação do mRNA	12
Figura 5 -	Estrutura secundária da proteína VHL (pVHL) e do complexo VCB	13
Figura 6 -	Interface dos domínios da pVHL e da Elongina C	13
Figura 7 -	Distribuição das mutações somáticas tipo *missense* no CR	14
Figura 8 -	Principais sítios de mutação e resíduos envolvidos da pVHL	15
Figura 9 -	Similaridade dos complexos VEC e SCF	16
Figura 10 -	Distribuição das mutações germinativas no gene *VHL*	19
Figura 11 -	Distribuição dos tipos de mutação e correlação com o fenótipo	22
Figura 12 -	Sondas utilizadas para FISH	43
Figura 13 -	Padronização do *Southern-blot*	58
Figura 14 -	Padronização do FISH com amostra normal	61
Figura 15 -	Padronização do FISH com deleção completa de um dos alelos do gene *VHL*	62
Figura 16 -	FISH: mutação germinativa da família VH3 (deleção completa)	63
Figura 17 -	Distribuição das mutações pontuais no gene *VHL*	64
Figura 18 -	Distribuição das mutações e correlação com o fenótipo	70
Figura 19 -	Rastreamento e tratamento da paciente VH8C	78
Figura 20 -	Rastreamento clínico e tratamento da paciente VH6A	79
Figura 21 -	Distribuição do número de lesões por paciente com VHL	84
Figura 22 -	Incidência das lesões de VHL por idade	87

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE BIBLIOTECA

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Programa de rastreamento clínico para VHL	27
Tabela 2 -	Manifestações clínicas por família: fenótipo familial	49
Tabela 3 -	Mutações germinativas e polimorfismos em VHL	59
Tabela 4 -	Prevalência (%) de lesões associadas à VHL nas famílias	72
Tabela 5 -	Incidência e prevalência das lesões em 49 pacientes selecionados	85
Tabela 6 -	Características das manifestações clínicas de VHL	86

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	micrograma
μL	microlitros
μM	micromolar
AdP	cistoadenoma pancreático
AdR	adenoma renal
AR	angioma de retina
ASR	adenoma de supra-renal
AstrC	astrocitoma cerebelar
CGH	hibridação genômica comparativa
CiE	cisto de epidídimo
CiH	cisto hepático
CiM/Ov	cistos de mama e ovário
CiP	cistos pancreáticos
CiR	cistos renais
CP	carcinoma pancreático
CR	carcinoma renal
DNA	acido desoxirribonucléico
dNTPs	desoxirribonucleotideos
DO	densidade óptica
EDTA	acido etileno diamino tetracético
EUA	Estados Unidos da América
FE	feocromocitoma
FISH	hibridação *in situ* por fluorescência
g	grama
HB	hemangioblastoma de SNC
HC	hemangioblastoma cerebelar
kb	quilobases
KD	kilo Daltons
LOH	perda de heterozigosidade (do inglês, *loss of heterozigosity*)
M	molar

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE BIBLIOTECA

mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	acido ribonucléico mensageiro
NA	não avaliado
NCI	National Cancer Institute
NIH	National Institute of Health
nt	nucleotídeo
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
pVHL	proteína VHL
RM	ressonância magnética
RNA	acido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SemT	seminoma de testículo
SNC	sistema nervoso central
SPO	tumor esporádico
TBE	tris-borato EDTA
TC	tomografia computadorizada
TNEP	tumor neuroendócrino pancreático
US	ultra-sonografia
UV	luz ultravioleta
VHL	von Hippel-Lindau
VHLFA	VHL Family Alliance

ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO 1

1.1- Histórico 1

1.2- Epidemiologia e genética da doença de VHL 2

1.3- Manifestações clínicas da doença de VHL 3

1.4- Critério diagnóstico clínico 7

1.5- Mapeamento do gene *VHL* com a sonda g7 9

1.6- Estrutura, expressão e função do gene *VHL* 10

1.7- Mutações germinativas no gene *VHL* 18

1.8- Classificação de VHL e correlação genótipo-fenótipo 20

1.9- Mutações somáticas nos tumores esporádicos e associados ao VHL 24

1.10- Aconselhamento genético e rastreamento clínico 26

1.11- Aspectos psicológicos resultantes do teste genético 28

2- JUSTIFICATIVA 30

3- OBJETIVOS 32

Objetivo primário 32

Objetivo secundário 32

4- PACIENTES E MÉTODOS 33

4.1- Seleção de pacientes e coleta de dados clínicos 33

4.2- Material biológico 36

4.3- Extração de DNA de células mononucleares do sangue periférico 36

4.4- Amplificação por PCR dos exons 1, 2 e 3 do gene *VHL* 37

4.5- Seqüenciamento direto 39

4.6- Análise por *Southern-blot* quantitativo 40

4.7- Estudo citogenético por FISH 41

4.8- Estudo das mutações novas e variantes na população Brasileira 45

4.9- Avaliação dos familiares assintomáticos 45

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO 47

5.1- O aconselhamento genético e avaliação clínica das famílias com VHL 48

5.2- Detecção das mutações germinativas nas famílias com VHL 57

5.3- Padronização do FISH 60

5.4- Análise das mutações germinativas das famílias com VHL 64

5.5- Detecção e análise das mutações germinativas em pacientes com tumores aparentemente esporádicos 67

5.6- Estudo populacional das variantes alélicas 68

5.7- Correlação genótipo-fenótipo 69

5.8- Teste preditivo em familiares assintomáticos 74

5.9- Programa de rastreamento clínico em pacientes de alto risco 75

5.10- Impacto do rastreamento clínico e molecular na história natural da doença 80

5.11- Notas sobre os aspectos psicológicos e sociais 82

5.12- Aspectos clínicos da doença de VHL no Brasil 84

6- CONCLUSÕES FINAIS 88

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 90

ANEXOS

Anexo 1 – Ficha de avaliação clínica.

Anexo 2 – Consentimento pós-informado.

Anexo 3 – Total de pacientes do estudo.

Anexo 4 – Lista de probandos e familiares pertencentes às famílias com VHL.

Anexo 5 – Lista de pacientes e familiares com tumores esporádicos.

Anexo 6 – Lista dos indivíduos em rastreamento clínico.

Anexo 7 – Heredogramas das famílias e mutações germinativas.

Anexo 8 – Capítulo de livro: "Síndrome de von Hippel-Lindau", em Genética Molecular do Câncer, Sociedade Brasileira de Cancerologia, 2002.

Anexo 9 – Capítulo: "La enfermidad de von Hippel-Lindal en Brasil", em La enfermidad de von Hippel-Lindau – uma grave realidad presente em las distintas especialidades médicas, Colégio Médico de Chile, 2001.

Anexo 10 – Em "Projeto Diretrizes". Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. 1ª Edição, 2001.

Anexo 11 – Artigo em periódico: "High frequency of novel germline mutations in the VHL gene in the heterogeneous population of Brazil", J C C Rocha, R L A Silva, B B Mendonça, S Marui, A J G Simpson, A A Camargo. J Med Genet 40:e31, 2003.

Anexo 12 – Publicações não relacionados à tese.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Histórico

Desde 1864 alguns oftalmologistas começaram a relatar que lesões angiomatosas da retina podiam ocasionar a perda da visão e algumas vezes estavam associadas a lesões semelhantes no cerebelo. Em 1894, Treacher Collins, um oftalmologista inglês descreveu angioma de retina em dois irmãos (**COLLINS 1894**). Somente em 1904 a natureza familial dos angiomas de retina foi reconhecida pelo oftalmologista alemão Eugen von Hippel (1867-1938) que denominou estas lesões de *angiomatosis retinae* (**VON HIPPEL 1904**). No entanto, foi o patologista sueco Arvin Lindau que relatou que o HB de cerebelo e o AR apresentavam a mesma morfologia sugerindo um mecanismo patogênico semelhante, comum a esses tumores e de causa hereditária (**LINDAU 1927**). **CUSHING e BAILEY** (**1928**) atribuíram a Lindau a associação entre o HB de cerebelo e de retina, designando-a "doença de Lindau"; além de apresentarem o primeiro relato completo de um caso.

A associação com outros tumores, como carcinoma de células claras do rim (CR), feocromocitoma (FE), tumores pancreáticos e cistoadenoma do epidídimo, entre outros, vem sendo relatada na literatura apenas nas últimas décadas do século XX. A primeira revisão da literatura veio com o clássico estudo de **MELBON e ROSEN** (**1964**) que estabeleceu os critérios diagnósticos clínicos utilizados até hoje e descreveu uma família extensamente afetada pela síndrome por eles denominada de "von Hippel-Lindau" (VHL). **SHOKEIR** (**1970**) descreveu um *pedigree* com um padrão de herança autossômica dominante e de penetrância incompleta. Desde então, um enorme avanço no conhecimento desta patologia vem sendo alcançado, bem como o entendimento da diversidade de apresentações clínicas e dos fatores genéticos relacionados ao risco de desenvolvimento das manifestações da doença de VHL (**MAHER et al. 1990; FILL et al. 1979; ATUK et al. 1979; HORTON et al. 1976; JENNINGS e GAINES 1988**).

A suspeita de que o gene implicado na doença de VHL poderia estar situado no braço curto do cromossomo 3 veio através do estudo de famílias com CR hereditário, cujos membros afetados apresentavam na análise do cariótipo uma quebra no braço curto do cromossomo 3 e translocação do segmento quebrado para o cromossomo 8 (**COHEN et al. 1979**). Este achado levou aos estudos genéticos de ligação (*Linkage*)

FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE BIBLIOTECA

com foco no cromossomo 3 nas décadas de 1980 que resultaram na localização do gene na região 3p25-26 (**SEIZINGER et al. 1988**). Em 1993, o gene VHL foi identificado por pesquisadores no Instituto Nacional do Câncer (NCI) nos Estados Unidos (**LATIF et al. 1993**). Desde então, enormes avanços vêm sendo alcançados no entendimento da fisiopatologia e da tumorigênese desta doença.

1.2- Epidemiologia e Genética da doença VHL

A doença de VHL tem sido encontrada em todos os grupos étnicos. Estudo epidemiológicos realizados na Inglaterra por **MADDOCK et al. (1996)** e na Alemanha **GLAVAC et al. (1996)** revelaram uma incidência de 1/39.000 a 1/53.000 nascimentos e uma prevalência de 1/31.000 a 1/85.000. Devido à raridade e à diversidade clínica desta doença é provável que muitos casos sejam subestimados. A penetrância é de 97% em torno dos 60 anos e a expectativa mediana de vida do portador é de 49 anos. A síndrome VHL é hereditária e segue um padrão de herança autossômico dominante, afetando igualmente ambos os sexos e predispondo a prole a uma chance de 50% de herdar um alelo com mutação de um dos pais com a doença. Um efeito fundador foi observado por **BRAUCH et al. (1995)** em 14 famílias alemãs da região da Floresta Negra portadoras de doença VHL com fenótipo predominante de FE e HB do SNC.

Ocasionalmente uma mutação *de novo* no gene ocorre na ovogênese, espermatogênese ou mesmo nas fases iniciais da embriogênese, dando origem a um indivíduo afetado cujos pais não são afetados pela doença VHL. A incidência estimada de mutação *de novo* é menor que 5% das mutações detectadas (**NEUMANN et al. 1995; RICHARDS et al. 1995; DECKER et al. 1996**). Porém, estudos recentes com detecção de mutação germinativa em tumores aparentemente esporádicos sugerem que este número seja maior.

A análise de polimorfismos do DNA através de sondas foi usada como maneira de detectar indivíduos portadores entre os membros assintomáticos de famílias com VHL (**GLENN et al. 1992**). Marcadores de regiões microssatélites (**OLSCHWANG et al. 1995**) e polimorfismos intragênicos (**RICHARDS et al. 1993**) mostraram ser métodos complementares para o diagnóstico e detecção de portadores assintomáticos da doença de VHL, permitindo o rastreamento de doença oculta destes indivíduos.

Mais recentemente, após a identificação e caracterização do gene *VHL* tem sido possível detectar em uma amostra de sangue periférico a presença e o tipo de mutação germinativa no gene *VHL* através da utilização de técnicas como o SSCP (single-stranded conformational polymorphism), o DGGE (denaturing gradient gel eletrophoresis) e o seqüenciamento do DNA. Nos primeiros estudos de detecção de mutação era possível identificar a mutação germinativa do gene *VHL* nos indivíduo afetado em cerca de 85% dos casos. As mesmas técnicas também permitem pesquisar a presença de mutação somática do gene *VHL* nos tecidos tumorais.

Estudos de perda de heterozigosidade (LOH) revelam perda do alelo selvagem nos tumores de VHL demonstrando que o gene *VHL* comporta-se como um gene supressor de tumor (**TORY et al. 1989; PAUSE et al. 1998**). Estes achados são compatíveis com a hipótese de **KNUDSON (1971)** de que a tumorigênese é iniciada por um processo com duas etapas: a primeira, constituída pela herança de uma mutação germinativa no gene *VHL* proveniente de um dos pais afetados; e a segunda, quando uma célula somática sofre uma mutação ou deleção do alelo selvagem remanescente, possibilitando a formação de tumores, caracterizados por uma população clonal de células contendo uma mutação germinativa em um alelo e nova mutação somática no alelo selvagem. A inativação da única cópia funcional do gene *VHL* libera a célula da função supressora de tumor do gene *VHL* (**SCHUIN et al. 1994; PAUSE et al. 1998**).

A tendência para desenvolver tumores em determinados tecidos alvo (olho, SNC, rim, adrenal, pâncreas e epidídimo) não é conhecida. Como apenas um evento mutacional somático é necessário para a completa inativação do gene *VHL*, os tumores tendem a ser bilaterais e multicêntricos e a ocorrer em uma idade mais precoce que seus correspondentes esporádicos (**MAHER et al. 1990**).

1.3- Manifestações clínicas da doença de VHL

A doença de VHL é uma doença multissistêmica e de apresentação clínica variada. Uma característica peculiar desta síndrome é a combinação de tumores malignos e benignos em mais de dez órgãos alvo diferentes. As manifestações clínicas podem ocorrer ao longo de toda a vida do indivíduo. Aproximadamente 60.2% dos

pacientes desenvolvem HB cerebelar, 41% AR, 25.3% carcinoma renal de células claras (CR), 14.5% HB espinhal e 14.5% FE. Relativamente poucos pacientes desenvolvem todas as manifestações da doença e cerca de 50% dos pacientes tem apenas uma manifestação (**NEWMANN e WIESTLER 1991; MAHER et al. 1990**). Os cistos são na grande maioria assintomáticos e representam os achados clínicos mais freqüentes. Afetam principalmente o rim e o pâncreas e são geralmente múltiplos. Outros sítios de ocorrência de cistos na doença de VHL são o epidídimo e fígado, e raramente pulmão e osso (**MADDOCK et al. 1996**).

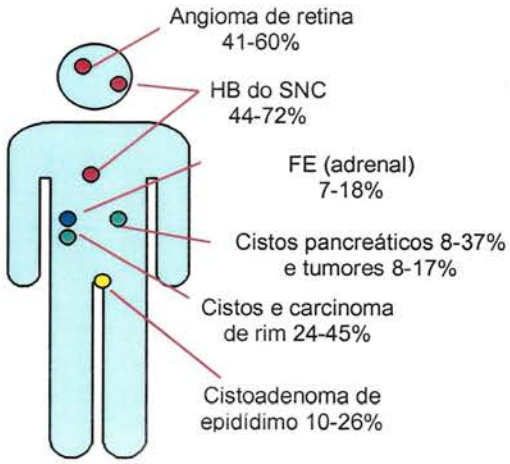


Figura 1 – Principais órgãos acometidos na doença de VHL e freqüência das principais manifestações clínicas (**MAHER et al. 1990**).

A idade do início da doença é variável e depende da expressividade da doença, individual e familial, e da intensidade do rastreamento de lesões assintomáticas. Assim, um programa de rastreamento intensivo pode aumentar significativamente o número de indivíduos afetados na família (**CHOYKE et al. 1995**).

O AR é geralmente a manifestação mais precoce da doença. O AR é indistinguível morfologicamente do HB do cerebelo sendo de apresentação comum na doença VHL, com idade média de diagnóstico aos 25 anos (variando de 1 a 67 anos). O oftalmologista tem um papel crítico no diagnóstico da doença uma vez que 43% dos pacientes apresentam AR como primeira manifestação clínica (**MAHER et al. 1990**). As lesões são geralmente periféricas, mas podem envolver diretamente o disco óptico

e a *ora serrata*. Apesar de ser freqüentemente assintomático, o AR pode causar danos visuais graves à medida que atinge maiores proporções ou quando está localizado centralmente. Complicações devido à hemorragia incluem descolamento de retina, glaucoma, catarata, uveíte e oftalmite simpatética. O tratamento consiste na fotocoagulação a laser para lesões diagnosticadas precocemente, crioterapia para lesões maiores, e enucleação nos casos graves (**MAHER et al. 1990; GINSBURG et al. 1992**).

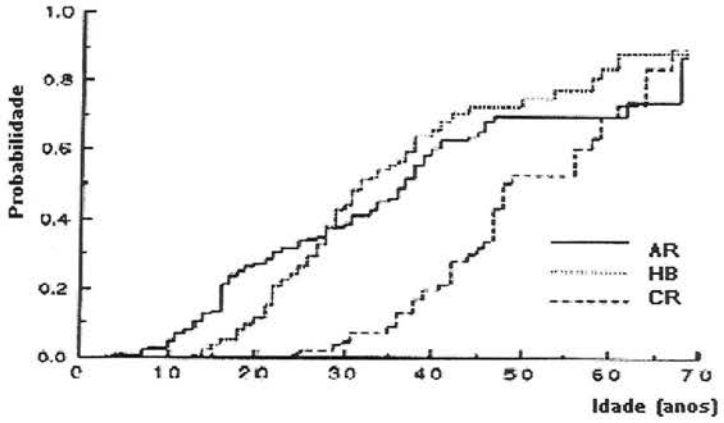


Figura 2 – Incidência cumulativa dos casos de angioma de retina (AR), hemangioblastoma (HB) do SNC e de carcinoma renal do tipo células claras (CR) pela idade do diagnóstico destas lesões. Adaptado de **CHOYKE et al. (1995)**.

Os HB do SNC ocorrem com freqüência de 44-72% nos pacientes com VHL, sendo uma das manifestações mais freqüentes da síndrome. Os HB do SNC localizam-se preferencialmente no cerebelo, na medula espinhal e mais raramente no cérebro. Apenas 2% dos HB do SNC ocorrem no parênquima cerebral (**MAHER et al. 1990**). Clinicamente, o HB na doença de VHL desenvolve-se quase invariavelmente antes dos 50 anos, sendo a idade média de diagnóstico aos 29 anos (variando de 11 a 78 anos) (**HUSON et al. 1986**). Os HB são lesões vasculares e apresentam características morfológicas indistinguíveis do AR e tendem a ocorrer de forma múltipla. Freqüentemente apresentam componentes císticos e sólidos. Devido ao seu crescimento lento, muitas vezes são assintomáticos. Os sintomas podem ser intermitentes e incluem cefaléia, vertigem, vômito, ataxia, fala arrastada, nistagmo, dismetria e paralisia do nono par craniano, até quadros neurológicos agudos graves

com perdas sensoriais e motoras dependendo da localização da lesão. A medula espinhal é sítio de HB em aproximadamente 13% dos casos e a localização preferencial é no cone medular ou na junção crânio-cervical. Siringomielia pode ocorrer em até 25% dos pacientes com HB espinhal (**CHOYKE et al. 1995**). O HB do SNC pode representar a primeira manifestação da doença. Cerca de 5 a 30% das ocorrências de HB intracranianos e 80% dos HB espinhais estão associadas à doença de VHL. Assim, todos os pacientes com HB do SNC devem ser considerados para investigação detalhada da sua história familial e de lesões associadas à doença de VHL (**LONDRINI et al. 1991**). O tratamento primário das lesões sintomáticas consiste na exérese cirúrgica da lesão (**SYMON et al. 1993; NEUMANN et al. 1989**). Em casos especiais, os tratamentos com radioterapia ou radiocirurgia têm sido utilizados para o controle da progressão das lesões (**RICHARDSON et al. 1980; PAGE et al. 1993**).

O tipo histológico dos CR de pacientes com VHL é tipicamente de células claras e em 35% das vezes se apresentam clinicamente com componente cístico (**NELSON et al. 1994**). A idade média do diagnóstico é aos 37 anos, variando de 16 a 76 anos (**MAHER et al. 1990**). O CR associado à doença de VHL ocorre em uma idade menor quando comparado com o seu correspondente esporádico (em torno dos 62 anos), é mais freqüentemente bilateral (mais de 75% dos pacientes portadores de VHL) e multicêntrico em 87% dos casos (**FILL et al. 1979**). Além disso, o CR da doença de VHL parece apresentar uma taxa de crescimento menor e metástase mais tardia em relação a forma esporádica (**CHOYKE et al. 1995**).

Lesões pancreáticas, incluindo cistos, cistoadenomas, tumores neuroendócrinos, adenocarcinoma, hemangioblastoma e metástase de carcinoma renal, têm sido descritas associadas a VHL (**CHOYKE et al. 1995; NEWMANN e WIESTLER 1991; LIBUTTI et al. 1998; FILL et al. 1979; CHAMBERS et al. 1997**). Recentemente, o envolvimento pancreático na evolução da doença foi estudado em 158 pacientes consecutivos pertencentes a 94 famílias francesas. O envolvimento pancreático foi observado em 77,2% dos pacientes e incluíam cistos pancreáticos (91,1%), tumores neuroendócrinos (12,3%) e lesões combinadas (11,5%). O pâncreas foi o único órgão afetado em 7,6% dos pacientes. As lesões pancreáticas necessitaram intervenção cirúrgica em apenas 8,2%, quando sintomáticas ou para ressecção de tumores neuroendócrinos (**HAMMEL et al. 2000**).

As famílias que apresentam fenótipo associado a FE freqüentemente desenvolvem o FE antes de outras manifestações da doença (**CHOYKE et al. 1995**). A

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE BIBLIOTECA

média de idade ao diagnóstico do FE em VHL é de 29 ± 14 anos (variando de 5 a 62 anos), de acordo com um estudo francês (**RICHARD et al. 1994**). **RICHARD et al. (1994)** relataram a presença de tumor bilateral em 42% dos 36 pacientes estudados; paraganglioma estava associado com FE adrenal em 4 casos e FE maligno ocorreu em 3 casos. Em 6 casos, FE foi a primeira manifestação da doença.

O cistoadenoma do epidídimo ocorre em 10 a 26% dos pacientes com VHL. Outras complicações viscerais incluem cistos renais, pancreáticos e de epidídimo, além de tumores pancreáticos em pequeno número de pacientes. Manifestações paraneoplásicas podem ocorrer, como policetemia associada ao HB do cerebelo (5 a 20%) ou ao tumor renal.

Recentemente tem sido descrita a associação de tumores de saco endolinfático - extremamente raros na população geral - em 11% dos pacientes com doença VHL por **MANSKI et al. (1997)**, ocasionando perda auditiva, zumbido e paresia facial, sugerindo que estes tumores façam parte da síndrome e, portanto devam ser considerados no rastreamento clínico dos indivíduos com diagnóstico de VHL.

Historicamente, a média de idade do óbito de pacientes com VHL era de 49 anos, e a causa mais comum era por complicações neurológicas dos HB de SNC (em 53% dos casos) e por CR metastático (em 32% dos casos) (**MAHER et al. 1990; GLENN et al. 1990; MAHER et al. 1991; FILLING-KATZ et al. 1991; NEWMANN et al. 1992**). A evolução dos métodos de imagem – com a US e a TC nas décadas de 1970 e início dos anos 80 e posteriormente a RM – possibilitou o aumento da identificação de indivíduos afetados pela doença e intervenção precoce. O avanço das técnicas cirúrgicas, em especial as neurocirúrgicas, também contribuiu para a redução da morbidade e mortalidade operatórias (**CHOYKE et al. 1995**).

1.4 Critério diagnóstico clínico

Na presença de uma história familial positiva para a doença de VHL, o diagnóstico clínico pode ser feito pela identificação de uma única manifestação característica da síndrome: AR, HB do SNC, tumores renais, FE, cistos pancreáticos múltiplos, ou cistoadenoma papilífero de epidídimo. Na ausência de história familial é necessário o diagnóstico de pelo menos duas lesões características, sendo que uma

delas deve ser AR ou HB do SNC (**MELBON e ROSEN 1964**). Os cistos renais e de epidídimo são muito freqüentes na população geral para serem considerados sinais confiáveis para o diagnóstico de VHL.

As mutações germinativas que ocasionam a doença de VHL podem ser herdadas em caráter familial ou ainda ocorrerem como eventos novos causados por uma mutação *de novo*. Neste último, o diagnóstico clínico tem sido confirmado na maioria dos casos com o diagnóstico molecular (**DECKER et al. 1996**). Mosaicismos somáticos também são descritos em VHL e são responsáveis por uma expressão variável das manifestações da doença, dificultando seu diagnóstico (**SGAMBATI et al. 2000; MURGIA et al. 2000**).

Várias formas de apresentações atípicas têm sido descritas associadas ao VHL, dificultando e muitas vezes atrasando o seu diagnóstico. Um caso raro de hemangioblastoma hipofisário foi descrito em um paciente com VHL associado a angioma de retina e FE bilateral (**GOTO et al. 2001**). Uma paciente com eritrocitose, paragangliomas múltiplos e somatostatinoma duodenal só foi diagnosticada como portadora de VHL após o desenvolvimento de um angioma de retina (**KARASAWA et al. 2001**). A apresentação clínica de cistos renais e pancreáticos em adultos deve ser diferenciada da doença policística do rim, uma entidade distinta de padrão de herança autossômico dominante (**CHATHA et al. 2001**). Co-morbidades genéticas também podem retardar ou confundir o diagnóstico, como no caso recente de uma paciente portadora de VHL que desenvolveu ataxia espino-cerebelar tipo 2 (**MCNEIL et al. 2001**).

A predisposição genética ao FE está associada a mutações germinativas nos genes *VHL*, *RET*, *NF1* e recentemente ao gene *SDHD* (**WOODWARD et al. 1997; ASTUTI et al. 2001**).

Diversas lesões do SNC têm sido descritas em associação com a doença de VHL, como ependimoma cerebelar, astrocitoma, neuroblastoma, malformações arterio-venosas e tumores neuroectodérmicos primitivos; porém, estas lesões têm sido consideradas apenas coincidentes, desde que são raramente descritas (**HORTON et al. 1976; BECKER et al. 1993**).

1.5- Mapeamento do gene VHL *com a sonda g7*

Vários estudos citogenéticos e moleculares mostraram que a deleção do 3p era um fato comum nos tumores relacionados ao VHL, especialmente o CR (**TEYSSIER et al. 1986; KOVACS e HOENE 1988; MAHER e YATES 1991**; **YAMAKAWA et al. 1991**) e que as aberrações cromossômicas do CR associado ao VHL eram similares às encontradas no CR esporádico (**GOODMAN et al. 1990; KOVACS et al. 1991; LI et al. 1993**). Observou-se a tendência de concentrar características clínicas de VHL nos portadores da doença na mesma família sugerindo que a doença VHL fosse causada por mutações diferentes em um único *locus* genômico (**NEWMANN e WIESTLER 1991**). A identificação de marcadores flanqueando a região 3p25-26 permitiu o diagnóstico em indivíduos pré-sintomáticos e revelou que o fenótipo das famílias com VHL com ou sem FE eram causados pelo envolvimento do mesmo gene (**SEIZINGER et al. 1991**).

O *locus* associado à doença foi mapeado na região cromossômica 3p25-26 através da identificação de três pacientes não relacionados com CR hereditário apresentando rearranjos cromossômicos constitutivos grosseiros nesta região (**COHEN et al. 1979; SEIZINGER et al. 1988**). Desta forma, foi possível posicionar o *locus* VHL através de análise de ligação e por mapeamento meiótico. Um clone de cDNA (cos11) isolado a partir de uma biblioteca de teratocarcinoma construída no vetor λgt11 e mapeado na região deletada foi usado para gerar um mapa de restrição.

O isolamento de genes candidatos foi obtido com o uso de sondas de cDNA correspondendo às seqüências codificantes evolutivamente conservadas desta região de deleção. Das duas sondas usadas, g6 (localizada na região telomérica de cos11) mostrou-se improvável de ser o gene VHL, uma vez que nenhuma mutação foi encontrada em 120 pacientes com VHL analisados; enquanto que o segmento g7 (GenBank: L15409) provou ser um forte candidato para o gene VHL já que era expresso em diversos tecidos (por *Northern-blot*) incluindo os tecidos afetados pela doença de VHL; era um gene de cópia única (por *Southern-blot*) e tinha apenas um *locus* na região 3p25 (por FISH). Dos 221 pacientes com VHL, 28 (12%) apresentavam rearranjos detectáveis por *Southern-blot*. A clonagem do gene associado à doença de VHL foi concluída em 1993 em um estudo cooperativo internacional entre as equipes do Dr. Bert Zbar (Frederick Cancer Research and Development Center / National

Cancer Institute – EUA) e do Dr. Eamonn R Maher (Universidade de Cambridge – Inglaterra) (**LATIF et al. 1993**).

1.6- Estrutura, expressão e função do gene VHL

Diversos estudos estabeleceram o mapa físico do gene *VHL* e confirmaram o locus deste gene na região 3p25-26. O gene *VHL* foi clonado em 1993 e é composto por três exons, sendo que o exon 2 sofre *splicing* alternativo. O produto gênico da isoforma contendo apenas os exons 1 e 3 não é suficiente para inibir a tumorigênese (**GNARRA et al. 1994**). O cDNA do gene *VHL* possui 1810pb em extensão com uma fase aberta de leitura (ORF) de 852pb. O mRNA transcrito apresenta dois tamanhos distintos, 6 e 6.5kb, com uma relação entre eles de 2:1 (**LATIF et al. 1993**). Ambos mRNAs são expressos em tecidos adultos como cérebro, rim, glândula adrenal, próstata, pulmão e coração, enquanto que no cérebro fetal a expressão é limitada apenas ao transcrito menor e no rim fetal apenas ao maior. A expressão do gene *VHL* é necessária para a embriogênese, como foi demonstrado com experimentos com gene *knock-out* em camundongos (**GNARRA 1997**).

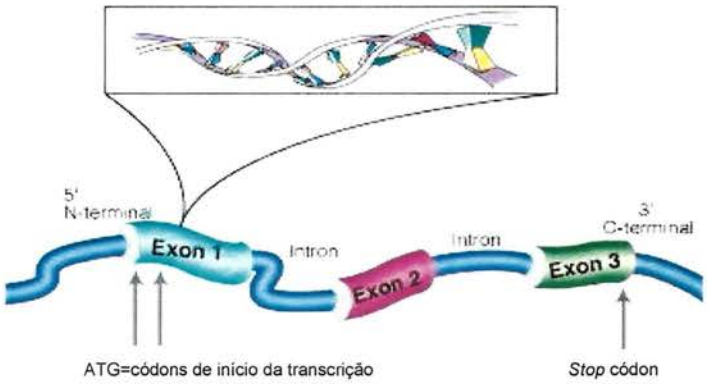


Figura 3 – O gene *VHL* é um gene supressor de tumor, possui três exons e dois sítios iniciadores de transcrição, codificando para uma proteína VHL (pVHL) de 160 e 213 aninoácidos dependendo do sítio iniciador.

KUZMIN et al. (1995) analisou a extremidade 5' do gene VHL e identificou os sítios de início da transcrição e o promotor do gene. O produto menor do gene *VHL* é gerado por um iniciador interno na mesma fase de leitura a partir da metionina do códon 54. Ambas as isoformas da proteína VHL (pVHL) de 160 e 213 aminoácidos se comportam de modo semelhante em estudos bioquímicos e funcionais (**SCHOENFELD et al. 1998; ILIOPOULOS et al. 1998; BLANKENSHIP et al. 1999**). A pVHL de 213 aminoácidos não apresenta nenhuma similaridade com outras proteínas humanas conhecidas (**LATIF et al. 1993**). O homólogo do gene *VHL* do rato tem 88% de identidade com o gene *VHL* humano (**DUAN et al. 1995**). Nesta tese, ambas as formas serão referidas indistintamente como pVHL.

LEE et al. (1996) demonstrou que a localização da pVHL é determinada pela densidade das células em meio de cultura. Em cultura esparsa, a pVHL foi encontrada predominantemente no núcleo, enquanto que em cultura confluente a pVHL foi observada no citoplasma. Experimentos indicam que a localização sub-celular da pVHL é regulada de maneira ciclo-dependente (**YE et al. 1998**). A microscopia imuno-eletrônica utilizada por **SAKASHITA et al. (1999)** demonstrou a localização citoplasmática da pVHL, particularmente em células mitóticas.

A expressão da pVHL por imuno-histoquímica em tecidos normais ocorre nas células epiteliais que cobrem a superfície corporal, o trato respiratório, digestivo e gênito-urinário; nas células epiteliais secretoras das glândulas exócrinas e endócrinas; nas células parenquimatosas dos órgãos viscerais; em cardiomiócitos; nos neurônios de tecidos nervosos; nos linfócitos dos órgãos linfóides; e nos macrófagos (**SAKASHITA et al. 1999**). Embora a pVHL seja expressa difusamente em diversos órgão e tipos celulares, sua expressão não é demonstrada nas células endoteliais de tecidos normais (**LOS et al. 1996**). Entretanto, foi observado expressão intensa da pVHL nas células endoteliais proliferativas da placenta, metástases de adenocarcinoma pancreático, na base de úlceras esofágicas e na neovascularização de lesões ateroscleróticas (**SAKASHITA et al. 1999**). **LOS et al. (2000)** demonstrou que as células endoteliais nos tumores associados à doença de VHL são geneticamente estáveis e que o estroma é o componente neoplásico da doença.

Vários estudos demonstraram a natureza supressora de tumor do gene VHL selvagem através de ensaios de transfecção (**CHEN et al. 1995a; ILIOPOULOS et al. 1995; PAUSE et al. 1998**). Um maior entendimento do papel deste gene na tumorigênese foi alcançado com a identificação de alvos funcionais da pVHL. O

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE BIBLIOTECA

complexo Elongina SIII foi identificado como um alvo funcional da pVHL e é um fator de transcrição celular envolvido na regulação da elongação do mRNA. A Elongina SIII é um heterotrímero consistindo de uma subunidade ativa A e duas subunidades reguladoras (B e C) que ativam a elongação da transcrição pela RNA polimerase II. A pVHL é capaz de ligar-se fortemente e especificamente com as subunidades B e C inibindo a atividade transcricional da Elongina SIII. Nos pacientes com doença VHL, a mutação no gene *VHL* interfere com este mecanismo de controle, acelerando o processo transcricional e favorecendo o crescimento celular (**KRUMM e GROUDINE 1995, DUAN et al. 1995**).

A estrutura do complexo ternário composto pela pVHL-Elongina C-Elongina B (VCB) foi conhecida há pouco tempo, sendo caracterizados dois domínios principais: um domínio maior NH2 terminal de 100 aminoácidos rico em folhas β pregueadas (domínio β) e um domínio menor rico em α hélices (domínio α). O domínio β consiste de sete fitas β sanduíches (resíduos 63 até 154) e uma α hélice (H4; resíduos 193 até 204). O domínio α da pVHL consiste de três α hélices (H1, H2 e H3) e forma com a hélice H4 da Elongina C um aglomerado de quatro hélices arranjadas entre si em dois pares com ângulos perpendiculares.

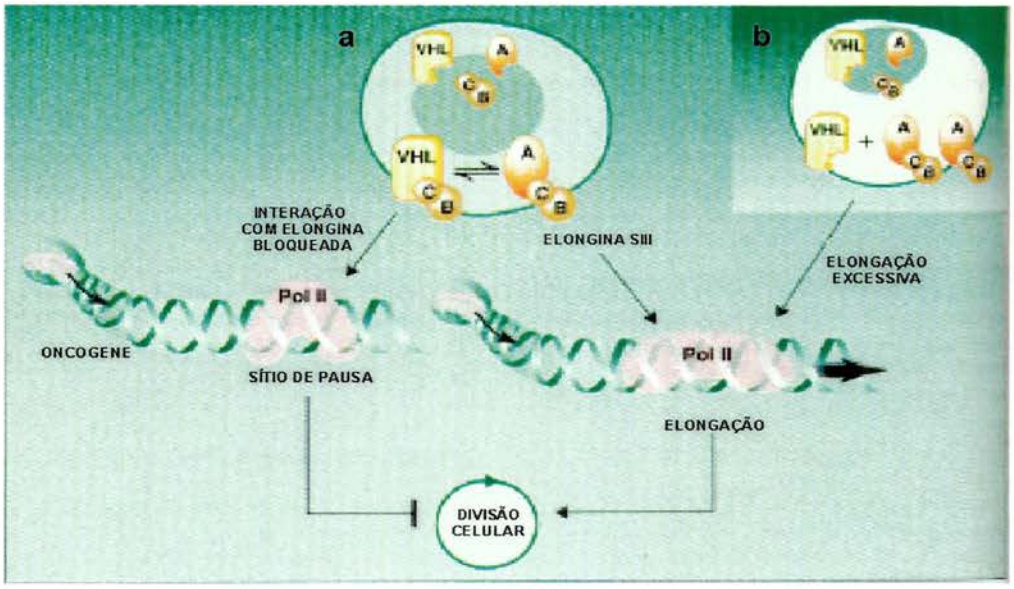


Figura 4 – O processo de elongação do mRNA é regulado na célula normal (a) pelo equilibrio entre o complexo Elongina SIII (formado pelas sub-unidades das Elonginas A, B e C) e o complexo VCB (formado pelas sub-unidades pVHL, Elongina C

e Elongina B). Na presença da pVHL mutante (b) e maior disponibilidade do complexo SIII, o processo de elongação é facilitado.

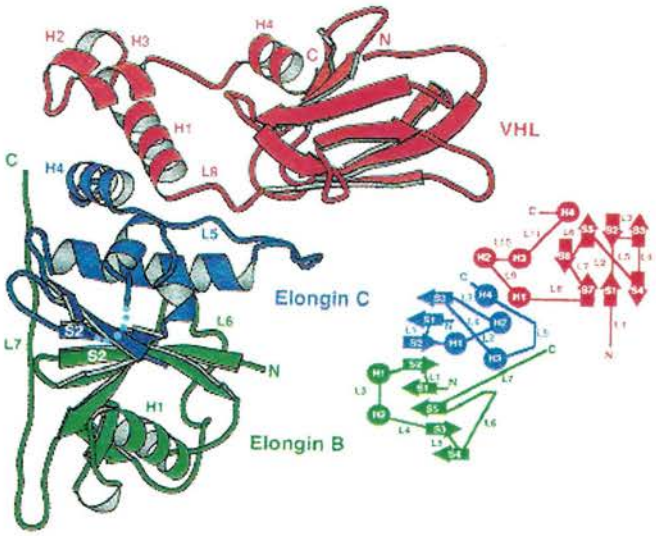


Figura 5 – Estrutura secundária do complexo ternário VCB composto pela interação entre a pVHL e a Elongina C e entre esta última e a Elongina B.

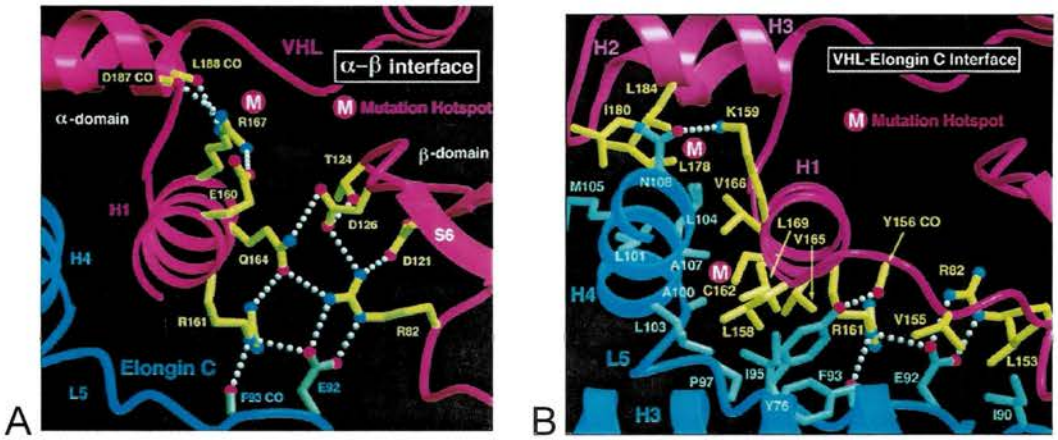


Figura 6 – Interface dos domínios α e β da pVHL e da Elongina C. A figura A mostra os resíduos da pVHL em amarelo, os resíduos da Elongina C em verde, os pontilhados brancos indicam pontes de hidrogênio entre os átomos de oxigênio (em vermelho) e de nitrogênio (em azul).

Os domínios α e β são conectados pelos resíduos polipeptídicos 154 a 156 e 189 a 194, e por uma interface polar que é estabilizada por uma rede de pontes de hidrogênio a partir da hélice H1, da fita β sanduíche e da Elongina C. Ao todo, 35 resíduos da pVHL interagem com a Elongina C, sendo uma grande porção da superfície do domínio α e uma pequena porção do domínio β (**STEBBINS et al. 1999**).

A análise estrutural da pVHL mutante e dos efeitos causados pelas mutações foi estudado em 279 mutações *missense* derivadas de tumores. Aproximadamente metade das mutações ocorreu no domínio α, nos resíduos de contato com a Elongina C. A hélice H1 do domínio α contém o resíduo Arg167, o ponto quente de mutação mais freqüente, que tem um papel estrutural estabilizando a hélice H1 e a interface dos domínios α e β. Este padrão freqüente de mutações no domínio α ressalta o papel da Elongina C para a atividade supressora de tumor da pVHL. O restante das mutações localizou-se no domínio β, principalmente na área não relacionada ao contato com a Elongina C. Algumas destas mutações situavam-se em resíduos importantes para a integridade estrutural das fitas β sanduíches, tais como do núcleo hidrofóbico (Pro86, Phe76, Phe119, Trp117 e Val130) e resíduos polares internalizados que mantém as fitas juntas (Asn78) (**STEBBINS et al. 1999**).

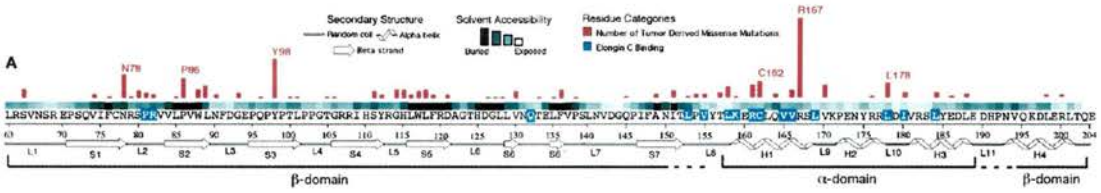


Figura 7 – Elementos estruturais e conservados da pVHL humana. A figura mostra a distribuição das mutações missense nos resíduos da pVHL, correspondentes aos domínios α e β (adaptado de **STEBBINS et al. 1999).**

O resíduo Try98, o segundo sítio mais freqüente de mutação somática em VHL, encontra-se na superfície de uma fita β sanduíche, oposto ao sítio de ligação à Elongina C e não têm papel estrutural. Outros resíduos hidrofóbicos nesta mesma região, descrita como exposta a solventes, também são sítios freqüentes de mutação nos tumores relacionados à VHL (**STEBBINS et al. 1999**). A análise estrutural mostrou

que estes resíduos correspondiam a um sítio secundário de ligação macromolecular da pVHL também importante para sua atividade supressora de tumor, o HIF1, que será discutido abaixo.

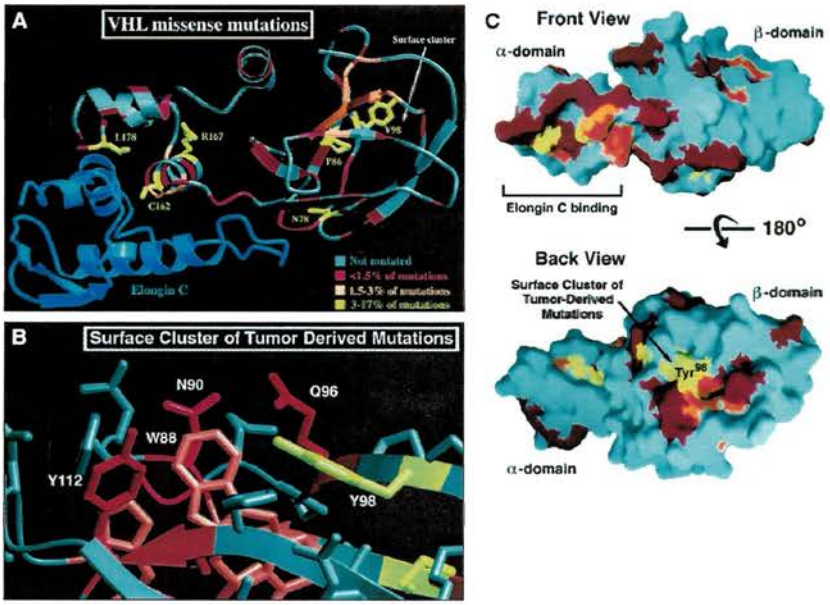


Figura 8 – Estrutura em detalhe da pVHL mostrando os três principais sítios de mutações derivadas de tumores: nos resíduos hidrofóbicos centrais dos domínios α e β da pVHL (figura A), nos resíduos superficiais de ligação à Elongina C (figura A e C) e no sítio secundário de ligação macromolecular em torno do resíduo Tyr98 (figura B e C).

A Cul1 e Cul2 apresentam alta similaridade com a Cdc53 de levedura, que desempenha um papel de ubiquitinação de proteínas. A similaridade do complexo VEC com o complexo Skp1-Cdc53-Fbox (SCF) de levedura sugeriram que a pVHL fizesse parte de uma vasta família de proteínas adaptadoras envolvidas na degradação de proteínas por ubiquitinação (**Figura 9**) (**STEBBINS et al. 1999**).

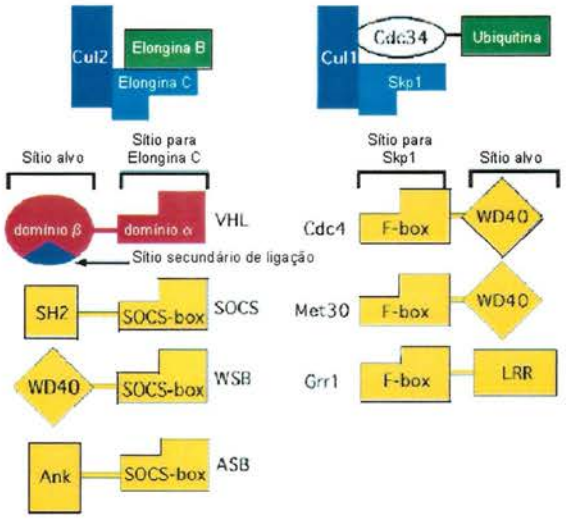


Figura 9 – A estrutura do complexo VEC revela a similaridade com as proteínas do complexo SCF e sugerem que a pVHL seja um membro da superfamília SOCS-box (em amarelo) de proteínas adaptadoras envolvidas na degradação de proteínas.

O papel da pVHL na angiogênese tumoral colocou o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) como um dos possíveis alvos da pVHL. Foi demonstrado que a pVHL pode inibir a transcrição do gene *VEGF* através da ligação ao sítio Sp1 presente na sua região promotora (**MUKHOPADHYAY et al. 1997**). Este processo é mediado por duas isoformas da proteína quinase C (PKC), a PKCδ e PKCζ (**OHH e KAELIN 1999**). No modelo proposto para a regulação da angiogênese mediada pelo complexo VCB, uma pVHL intacta seria necessária para a via de angiogênese induzida por hipoxia. Desta forma, demonstrou-se que a hipoxia induzia a transcrição de mRNAs, como o mRNA de VEGF, PDGF-B (cadeia B do fator de crescimento derivado de plaqueta) e de GLUT1, através de uma via mediada pela pVHL (**LONERGAN et al. 1998**). Além deste efeito transcricional em VEGF, foi demonstrado que a pVHL também age interferindo na estabilidade do mRNA de VEGF tendo, deste modo, um efeito pós-transcricional. Assim, a pVHL íntegra é necessária para a desestabilização do mRNA de VEGF sob condições normóxicas (**GNARRA 1996; ILIOPOULOS et al. 1996**). A descoberta de outros elementos desta via vem esclarecendo alguns passos deste processo.

MAXWELL et al. (1999) demonstrou que o mediador da pVHL na regulação da resposta à hipoxia é o HIF1 (hipoxia-inducible factor-1). O HIF1 funciona como um

ativador transcricional ligando-se diretamente ao DNA através de suas subunidades α e β. O complexo VEC e sua combinação de pelo menos mais uma proteína Rbx1 regulam a quantidade e disponibilidade de HIF1, através de sua atividade de ubiquitina ligase (**KAMURA et al. 1999**). A pVHL íntegra tem uma ação de ubiquitinação das subunidades α de HIF1 (HIFα) na presença de oxigênio, marcando-a para degradação pelo proteassoma 26S. Células deficientes de pVHL são incapazes de degradar as subunidades HIFα produzindo a ativação constitutiva dos genes induzidos por HIF e contribuindo para o fenótipo angiogênico dos tumores relacionados ao VHL (**KAMURA et al. 1999; TANIMOTO et al. 2000**).

Os produtos do gene *VHL* de 24kD e de 18kD, produzidos a partir dos dois sítio de transcrição, apresentam funções idênticas quanto à supressão de tumores, regulação negativa do VEGF e da proteína transportadora de glicose GLUT-1, e capacidade de ligação às elonginas (**KAELIN et al. 1998; SCHOENFELD et al. 1998; ILIOPOULOS et al. 1998**). Esta observação explica o porque das mutações em VHL situarem-se quase exclusivamente entre o C-terminal e o resíduo 54 (**MAHER e KAELIN 1997**).

Outros autores demonstram a transativação e regulação de outros genes pela pVHL (**FLAMME et al. 1998; LONERGAN et al. 1998**).

Outros alvos conhecidos da pVHL incluem a anidrase carbônica (CA) 9 e a CA12, envolvidas na regulação do pH extracelular (**IVANOV et al. 1998**). A pVHL também é necessária para a montagem adequada da matriz extracelular através da interação com a fibronectina que é depositada na matrix extracelular. Esta interação é abolida na pVHL mutante, mesmo nas mutações que não afetam o sítio para as elonginas, sugerindo que a ligação à fibronectina contribui para a função supressora de tumor da pVHL (**OHH et al. 1998**). Dados preliminares sugerem que as células com pVHL mutante são capazes de secretar a fibronectina, mas que uma vez secretada a fibronectina não é capaz de polimerizar-se adequadamente. O modelo atual especula que a pVHL teria um papel na eliminação da fibronectina malformada ou malprocessada (**KOPITO 1997**).

1.7- Mutações germinativas no gene VHL

Até hoje, mais de 550 famílias com VHL foram identificadas na Europa, Estados Unidos e Japão sendo caracterizadas 210 mutações germinativas no gene *VHL* nestas famílias (**THE HUMAN GENE MUTATION DATABASE 2002**). Historicamente, a detecção de mutações nos casos esperada variava de 36% a 82%, dependendo das técnicas utilizadas (**RICHARDS et al. 1993 e 1994; CROSSEY et al. 1994; BRAUCH et al. 1995; DECKER et al. 1996; GLAVAC et al. 1996; ZBAR et al. 1996**). Aproximadamente 20% dos pacientes com mutações germinativas do gene *VHL* tinham grandes deleções detectadas por *Southern-blot*, 27% tinham mutações tipo *missense* e 27% tinham mutações *nonsense* ou *frameshift*. Mais recentemente, avanços na análise das mutações com a combinação das técnicas de sequenciamento, *Southern-blot* quantitativo e FISH tem sido possível detectar mutações germinativas no gene *VHL* em 73% a 100% dos probandos (**STOLLE et al. 1998; YOSHIDA et al. 2000**). O FISH, utilizando grandes fragmentos gênicos como sonda, permite diagnosticar em preparações metafásicas grandes deleções do gene *VHL*. Com o uso combinado destas sondas é possível definir a extensão da deleção. Também é possível o diagnóstico de mosaicismo em casos especiais (**PACK et al. 1999**).

Métodos de pre-rastreamento de mutação têm sido propostos antes do seqüenciamento de diversos genes, sendo o *single strand conformational polymorfism* (SSCP) uma das técnicas mais utilizadas. Recentemente, a técnica *denaturing high performance liquid chromatography* (DHPLC) revelou-se um método prático e bastante sensível (**ELLIS et al. 2000**). Do mesmo modo que o *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE), o DHPLC detecta mobilidade alterada de DNA heteroduplex em relação ao homoduplex. Em um estudo recente foram avaliadas 43 mutações conhecidas no gene *VHL* retrospectivamente por DHPLC e 36 indivíduos foram estudados quanto ao estado de portador assintomático.. A sensibilidade para detecção de mutações utilizando-se dois aparelhos comerciais empregados para a metodologia. (*Variant-Helix TM System* e o sistema de análise de fragmentos *Wave*®) foi de 72% e 94%, respectivamente. Já nos pacientes assintomáticos em que a mutação da família podia ser identificada pelo DHPLC a sensibilidade foi de 100%. Os autores sugerem que uma vez caracterizada a mutação específica da família, o DHPLC poderia ser

utilizado na determinação do estado de portador em familiares assintomáticos, desde que é um método sensível, rápido e barato para este fim (**KLEIN et al. 2001**).

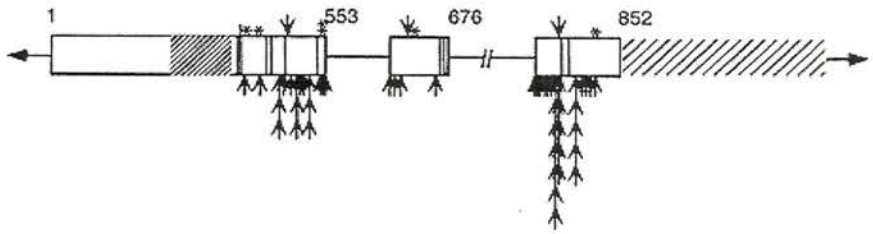


Figura 10 – Distribuição das mutações germinativas ao longo do gene *VHL*, que mostra uma tendência de concentrarem-se prinipalmente nas regiões codificadoras dos exons 1 e 3. Reproduzido de **CHEN et al. (1995b)**.

Globalmente, as mutações germinativas se distribuem pelos 3 exons do gene VHL mas tendem a se concentrar nos exons 1 e 3, com uma predominância de mutações pontuais. A região entre os dois códons iniciadores, correspondendo aos 53 primeiros códons do gene *VHL*, é em geral poupada, sendo descritas até o momento apenas uma mutação associada a VHL e duas associadas a FE. Até mesmo as mutações somáticas observadas nos tumores poupam esta extremidade 5' (**CHEN et al. 1995a ou b; ZBAR et al. 1996; GLAVAC et al. 1996**).

No estudo realizado por **STOLLE et al. (1998)** recentemente uma freqüência de 100% na detecção de mutações germinativas no gene *VHL* em 93 famílias estudadas foi alcançada através das técnicas de *Southern-blot* quantitativo e FISH - para detecção de grandes deleções e rearranjos intragênicos - em conjunto com o seqüenciamento do gene *VHL* - para detecção de mutações pontuais. A detecção de mutação em 100% dos casos dá suporte ao conceito de que o VHL é uma doença geneticamente homogênea; com o emprego das técnicas descritas um indivíduo que não tem a mutação detectada é improvável de ser um portador do gene *VHL* mutante (**STOLLE et al. 1998**).

Como todos os tumores associados a doença de VHL também ocorrem de forma esporádica, o diagnóstico clínico de casos *de novo* pode ser dificultado ou mesmo pode ser retardado até que critérios mínimos sejam conseguidos. Assim, na ausência de história familial estes tumores podem equivocadamente ser considerados

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE BIBLIOTECA

de origem esporádica. Estudos com pacientes portadores de tumores aparentemente esporádicos associados a VHL vêm avaliando a prevalência de VHL nestes grupos.

Estima-se que entre 10 a 14% dos pacientes de HB cerebelar aparentemente esporádicos apresentem mutações germinativas no gene *VHL* (**OLSCHWANG et al. 1998; GASKER et al. 1999**). Um estudo comparou características clínicas dos HB esporádicos daqueles associados à VHL e verificou que os pacientes com VHL tendem a desenvolver HB em uma idade mais jovem, lesões múltiplas (53%), maior taxa de lesões novas (taxa de uma lesão nova a cada 2,1 anos), além de maior freqüência de lesões espinhais (**CONWAY et al. 2001**).

A prevalência de indivíduos com AR esporádico com mutação germinativa no gene *VHL* não é conhecida e é provável que seja muito maior que a estimativa de 20% relatada por von Hippel em 1927. Aproximadamente metade dos pacientes de até 10 anos de idade com angioma de retina solitário é portadora de VHL, sendo importante a recomendação de um programa de rastreamento clínico e de teste genético (**SINGH et al. 2001**).

Uma significativa proporção (8.8%) dos pacientes com casos aparentemente esporádicos de FE carreia mutação germinativa no gene *VHL* (**KRIJGER et al. 1998**). Dos 27 casos com FE esporádicos estudados por **BAR et al. (1997)** nenhum dos pacientes com tumor unilateral apresentou mutação germinativa para os gene *VHL* e RET, enquanto que os dois casos bilaterais tinham mutação no gene *VHL*; restringindo o diagnóstico molecular e o rastreamento clínico aos casos de ocorrência familial, idade jovem e tumores múltiplos. **WOODWARD et al. (1997)** encontrou mutação germinativa no gene *VHL* na maioria dos pacientes com FE bilateral esporádico e em todos com FE familial.

1.8- Classificação de VHL e correlação genótipo-fenótipo

As famílias com VHL apresentam variações quanto a apresentação dos tumores, sendo que qualquer combinação das lesões pode resultar num fenótipo familial específico. A observação clínica de que o fenótipo associado ao FE era exclusivo de algumas famílias com VHL mostrou que existiam diferenças no espectro de mutações germinativas presentes neste grupo de pacientes. Por outro lado, a

evidência da presença de mutação germinativa no *gene VHL* em quase 100% dos portadores de FE familial revelou que esta síndrome representa na realidade uma variante da doença de VHL. (**CROSSEY et al. 1995; GARCIA et al. 1997; MULVIHILL et al. 1997**).

Em decorrência da sua enorme heterogeneidade clínica, a síndrome VHL tem sido classificada pela ausência ou presença de FE na família em VHL tipo 1 e VHL tipo 2 (7 a 20%), respectivamente (**NEWMANN e WIESTLER 1991**). Posteriormente, a observação de que as famílias com VHL tipo 2 (com FE) cursavam com espectros clínicos diferentes dependendo do tipo de mutação permitiu a subdivisão em: tipo 2A (com FE, com AR e/ou HB, sem CR); tipo 2B (com FE, com AR e/ou HB, com CR); e tipo 2C (com FE, sem AR e/ou HB, sem CR) (**RITTER et al. 1996; VAN DER HARST et al. 1998**). As evidências que justificam esta classificação foram baseadas na correlação entre o genótipo e o fenótipo apresentado por estas famílias e são apresentados a seguir.

Considerando globalmente todas as famílias com VHL, 58% das mutações germinativas detectadas em VHL são do tipo *missense* e 42% resultam em uma proteína truncada (**THE HUMAN GENE MUTATION DATABASE 2002**). No entanto, este espectro das mutações se altera significativamente quando as famílias são classificadas de acordo com o fenótipo associado ao VHL tipo 1 e VHL tipo 2. As famílias com VHL tipo 1 freqüentemente apresentam grandes deleções e mutações pontuais que causam uma terminação prematura da transcrição gênica (microdeleções e inserções e mutações *nonsense*) resultando em uma proteína truncada (**FRIEDRICH 2001**). Nas 114 famílias estudas por **CHEN et al. (1995b)**, os pacientes com VHL tipo 1 apresentavam mutações que resultavam em um produto gênico truncado em mais de 50% dos casos, enquanto que 96% do grupo com VHL tipo 2 tinha mutações do tipo *missense*.

CROSSEY et al. (1994) correlacionaram o genótipo e o fenótipo em 55 famílias. Mutações que causam um produto truncado foram detectadas em 70% das famílias sem FE e em apenas 16% das famílias com FE. Por outro lado, 80% das famílias com FE apresentavam mutações *missense*, comparando com apenas 25% das famílias sem FE. Particularmente, o codon 167 é tido como um sítio quente de mutação (*hot spot*), e a substituição da arginina codificada pelo codon 167 está associada a um alto risco (62%) para o desenvolvimento de FE e CR (**ZBAR et al. 1996; MAHER et al. 1996**).

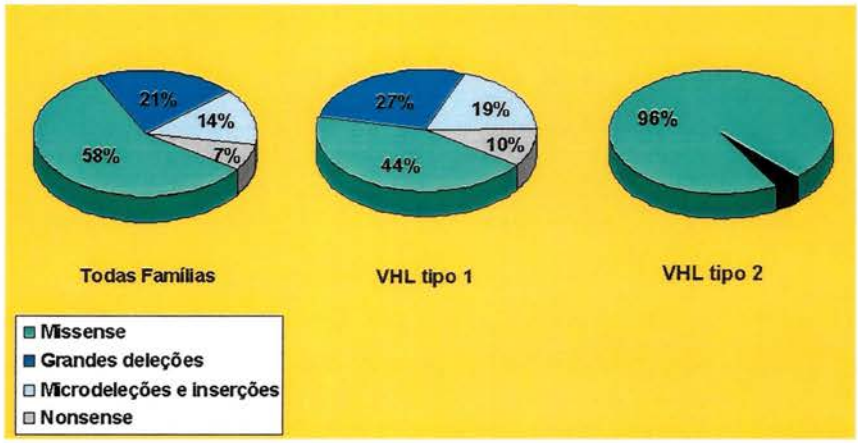


Figura 11 – Distribuição e freqüência das mutações encontradas nas famílias com VHL, considerando todas as famílias, e as famílias com VHL tipo 1 e VHL tipo 2 separadamente. Proporcionalmente, as famílias com VHL tipo 1 têm mais mutações que ocasionam um produto truncado, enquanto que as famílias com VHL tipo 2 têm na sua grande maioria mutações do tipo *missense*.

O estudo realizado no Japão mostra diferenças no padrão de mutações germinativas naquela população, com índice de detecção menor que a registrada nas populações ocidentais (73% das 77 famílias estudadas, sendo 66% no VHL tipo 1 e 93% no VHL tipo 2). Cerca de 49% das mutações pontuais encontradas nunca haviam sido detectadas em outras populações; várias mutações que eram conhecidas por causarem VHL tipo 1 foram identificadas em famílias com VHL tipo 2. (**YOSHIDA et al. 2000**).

HES et al. (2000) observaram que famílias com deleções parciais e completas do gene *VHL* além de um baixo risco de FE, exibem um fenótipo associado com uma preponderância de HB do SNC.

A análise de 44 pacientes com tumores neuroendócrinos pancreáticos associados a VHL mostrou que mutações *missense* são prevalentes neste grupo (58%). Quatro dos cinco pacientes com doença metastática tinham mutação no exon 3 do gene *VHL*, sugerindo que a análise de mutações pode definir um grupo de risco que se beneficiaria com intervenção cirúrgica precoce (**LIBUTTI et al. 1998**). **HAMMEL et al (2000)** em seu estudo sobre manifestações pancreáticas associadas ao VHL, relataram que os pacientes com lesões pancreáticas apresentavam menos FE, e

pacientes com tumores neuroendócrinos pancreáticos tinham menos envolvimento renal.

Diferenças em relação a penetrância da doença também têm sido observadas com algumas mutações específicas. O estudo de 125 indivíduos portadores da mutação 505T>C, causada por efeito fundador na região da Floresta Negra na Alemanha, revelou que esta mutação confere uma penetrância em idade mais avançada (48% aos 35 anos e 88% aos 70 anos) e que não aumentou a mortalidade dos portadores quando comparada à população geral (**BENDER et al. 2000**).

Recentemente, vem-se tentando correlacionar o fenótipo da doença com alterações estruturais e funcionais das pVHL mutantes. Ao revelar a estrutura do complexo VCB, **STEBBINS et al. (1999)** analisaram algumas mutações germinativas com o fenótipo das famílias. As mutações associadas ao VHL tipo 1 freqüentemente localizavam-se nos resíduos hidrofóbicos centrais do domínio β da pVHL e potencialmente levavam ao completo desmanche da estrutura da pVHL. Já a maioria das mutações em VHL tipo 2 eram situadas nos resíduos que entravam em contato com a Elongina C (como Leu158, Arg161) ou no putativo sítio secundário de ligação da pVHL (como Tyr98, Tyr112, Asp90, Gln96, Trp88), discutido anteriormente no item **1.6**. A maioria das mutações relacionadas ao tipo 2 foram associadas a pequenos danos locais na pVHL (mutações *missense*), sem afetar a conformação da pVHL e sua interação com a Elongina C. Estes dados suportam a teoria de que o VHL tipo 2 não está associado à mutações que causem perda total de função da pVHL e é consistente com a ausência de grandes deleções e inserções nestes casos. Especulações de que as mutações associadas ao VHL tipo 2 levariam a um ganho de função da pVHL mutante ou ainda teriam um efeito dominante negativo têm sido sugeridas. Partindo do princípio que a pVHL tem dois sítios de ligação protéicos, uma mutação em apenas um destes sítios seria capaz de seqüestrar elementos fundamentais destas vias (**STEBBINS et al. 1999**).

Um estudo recente demostrou que a proteína mutante L188V associada ao fenótipo 2C preserva a capacidade de regulação do HIF e mantém a habilidade de suprimir o crescimento de carcinoma renal *in vivo*, porém é deficiente em promover a montagem da matriz extracelular (**HOFFMAN et al. 2001**). Por outro lado, foi demonstrado que o resíduo Arg167 mutante mantém a habilidade de ligar-se à Elongina C.

Todos esses dados funcionais e estruturais mostram a complexidade da análise das mutações no gene *VHL* e o seu fenótipo resultante. O amplo entendimento da correlação genótipo fenótipo permitirá um maior conhecimento da doença em termos de acompanhamento clínico e de patogênese molecular.

1.9- Análise das mutações somáticas nos tumores esporádicos e associados a VHL

Mutações somáticas, perda de heterozigose (LOH) envolvendo o gene *VHL* são achados freqüentes nos HB do SNC, CR e em outros tumores esporádicos ou associados com VHL (45-90%), enquanto que eventos epigenéticos como metilação são raramente observados (0-19%) (**GNARRA et al. 1994; SCHUIN et al. 1994; HERMAN et al. 1994; CLIFFORD et al. 1998; WIZIGMANN-VOOS e PLATE 1996; VORTMEYER et al. 1997; LEE et al. 1998; MEYER et al. 2000**). Recentemente, a inativação somática do 2° alelo do gene *VHL* foi estudada nos tumores de pacientes com VHL que apresentavam grandes deleções germinativas. Todos os tumores estudados neste grupo de pacientes apresentavam retenção do 2° alelo e mutações pontuais no gene *VHL*, representando o 2° evento mutacional (**VORTMEYER et al. 2002**).

As mutações somáticas nos CR esporádicos tendem a concentrar-se no exon 1 (62%) e no exon 2 (23%), e apenas 15% ocorrem no exon 3. Uma alta freqüencia de mutações consistindo de transversões (61%) é observada nos CR esporádicos, sugerindo o papel de carcinógenos exógenos na etiologia destes tumores (**MEYER et al. 2000**). Um estudo experimental animal demonstrou a indução de transversões no gene *VHL* de ratos após exposição química à nitrosaminas, um importante carcinógeno da fumaça do cigarro (**SHIAO et al. 1998**). Um estudo alemão demonstrou que o espectro de mutações/metilação nos CR variou de acordo com a progressão dos tumores e que estava significativamente associada aos tumores mais avançados com estadio pT3. Em 12% dos casos o sítio de mutação envolvia uma região de *hot spot* com repetição de timidina (ATT.TTT) nos codons 147 e 148 do exon 2 do gene *VHL*.

Mutações somáticas nesta região foram associadas com estadio avançado (tumor pT3 pela classificação TNM) e pior prognóstico (**BRAUCH et al. 2000**).

A caracterização citogenética molecular de carcinomas renais de pacientes com VHL foi feita recentemente pelo Departamento de Urologia do NIH (**PHILLIPS et al. 2001**). Utilizando-se as técnicas *spectral karyotyping* (SKY), FISH e hibridação genômica comparativa (CGH) foi demonstrado que deleções do 3p25, ganhos cromossômicos 7 e 10 e isocromossomo 17q são achados comuns em VHL, tal como nos tumores renais esporádicos. Além disso, os tumores de baixo grau de malignidade associados ao VHL tendem a ser diplóides com t(2,15) (p22,q22), enquanto que tumores de alto grau revelam marcada aneuploidia e com translocações não recíprocas, incluindo der(10)t(9,10), der(19)t(13,19) e der(2)t(2,3).

As análises de alterações somáticas em FE associado a VHL e a forma esporádica demonstram que as vias genéticas envolvidas nestes dois grupos são claramente distintas. Embora mutações somáticas e metilação não sejam observadas nestes dois grupos, nos FE associados a VHL existe uma alta freqüência de LOH para marcadores 3p (91%), uma baixa freqüência de LOH para 1p (15%) e 22q (24%) e perda seletiva do cromossomo 11 detectada por CGH (94%). Em contraste, nos FE esporádicos não foi observada nenhuma alteração no gene VHL, acompanhada de uma alta freqüência de LOH em 1p (71%), moderada freqüência de LOH em 22q (53%) e apenas 13% de perda do cromossomo 11 por CGH (**BENDER et al. 2000; LUI et al. 2002**).

A predisposição para tumores neuroendócrinos pancreáticos tem sido descrita em associação às síndromes neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (MEN1) e VHL. Embora mutações no gene *MEN1* estejam presentes em cerca de 25% dos casos de tumores neuroendócrinos pancreáticos esporádicos, mutação no gene *VHL* tem sido raramente encontrada. No entanto, perda alélicas no 11q têm sido descritas em quase todos subtipos destes tumores, com menor freqüência nos tumores não funcionantes (**MOORE et al. 2001**).

1.10- Aconselhamento genético e rastreamento clínico

O aconselhamento genético foi definido pela Sociedade Americana de Genética Humana em 1975 como o "processo de comunicação que trata dos problemas humanos causados pela ocorrência ou pelo risco de ocorrência de uma doença genética na família" (**Genetic counseling – ASHG 1975**).

O aconselhamento do risco de câncer familial serve tanto para analisar os fatores de risco para o desenvolvimento dos tumores nos membros das famílias, bem como para informar as opções disponíveis para a prevenção e para o tratamento precoce das lesões. O aconselhamento genético familial é educativo no sentido que orienta os membros da família a compreenderem os aspectos clínicos e hereditários relativos à doença e a escolherem alternativas de ação preventivas e terapêuticas (**BROOKS 1998**). São discutidos aspectos epidemiológicos e genéticos da origem dos tumores e o espectro da apresentação clínica, diagnóstico e tratamento da doença (**PETERS e STOPFER 1996**). O aconselhamento também consiste na atuação direta do geneticista sobre os aspectos psicossociais do paciente visando a redução da ansiedade, adaptação à carga de estresse relacionada à doença, conforto no luto e ajuda na decisão sobre o teste genético.

Nos membros assintomáticos da família o enfoque principal é o preventivo. A identificação dos indivíduos de alto risco na família permite ao geneticista dirigir o programa de rastreamento clínico para estes indivíduos. O rastreamento clínico é um programa de prevenção e de detecção precoce das lesões recomendado à população de risco, com impacto positivo na redução da morbidade e na mortalidade da doença (**OFFIT 1997**). A estimativa do risco é baseada na análise do heredograma, após cuidadosa coleta da história familial. Sempre que possível é importante obter documentos que comprovem a ocorrência das lesões nos familiares afetados. Os indivíduos assintomáticos de 1° e 2° grau relacionados ao paciente têm um risco de 50% e 25% respectivamente de serem portadores da mutação germinativa no gene *VHL* e, portanto são considerados para avaliação molecular com o teste genético.

O teste positivo define a população de alto risco para a doença VHL que deve seguir um estreito acompanhamento em programa especial de rastreamento clínico. Familiares de 1° e 2° grau que aguardam o resultado do teste genético ou que não foram testados são considerados clinicamente como alto risco e também devem ser

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE BIBLIOTECA

incluídos no programa de rastreamento clínico regular. Mesmo os testes positivos não significam que o portador se tornará sintomático no futuro. Por isso é recomendado que indivíduos sob risco sejam encaminhados para aconselhamento genético com um geneticista clínico, antes mesmo do teste (**STATEMENT OF THE AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY 1996**).

Como a doença de VHL é multissistêmica, é recomendado que os pacientes e seus familiares de risco sejam acompanhados por uma equipe muldisciplinar constituída pelos profissionais médicos e de apoio das diversas especialidades relacionadas às manifestações clínicas da doença de VHL como, geneticista clínico, urologista, neurocirurgião, oftalmologista, endocrinologista, psicólogo, enfermeira, assistente social, nutricionista, entre outros. Logo que o diagnóstico de VHL seja suspeitado, o geneticista clínico deve ser consultado para coordenar os vários exames necessários para avaliar completamente o probando e também para identificar portadores assintomáticos entre seus familiares (**GLENN et al. 1990; MARTZ 1991**). **CHOYKE et al. (1995)** comparam a atuação do geneticista como a de um "maestro de uma sinfonia médica que inclui várias especialidades". Sem este coordenador, o seguimento do paciente pode torna-se irregular, e graves inadvertências podem ocorrer.

Teste	NIH	CAMBRIDGE, U.K	HAWAII
Catecolaminas urinárias	A partir de 2 anos, a cada 1-2 anos	anualmente	No mínimo uma vez ou se PA elevada
Oftalmoscopia	A partir da infância, anualmente	A partir de 5 anos, anualmente	A partir de 6 anos, anualmente
Angiografia fluoresceínica	Não é rotina	Rotina a partir de 10 anos. anualmente	Não é rotina
RM cerebral e espinhal	A partir de 11 anos, a cada 2 anos;* Após 60 anos, a cada 3-5 anos	A partir da adolescência, a cada 3 anos até 50 anos, depois a cada 5 anos	Iniciar após 20 anos, no mínimo a cada 10 anos
TC ou ultrassonografia abdominal	A partir de 11 anos, US anualmente A partir de 20 anos, TC anualmente** ou a cada 2 anos (US complementar aos achados de TC TC)	A partir da adolescência, US anual, TC a cada 3 anos	Iniciar com 15-20 anos, repetir US a cada ano

Tabela 1 – Programa de rastreamento clínico recomendado pelo National Institute of Health (NIH), pela Universidade de Cambridge (Cambridge, UK) e pelo consenso durante o 2º Simpósio Internacional de VHL ocorrido no Havaí (Hawaii).
* Exame do ouvido médio para sintomas de perda de audição, tinido ou vertigem.
** Após 60 anos e sem evidência de VHL, TC pode ser feita a cada 2 anos

Os exames recomendados para o rastreamento clínico de indivíduos de alto risco foram estabelecidos no 2° Simpósio Internacional de VHL ocorrido em Honolulu - Havaí em 1996 e são detalhados abaixo na **Tabela 1**. Incluem a realização de tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM) de crânio e da coluna; ultra-sonografia (US) ou TC de abdome; exame oftalmológico com fundoscopia, dosagem de catecolaminas e ácido vanil mandélico (VMA) urinários; exame clínico com atenção especial ao exame neurológico e do epidídimo. Na presença de zumbido, tinido ou diminuição da acuidade auditiva, a RM do ouvido médio é indicada para investigação de tumor do saco endolinfático (**MANSKI et al. 1997**). Vários centros especializados vêm desenvolvendo seus próprios programas de rastreamento, como o do National Institute of Health (NIH) (**CHOYKE et al. 1995**) e da Universidade de Cambridge, na Inglaterra (**MAHER et al. 1990**). Todos estes protocolos têm em comum a necessidade de exames periódicos durante toda a vida do paciente.

1.11- Aspectos psicológicos resultantes do teste genético

O impacto psicológico da doença de VHL nos pacientes e nas famílias é ha muito conhecido e pode ser devastador. Negação, ansiedade, culpa, isolamento, superproteção e distúrbios de personalidade podem ser observados. Resultam da adaptação ao grave estresse crônico imposto aos indivíduos e às famílias com VHL. Com cuidados médicos e psicológicos adequados e precoces, muitas destas reações podem ser evitadas ou amenizadas (**LANGSLEY et al. 1964**).

O teste genético pode ocasionar profundo impacto emocional e psicológico nos pacientes jovens, particularmente as crianças mais velhas e os adolescentes. Esta reação pode ser complicada pela atitude dos pais e dos familiares e pelo grau de maturidade psicológica, emocional e cognitiva da criança. A criança de alto risco pode somatizar sintomas da doença mesmo sem qualquer evidência clínica de lesões, chamado de "síndrome da criança vulnerável". Pode haver ciúmes por parte dos irmãos quando percebem que a criança afetada recebe mais atenção dos pais. Por outro lado, os membros não afetados da família podem sofrer com a chamada "culpa

do sobrevivente" ao perceberem que o familiar afetado pode vir a desenvolver ou mesmo morrer da doença (**NICHOLS et al. 1998**).

Os benefícios trazidos pelo teste genético parecem superar os riscos envolvidos. O conhecimento da susceptibilidade à doença ajuda no planejamento futuro e acaba com a incerteza de ser ou não portador de mutação. Em geral, o conhecimento da alteração genética é melhor do que não saber (**REISER e SCHAEFFER 1996**).

Ocasionalmente, psicoterapia de apoio ou mesmo auxílio psiquiátrico são necessários e estão indicados em qualquer das seguintes situações: incapacidade de tomar decisões clínicas, depressão, culpa ou ansiedade em vários níveis, luto prolongado, ideação suicida ou obsessiva, excesso de zelo com a saúde, distúrbios do sono e do apetite, somatização, disfunção sexual ou da libido (**PETERS e STOPFER 1996**).

2- JUSTIFICATIVA

A doença VHL é uma doença multissistêmica, envolvendo a participação de diversas especialidades médicas, como oncologia clínica, genética, oftalmologia, neurologia e neurocirurgia, endocrinologia, urologia, radiologia entre outras, associadas ao laboratório de genética. O acompanhamento ideal do paciente afetado requer, portanto uma abordagem multidisciplinar, inclusive com acompanhamento psicológico, de acordo com as necessidades do paciente.

O diagnóstico molecular da doença VHL é realizado nos países da Europa, Estados Unidos e Ásia nos indivíduos com critérios diagnósticos clínicos bem definidos, bem como nos casos familiares de tumores relacionados à síndrome. O teste genético é de significado clínico especial para os pacientes com manifestações clínicas da síndrome de VHL e ausência de história familial. Desta forma é possível confirmar casos *de novo* da doença VHL.

Mais recentemente, mutações germinativas nos casos esporádicos de tumores relacionados à síndrome VHL vêm sendo descritas, principalmente quando de ocorrência em idade jovem, múltiplos ou bilaterais. A realização do teste permite que sejam rastreados pacientes portadores de VHL no grupo de pacientes com tumores aparentemente esporádicos. É possível que futuramente possam ser estabelecidos critérios baseados no risco para VHL neste grupo de pacientes.

A caracterização da mutação no gene VHL proporciona tanto nos indivíduos doentes quanto nos assintomáticos a determinação do risco para um determinado fenótipo e, portanto permite definir o acompanhamento clínico mais apropriado para estes indivíduos. Contribui para um maior entendimento dos mecanismos fundamentais da doença de VHL e de sua variabilidade fenotípica.

Entretanto, no nosso meio, tal como em toda América Latina, o diagnóstico molecular ainda não havia sido realizado. Este estudo visou detectar e caracterizar as mutações do gene VHL, permitindo a confirmação de casos da doença nos indivíduos sintomáticos com ou sem história familial, além de avaliar alguns grupos de pacientes com tumores aparentemente esporádicos quanto a prevalência da doença VHL.

Os objetivos do projeto foram ampliados aos familiares do paciente com VHL e foi incluído o suporte clínico e psicológico com o aconselhamento genético das famílias afetadas. O rastreamento genético e clínico de famílias com predisposição ao câncer

podem beneficiar seus membros com a detecção precoce e tratamento adequado dos tumores. Aos pacientes e familiares incluídos no estudo foram oferecidos suporte clínico, psicológico e exames complementares necessários disponíveis na estrutura do Hospital do Câncer A.C. Camargo, em São Paulo. Apesar do estudo ter se concentrado principalmente na cidade de São Paulo outros pólos nacionais foram alcançados, permitindo a caracterização clínica e molecular de famílias brasileiras. Também foram analisados neste estudo duas famílias provenientes do Chile e de Portugal e uma paciente Argentina.

3- OBJETIVOS

Objetivo primário

- Detectar através do seqüenciamento direto e de *Southern-blot* quantitativo a presença de mutações germinativas no gene VHL nos pacientes portadores da doença de von Hippel-Lindau e familiares de risco.
- Caracterizar as mutações encontradas nas famílias estudadas, correlacionando o genótipo com o fenótipo apresentado.
- Analisar a prevalência de mutação germinativa no gene *VHL* nos pacientes com tumores aparentemente esporádicos: hemangioblastoma de sistema nervoso central, angioma de retina, FE com cistos de epidídimo, carcinoma renal de células claras multicêntrico.

Objetivo secundário

- Oferecer aconselhamento genético e suporte com rastreamento clínico para a doença de von Hippel-Lindau aos portadores da mutação e demais familiares do paciente considerados de risco.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE BIBLIOTECA

4- PACIENTES E MÉTODOS

4.1- Seleção de pacientes e coleta de dados clínicos

Critérios de Inclusão: Foram analisados pacientes que preenchiam os critérios mínimos para o diagnóstico clínico da doença de VHL; pacientes suspeitos de VHL com critérios clínicos insuficientes; e pacientes com tumores aparentemente esporádicos com os seguintes diagnósticos: hemangioblastoma de sistema nervoso central esporádico, angioma de retina esporádico, FE esporádico com cistos de epidídimo, e carcinoma renal de células claras multicêntrico.

Os heredogramas das famílias foram construídos com os dados fornecidos por familiares e, sempre que possível, eram solicitados atestados e laudos que comprovassem as enfermidades relatadas.

Foram incluídos 20 famílias com diagnóstico clínico de VHL originárias de várias localizações geográficas brasileiras, duas famílias com suspeita de VHL, oito pacientes com tumores aparentemente esporádicos e dois de seus familiares, somando um total de 100 indivíduos estudados (**Anexo 3**). Visando manter a confidencialidade dos indivíduos testados cada indivíduo recebeu um código próprio de identificação. Cada família com diagnóstico ou suspeita de VHL foi identificada pelo código "VH" seguido do número correspondente a ordem de entrada no estudo, p.e, família VH16, correspondente a família VHL de número 16. Os membros de cada família foram identificados pelo código da família seguido por uma letra alfabética em ordem crescente de entrada no estudo; p.e, VH16A e VH16B, relativo à família com VHL de número 16, indivíduos A e B. Os pacientes com tumores aparentemente esporádicos foram identificados pelas letras iniciais correspondentes ao quadro clínico, seguida do número de ordem de entrada no estudo. Na inclusão de outros membros da família, cada membro testado recebeu uma letra alfabética correspondente; p.e, HB1A e HB1B, relativo à família com HB aparentemente esporádico de número 1, sendo A correspondente ao probando e B ao familiar.

Familiares assintomáticos relacionados com risco clínico estimado de 50% (parentes de 1° grau) e de 25% (parentes de 2° grau) foram incluídos no programa de aconselhamento genético e o teste genético foi oferecido após a identificação de

mutação no probando. Tendo em vista que a mutação germinativa patogênica é a mesma entre todos os membros de uma única família, apenas a mutação da família foi testada nos familiares assintomáticos. Sempre que possível a presença de mutação era confirmada em outros indivíduos afetados da família, desde que houvesse parentes vivos disponíveis para a coleta de sangue. No caso do teste preditivo, os parentes em 1° grau eram testados inicialmente sempre que possível, e somente no caso de teste positivo eram testados seus descendentes.

Critério diagnóstico clínico da doença de VHL: Na presença de história familial de VHL, o diagnóstico clínico foi feito pela identificação de uma única lesão característica da síndrome, como HB (cerebelar, cerebral ou espinhal), AR, tumores renais, FE, cistos pancreáticos múltiplos, ou cistoadenoma de epidídimo. Na ausência de história familial, o diagnóstico de VHL foi considerado suficiente na presença de no mínimo dois HB ou AR; um HB ou AR associado com pelo menos uma lesão visceral característica. Outras manifestações da doença, como cistos renais ou de epidídimo, não foram consideradas já que são de ocorrência freqüente na população geral e, portanto não são marcadores relevantes para o diagnóstico de VHL.

Busca de casos: A identificação de pacientes portadores de VHL foi feita através de busca direta por contato com Instituições e Hospitais, entre eles, o Hospital do Câncer (Hospital AC Camargo); o Hospital das Clínicas da USP, São Paulo; o Departamento de Genética Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP; o Hospital São Paulo da Escola Paulista de Medicina (Universidade Federal de São Paulo). A apresentação do projeto e dos seus resultados em aulas didáticas sobre "Câncer Hereditário" e em congressos científicos contribuiu também para a divulgação do projeto e obtenção de casos novos.

Aconselhamento genético e rastreamento clínico: Todos os indivíduos incluídos no estudo receberam o aconselhamento genético pré e pós-teste no Depto. de Oncogenética do Hospital do Câncer ou em centros de genética de referência de sua região. O teste genético, dentro de um contexto de aconselhamento genético, foi apresentado como uma ferramenta diagnóstica auxiliando nas condutas e no prognóstico da doença. Foi procedido o aconselhamento pré-teste em todos os participantes que consentiram a realização do teste molecular para detecção de

mutação germinativa no gene VHL . Os familiares dos pacientes foram avaliados quanto ao risco de desenvolverem a doença e o aconselhamento genético foi oferecido a fim de informar a magnitude do risco de câncer e de outros tumores, bem como discutir as opções de prevenção e de tratamento destas lesões. Aspectos críticos para o aconselhamento genético foram respeitados, como: (1) a importância do aconselhamento pré e pós-teste; (2) a confidencialidade; (3) a necessidade de aconselhamento individualizado para cada família; (4) considerar o impacto psicológico e social do teste genético.

O programa de rastreamento clínico foi oferecido para todos os indivíduos chamados de "alto risco". Os indivíduos considerados de alto risco foram definidos como:

- Pacientes com alguma manifestação de VHL, que mantém risco de novas lesões ou recidivas.
- Parentes em primeiro grau de paciente com VHL, incluindo irmãos, filhos, pai ou mãe nas seguintes condições: quando houver recusa ou impossibilidade da realização do teste molecular; quando o resultado do teste ainda não estiver disponível; ou em caso de mutação não detectada na família.
- Portadores de mutação deletéria no gene *VHL* detectada através de teste molecular, com ou sem manifestações clínicas.
- Entre os parentes de segundo grau, apenas os filhos de parentes de 1° grau são considerados de alto risco.

Os exames clínicos e radiológicos para rastreamento de lesões associadas à doença de VHL, bem como a periodicidade em que devem ser realizados, seguem as recomendações estabelecidas no Simpósio de VHL ocorrido no Hawaii em 1996 e foram detalhados na introdução na **Tabela 1**.

Foram considerados como de "baixo risco" todos os indivíduos submetidos à pesquisa molecular em que se confirmou a ausência da mutação deletéria da família a que pertencem.

Ficha de registro de dados clínicos e familiares (**Anexo 1**): Todos os dados relevantes ao estudo foram coletados através de ficha própria (Ficha de Avaliação Clínica) contendo a identificação do paciente, dados clínicos, história familial detalhada e sempre que possível o heredograma da família, para posterior análise e correlação com outros objetos da pesquisa.

Consentimento pós-informado (**Anexo 2**): Todos os pacientes que preencheram os critérios de inclusão e concordaram com a realização do teste genético de DNA , após esclarecimento dos objetivos deste estudo, consentiram formalmente a coleta de sangue para utilização do mesmo em estudo genético-molecular.

Registro dos resultados obtidos em banco de dados: Todos os dados coletados foram registrados em planilhas informatizadas para posterior análise.

4.2- Material Biológico

Coleta de sangue: amostras de 5 a 10mL de sangue periférico dos indivíduos estudados foram colhidas de maneira convencional em tubos de ensaio contendo EDTA. No caso de amostras provenientes de outros estados do Brasil ou do exterior, o material foi transportado refrigerado através de empresas transportadoras privadas, de modo que o intervalo entre a coleta e a extração do DNA fosse de no máximo cinco dias.

Recebimento das amostras: As amostras recebidas no Instituto Ludwig e no Hospital A.C. Camargo ficaram disponíveis para extração do DNA até o prazo limite de 5 dias a partir da coleta, desde que devidamente conservado sob refrigeração em geladeira.

4.3- Extração do DNA de células mononucleares do sangue periférico

Inicialmente foi separado o precipitado linfocitário (*pellet*) das amostras de sangue dos indivíduos. Para tanto, o sangue foi homogeneizado e transferido para tubos de 50mL. Foi adicionado o mesmo volume (1:1) de solução PBS 1X pH 7,4 (123mM NaCl; 2,7mM KCl; 4,3mM Na2HPO4; 1,4mM K2HPO4). Cuidadosamente foi acrescido Ficoll-Hypaque sem misturar à amostra. Colocou-se 20mL de uma solução de Ficoll-Hypaque em um tubo Falcon de 50mL e acrescentou-se o sangue diluído lentamente pela parede do tubo. Após centrifugação por 30 minutos, a 1200rpm, numa temperatura de 23°C, a fase correspondente ao halo linfocitário foi aspirada com pipeta

Pasteur esterilizada e transferida para um tubo de 15mL. Duas lavagens com 10mL de solução PBS 1X foram realizadas, consistindo de centrifugação a 2000rpm por 15 minutos, descarte do sobrenadante e ressuspensão do *pellet* precipitado. Uma última centrifugação foi feita em um tubo de microcentrífuga (Eppendorf) 1,5mL e o *pellet* foi congelado a -70°C até a etapa seguinte de digestão enzimática.

Na etapa de digestão, o *pellet* linfocitário foi descongelado e ressuspendido em 2,0mL de TES pH 8,0 (TrisHCl 10mM pH 8,0; SDS 0,5%; EDTA 5mM pH 8,0) e transferido para um tubo de 15mL. Cerca de 10μL de proteinase K (20mg/μL) foi adicionado à solução e o tubo de 15mL foi incubado em banho mantido a 37°C durante 24 horas.

A extração do DNA foi feita pelo método de Fenol-clorofórmio. Nesta etapa, 2mL de fenol pH 8,0 foram acrescidos ao tubo de 15mL e agitados por 5 minutos no agitador automático. O material foi centrifugado durante 15 minutos a 4°C a 3000rpm. A fase aquosa foi transferida para outro tubo de 12mL e a extração do DNA com clorofórmio foi procedida duas vezes e consta da adição de 2mL de clorofórmio-alcool isoamílico seguida de agitação durante 5 minutos, centrifugação por 10 minutos e recuperação da fase aquosa. Foram acrescentados em um tubo *Corex* 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 2,5X o volume de etanol absoluto gelado. A solução foi incubada durante 30 minutos à -70°C ou durante 24horas à -20°C. Em seguida, o tubo *Corex* foi centrifugado por 30 minutos a 15.000rpm. O etanol foi desprezado, o DNA precipitado foi lavado com álcool 70% e seco na estufa durante aproximadamente 15 minutos. O DNA foi então ressuspendido com 200μL de TE, transferido para tubo de 1,5mL (Eppendorf) e conservado no freezer a -20°C. Antes da sua utilização, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro em 260 e 280nm, aliquotado e diluído para as reações de PCR e de *Southern-blot*.

4.4- Amplificação dos exons 1, 2 e 3 do gene VHL por PCR

A amplificação dos exons 1, 2 e 3 do gene *VHL* foi procedida em um ciclador térmico isoladamente com temperaturas de desnaturação de 95°C por um minuto, de anelamento específica para cada par de iniciadores por um minuto e de extensão à 72°C por um minuto, repetidas em 35 ciclos. Inicialmente foram desenhados iniciadores *sense* (S) e *anti-sense* (A) para cada um dos exons do gene *VHL*. Outros

iniciadores também foram desenhados visando uma maior reprodutibilidade das amplificações e seqüências.

Os iniciadores usados tanto para PCR e seqüenciamento e seus respectivos TMs são:

EXON	INICIADORES		TM (°C)
exon 1(NT 300-553)	1S	CCA TCC TCT ACC GAG CGC GCG	72
	1A	GGG CTT CAG ACC GTG CTA TCG	68
	1Z	ACT GGG ACG AGG CCG AGG T	74
exon 2(NT 554-676)	2S	TGC CCA GCC ACC GGT GTG	62
	2A	GTC TAT CCT GTA CTT ACC ACA ACA	68
exon 3(NT 693-855)	3S	CGT TCC TTG TAC TGA GAC CCT	64
	3A	ACT CAT CAG TAC CAT CAA AAG CTG	68
	3F	CAC ACT GCC ACA TAC ATG CAC TC	70

Exon 1 – Para a PCR do exon 1 foram utilizados inicialmente os iniciadores 1S e 1A, gerando um produto de 522pb, porém os resultados não foram reprodutíveis em mais da metade das amostras testadas utilizando-se enzima TAQ DNA polimerase (Gibco-BRL). Com a descrição da raridade de mutações germinativas nos primeiros 53 códons do gene *VHL* (**STOLLE et al. 1998**) foi desenhado um novo iniciador *sense* 1Z. Assim, uma nova reação de PCR foi padronizada utilizando-se os iniciadores 1Z e 1A, gerando um produto de 378pb e de excelente reprodutibilidade com a enzima TAQ DNA polimerase . A reação foi padronizada nas seguintes condições: 0,4μM de cada iniciador; 0,2mM dNTPs; 1,5mM MgCl2; tampão 1X; TAQ polimerase 1U; 50ng de DNA da amostra; volume final de 25μL. A temperatura de anelamento das reações de PCR foi de 69°C.

Exon 2 – A amplificação do exon 2 com os iniciadores 2S e 2A gera um produto de 232pb e foi padronizada facilmente: 0,4μM de cada iniciador; 0,2mM dNTPs; 1,5mM MgCl2; tampão 1X; TAQ polimerase 1U; 50ng de DNA da amostra; volume final de 25μL. A temperatura de anelamento da reação foi de 59°C.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE BIBLIOTECA

Exon 3 – Não foi conseguido a padronização com os iniciadores 3S e 3A. Porém, com o uso do iniciador 3F foi possível gerar um produto amplificado de 383pb: 0,4μM de cada iniciador; 0,2mM dNTPs; 3,0mM MgCl2; tampão 1X; TAQ polimerase 1U (Gibco-BRL); 50ng de DNA da amostra; volume final de 25μL. A temperatura de anelamento da reação foi de 59°C.

Após amplificação, os produtos correspondentes aos exons 1, 2 e 3 foram separados em gel de poliacrilamida à 8% e corados com solução de nitrato de prata para identificação dos fragmentos.

4.5- Seqüenciamento direto

Os fragmentos de PCR amplificados foram seqüenciados no seqüenciador semi-automático ABI377 (Applied Biosystems) através da utilização do kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) seguindo especificações do fornecedor. Nas reações de seqüência foram usados os iniciadores 1Z, 1A, 2S, 2A, 3S e 3A, produzindo seqüências de ótima qualidade. O iniciador 3S funciona como um iniciador interno (*nested*) do fragmento amplificado do exon 3 e produz seqüências de melhor qualidade que o iniciador 3F. As reações de sequenciamento dos produtos de PCR correspondendo aos exons 2 e 3 foram padronizadas com os seguintes passos: desnaturação à 96°C por 30 segundos; anelamento à 55°C por 15 segundos; e extensão à 60°C por quatro minutos, em 25 ciclos. A padronização para o sequenciamento do exon 1 foi padronizada nas seguintes condições: desnaturação à 96°C por 30 segundos; anelamento à 60°C por 15 segundos; e extensão à 60°C por quatro minutos, em 25 ciclos.

Uma vez obtida a seqüência de boa qualidade, os iniciadores eram localizados, era o início e o fim da região codificante do fragmento amplificado assinalado com destaque nas regiões dos bordos dos exons (regiões de *splicing*). Para a detecção de mutação, as seqüências foram analisadas manualmente comparado-se os eletroferogramas obtidos com seqüências controles do gene *VHL* de um indivíduo normal e homólogas às depositada no GenBank sob o número de acesso L15409. Todas as alterações encontradas eram confirmadas no sentido *senso* e *anti-senso*.

4.6- Análise por Southern-blot quantitativo

A padronização da técnica de *Southern-blot* para detecção de grandes deleções no gene *VHL* foi iniciada logo ao recebimento da sonda g7 utilizada na literatura (**STOLLE et al. 1998**) e cedida pela Dra. Alessandra Murgia (Universidade de Pádua – Itália), correspondendo ao fragmento do gene *VHL* clonado em 1993 e depositada no GenBank sob o número de acesso L15409. O uso da sonda g7 foi autorizado pelo Dr. Berton Zbar (National Cancer Institute) que clonou o gene VHL pela primeira vez em 1993 (**LATIF et al. 1993**).

4.6.1- Digestão do DNA e transferência por Southern-blot

Após a extração e quantificação, uma alíquota de 100ng de DNA de cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0,5μg/mL de brometo de etídeo para avaliação da integridade física do DNA analisado. 5μg de DNA de cada amostra foram incubadas com 20 unidades de *Eco*RI e *Ase* I (Biolabs) à 37°C por 16 horas e submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,9% (p/v) (GIBCO-BRL, EUA) em TBE 1X, acrescido de 0,5μg/mL de brometo de etídeo sob voltagem de 25v durante um período de aproximadamente 24 horas. Após eletroforese, o gel sofreu uma desnaturação em 1,5M de NaCl + 0,5M de NaOH por 45 minutos e foi neutralizado duas vezes em 1,5M de NaCl + 0,5M de Tris pH 7,5 por 30 minutos. Os fragmentos de restrição separados por eletroforese foram transferidos para a membrana de Nylon (Hybond^{TM}-N, Amershan) através da técnica de *Southern-blot*. O DNA foi fixado à membrana através de um *crosslinking* com UV. As membranas foram embaladas e conservadas sob refrigeração até a hibridação.

4.6.2- Hibridação e lavagem da membrana

Foram utilizados como sondas os fragmentos clonados g7 e β-globina cedidos pela Dra. Alessandra Murgia (Universidade de Pádua – Itália). Após purificação e quantificação, 10ng do fragmento g7 e de β-globina foram marcados por *random*

priming com o kit *Randon Primers DNA Labeling System* (GIBCO BRL), conforme especificações do fabricante.

As membranas contendo os DNAs foram incubadas na solução de hibridação segundo **CHURCH e GILBERT (1994)** (50% 0,5M Na_2HPO_4, 7% SDS, 1% BSA e 1 mM EDTA) por 10 minutos a 65°C no incubador para hibridação (Robbins Scientific – modelo 400 – EUA). Foram incubados 125μL de solução por cm^2 de membrana. As membranas foram então hibridadas separadamente com as sondas radioativas, após desnaturação prévia à 95°C, no forno de hibridação à 65°C. Em seguida as membrana foram lavadas duas vezes em solução de lavagem I (50% 0,5M Na_2HPO_4, 7% SDS e 1 mM EDTA) sob agitação constante por 30 minutos a 65°C. Após, foi feita a exposição contra filmes de Raio X (BRAF QA-S, Kodac, Brasil) a -70°C. O sinal da hibridação foi detectado por meio de auto-radiografia.

4.6.3- Detecção de deleções e análise quantitativa do Southern-blot

A sonda g7 identifica uma banda de 22kb após digestão do DNA genômico com a endonuclease de restrição *Eco R1*; e de 9,7kb após a dupla digestão com as endonucleases *Eco R1* e *Ase I*. Na presença de rearranjo alélico germinativo podem ser observadas duas bandas, uma correspondente ao alelo do gene VHL selvagem e a outra ao alelo com grande deleção ou inserção.

A análise quantitativa das bandas obtidas pela técnica de *Southern-blot* foi conseguida através da co-hibridação das membranas com a sonda da β-globina, que por ser um gene de cópia única, possibilita a comparação entre a intensidade das bandas obtidas pelas duas sondas. A relação entre a intensidade das bandas da β-globina e de g7 permite o diagnóstico molecular de deleção completa de um alelo do gene VHL (**STOLLE et al. 1998**).

4.7- Estudo citogenético por Hibridação in situ Fluorescente (FISH)

O estudo citogenético foi realizado em linfócitos de sangue periférico dos probandos afetados por VHL suspeitos de portarem deleção completa ou parcial

constitutiva no gene *VHL*. As amostras utilizadas para padronização foram amostras de indivíduos normais e posteriormente foram realizadas nas amostras de indivíduos de duas famílias com grandes deleções detectadas pelo *Southern-blot* (VH3 e VH13).

As reações de hibridação foram padronizadas no Laboratório de Citogenética Molecular do Departamento de Urologia do NIH, sob supervisão do Dr. Thomas Ried e do Dr. John Phillips no período de 15 de Setembro a 6 de Outubro de 2001. As sondas utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Dr. John Phillips para reprodução dos experimentos no Brasil.

4.7.1- Cultura de linfócitos e preparo das lâminas

A cada 4,5 ml de meio RPMI contendo 20% de soro fetal bovino e 1% de fitohemaglutinina, foi adicionado 0,5 ml de plasma rico em linfócitos. Após 72 horas de incubação a 37°C, foi adicionado a cada frasco de cultura 50 μl de solução $4x10^{-5}$ M de colchicina por 20 minutos. A solução de cultura foi centrifugada a 1000rpm para precipitação dos linfócitos. Para a hipotonização, uma solução 0,075 M de KCl aquecida a 37°C foi utilizada para ressuspender o *pellet* linfocitário, mantida por 12 minutos de incubação a 37°. Para a fixação foi utilizado álcool metílico:ácido acético, na proporção 3:1. Inicialmente algumas gotas da solução fixadora foram adicionadas à solução hipotônica contendo os linfócitos e após centrifugação o *pellet* linfocitário foi ressuspendido em solução fixadora apenas. As lâminas para a etapa seguinte foram preparadas pingando-se a solução de linfócitos fixados na mesma. As lâminas foram "envelhecidas" por três dias a 4°C e estocadas a –20°C até sua utilização.

4.7.2- Pre-tratamento das lâminas para a hibridação

As lâminas utilizadas para FISH foram pré-tratadas com RNAse (Boehringer®) 1:200, por uma hora a 37°C. As preparações metafásicas foram tratadas com solução de Pepsina e fixadas com solução de Formaldeído 1%/ 1xPBS/1M MgCl2. As lâminas foram lavadas com três banhos de três minutos de 2xSSC à temperatura ambiente, desidratadas em uma série de banhos de etanol (50%, 75% e 100%) à temperatura ambiente e depois secas ao ar. Em seguida, a área de hibridação foi selecionada e delimitada ao microscópio.

Imediatamente antes da hibridação, os cromossomos foram desnaturadas em 100μL de 70% Formamida/2x SSC a 78°C em banho seco por três minutos, desidratados em série de etanol gelado e as lâminas foram secas ao ar.

4.7.3- Marcação das sondas

As sondas específicas para a região 3p25 utilizadas contêm o gene *VHL* e as regiões adjacentes 5'e 3' do gene. Os fragmentos genômicos utilizados como sonda foram comercialmente clonados em vetores (GeneQuest®) (**Figura 12**) e são especificados a seguir:

- **cos 3**: contém a região 3' do gene *VHL* e a região 3' adjacente.
- **cos 31**: contém parte distal de cos 3 e região adjacente.
- **g7**: corresponde ao cDNA do gene *VHL*.
- **cos 11**: contém grande parte da região 5' de g7, região g6 e região adjacente distal.
- **p1-191**: contém cos 11 e região adjacente distal.

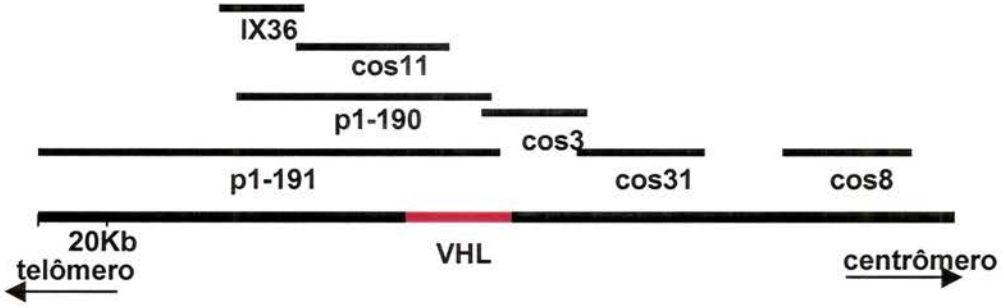


Figura 12 – Posicionamento genômico do gene *VHL* na região 3p25 e fragmentos genômicos utilizados como sonda para a técnica de FISH

Foram utilizadas as seguintes sondas para a região centromérica do cromossomo 3: a sonda p3α5, não marcada, gentilmente cedida pela Dra. Otávia Caballero; e a sonda comercial *Spectrum Orange 3* (GeneQuest®), já marcada. As

sondas contendo seqüência alfóide centromérica para o cromossomo 3 e a sonda para o gene *VHL* foram distintamente marcadas por *Nick Translation* com digoxigenina 11-dUTP (Boehringer Manheim), ou biotina 11-dUTP (Sigma). Aproximadamente 200ng da sonda escolhida foi marcada com biotina ou digoxigenina e digeridas em uma única reação contendo Bio-16-dUTP ou Dig-11-dUTP (1mM), dNTP (0,5mM de dATP, dCTP e dGTP; 0,05mM dTTP), DNAse 1:10.000 (Boehringer Mannheim®), DNA Polimerase (Kornberg®), tampão NT, e 0,1M β-Mercaptoetanol; à 15°C por aproximadamente uma hora, de forma a obter-se fragmentos entre 500 700pb. Um gel de agarose 1% foi utilizado para averiguar o tamanho dos fragmentos.

4.7.4- Hibridação in situ

Para a hibridação *in situ* fluorescente foi empregada uma das sondas de DNA centromérico do cromossomo 3 combinada com uma das sondas para a região 3p25. Após a marcação, as sondas foram precipitadas com Acetato de sódio e etanol, juntamente com 50μL de *Human Cot-1 TM DNA* 1mg/ml (GIBCO BRL®) e 10μL de DNA de esperma de salmão 10mg/ml (SIGMA®). O *pellet* seco foi então ressuspendido no meio de hibridação contendo 6μL de Formamida deionizada 70% (pH 7,5) e 6μL de *Master Mix* (solução 10% Dextran sulfato/2xSSC), para a hibridação.

As sondas, ressuspendidas nesse meio de hibridação (de 0,5 a 2 ng/μl para a sonda alfóide e 50 a 100ng/μl para g7), foram desnaturadas por dez minutos a 74°C e aplicadas em cada área de hibridação (18x18mm). A hibridação foi realizada sob lamínula em câmara úmida a 37°C por 16 a 24 horas.

A lavagem pós-hibridação consistiu de três banhos de quatro minutos, dois de 50% formamida/2xSSC e outros dois de 2xSSC, todos a 37°C. Antes da imunodetecção, as lâminas foram incubadas em PBS modificado (PBS contendo 0,1% Tween 20 e 10% superblock-buffer). A avidina conjugada ao fluorocromo FITC (1:25 - 40 μg/ml - Sigma) e o anticorpo antidigoxigenina conjugado ao fluorocromo rodamina TRITC (1:200 - 15 μg/ml - Boehringer Manheim) foram diluídos nesse PBS. A imunocoloração foi realizada em câmara úmida durante uma hora a 37°C. As lâminas foram coradas com uma solução de DAPI (0,8 ng/μl) em Vectashield Mounting Medium (Vector). Para a análise, foi utilizado um microscópio de fluorescência (Leica®) com

lâmpada de 100 W, equipado com filtros para FITC, rodamina TRITC, DAPI e uma câmara CCD (Cooled charge – coupled device). As preparações cromossômicas foram fotografadas digitalmente.

4.8- Estudo das mutações novas e variantes na população brasileira

Amostras de DNA de 60 a 86 indivíduos normais da população brasileira do "Banco de Normais" do Laboratório de Genética do Câncer foram avaliadas para a detecção da freqüência alélica das variações de seqüência polimórficas conhecidas e as variações de seqüência novas detectadas no estudo. Para isso, as reações de PCR para os 3 exons do gene *VHL* e de seqüenciamento direto foram realizadas em placas de 96 *wells* nas mesmas condições já descritas nos itens **4.4** e **4.5**. O seqüenciamento foi feito no seqüenciador automático MegaBace, nas mesmas condições já descritas. Após identificação da alteração de seqüência, a mesma foi confirmada com novo seqüenciamento no seqüenciador ABI 377.

4.9- Avaliação dos familiares assintomáticos e o teste preditivo

Os objetivos do projeto foram ampliados aos familiares do paciente com VHL. Da mesma forma que os probandos, todos os familiares incluídos no estudo foram avaliados nos respectivos centros de genética e os dados clínicos foram coletados da Ficha de Avaliação Clínica (**Anexo 1**). Aos familiares incluídos no estudo foi oferecido suporte clínico, psicológico e exames complementares necessários disponíveis na estrutura do Hospital do Câncer A.C. Camargo, em São Paulo, ou nos centros de genética de referência. Os familiares foram esclarecidos quanto à doença presente na família, aos aspectos genéticos, sociais e psicológicos, dentro de um processo de aconselhamento genético. Aos familiares assintomáticos considerados como alto risco, o teste preditivo foi oferecido como um meio de definição quanto o seu estado de

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE BIBLIOTECA

portador ou não da mutação deletéria identificada na família. Após o entendimento dos objetivos do estudo e da assinatura do consentimento informado, foi feita a triagem da mutação deletéria presente na sua família. O resultado foi informado pessoalmente em consulta médica e o seu significado foi discutido individualmente, bem como foram definidas as condutas posteriores.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este projeto foi iniciado em Março de 1998 e aprovado pela Comissão de Ética do Hospital do Câncer em 09 de Outubro de 1998. No total foram incluídos no estudo 100 indivíduos: 83 indivíduos pertencentes a 20 famílias com diagnóstico clínico de VHL; sete indivíduos pertencentes a duas famílias encaminhadas para avaliação com diagnóstico diferencial de VHL; além de oito pacientes com tumores aparentemente esporádicos associados a VHL e dois familiares de uma paciente com HB esporádico (**Anexo 3**).

Das 20 famílias com diagnóstico clínico de VHL estudadas, 17 relatavam história familial afetando principalmente parentes em 1° e 2° graus; e três correspondiam a casos novos de VHL (sem história familial). Oitenta e três indivíduos pertencentes às 20 famílias foram avaliados para pesquisa de mutação no gene *VHL* – em média quatro membros por família, variando de um a 16 membros avaliados. Destes, 35 já tinham alguma manifestação da doença e, portanto tratavam-se de pacientes com diagnóstico de VHL e 48 eram familiares assintomáticos diretamente relacionados e considerados clinicamente como de alto risco para a doença.

Amostras das duas famílias com suspeita de VHL (VH7 e VH19) foram encaminhadas devido ao quadro sugestivo de VHL pela história familial, porém sem investigação completa dos casos. Posteriormente, as famílias puderam ser avaliadas. O quadro clínico de todas as famílias será amplamente discutido no item **5.1** a seguir.

Oito pacientes com tumores relacionados a VHL aparentemente esporádicos foram incluídos e eram assim distribuídos: um paciente com angioma de retina na infância; seis pacientes com carcinoma de células claras renais (CR) multicêntrico (multifocal ou bilateral); um paciente com FE unilateral associado com cistos de epidídimo; e um paciente com hemangioblastoma sem história familial. O probando VH19A (com CR bilateral pertencente a uma das famílias suspeitas de VHL) foi analisado conjuntamente com o grupo de pacientes com CR aparentemente esporádicos, recebendo posteriormente a identificação CR5A. Dois familiares assintomáticos de uma paciente com HB aparentemente esporádico também foram incluídos no estudo.

O teste genético foi utilizado neste estudo: para identificação da mutação patogênica nas famílias com VHL; para caracterizar mutação *de novo* nos casos de

VHL sem história familial; como teste preditivo nos familiares de risco; para diagnosticar a doença quando os critérios clínicos de VHL não eram completamente preenchidos; para o diagnóstico diferencial com outras síndromes genéticas quando havia suspeita de VHL; para avaliar a prevalência de mutações germinativas no gene *VHL* em pacientes com tumores aparentemente esporádicos relacionados ao VHL; e para avaliar freqüência alélica populacional das variações de seqüência detectadas.

5.1- O aconselhamento genético e avaliação clínica das famílias com VHL

Todas as manifestações clínicas dos indivíduos afetados e a história familial foram registradas na Ficha de Avaliação Clínica (**Anexo 1**). Todos os participantes receberam aconselhamento genético pré-teste sendo discutido os aspectos clínicos, sociais e psicológicos envolvidos na doença e no teste molecular. O teste genético foi autorizado formalmente através de consentimento pós-informado assinado pelo paciente ou seu responsável legal após esclarecimentos (**Anexo 2**). As famílias provenientes de outros estados ou cidades do interior receberam o aconselhamento genético pré e pós-teste em centros de referência especializados em genética de cada região. O fenótipo apresentado pelas famílias com VHL, correspondendo às manifestações clínicas características de VHL relatadas por cada uma das famílias, é mostrado na **Tabela 2**. Todos os probandos apresentavam manifestações da doença, com exceção dos indivíduos VH1A e VH8A que eram assintomáticos.

Os heredogramas das famílias com diagnóstico ou suspeita de VHL são mostrados no **Anexo 7** e as manifestações apresentadas pelos pacientes com VHL são sumarizados na lista de pacientes e familiares (**Anexo 5**). A seguir são discutidos aspectos clínicos relevantes de cada uma das famílias com VHL e algumas observações evolutivas de seguimento antes e após o teste genético.

Família VHL	n	HB	AR	CiP	CiR	CiE	CiH	FE	AdR	AdP	CR	TNEP	CP	outros	VHL tipo
VH1	5	4/5	-	1/5	1/5	1/3	-	-	-	-	2/5	-	-	-	1
VH2	10	10/10	1/10	2/10	1/10	1/5	-	-	1/10	-	4/10	-	-	-	1
VH3	6	4/6	-	2/6	2/6	-	-	-	1/6	-	2/6	-	1/6	-	1
VH4	8	7/8	1/8	3/8	4/8	-	-	-	1/8	-	1/8	-	-	-	1
VH5	2	1/2*	1/2	1/2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
VH6	1	1/1	-	1/1	1/1	-	-	-	-	1/1	1/1	-	-	CiM/Ov	1
VH8	5	3/5	1/5	2/5	2/5	-	-	-	-	1/5	1/5	-	-	ASR	1
VH9	10	7/10	3/10	3/10	3/10	3/7	-	-	-	-	3/10	-	-	ASR	1
VH10	2	2/2	-	2/2	1/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
VH11	4	2/4	-	-	1/4	-	-	3/4	-	-	-	-	-	-	2
VH12	2	1/2	-	-	-	-	-	2/2	-	-	-	-	-	-	2
VH13	5	2/5	1/5	2/5	1/5	-	1/5	-	-	2/5	-	-	-	-	1
VH14	14	7/14	2/14	3/14	2/14	-	-	-	-	1/14	1/14	-	-	-	1
VH15	3	1/3	1/3			-	-	-	-	-	1/3	-	-	-	1
VH16	5	4/5	3/5	1/5	1/5	1/5	-	-	-	-	2/5	-	-	AstrC,SemT	1
VH17	1	1/1	1/1	1/1		-	-	-	1/1	-	-	-	-	-	1
VH18	3	2/3	3/3	1/3	1/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
VH20	3	3/3	-	1/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
VH21	1	-	1/1	-	-	-	-	1/1	-	-	-	-	-	-	2
VH22	2	2/2	-	1/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

Tabela 2 – Fenótipo global apresentado pelas famílias VHL, prevalência das manifestações por membros afetados e classificação clínica do tipo de VHL.

Legenda: n – número total de membros afetados com manifestacões de VHL ou portadores assintomáticos de mutação no gene *VHL*; HB – hemangioblastoma de SNC; AR – angioma de retina; CiP – cistos pancreáticos; CiR – cistos renais; CiE – cisto de epidídimo; CiH – cisto hepático; FE – feocromocitoma; AdR – adenoma renal; AdP – cistoadenoma pancreático; CR – carcinoma renal; TNEP – tumor neuroendócrino pancreático; CP – carcinoma pancreático; CiM/Ov – cistos de mama e ovário; ASR – adenoma de supra-renal; AstrC – astrocitoma cerebelar; SemT – seminoma de testículo; NA – não avaliado. A avaliação de CiE somente considera os pacientes de sexo masculino. * história clínica presumida porém sem comprovação clínica, radiológica ou anatomopatológica

- A família VH1 foi encaminhada para investigação dos filhos de um paciente com diagnóstico de VHL. O pai das crianças havia falecido em 1997 aos 37 anos no pós-operatório imediato devido a complicações causadas por múltiplos hemangioblastomas cerebelares. O diagnóstico de VHL foi dado apenas na autopsia, quando diversas outras lesões ocultas assintomáticas foram detectadas, entre elas: pâncreas policístico, cistos renais bilaterais múltiplos, carcinoma renal tipo células claras e cistos de epidídimo. Ambas as crianças VH1A e VH1B eram assintomáticas e estavam em acompanhamento clínico realizando exames periódicos. Apesar da história familial, não havia familiar vivo para o teste genético. A questão foi discutida com a mãe que decidiu testar os dois filhos menores, mesmo sabendo que o resultado poderia não ser conclusivo. Origem da família: São Paulo.

- A família VH2 era do Rio de Janeiro e o diagnóstico de VHL já havia sido feito pelo quadro clínico apresentado por vários familiares em cinco gerações. Observa-se uma elevada taxa de óbitos nas primeiras gerações em decorrência de HB de SNC, enquanto que nos pacientes com VHL de gerações mais novas o CR foi o responsável pelos últimos óbitos na família.

- A família VH3 é formada por descendentes de poloneses imigrantes que residem em Recife, PE. As manifestações clínicas apresentadas definem claramente um fenótipo agressivo da doença com manifestações importantes, inclusive carcinoma pancreático e renal. A probanda VH3A faleceu poucos meses após entrar no estudo em decorrência de carcinoma renal tipo células claras bilateral, já metastático à apresentação. Este episódio alertou diversos membros da família da importância dos exames de rastreamento. Uma das filhas da paciente (VH3B) apresentou cistos renais e pancreáticos ao exame ultra-sonográfico de rastreamento. Apesar de fazerem parte do espectro VHL, os cistos de pâncreas e rins são manifestações inespecíficas e prevalentes na população geral. O teste molecular nesta situação pode ser usado para definir se existe correlação entre estas manifestações menores com a doença de VHL. A outra filha da paciente (VH3C) assintomática apresentou HB cerebelar detectado nos exames de rastreamento. Os testes genéticos de ambas as

filhas estão em andamento. Recentemente, os pacientes VH3D VH3E, ambos com VHL, entraram no estudo como controles positivos para a análise da mutação na família.

- A família VH4, de São Paulo, apresenta manifestações semelhantes às famílias anteriores. Após a identificação da mutação no probando VH4A, vários familiares assintomáticos receberam aconselhamento genético e submeteram-se ao teste preditivo. Os familiares portadores da mutação estão em programa de rastreamento de lesões. O paciente VH4B faleceu em 2001 por septicemia de origem urinária decorrente da paraplegia resultante de HB espinhais diagnosticados no passado. Várias novas lesões nos membros com mutação foram reveladas com o rastreamento clínico.

- O paciente VH5A, de 12 anos, foi atendido no Hospital do Câncer A.C. Camargo proveniente de João Pessoa, PB, com quadro de angioma de retina aparentemente esporádico. No entanto, ao questionar a história patológica familiar com uma tia paterna do probando for revelado que a mãe do paciente havia sido adotada e que veio a falecer subitamente de tumor no cerebelo aos 28 anos, levantando a possibilidade de tratar-se de um caso familial de VHL ao invés de uma lesão esporádica. Neste caso, o teste genético foi importante para definir o diagnóstico e o risco de outras lesões associadas a VHL, desde que não haviam dados que pudessem confirmar a história da família.

- A paciente VH6A, apesar da história familial negativa para VHL, apresentava critérios clínicos sugestivos da doença, como HB de cerebelo, cistos renais e pancreáticos. Uma tomografia computadorizada de abdome em 1998 mostrou rim esquerdo excluso por cálculo coraliforme e uma lesão no pólo inferior do rim direito de 1,0cm de diâmetro. O diagnóstico de VHL foi estabelecido com o teste genético. Após um ano de seguimento, o exame tomográfico do abdome mostrou um aumento da lesão para 3 cm de aspecto misto com componentes sólido e cístico, além de uma nova lesão de 1 cm de diâmetro, também no pólo inferior do rim direito único. A paciente foi submetida a uma cirurgia laparoscópica com exérese das lesões com margem de segurança, cujo laudo anátomo-patológico foi de carcinoma renal tipo células claras nas duas lesões

com margens livres de neoplasia (Figura 3). A paciente passou bem no pós-operatório. Como houve preservação do parênquima renal, a função renal foi mantida normalmente. Além disso, a paciente apresenta múltiplos cistos ovarianos bilaterais e extensa doença fibrocística das mamas. Os pais da paciente (VH6B e VH6C) foram incluídos para caracterização de um caso novo de VHL. Origem da família: São Paulo.

- A família VH7 é de originária de Minas Gerais, porém alguns membros da família residiam em São Bernardo do Campo, SP. A família foi encaminhada por suspeita de VHL porque todos os afetados apresentam um quadro monótono de "hemangioblastomas" de SNC, sem desenvolverem, no entanto outras lesões associadas a VHL. Quatro pacientes (mãe e três filhos) foram encaminhados para avaliação, com relato de que a mãe e um dos filhos apresentavam HB cerebelar. O seqüenciamento do gene *VHL* mostrou apenas um polimorfismo gênico sem segregação com a doença e o *Southern-blot* mostrou ausência de rearranjos ou deleções gênicas envolvendo o gene VHL. Posteriormente, a investigação dos casos mostrou tratar-se da síndrome de hemangioma cavernoso familial. Uma irmã da probanda que apresentava crises convulsivas foi avaliada recentemente com TC de crânio que revelou um hemangioma cavernoso de cerebelo. O diagnóstico de VHL foi afastado.

- A família VH8 é de Caieiras, SP e relatava apenas manifestações vasculares de VHL, com hemangioblastoma do SNC e angiomas de retina. Diversos membros receberam o aconselhamento genético e foram investigados com o teste genético. O probando VH8A e sua tia VH8D foram identificados como portadores assintomáticos da mutação e incluídos no programa de rastreamento clínico. A paciente VH8D apresenta apenas cistos renais e pancreáticos, e o paciente VH8A permanece hígido até o momento. A mãe do probando, VH8B e sua tia materna, VH8C, amba com VHL, apresentaram outras lesões ocultas durante o rastreamento que eram completamente assintomáticas. A paciente VH8B foi operada devido a um novo HB cerebelar. A paciente VH8C ressecou um cistoadenoma pancreático e um CR de 3,0cm. Atualmente, a paciente VH8C está investigando um nódulo não funcionante na glândula supra-renal direita.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE BIBLIOTECA

- A família VH9 é originária de Brasília, DF, com diversos parentes residentes em Goiânia e vem sendo acompanhada pelo Departamento de Genética da Universidade de Brasília (UNB). Apresentam as manifestações comuns em VHL tipo 1, inclusive com casos de carcinoma renal. O teste genético foi realizado em um grande número de familiares com VHL e assintomáticos, sendo identificados dois indivíduos portadores da mutação.

- A família VH10 vem sendo acompanhada pelo Departamento de Genética Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. A história patológica familial foi dificultada pela falta de informações fornecidas pela família. Dos três membros avaliados (pai e dois filhos), dois deles eram afetados por com HBs de cerebelo e cistos pancreáticos. O seqüenciamento do gene *VHL* do probando VH10A mostrou uma mutação germinativa não conhecida, que foi confirmada no seu filho afetado (VH10B). Apesar do filho não afetado (VH10C) não apresentar a mesma alteração genética, foi recomendado que seja mantido o rastreamento clínico até que o caráter deletério da mutação seja comprovado.

- A família VH11, de São Paulo, foi a primeira do estudo com quadro predominante de FE, sem tumor renal diagnosticado até o momento. A família vem sendo acompanhada clinicamente no Departamento de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da USP. A mutação detectada foi confirmada em outros membros afetados. Alguns familiares assintomáticos também foram testados, sendo identificado um indivíduo portador da mutação (indivíduo VH11G).

- A família VH12 é de origem portuguesa e os descendentes vivem em São Paulo. Também se encontram em acompanhamento clínico no Departamento de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da USP. Os membros afetados apresentam predominantemente quadro de FE. A mutação foi identificada no probando VH12A e em sua irmã com VHL (VH12B), permitindo que o teste genético possa ser utilizado com preditivo para outros membros da família. Como não há história de VHL nos ascendentes, será interessante analisar futuramente os pais destas pacientes quanto ao estado de portadores.

- Na família VH13, de São Paulo, observa-se uma maior incidência de lesões pancreáticas, incluindo cistos e adenomas. Dois membros com VHL (VH13A e VH13B) estão acompanhando periodicamente lesões sólidas de pâncreas e está sendo discutido o momento mais adequado para a abordagem cirúrgica diagnóstica. No seguimento, a paciente VH13A apresentou AR achado na investigação oftalmológica e tratado precocemente com laser. Na investigação abdominal da paciente VH13B foram encontrados cistos hepáticos. As duas filhas assintomáticas da paciente VH13A foram incluídas após a detecção da mutação da família.

- A família VH14 reside atualmente em São Paulo, porém são imigrantes da Paraíba onde mora a maior parte da família. Os membros afetados relatam manifestações predominantemente benignas associadas ao VHL tipo 1, sendo rara a ocorrência de câncer na família – só há um caso relatado sem confirmação anátomo-patológico. A mutação foi encontrada no seqüenciamento. Seus três filhos assintomáticos, incluindo um da paciente estudados com o teste preditivo, um não era portador e dois deles foram identificados com portadores da mutação. O restante da família que reside na Paraíba não mostrou interesse em participar do estudo.

- A família VH15, proveniente de Porto Alegre, RS, foi encaminhada pelo Departamento de Genética do Hospital das Clínicas da UFRS. Amostras de sangue de três indivíduos afetados com VHL e de um indivíduo assintomático foram enviadas para análise de mutações. O espectro de manifestações é compatível com VHL tipo 1.

- A família VH16, do Rio de Janeiro, entrou no estudo após contato pela Internet através da *Home Page* do Hospital do Câncer. O probando VH16A já havia apresentado inúmeras manifestações da doença no decorrer da sua vida, como HB cerebelar, AR, CR direito tratado com nefrectomia total e cistos múltiplos. Havia um relato médico com o diagnóstico de FE tratado clinicamente com "quimioterapia", o que caracterizaria o tipo 2B de VHL. Durante a investigação clínica no Hospital do Câncer foi diagnosticado um 2° tumor maligno primário no

rim esquerdo, além de uma massa supra-renal direita e inúmeras metástases pulmonares. O diagnóstico de FE em atividade foi sugerido pelo quadro de hipertensão e pelo aumento de catecolaminas séricas, porém não houve captação do radio-marcador na cintilografia com meta-iodo-benzil-guanidina. O paciente foi submetido a uma laparotomia diagnóstica que removeu a lesão supra-renal cujo laudo anátomo-patológico mostrou tratar-se apenas de tecido fibroso cicatricial. A biópsia do nódulo pulmonar revelou metástase de CR. Na ausência de confirmação do FE no paciente e nos familiares, a família foi re-classificada como VHL tipo 1. O paciente VH16A trouxe laudos anátomo-patológicos de tumores não descritos como relacionados à VHL, como astrocitoma cerebelar e seminoma de testículo direito. Os blocos de parafina destas lesões foram solicitados para revisão. Vários membros da família já haviam falecido em conseqüência da doença. Apesar da família residir no Rio de Janeiro, o probando e sua prima assintomática (VH16B) preferiram deslocar-se para São Paulo para receber o aconselhamento genético e serem testados para a presença de mutação no gene *VHL*. A paciente VH16B, portadora da mutação, está realizando os exames de rastreamento clínico, inclusive com investigação de FE.

- A família VH17 é composta por apenas um paciente afetado por VHL sem história familial, sugerindo um caso novo de VHL. As manifestações do probando são predominantemente HB cerebelares e espinhais que se iniciaram a partir dos 11 anos de idade, além de AR, adenoma renal e cistos múltiplos. O paciente está sendo acompanhado no Departamento de Oncogenética e no Hospital das Clínicas da USP.

- A família VH18 é proveniente de Ribeirão Preto e está em acompanhamento no Depto. de Genética Médica da USP – Ribeirão Preto, SP. A amostra de DNA da probanda, afetada com HB, AR e cistos renais e pancreáticos, e única sobrevivente entre afetados da família, foi encaminhada para análise. A família apresenta características clínicas que classificam o VHL como do tipo 1.

- A família VH19, de Campinas, SP, foi encaminhada com suspeita de VHL após o probando VH19A ter desenvolvido CR bilateral. Duas de suas irmãs

apresentavam "problemas" cerebelares. O probando apresentava distúrbio cerebelar progressivo com ataxia e fala arrastada. Tanto o seqüenciamento do gene *VHL* quanto o *Southern-blot* não apresentaram alterações nos testes realizados no probando. A tomografia computadorizada de crânio não mostrou qualquer lesão no SNC e a ressonância magnética do crânio revelou uma atrofia cerebelar moderada. O diagnóstico neurológico de ataxia espino-cerebelar foi feito, excluindo VHL. O paciente por apresentar câncer renal bilateral foi elegível para a análise no grupo de tumores aparentemente esporádicos. O paciente e outros familiares foram encaminhados para o Depto. de Genética da UNICAMP para investigação da síndrome cerebelar. Recentemente, o probando VH19A apresentou câncer de próstata, seu terceiro tumor maligno primário, sugerindo a possibilidade de envolvimento de um gene de suscetibilidade ao câncer diferente do gene *VHL*.

- A família VH20 foi indicada pela *VHL Family Alliance* (VHLFA) para análise molecular e é originária de Quito, Equador. Após vários contatos por correio eletrônico com a paciente VH20A e seu médico responsável, as amostras de sangue foram enviadas para análise. O quadro familial é de VHL tipo 1. Amostra do filho da paciente de 3 anos de idade (VH20B) também foi testada e não apresentava a mutação detectada pelo *Southern-blot*.

- O paciente VH21A, do Rio de Janeiro, apresenta manifestações típicas de VHL apesar de não ter história familial da doença. O quadro de FE bilateral com angioma de retina definiu VHL do tipo 2. O paciente está em acompanhamento no Depto. de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da USP, São Paulo. Recentemente, foi enviado material dos pais do paciente para confirmar se a mutação encontrada no paciente é uma mutação *de novo*.

- A paciente VH22A é da cidade do Porto, Portugal e foi indicada pela VHLFA. A paciente apresentou um HB cerebelar ressecado aos 30 anos e múltiplos cistos pancreáticos. Foi orientada a procurar um serviço de genética em sua cidade e desde então, foram mantidos vários contatos com a paciente e com sua médica geneticista por correio eletrônico. A mãe da paciente, falecida aos 56 foi operada três vezes por HB cerebelares e apresentava hipertensão arterial não

investigada. A avó materna da paciente nasceu no Brasil, faleceu aos 63 anos por câncer hepático sem investigação e era prima em 1° grau do seu marido.

Os cincos pacientes com CR esporádicos apresentavam tumores múltiplos e/ou bilaterais. Os pacientes AR1 e FE1 apresentam AR esporádico e FE unilateral associado com cistos de epidídimo, respectivamente. A paciente HB1A apresentava HB cerebelar aparentemente esporádico e após a detecção de mutação germinativa, seus dois filhos assintomáticos (HB1B e HB1C) foram incluídos no estudo.

5.2- *Detecção das mutações germinativas nas famílias com VHL*

Após a extração do DNA, foram gerados fragmentos de PCR correspondentes aos produtos amplificados dos três exons do gene VHL dos indivíduos incluídos no estudo. O par de iniciadores 1Z e 1A foi utilizado como padrão para amplificação do exon 1 do gene *VHL*. Todas as mutações identificadas no exon 1 foram detectadas por estes iniciadores.

Para as reações de seqüência foram utilizados como molde os produtos amplificados dos exons 1, 2 e 3 do gene *VHL*. Foi realizado o seqüenciamento das regiões codificantes do gene *VHL* correspondes aos produtos de PCR para o exon 1, 2 e 3 em todos os probandos do estudo. Após a identificação da mutação da família, os familiares foram testados apenas para a mutação considerada deletéria.

A **Figura 13** mostra o resultado da padronização da técnica de *Southern-blot* utilizando DNA linfocitário de um indivíduo normal com concentrações crescentes de DNA (5μg, 10μg, 15μg e 20μg). A hibridação utilizando a sonda g7 foi satisfatória, reproduzindo com a mesma qualidade os resultados obtidos na literatura. A reação foi padronizada com concentrações de DNA de 5 ou 10μg para cada amostra. A técnica de *Southern-blot* foi realizada nas famílias sem mutação detectada pelo seqüenciamento, e correspondem às famílias VH2, VH3, VH13 e VH20, além das famílias VH7 e VH19 em que VHL era diagnóstico diferencial. Os pacientes com tumores aparentemente esporádicos não foram investigados com *Southern-blot*.

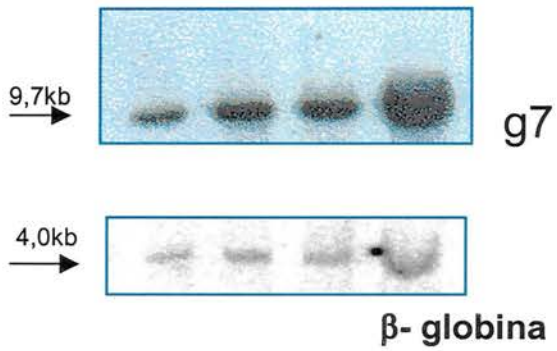


Figura 13 – Resultado da padronização do *Southern-blot* com amostras de um indivíduo normal utilizando-se quantidades variáveis de DNA genômico (5μg, 10μg, 15μg, e 20μg) e hibridizado com as sonda g7 e de β-globina. As setas indicam o fragmento de 9,7kb correspondendo aos alelos do gene *VHL* selvagem e de 4,0kb correspondente ao gene da β-globina.

Foram encontradas mutações germinativas no gene *VHL* associadas à doença em todas as 20 famílias com VHL (**Tabela 3**), conferindo uma taxa de 100% de detecção quando o diagnóstico clínico de VHL é bem estabelecido. Dos 83 indivíduos pertencentes às 20 famílias incluídos no estudo até o momento, 78 amostras já foram completamente analisadas por seqüenciamento do gene *VHL* e/ou por *Southern-blot* quantitativo e cinco foram incluídas recentemente para análise (**Anexo 5**).

A ausência de mutação germinativa nas famílias suspeitas de VHL (VH7 e VH13) tornou o diagnóstico de VHL pouco provável, levando a uma maior investigação clínica dos pacientes e ao diagnóstico correto das enfermidades destas famílias. A análise destas duas famílias reforça a importância da investigação clínica rigorosa visando o diagnóstico definitivo. O teste genético só foi informativo quando a suspeita de VHL era baseada em dados clínicos consistentes, demonstrando que a sensibilidade do teste pode ser influenciada pela seleção da amostra.

Família	VHL tipo	Mutação em nt da região codificadora	Exon	Conseqüência para a proteína VHL	Tipo de mutação	Referencia
VH1	1	227 del TCT	1	delPhe76	in-frame del	Patel, 2000
VH9	1	238A>C	1	Ser80Arg	missense	Nova
VH5	1	262T>C	1	Trp88Arg	missense	Nova
VH18	1	280G>T	1	Glu94Stop	nonsense	Crossey, 1994
VH22	1	302T>G	1	Leu101Arg	missesnse	Zbar, 1996
VH6	1	305 del C	1	Ateração a partir do aa 102. Stop-codon em 143	frameshift	Nova
VH16	1	320G>C	1	Arg107Pro	missense	Stolle, 1998
VH10	1	IVS1+7G>A	Intron 1	-	sítio de splicing	Nova
VH15	1	344 del A	2	Ateração a partir do aa 115. Stop codon em 158	frameshift	Nova
VH21	2	371C>T	2	Thr124Ile	missense	Nova
VH14	1	388G>T	2	Val130Phe	missense	Nova
VH4	1	407T>C	2	Phe136Ser	missense	Crossey, 1994
VH17	1	436 del C	2	Ateração a partir do aa 146 Stop-codon em 158	frameshift	Nova
VH8	1	IVS2+1G>A	Intron 2	-	sítio de splicing	Glavac, 1996
VH12	2	499C>T	3	Arg167Trp	missense	Crossey, 1994
VH11	2	500G>A	3	Arg167Gln	missense	Crossey, 1994
VH2	1	Deleção parcial	-	-	rearranjo	-
VH13	1	Deleção parcial	-	-	rearranjo	-
VH20	1	Deleção parcial	-	-	rearranjo	-
VH3	1	Deleção completa	-	-	rearranjo	-
HB1	HB spo	74C>T	1	Pro25Leu	missense	van der Harst 1998
VH2, VH15	-	183C>G	1	Pro61Pro (sinônima)	polimorfismo	1/86 (1.16%)*
VH11	-	IVS –94T>A	Intron 2	Sem efeito	polimorfismo	2/118 (1.69%)*
VH7	-	642+18T>C	3	3'UTR of exon 3	polimorfismo	3/172 (1.74%)*

Tabela 3 - Mutações germinativas e polimorfismos encontrados nas famílias com diagnóstico ou suspeita de VHL e nos tumores esporádicos. São mostradas as mutações na seqüência de nucleotídeo e as conseqüências para a pVHL.

5.3- Padronização do FISH

A técnica de FISH foi padronizada no Laboratório de Citogenética Molecular do Departamento de Urologia do NIH, sob supervisão do Dr. Thomas Ried e do Dr. John Phillips no período de 15 de Setembro a 6 de Outubro de 2001. As sondas utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Dr. John Phillips para reprodução dos experimentos no Brasil. A padronização utilizou amostras normais e uma amostra sabidamente com deleção completa do gene *VHL* (**Figuras 14** e **15**). Foram testadas quatro amostras com deleções de pacientes do estudo, duas delas parciais (ambas em pacientes da família VH13) e duas com deleção completa (ambas em pacientes da família VH3).

Na padronização e nos experimentos com as amostras brasileiras foram utilizadas várias sondas para a região 3p25 e para o centrômero do cromossomo 3. Os experimentos utilizando-se as sondas Cos 3, Cos 31, Cos 11 e P1-191 foram padronizados com sucesso, porém não foi possível reproduzir os resultados com a sonda g7. As dificuldades em reproduzir-se os resultados com esta sonda são atribuídas ao pequeno tamanho da mesma (1,7kb).

A deleção completa do gene VHL diagnosticada pelo *Southern-blot* na família VH3 pôde ser identificada com a sonda Cos 11. O sinal produzido mostrou uma diminuição significativa da intensidade em um dos cromossomos 3, consistente em 20 metáfases estudadas, sugerindo que a área de deleção fosse menor que a área de hibridação da sonda (**Figura 16**). A deleção parcial detectada por *Southern-blot* na família VH13 não foi detectada pelo FISH, que não mostrou diferenças na intensidadesdas marcações correspondentes do par de cromossomos 3; possivelmente por tratar-se de uma deleção genômica menor que a área de hibridação das sondas. Embora este método não tenha sido útil para diagnóstico dos rearranjos encontrados nas amostras estudadas, um amplo estudo comparando-se a sensibilidade das técnicas de *Southern-blot* e FISH nunca foi feito.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE BIBLIOTECA

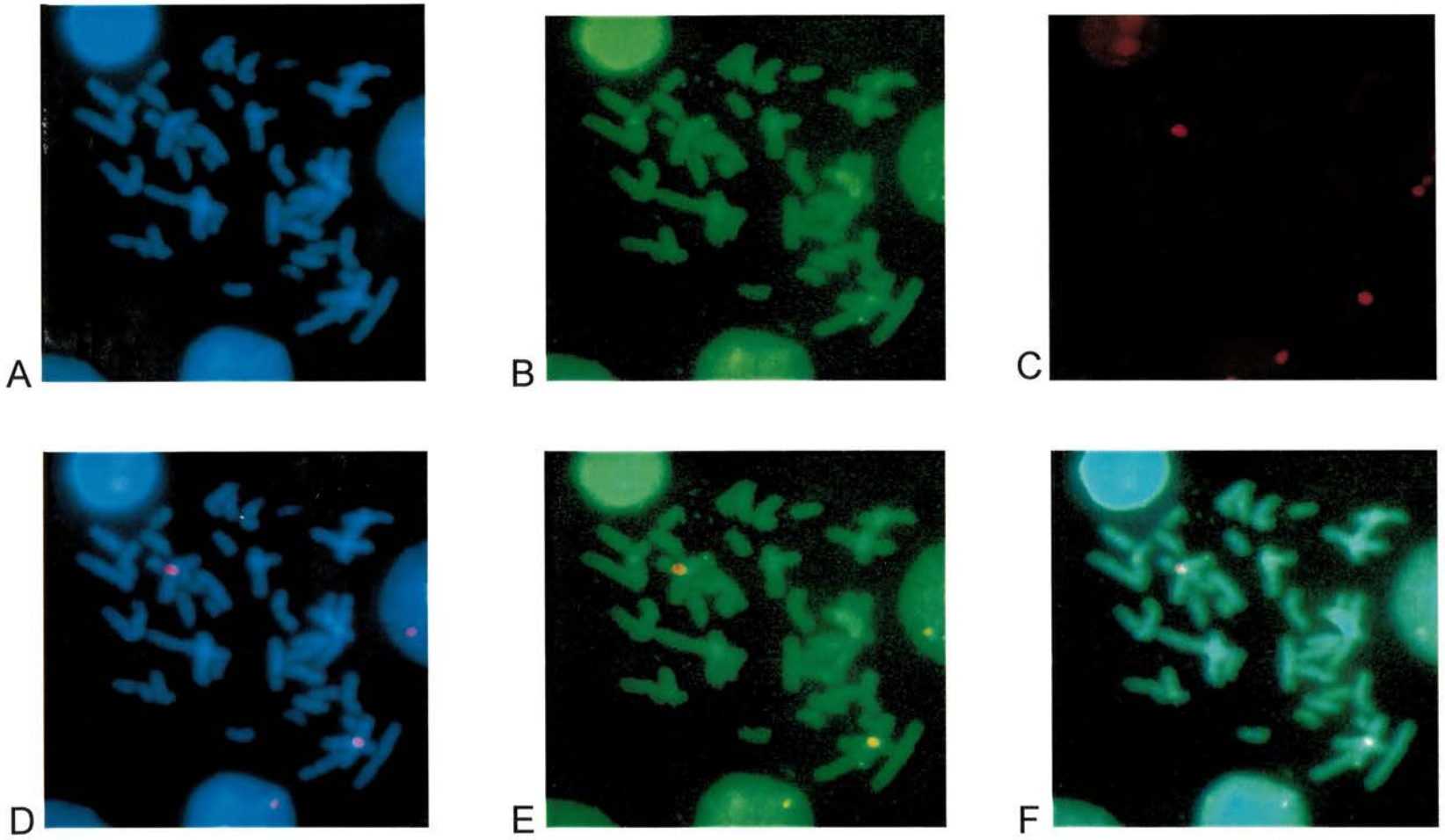


Figura 14 – Padronização da técnica de FISH em linfócitos em metáfase hibridados com as sondas específicas para a região centromérica do cromossomo 3 humano e para o lócus do gene *VHL* utilizando-se vários filtros. **A** – coloração com DAPI; **B** – identificação da região correspondente ao gene *VHL* com a sonda **cos 3** marcada com biotina, FITC; **C** - marcação do centrômero do com sonda *sprectrum orange 3*, TRITC; **D** – combinação das imagens A + C; **E** – combinação das imagens B + C; **F** – imagem composta com DAPI, FITC e TRITC.

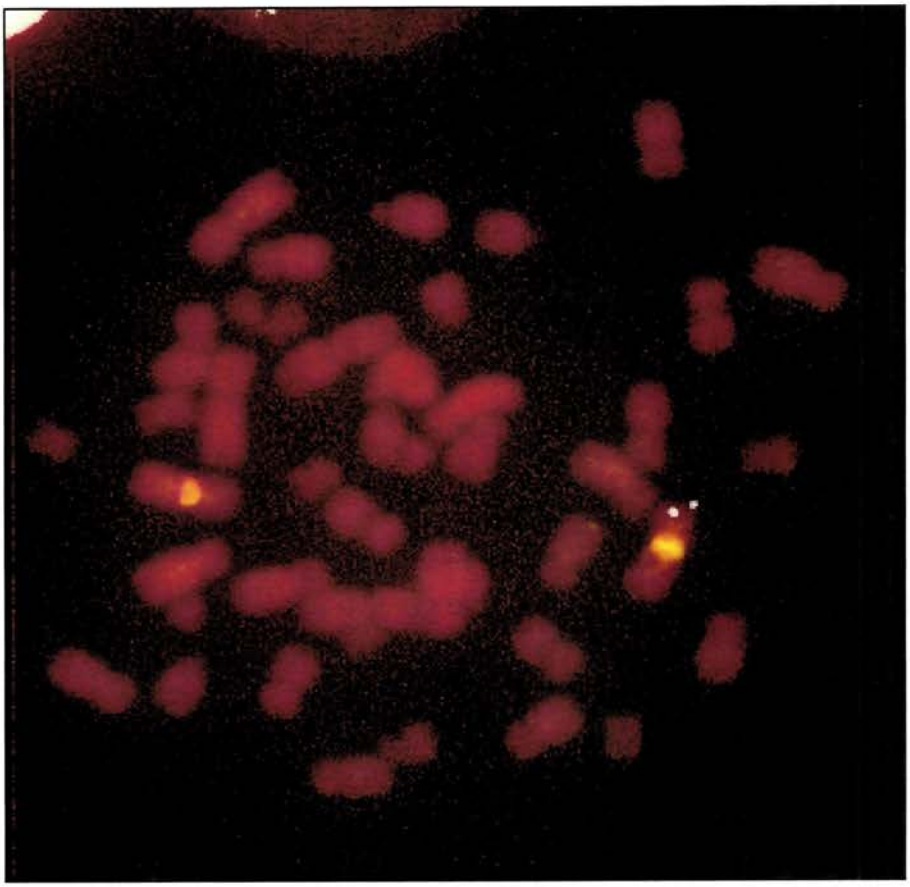


Figura 15 – Padronização do FISH para o gene *VHL* utilizando-se a sonda cos 11 marcada com biotina e a sonda centromérica *spectrum orange 3* em uma amostra controle com deleção completa do gene *VHL* em um dos comossomos. Imagem editada.

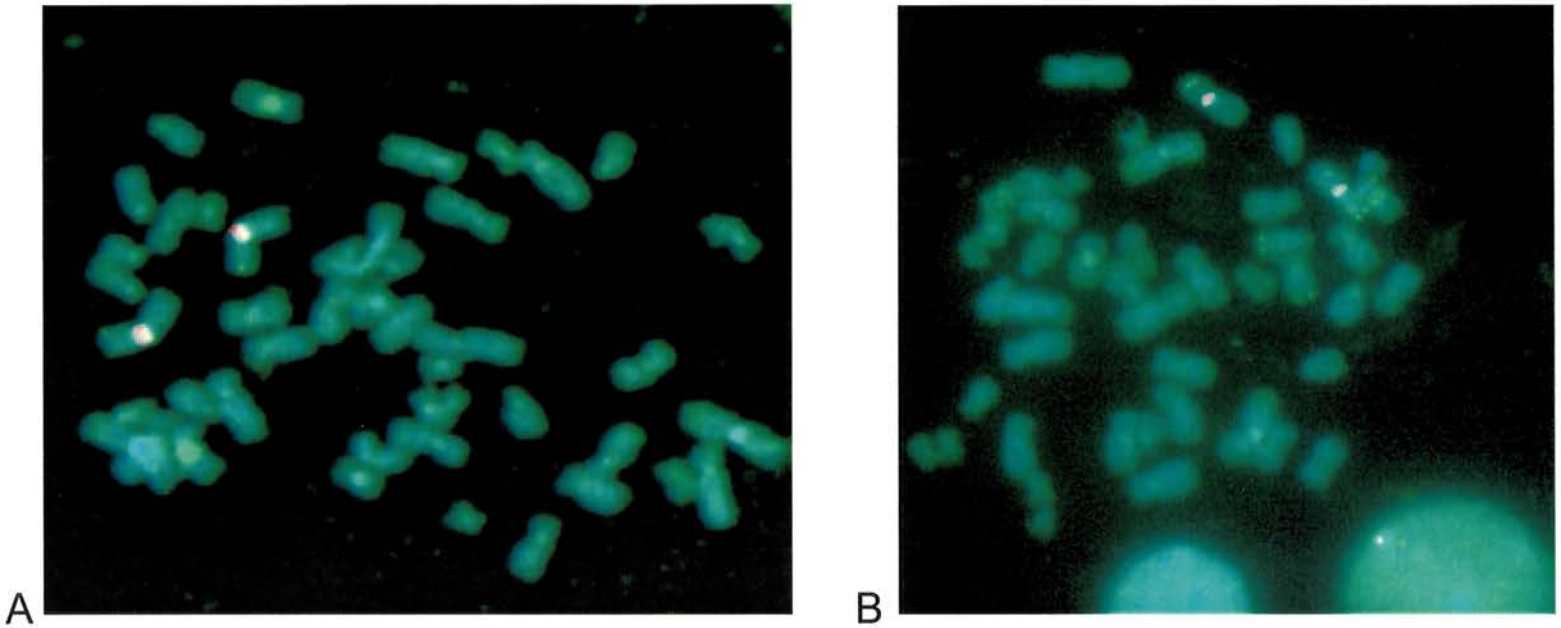


Figura 16 – Experimento de FISH para o gene *VHL* em metáfases linfocitárias do paciente VH3D. **A** – foram utilizadas as sondas Cos 11 marcada com biotina (verde) e *spectrum orange 3* (vermelho). **B** – utilizou-se as sondas Cos 3 marcada com biotina (verde) e *spectrum orange 3* (vermelho). Observa-se uma redução da intensidade do sinal de hibridação do gene *VHL* com a sonda Cos 11 em um dos cromossomos.

5.4- Análise das mutações germinativas nas famílias com VHL

Nas 20 famílias com VHL analisadas, foram detectadas as mutações germinativas responsáveis pela doença em todos os probandos estudados, consistindo de 16 mutações pontuais distintas (famílias VH1, VH4, VH5, VH6, VH8, VH9, VH10, VH11, VH12, VH14, VH15, VH16, VH17, VH18, VH21 e VH22); e quatro rearranjos envolvendo o gene *VHL*, sendo três deleções parciais (famílias VH2, VH13 e VH20) e uma deleção completa (família VH3); além de três polimorfismos distintos nas famílias VH2, VH7, VH11 e VH15 (**Tabela 3**).

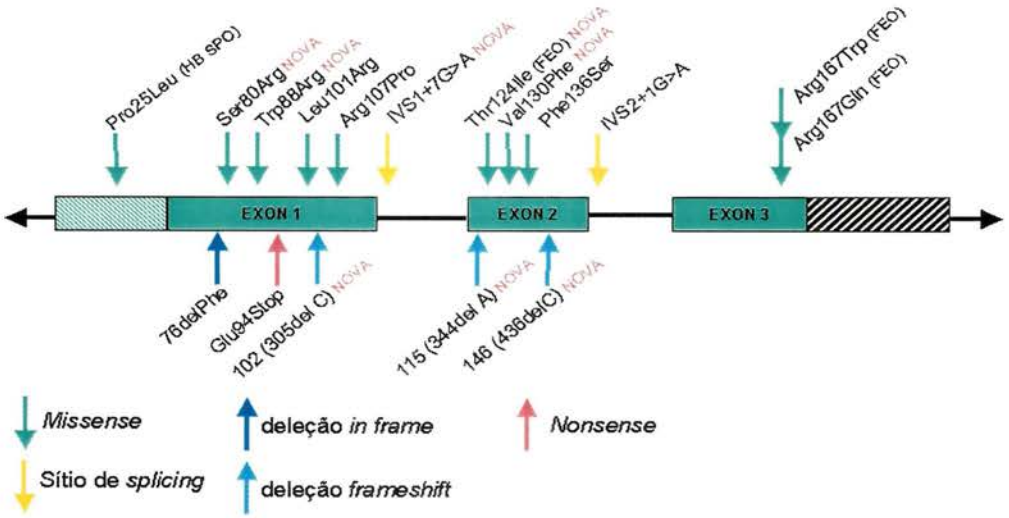


Figura 17 - Distribuição das mutações pontuais no gene *VHL*. As mutações novas são mostradas em detalhe, bem como às detectadas em famílias com fenótipo associado a feocromocitoma (FEO).

Das 16 mutações pontuais encontradas, 14 eram em regiões codificantes (sete no exon 1, cinco no exon 2, e duas no exon 3). Destas, nove eram do tipo *missense*, três correspondiam a micro-deleções (uma *in frame* e duas do tipo *frameshift*), e uma mutação *nonsense*. Duas mutações encontradas eram localizadas em regiões doadoras de *splicing* (uma no intron 1 e outra no intron 2). A distribuição das mutações pontuais no gene *VHL* é mostrada na **Figura 17**.

Oito mutações pontuais correspondem a mutações nunca descritas anteriormente em outras populações, sendo encontradas nos membros afetados das

famílias VH5, VH6, VH9, VH10, VH14, VH15, VH17 e VH21. A taxa de 50% de mutações pontuais novas é semelhante às descritas em outras populações já estudadas, ocidentais ou orientais (**YOSHIDA et al. 2000**). As demais famílias apresentavam mutações conhecidas e são mostradas na **Tabela 3**. Todas as mutações novas ocorreram em famílias com VHL do tipo 1 e especulações sobre seu caráter deletério são discutidas a seguir:

A mutação Trp88Arg detectada no paciente VH5A é uma mutação *missense* nova. Como a mãe do probando VH5A era adotiva e já havia falecido não foi possível avaliar a segregação da mutação na família. No entanto, duas mutações *missense* com trocas de aminoácidos diferentes e uma *nonsense* já foram descritas neste códon (**CHEN 1995b; CLINICAL RESEARCH GROUP FOR VHL IN JAPAN 1995; MATTOCKS et al 2000**). Esta mutação resulta na alteração de um aminoácido na extremidade de uma fita β-sanduíche no domínio β da pVHL.

A paciente VH6A (com diagnóstico síndrômico de VHL e sem história familial) apresenta a mutação 305delC não descrita previamente e consiste na deleção de 1 nucleotídeo no códon 102 do gene *VHL*. Duas pequenas deleções neste códon já foram relatadas (**CROSSEY et al. 1994; HUMAN GENOME MUTATION DATABASE**). Esta mutação provoca uma alteração da fase aberta de leitura a partir da mutação, e produz como conseqüência um códon de terminação prematuro na posição 143, provocando a deleção do domínio α da pVHL responsável pela ligação à Elongina C.

O probando da família VH9 apresentava uma mutação Ser80Arg nova, porém mutações neste códon, inclusive causando a mesma troca de aminoácidos, já haviam sido descritas associadas com VHL (**CROSSEY et al. 1994; CHEN et al. 1995b; GLAVAC et al. 1996**). Nesta família foi possível avaliar a segregação da doença com a mutação, sugerindo seu caráter deletério para os portadores da mesma. A mutação afeta uma região de ligação em alça de duas fitas β sanduíches do domínio β, em uma região de ligação com a Elongina C.

A mutação IVS1+7G>A encontrada na família VH10 é uma mutação em sítio doador de *splicing*. Esta mutação foi encontrada nos dois afetados da família estudados e não foi detectada no familiar assintomático. Apesar de duas mutações deste tipo já terem sido descritas anteriormente, as conseqüências biológicas desta mutação são desconhecidas (**ZBAR et al. 1996; OLSCHWANG et al. 1998**). É possível que a transcrição a partir desta região seja prejudicada ocasionando um *produto truncado*.

No mesmo códon onde foi encontrada a mutação Val130Phe da família VH14 já existe relato de mutação, porém com troca de aminoácidos diferentes (**ZBAR et al. 1996**). Foi possível avaliar a segregação da mutação em três membros afetados da família. A mutação afeta uma região correspondente a um fita β sanduíche do domínio β da pVHL.

Na família VH15, a mutação 344delA foi detectada na única paciente com VHL estudada. Esta mutação causa uma mudança na fase aberta de leitura a partir do códon 115 que resulta em um códon de terminação precoce na posição 158, deletando o domínio α da pVHL de ligação à Elongina C. Apesar desta mutação ser nova, quatro mutações do tipo *missense* já foram descritas no códon 115 (**GLAVAC et al. 1996; OLSCHWANG et al. 1998; CHEN et al. 1995b**).

O paciente VH17A, sem história familial, apresenta a mutação 436delC que causa alteração da fase aberta de leitura a partir do códon 146 e produz como conseqüência um códon de terminação na posição 158, deletando o sítio de ligação à Elongina C. Nenhuma mutação germinativa nesta posição foi descrita anteriormente.

O paciente VH21A apresenta a mutação *missense* Thr124Ile nova. Como não há história familial de VHL e alterações de seqüência envolvendo este códon nunca foram descritas anteriormente, o caráter deletério desta mutação não pôde ser esclarecido. No entanto, encontra-se na região correspondente ao domínio β da pVHL, entre duas fitas β sanduíches.

Os três pacientes com VHL sem história familial incluídos no estudo apresentavam mutações nunca descritas antes. Em dois deles foi possível esclarecer a origem da mutação com a análise de amostras dos pais. No caso da paciente VH6A, seus pais naturais não apresentavam a mutação e esta foi caracterizada como mutação *de novo*. Já no paciente VH17A, a avaliação genética da sua mãe (VH17B) revelou que ela era portadora assintomática da mutação. O teste genético foi confirmado com uma nova coleta de material da paciente VH17B. O paciente VH21A também não apresenta história familial. As amostras de seus pais (VH21B e VH21C) foram colhidas recentemente para análise.

O estudo da freqüência alélica na população nestes oito casos de mutação nova foi importante para excluir a possibilidade de variantes polimórficas freqüentes na população, e será discutido no item **5.6**.

Apesar de algumas destas mutações afetarem regiões importantes da pVHL, como domínios de ligação às Elonginas, regiões de α hélice e de folha β pregueada, a

completa caracterização do seu caráter deletério depende da análise de segregação na família, do estudo populacional e das conseqüências funcionais da pVHL. Os resíduos protéicos envolvidos nas mutações novas descritas podem ser vistos na **Figura 7**.

Algumas mutações no domínio β localizam-se em resíduos importantes para a integridade estrutural das fitas β sanduíches, como as que afetam os resíduos hidrofóbicos Phe76 e Val130 que mantém a integridade estrutural da pVHL. O resíduoTrp88 localiza-se no sítio secundário de ligação macromolecular da pVHL descrito por **STEBBINS et al. (1999)**.

5.5- Detecção e análise das mutações germinativas nos pacientes com tumores aparentemente esporádicos

O estudo com pacientes com tumores aparentemente esporádicos resultou na detecção de uma mutação germinativa no exon 1 do gene *VHL* em uma paciente com história de hemangioblastoma cerebelar aparentemente esporádico. A mutação Pro25Leu encontrada já havia sido descrita anteriormente na linhagem germinativa de um paciente com FE aparentemente esporádico (**VAN DER HARST 1998**). Esta mutação está localizada entre os dois códons iniciadores de transcrição do gene *VHL* e o caráter deletério desta variação está por ser estabelecido. Recentemente, esta mutação foi descrita em uma família com VHL concomitante à mutação Pro86Arg. Após um estudo populacional, os autores concluíram que a mutação Pro25Leu era uma variante rara, com freqüência alélica de 0,5% (**ROTHBERG et al. 2001**). Os dois filhos da paciente HB1A foram testados e nenhum é portador da alteração. Pretende-se analisar amostras de outros familiares.

Nos casos restantes de tumores aparentemente esporádicos estudados nenhum apresentou alterações de seqüência no gene *VHL*. Os pacientes com tumores esporádicos não foram investigados com *Southern-blot*. Apesar do gene *VHL* estar freqüentemente envolvido na carcinogênese destes tumores, é pouco provável que mutações germinativas contribuam significativamente para os casos de CR aparentemente esporádicos. No único caso de AR esporádico estudado não foi encontrada alteração de seqüência no gene *VHL*. Será interessante futuramente

aumentar a amostragem de casos de tumores aparentemente esporádicos para avaliar a prevalência de mutações germinativas no gene *VHL*.

5.6- *Estudo populacional das variantes alélicas*

A freqüência populacional das variantes alélicas encontradas foram estudadas utilizando-se o banco de DNA de indivíduos normais criado para estudo das mutações e polimorfismos do Laboratório de Genética do Câncer do Instituto Ludwig.

Três polimorfismos foram encontrados nas famílias com diagnóstico ou suspeita de VHL (**Tabela 3**): no exon 1, nt 183C>G (Pro61Pro) nas famílias VH2 e VH15; no intron 2, nt 464 –94T>A (ou IVS2 –94T>A) na família VH11; e no nucleotídeo 642+18T>C, na região 3' não traduzida (3'UTR) do exon 3 na família VH7. Os dois primeiros já haviam sido descritos anteriormente e o último ainda não havia sido caracterizado. Esta última variante foi encontrada na família com hemangioma cavernoso familial, porém a variante não segregava com os indivíduos afetados. O estudo populacional caracterizou a freqüência alélica destas variantes. A variante Pro61Pro apresentou freqüência populacional de 1,16%. A variante IVS2 –95T>A foi detectada com freqüência de 1,69%. A variante 642 +18T>C, nunca descrita, apresentou-se com freqüência de 1,74% na nossa população. Como esta variantes existem na população brasileira com freqüência maior que 1% são consideradas variantes polimórficas.

Em relação às mutações novas no gene *VHL*, não foi detectada nenhuma alteração semelhante na população geral nos 120 alelos estudados. A mutação Pro25Leu da paciente HB1A também não foi observada nas amostras normais da população brasileira. Esta mutação, conforme discutido no item anterior, não pode ser caracterizada como deletéria, pois parece tratar-se de uma variante rara com freqüência alélica menor do que 1%. No caso da paciente HB1A, as diferenças étnicas da paciente de origem Argentina e da população estudada limitam ainda mais a análise desta mutação. Uma avaliação funcional dos efeitos destas mutações será necessária para sua completa caracterização.

5.7- Correlação genótipo-fenótipo

Dezessete das 20 famílias com VHL cursavam sem FE na apresentação clínica, portanto correspondem ao VHL tipo 1 (85%). Três famílias com FE bilateral entre outras manifestações típicas de VHL foram classificadas como VHL tipo 2 (15%). Clinicamente, as famílias com FE não apresentavam câncer renal ou pancreático, porém a subclassificação entre o tipo 2A e 2B não foi feita devido ao pequeno número de afetados nestas famílias. Apesar da suspeita inicial de FE associado a carcinoma renal do paciente VH16A, nenhuma família com VHL tipo 2B foi detectada. Os pacientes VH8C e VH9C apresentam nódulos de supra-renal, além de história pessoal ou familial de CR, porém estes nódulos não são funcionantes e foram considerados incidentalomas.

As mutações pontuais encontradas nos probandos das famílias VH1, VH4, VH7, VH8, VH16, VH18, VH19 e VH22 já haviam sido descritas anteriormente e estão associadas a VHL tipo 1 (sem FE), enquanto que as mutações das famílias VH11, VH12, também conhecidas, relacionam-se com VHL tipo 2 (com FE) (**Tabela 2**). As mutações Arg167Gln e Arg167Trp encontradas respectivamente nas famílias VH11 e VH12 têm sido descritas como associadas ao fenótipo VHL tipo 2B (com alto risco para FE e CR). Apesar de CR não ter sido observado até o momento nestas famílias, esta informação tem implicações para o rastreamento clínico.

A mutação do resíduo 80 do gene *VHL* é descrita aqui com a substituição de serina para arginina e é acompanhada com um fenótipo tipicamente de VHL tipo 1, com alto risco para CR e HB, e baixo risco para FE. No entanto, a substituição deste resíduo para glutamina é reconhecidamente associada ao fenótipo de VHL tipo 2C, com alto risco para FE e nenhum risco para CR e HB. Estas variações fenotípicas causadas por diferentes trocas de amínoácidos em um mesmo resíduo são descritas na literatura, como p.e. as mutações Leu188Gln e Leu188Val, associadas ao fenótipo de VHL tipo 1 e VHL tipo 2C, respectivamente (**CLIFFORD et al. 2001**); e as mutações Tyr112Asn e Tyr112His, com fenótipo de VHL tipo 2B e VHL tipo 2A, respectivamente (**BRADLEY et al. 1999**).

Globalmente, 45% das mutações encontradas foram do tipo *missense*, 20% microdeleções, 5% nonsense, 10% em sítios de *splicing* e 20% corresponderam a grandes deleções gênicas ou rearranjos. No entanto, quando separamos as famílias com VHL pela presença ou ausência do fenótipo FE, a distribuição do tipo das

mutações altera substancialmente. Enquanto que nas famílias com VHL tipo 1 a maioria das mutações potencialmente causam uma proteína truncada (66%), nas três famílias com VHL tipo 2 as mutações eram do tipo missense (**Figura 18**). A distribuição das mutações na população Brasileira é semelhante às descritas em outras populações (**CHEN et al. 1995b, CROSSEY et al. 1994, FRIEDRICH 2001**).

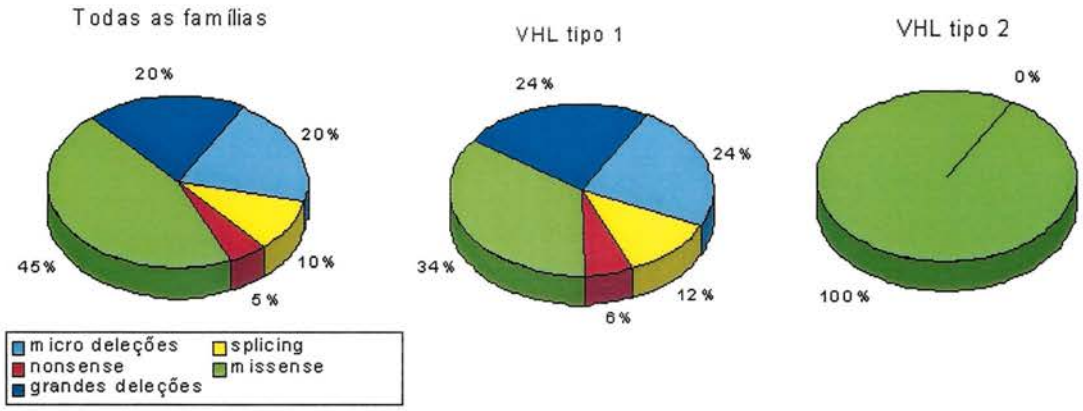


Figura 18 – Distribuição das famílias com VHL de acordo com o tipo de mutação germinativa detectada. Na primeira análise foram incluídas todas as famílias e nas seguintes, as famílias com VHL foram separadas de acordo com a classificação clínica em tipo 1 e tipo 2.

Ao analisarmos a distribuição das 16 mutações pontuais no gene VHL observamos que sete envolveram o exon 1, cinco localizaram-se no exon 2, duas no exon 3 e duas delas em regiões intrônicas em sítios doadores de *splicing* (no intron 1 e no intron 2). Das mutações pontuais, a grande maioria das mutações concentrou-se nos exons 1 (43,7%), seguido do exon 2 (31,3%) e apenas duas mutações ocorreram no exon 3 (12,5%) e em sítios de *splicing* (12,5%). Além disso, os três pacientes com VHL sem história familial apresentaram mutações nos exons 1 e 2. Este achado vai contra o descrito na literatura de que a maioria das mutações germinativas concentram-se principalmente nos exons 1 e 3 do gene VHL (**CHEN et al. 1995b; ZBAR et al. 1996; GLAVAC et al. 1996**).

Nenhuma das 13 mutações pontuais ocorridas em VHL tipo 1 envolveram o exon 3. No entanto, duas das três famílias com VHL tipo 2 (famílias VH11 e VH12) apresentaram mutação *missense* na região de *hot spot* correspondente ao códon 167 e associada ao fenótipo com FE e uma ocorreu no exon 2. Maiores conclusões não

podem ser feitas devido ao limitado número de famílias analisadas. Estas observações podem dever-se ao restrito número de famílias analisadas, mas podem revelar uma tendência peculiar da população Brasileira em relação à distribuição gênica da mutações em VHL.

Quando classificamos separadamente as mutações *missense* ocorridas nas famílias com VHL tipo 1 e tipo 2 estas diferenças ficam mais claras. Das seis mutações *missense* detectadas nas famílias com VHL tipo 1, quatro correspondem a transversões (A>C, T>G, G>C e G>T) e duas a transições T>C. Já nas famílias com VHL tipo 2 as três mutações *missense* correspondem a transições, sendo duas delas C>T e uma G>A. Esta diferença pode estar associada à origem das alterações genéticas entre os tipos de VHL.

O fenótipo global apresentado pelas famílias com VHL, correspondendo ao perfil das manifestações clínicas de VHL, foi obtido com os familiares através de relato verbal, atestado de óbitos, relatórios médicos, laudos anátomo-patológicos e exames radiodiagnósticos, e é mostrado na **Tabela 2**. Nota-se que em algumas famílias a prevalência das lesões relacionadas a VHL varia consideravelmente, refletindo riscos individuais diferentes entre uma e outra família. Em algumas famílias o risco para HB, AR, CR e FE parece ser superior ao risco geral relatado para estes tumores por **MADDOCK et al. (1996)** de 60,2%, 41%, 25,3% e 14,5%, respectivamente. Considerando que o fenótipo familial está relacionado às alterações genotípicas próprias da família, foi avaliada a relação entre o risco de HB, AR, CR e de FE de acordo com a prevalência das lesões por membros afetados em parentes de 1° e 2° grau e o tipo de mutação presente nestas famílias. O alto risco para o desenvolvimento destas lesões foi definido como valores superiores ao risco geral relatado por **MADDOCK et al. (1996)** e é mostrado na **Tabela 4**. Apesar do tamanho da amostra limitar conclusões definitivas, algumas especulações podem ser feitas e são discutidas a seguir.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE BIBLIOTECA

família	n	HB (%)	AR (%)	CR (%)	FE (%)	Tipo de mutação	Exon
VH5	2	50	50	0	0	*missense*	1
VH9	10	70	30	30	0	missense	1
VH16	5	80	60	40	0	*missense*	1
VH22	2	100	0	0	0	*missense*	1
VH4	8	87,5	12,5	12,5	0	*missense*	2
VH14	14	50	14,2	14,2	0	*missense*	2
VH21	1	0	100	0	100	*missense*	2
VH11	4	50	0	0*	75	*missense*	3
VH12	2	50	0	0*	100	*missense*	3
VH6	1	100	0	100	0	*frameshift*	1
VH15	3	33,3	33,3	40	0	*frameshift*	2
VH17	1	100	100	0	0	*frameshift*	2
VH1	5	80	0	40	0	deleção *in frame*	1
VH18	3	66,6	100	0	0	*nonsense*	1
VH10	2	100	0	0	0	*splicing*	-
VH8	5	60	20	20	0	*splicing*	-
VH2	10	100	10	40	0	rearranjo	-
VH3	6	66,6	0	33,3	0	rearranjo	-
VH13	5	40	20	0	0	rearranjo	-
VH20	3	100	0	0	0	rearranjo	-

* alto risco, de acordo com relatos de literatura

Tabela 4 – Prevalência das manifestações clínicas (HB, AR, CR e FE) apresentado nas famílias com VHL (%), de acordo com o tipo de mutação apresentada nestas famílias.

Em uma análise global, 12 famílias com VHL foram consideradas como de alto risco para HB. Destas, quatro apresentavam mutações *missense* (33,3%) e oito (66,7%) outros tipos de mutação. Por outro lado, cinco das oito famílias de baixo risco para HB apresentavam mutações *missense* (62,5%). Três das quatro famílias com rearranjos foram classificadas como de alto risco, corroborando os achados da literatura de que rearranjos envolvendo o gene *VHL* parecem estar associados a uma elevada freqüência de hemangioblastomas do sistema nervoso central (**HES et al. 2000**).

As três famílias com FE associado ao VHL tipo 2 apresentavam baixo risco para HB, AR, porém o pequeno número de pacientes afetados nestas famílias limita a análise. As duas famílias com mutações no códon 167 apresentam alto risco para o desenvolvimento de CR baseado nos relatos de literatura, conforme discutido anteriormente (**CHEN et al. 1995b; CLIFFORD et al. 2001**).

Ao todo, 12 das 20 famílias puderam ser categorizadas como de risco para o desenvolvimento de CR (60%), baseando-se na ocorrência de pelo menos um caso na família ou pelo fenótipo da mutação relatado na literatura, sendo sete delas consideradas como de alto risco (**Tabela 4**). Cinco destas sete famílias com alto risco para CR (71,5%) tinham mutações que potencialmente levam a uma proteína truncada, sugerindo que mutações que causem maiores danos à pVHL estejam associadas a um fenótipo mais agressivo da doença com CR. Este achado está de acordo com a observação feita por **YOSHIDA et al. (2000)**.

Apesar de não haver correlação entre o tipo de mutação e o risco de AR, quatro das cinco famílias com alto risco para AR, bem como cinco das sete famílias com CR também apresentavam alto risco para HB. O alto risco para estas lesões pode estar associado a alterações funcionais comuns da pVHL.

Recentemente, estudos funcionalis da pVHL mutante vem demonstrando que o fenótipo pode estar associado a alterações funcionais específicas próprias da mutação. **CLIFFORD et al. (2001)** correlacionaram os diversos padrões de tumorigênese em VHL com efeitos da regulação da pVHL mutante sobre o HIF-1α e com sua capacidade de interagir e complexar-se com outras proteínas. Mutações associadas com o fenótipo VHL 2C (FE apenas) mantém essas duas atividades; mutações que causam suscetibilidade ao HB (incluindo VHL tipo 1, 2A e 2B) mostram desrregulação sobre o HIF-1α e perda da capacidade de ligação com a fibronectina; e todas as mutações

associadas a CR causaram completa desregulação sobre HIF-1α e perda da capacidade de ligação com a fibronectina. Estudos com linhagens celulares de CR demonstraram que o papel sobre a regulação de HIF é fundamental para a função supressora de tumor do gene *VHL* (**MARANCHIE et al. 2002; KONDO et al. 2002**).

5.8- Teste preditivo nos familiares assintomáticos

O teste preditivo foi oferecido aos familiares assintomáticos dos probandos de cada família com diagnóstico de VHL após a identificação e caracterização da mutação deletéria da família. O estado de portador assintomático foi definido àqueles que apresentavam a mesma mutação deletéria da sua família. O rastreamento genético e clínico de famílias com predisposição ao câncer trouxe benefícios para vários membros com a detecção precoce e tratamento adequado dos tumores.

Foram incluídos no estudo 48 indivíduos assintomáticos considerados como de alto risco por serem familiares diretos (em 1° e 2° grau) de pacientes com VHL. Destes, 44 os testes genéticos foram concluídos para a presença ou ausência da mutação observada na sua família de origem e mais quatro foram incluídos recentemente. Desta análise, foi detectado o estado de portador da mutação em 14 indivíduos e em 30 indivíduos a mutação estava ausente (**Anexo 4**).

Todos os resultados dos testes foram comunicados e entregues para o próprio paciente ou para seu responsável legal durante consulta com o geneticista. No caso das amostras encaminhadas por centros de genética em outras regiões, o resultado foi enviado ao médico responsável pelo acompanhamento dos casos. Como parte integrante do projeto, o aconselhamento genético pós-teste visou o entendimento do resultado do teste, do seu significado e das condutas baseadas na avaliação de risco baseadas no teste preditivo. Os indivíduos portadores da mutação foram estimulados a aderirem ao programa de rastreamento de lesões associadas a VHL, enquanto que os indivíduos com resultados negativos para a mutação foram excluídos de risco para o desenvolvimento de VHL, bem como seus descendentes.

O teste genético serviu para refinar a avaliação de risco genético-clínico dos familiares assintomáticos considerados inicialmente com risco de 50% (para parentes

de 1° grau) e de 25% (para parentes de 2° grau). Os familiares com resultados negativos passaram a ter baixo risco para as lesões relacionadas ao VHL, com o mesmo risco que a população geral. Após o teste, apenas um terço dos pacientes eram portadores da mutação deletéria e continuaram no grupo de alto risco, portanto com risco de 97% de desenvolverem qualquer manifestação de VHL até os 60 anos de idade, baseado na penetrância da doença.

O teste preditivo também foi utilizado para caracterizar a mutação de dois pacientes com VHL sem história familial. Particularmente, o estudo da mãe do paciente VH17A que revelou seu estado de portadora da mutação motivou a re-avaliação de risco para outros membros da família. Neste caso, a irmã do paciente VH17A passou a ser considerada como de alto risco, porém ainda não foi avaliada em consulta.

O balanço custo-benefício do teste genético não foi avaliado, porém levando em consideração o alto custo dos exames de rastreamento clínico, dois terços dos pacientes desta amostra foram excluídos do risco e, portanto foram poupados do custo destes exames. Por outro lado, considerando a capacidade de detecção e do tratamento precoce das lesões através do rastreamento clínico, o teste positivo selecionou uma população "alvo" de alto risco, fazendo com que os exames de rastreamento fossem direcionados para os indivíduos potencialmente com o maior chance de benefício.

5.9- Programa de rastreamento clínico em pacientes com alto risco

O programa de rastreamento clínico recomendado foi instituído no Depto. de Oncogenética do Hospital do Câncer em 1998 para detecção e intervenção precoce das manifestações relacionadas a VHL nos indivíduos de alto risco. Em resumo, exames de imagem e clínicos são realizados periodicamente, como tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM) de crânio e coluna; avaliação oftalmológica com exame do fundo de olho; TC, RM ou ultra-sonografia (US) de abdome total; e dosagem de catecolaminas e ácido vanil-mandélico (VMA) séricos e urinários.

Foram considerados com alto risco para o desenvolvimento de lesões associadas a VHL, tanto pacientes que já apresentaram alguma manifestação da doença (pacientes com VHL), como também portadores assintomáticos de mutação e indivíduos assintomáticos que aguardam o resultado do teste preditivo.

No total, vinte pacientes foram avaliados no programa de rastreamento clínico no Depto. de Oncogenética, sendo 12 pacientes com VHL, seis indivíduos portadores de mutação e dois que aguardam o resultado do teste. O número de rastreamentos anuais para estes indivíduos variou de um a três, dependendo da data da entrada no projeto.

Dos 12 pacientes com VHL, apenas dois pacientes continuam sem lesões novas após um a três anos de rastreamento. Dez pacientes desenvolveram novas lesões associadas à doença. O desenvolvimento de novos cistos renais, pancreáticos ou hepáticos foi o achado mais freqüente sendo observado em cinco pacientes. Os resultados do rastreamento clínico são detalhados na tabela do **Anexo 6**. A seguir, são discutidos os achados e condutas de alguns pacientes:

Dois casos de CR foram diagnosticados em fase inicial. A paciente VH8C apresentou na avaliação abdominal duas massas distintas: uma de cerca de 7cm no rim direito suspeita de malignidade; uma massa caudal pancreática com calcificação central de 7cm sugestivo de cistoadenoma pancreático; além de doença cística acometendo todo o pâncreas. A paciente foi submetida à laparotomia exploradora em novembro de 2000, sendo realizado uma nefrectomia parcial à direita com omentectomia segmentar; e ressecção caudal do pâncreas com esplenectomia (**Figura 19**). O laudo histopatológico confirmou a suspeita das lesões com o diagnóstico de carcinoma de rim tipo células claras e cistoadenoma seroso de pâncreas. As funções renal e pancreática foram preservadas, garantindo a qualidade de vida da paciente. O quadro clínico da paciente VH6A já foi discutido no item **5.1** e é sumarizado na **Figura 20**.

O paciente VH16A, além do quadro já discutido no item **5.1**, apresentou um HB espinhal na região cervical e está em acompanhamento clínico. Em outros pacientes foram detectados HB cerebelares (VH2A e VH8B) e HB espinhal (VH4A). A paciente VH8B foi submetida a uma neurocirurgia sem intercorrências e não apresentou qualquer déficit neurológico. Os pacientes VH4A e VH2A estão em acompanhamento das lesões.

As pacientes VH4C e VH13A apresentaram pequenos AR tratados com laser sem qualquer seqüela do procedimento.

Dos oito indivíduos assintomáticos de alto risco acompanhados no Depto. de Oncogenética em programa de rastreamento, quatro permanecem sem sinais da doença e quatro apresentaram lesões associadas a VHL. A paciente VH4D apresentou HB cerebelar e HB cerebral ambos tratados com radiocirurgia, além de novos cistos renais. Cistos renais e pancreáticos surgiram nos pacientes VH3B e VH8D. Na paciente VH3C foi detectado por TC um HB espinhal completamente assintomático; a conduta está sendo avaliada por um neurocirurgião.

Os métodos de detecção mostraram-se úteis e de grande sensibilidade para o diagnóstico precoce das lesões. Nenhuma das lesões detectadas causavam qualquer sintoma. O impacto do programa de rastreamento será discutido a seguir.

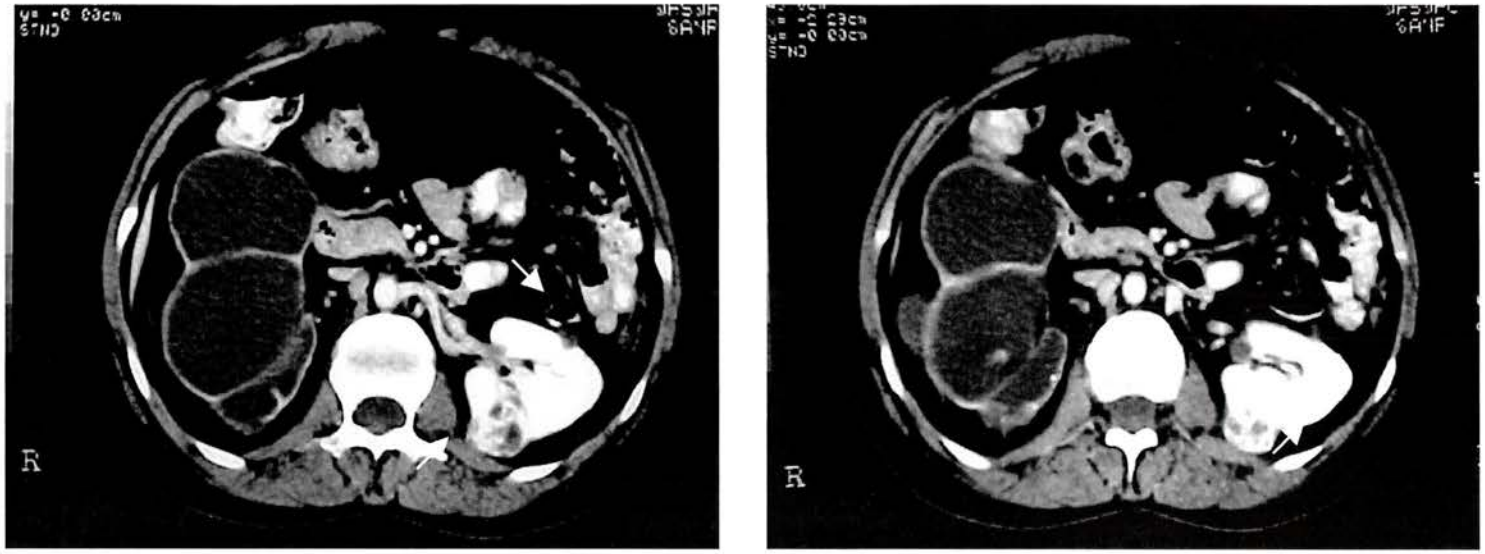


Figura 19 – Tomografia computadorizada de Abdome da paciente VH6. A seta mostra duas lesões renais de 3,0cm e 1,0cm respectivamente, a primeira de conteúdo misto (sólido e cístico) e a segunda sólida, observadas no acompanhamento da paciente pelo programa de rastreamento. As lesões foram ressecadas e laudo anatomopatológico foi de carcinoma renal tipo células claras.

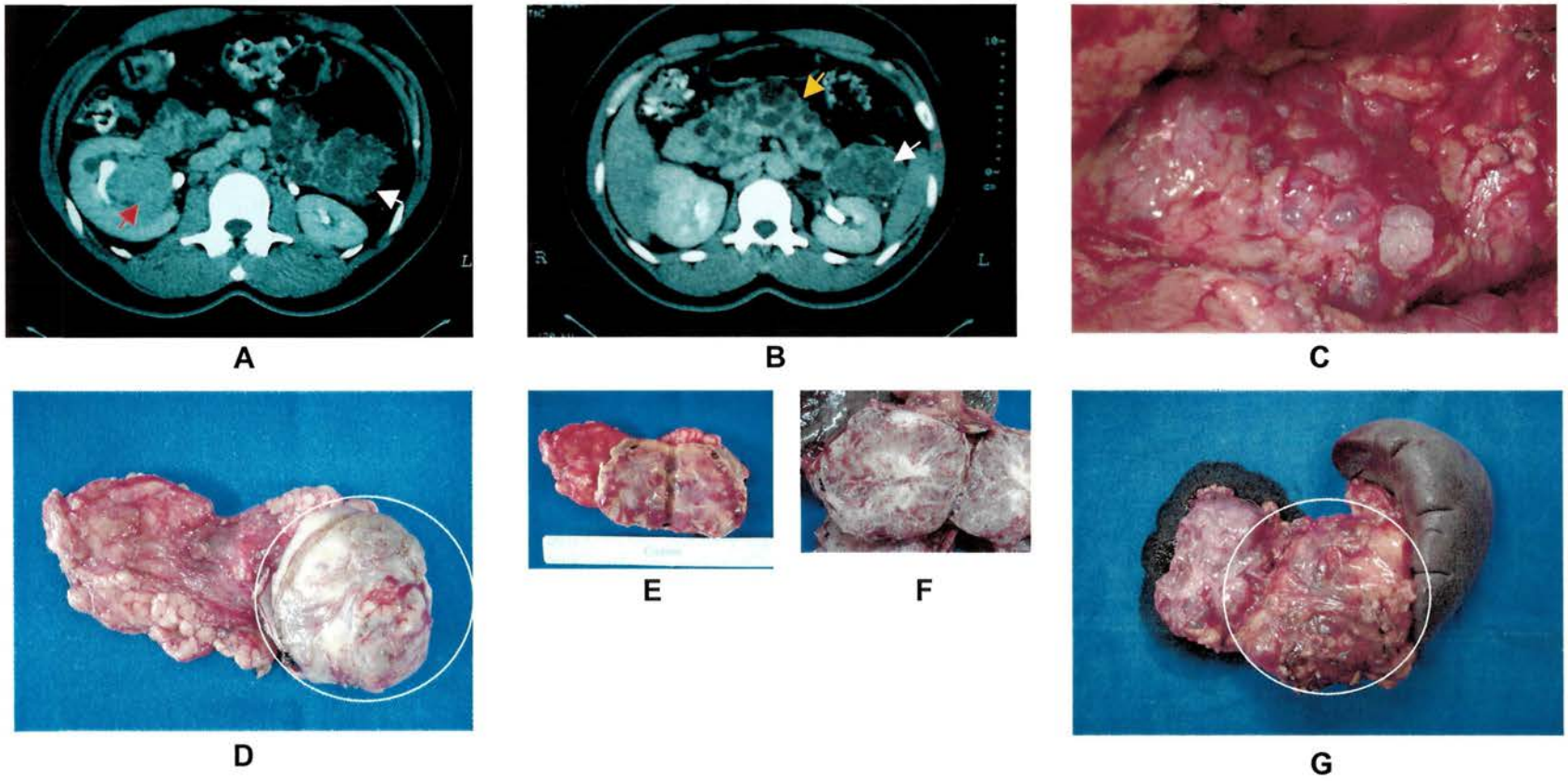


Figura 20 – O rastreamento clínico da paciente VH8C permitiu o diagnóstico de lesões pré-sintomáticas e seu tratamento adequado. A – TC abdome mostrando em detalhe o tumor renal (seta vermelha) e o tumor pancreático (seta branca). B – TC abdome mostrando em detalhe a doença cística pancreática (seta amarela) e o tumor pancreático (seta branca). C – Aspecto multicístico do pâncreas durante a cirurgia. D – Peça operatória: nefrectomia total e epiplon. E – O carcinoma renal é mostrado em detalhe. F – O cistoadenoma pancreático é mostrado em detalhe. G – Peça operatória: pancreatectomia caudal e esplenectomia.

5.10- Impacto do rastreamento clínico e molecular na história natural da doença

Os achados da autópsia do pai dos indivíduos VH1A e VH1B, descritos no item **5.1** revelam claramente o espectro variado de manifestações clínicas da doença de VHL em um indivíduo completamente assintomático até os 37 anos e a elevada morbidade e mortalidade nos pacientes com VHL que seguem a história natural da doença. Do mesmo modo, três pacientes com VHL faleceram no período do estudo por complicações da doença em decorrência dos seus diagnósticos tardios. Duas mortes foram causadas por CR metastático (VH3A e VH9D) e uma causada indiretamente por HB espinhal por complicações infecciosas após paraplegia. Adicionalmente, o paciente VH16A apresenta CR metastático e está em tratamento paliativo. Todos estes quadros poderiam ter sido evitados ou pelo menos minimizados se o diagnóstico e a intervenção tivessem sido precoces.

Outro aspecto mórbido da doença pôde se observado na família VH2 cujas causas de óbito mudaram das gerações mais antigas para as mais recentes. Isso pode ser explicado em parte pelas dificuldades no diagnóstico e tratamento das lesões associadas ao VHL. Nas gerações atuais, os avanços dos métodos de imagem e das técnicas de neurocirurgia mudaram o curso da evolução natural dos HB, no entanto o CR emergiu como uma importante causa de morbidade e de mortalidade, com diagnósticos tardios e em estadio avançado.

O programa de rastreamento e o diagnóstico molecular permitiram um avanço ainda maior na evolução clínica dos indivíduos susceptíveis, com impacto na morbidade e na mortalidade da doença, como pôde ser demonstrado nos pacientes de alto risco deste estudo. O aconselhamento genético trouxe o entendimento da doença e contribui para a qualidade de vida dos pacientes e seus familiares.

A alta taxa de detecção de mutação fez do teste genético um instrumento valioso para o diagnóstico molecular de VHL nos casos em que os critérios clínicos não foram preenchidos. No caso do paciente VH5A o teste genético foi importante no caso de história familial insuficiente, desde que a mãe do paciente era adotiva e a

causa do óbito não foi confirmada. Na paciente VH6A, sem história familial, o diagnóstico molecular antecedeu o critério diagnóstico clínico de VHL.

Com a taxa de detecção de mutação virtualmente de 100%, um resultado em que não foi encontrada mutação torna o risco muito baixo para a alteração genética. O teste genético levou ao questionamento do diagnóstico de VHL nas famílias VH7 e VH19 que posteriormente foram diagnosticadas com outras síndromes genéticas que mimetizaram VHL.

Em VHL, algumas características genéticas e moleculares próprias da doença contribuem para este alto índice de detecção de mutação: a doença é monogênica, dominante e de penetrância quase completa até os 60 anos de idade; o gene *VHL* possui apenas três exons facilitando o diagnóstico molecular; as mutações até hoje descritas estão restritas às regiões codificantes do gene e de emendas (*sítios de splicing*).

Em contra partida, o teste genético pode ser uma arma com conseqüências desastrosas e imprevisíveis se oferecidos sem o contexto do aconselhamento genético e com apoio de uma equipe multidisciplinar. O estresse psicológico é uma situação comum com testes genéticos e precisam de detecção precoce e de intervenção rápida para que não ganhem dimensões maiores. Algumas situações observadas neste estudo serão discutidas no item **5.11**.

O teste genético pode revelar alterações genéticas de significado biológico indeterminado. Por isso, é fundamental que testes de susceptibilidade em geral estejam ligados a instituições de pesquisa para caracterização da mutação e dos seus efeitos estruturais e funcionais.

Recentemente, a paciente VH4C engravidou acidentalmente e mesmo sabendo do risco para o seu filho deseja a gravidez e está muito feliz. O valor do teste no diagnóstico pré-natal é questionado, desde que não resulta em uma conduta médica de abortamento, haja vista a adaptabilidade e a qualidade de vida do paciente com VHL nos dias atuais. Talvez no futuro, as técnicas de diagnóstico molecular em célula única possibilitem o diagnóstico pré-implantacional. Para isso, as questões éticas e jurídicas precisam ser discutidas desde já.

5.11- Notas sobre os aspectos psicológicos e sociais

Embora a avaliação do impacto psicológico e social não tenha sido mensurada com instrumentos de avaliação apropriados, algumas observações sobre as famílias diretamente acompanhadas no Depto. de Oncogenética devem ser comentadas:

a- O teste genético oferecido dentro de um programa de aconselhamento genético e com uma equipe multidisciplinar foi bem aceito e contribuiu para o entendimento da doença e para a percepção de risco do próprio paciente e de seus familiares. No entanto, alguns pacientes com VHL, mesmo esclarecidos sobre seu diagnóstico clínico, viram o teste genético como o diagnóstico definitivo da sua doença. Um caso extremo foi o da paciente VH2A que é discutido abaixo no item **f**.

b- Os pacientes que já apresentavam manifestações da síndrome tenderam a aceitar o resultado do teste com menor estresse psicológico, embora questionamentos de culpa por terem transmitido a doença para seus descendentes tenham surgido ocasionalmente.

c- Os familiares assintomáticos tenderam a ficar ansiosos desde o momento da coleta do sangue para o teste preditivo. A redução do tempo até o resultado do exame, inicialmente de alguns meses para atualmente de uma a duas semanas, foi importante para reduzir o estresse gerado pelo teste nestes indivíduos.

d- Em dois familiares assintomáticos (VH14B e VH16B) o impacto psicológico do resultado positivo para presença da mutação foi maior, gerando grande ansiedade, angustia ou estado depressivo reativo temporário. Ambas as pacientes já estavam em acompanhamento psicológico e mantiveram o suporte psicológico após o resultado. Uma delas (VH14B) foi reavaliada recentemente, não se sente deprimida e continua com rastreamento clínico negativo. A paciente VH16B está realizando os exames de rastreamento e preocupa-se com sua filha que ainda não foi testada.

e- A dificuldade de acesso aos centros especializados de genética foi um fator limitante para o estudo de alguns familiares, além do desinteresse, da desinformação e talvez do medo do diagnóstico da doença.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE BIBLIOTECA

f- Não houve casos de recusa do teste genético quando este foi indicado pelo geneticista. No entanto, dois pacientes do estudo recusaram saber o resultado do teste genético. A paciente VH2A (com diagnóstico de VHL) recusou o teste no momento em que foi informada que o seu resultado estava disponível. Esta paciente apresentava um tumor renal que necessitava de investigação cirúrgica e já recusava anteriormente o procedimento indicado por seu urologista. Apesar de estar em acompanhamento psicoterápico, não admitia em nenhum momento o diagnóstico da doença, negando qualquer rastreamento clínico. A paciente após dois anos apresentou sintomas neurológicos decorrentes de HB cerebelar sendo submetida à neurocirurgia em 2001. O outro caso foi o do menor VH14 D assintomático de 3 anos de idade, cuja mãe (VH14A) recusou-se receber o resultado do teste preditivo até apresentar condições psicológicas de lidar com um possível resultado positivo. A paciente VH14A justificou que se sentiu abalada com o resultado da sua filha portadora (VH14B).

g- Um paciente VH16A apresentou depressão e leucopenia grave durante o tratamento paliativo com interferon-alfa e quimioterapia que só melhoraram com sua interrupção. Após algumas semanas do término do tratamento o paciente começou um processo de negação da doença dizendo-se curado e apresentou distúrbio de comportamento notado por seus familiares. O paciente está sendo acompanhado pelo Depto. de Psiquiatria do Hospital do Câncer. O quadro não teve relação com o teste genético que foi muito bem aceito na época pelo paciente.

h- O teste positivo nos familiares assintomáticos contribuiu para a aderência ao programa de rastreamento clínico. Mesmo esclarecidos do alto risco, vários familiares só iniciaram o rastreamento após o resultado do teste genético.

i- O teste genético quando negativo para mutação da família trouxe alívio e alegria para todos os membros testados e também para seus familiares. Estes indivíduos puderam descontinuar o seguimento, mas mesmo assim continuaram envolvidos com o problema familiar, tornando-se grandes incentivadores dos seus familiares de alto risco para a aderência ao acompanhamento genético-clínico.

Este estudo mostrou que uma abordagem psicológica especializada é fundamental no processo de aconselhamento genético em todas as suas etapas e que

o impacto psicológico causado pelo teste genético é não apenas resultado de características individuais, mas também depende do contexto e do momento em que o teste é oferecido. Este estudo também mostra que é importante avaliar prospectivamente o impacto psicológico e social nos estudos de predisposição genética e que este campo precisa ser mais explorado no nosso meio.

5.12- Aspectos clínicos da doença de VHL no Brasil

A incidência e a prevalência das principais lesões associadas a VHL foram avaliadas neste estudo para conhecer o perfil clínico da doença no Brasil. Foram incluídos nesta análise 49 indivíduos submetidos ao teste genético cujos dados clínicos puderam ser comprovados por relatório médico, atestado de óbito ou exame complementar, incluindo as lesões detectadas pelos exames de rastreamento clínico. Destes, 35 eram pacientes com diagnóstico de VHL à entrada do estudo e 14 indivíduos eram portadores assintomáticos de mutação. As idades dos pacientes ao diagnóstico de HB, AR e CR foram registradas em uma planilha para análise (**Tabela 5**).

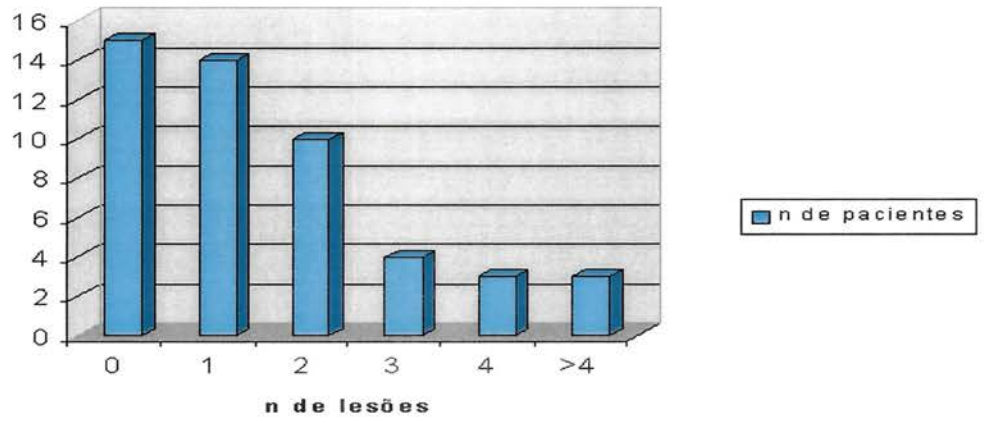


Figura 21 – Distribuição do número (n) de lesões associadas ao VHL, excluindo-se as lesões císticas, nos 49 indivíduos avaliados.

Paciente	n	HB	AR	CiP	CiR	CiE	CiH	Feo	AdR	AdP	CR	TNEP	CP	outros	VHL tipo	Id atual	OBS
VH1A	ASS	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		1	13	
VH2A	VHL	31	NA	31	31	NA	neg	neg	neg	neg	29	neg	neg		1	32	
VH3A	VHL	neg	neg	59	59	NA	neg	neg	neg	neg	59	neg	neg		1	59	óbito
VH3D	VHL	50, 57	neg	37	37	NA	neg	neg	49, 60	neg	37	neg	neg		1	63	
VH3E	VHL	13, 13	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		1	32	
VH4A	VHL	43	neg	43	43	NA	neg	neg	neg	neg	43, 43	neg	neg		1	46	
VH4B	VHL	30, 39	neg	neg	45	NA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		1	47	óbito
VH4C	VHL	20, 21	19, 22	21	neg	NA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		1	23	
VH4D	ASS	22*	neg	21	21, 22*	NA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		1	22	
VH4E	ASS	neg	neg	neg	neg	NA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		1	16	
VH5A	VHL	neg	13	13*	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		1	14	
VH6A	VHL	10	neg	34	34	NA	neg	neg	neg	42*	40	neg	neg	CiO,CiM	1	42	
VH8A	ASS	NA	neg	neg	neg	NA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		1	9	
VH8B	VHL	28, 34	18	neg	33	NA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		1	35	
VH8C	VHL	28	neg	39	neg	NA	neg	neg	neg	39*	39*	neg	neg	ASR*	1	41	
VH8D	ASS	neg	neg	30*	30*	NA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		1	31	
VH9A	VHL	22	neg	neg	33	NA	neg	neg	neg	neg	33	neg	neg		1	36	
VH9B	VHL	44	NA	64	64	64	neg	neg	neg	neg	64	neg	neg		1	66	
VH9C	VHL	49	24	50	neg	NA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	ASR	1	51	
VH9D	VHL	49, 49	25	49	49	neg	neg	neg	neg	neg	49	neg	neg		1	50	óbito
VH9E	VHL	neg	6	neg	neg	6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		1	21	
VH9L	ASS	NA	neg	neg	neg	NA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		1	19	
VH9P	ASS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		1	9	
VH10A	VHL	54	neg	54	54	NA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		1	56	
VH10B	VHL	14	neg	14	neg	NA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		1	16	
VH11A	VHL	26	neg	neg	neg	NA	neg	18	neg	neg	neg	neg	neg		2	37	
VH11B	VHL	neg	neg	neg	neg	NA	neg	26	neg	neg	neg	neg	neg		2	38	
VH11E	VHL	23	neg	neg	38	NA	neg	37	neg	neg	neg	neg	neg		2	41	
VH11G	ASS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		2	13	
VH12A	VHL	30	neg	neg	neg	NA	neg	33	neg	neg	neg	neg	neg		2	37	
VH12B	VHL	neg	neg	neg	neg	NA	neg	17	neg	neg	neg	neg	neg		2	35	
VH13A	VHL	neg	57	56	56	NA	neg	neg	neg	56	neg	neg	neg		1	57	
VH13B	VHL	neg	neg	70	70	NA	70	neg	neg	70	neg	neg	neg		1	86	
VH13E	ASS	neg	neg	neg	neg	NA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		1	30	
VH14A	VHL	neg	neg	34	34	NA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		1	40	
VH14B	ASS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		1	17	
VH14D	ASS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		1	4	
VH15A	VHL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	54	NA	NA		1	56	
VH15B	VHL	29	neg	neg	neg	NA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		1	32	
VH15C	ASS	neg	neg	neg	neg	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		1	7	
VH15D	VHL	neg	27	neg	neg	NA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		1	30	
VH16A	VHL	42, 46	39	41	41	43	41	neg	neg	neg	41, 46	neg	neg	AstC,SemT	1	46	
VH16B	ASS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		1	54	
VH17A	VHL	11,15,23.26,29	14	27	27	NA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		1	30	
VH17B	ASS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		1	53	
VH18A	VHL	23	25	23	23	NA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		1	29	
VH20A	VHL	22	neg	22	neg	NA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		1	24	
VH21A	VHL	NA	28	NA	NA	NA	NA	28	NA	NA	NA	NA	NA		2A	28	
VH22A	VHL	30	neg	30	neg	NA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		1	31	

Tabela 5 – Incidência e prevalência das lesões em 49 pacientes selecionados. São detalhadas as idades dos diagnósticos das lesões.

Tabela 5 – Incidência e prevalência das lesões em 49 pacientes selecionados. São detalhadas as idades do diagnóstico das lesões.

Cistos (renais, pancreáticos e hepáticos) foram os achados clínicos mais freqüentes, afetando 27 dos 41 pacientes avaliáveis (65,8%), porém todas as lesões eram assintomáticas. A co-existência de lesões císticas ocorreu em 17 destes pacientes. O HB foi a segunda lesão mais freqüentemente diagnosticada neste grupo, afetando 25 de 40 pacientes avaliáveis (62,5%), seguido do AR (12 em 39 pacientes avaliáveis, ou 30,7%), do CR (11 em 40 pacientes avaliáveis, ou 27,5%), FE (seis em 40 pacientes avaliáveis, ou 15%) e tumores pancreáticos (4 em 40 pacientes avaliáveis, ou 10%).

No total, 76 lesões diferentes, excluindo-se as lesões císticas, foram observadas nos 49 indivíduos analisados, com média de 1,5 por indivíduo. A co-existência de lesões foi observada em um grande número dos pacientes afetados, variando de uma até sete lesões por paciente. A distribuição do número de lesões por paciente é mostrada na **Figura 21**.

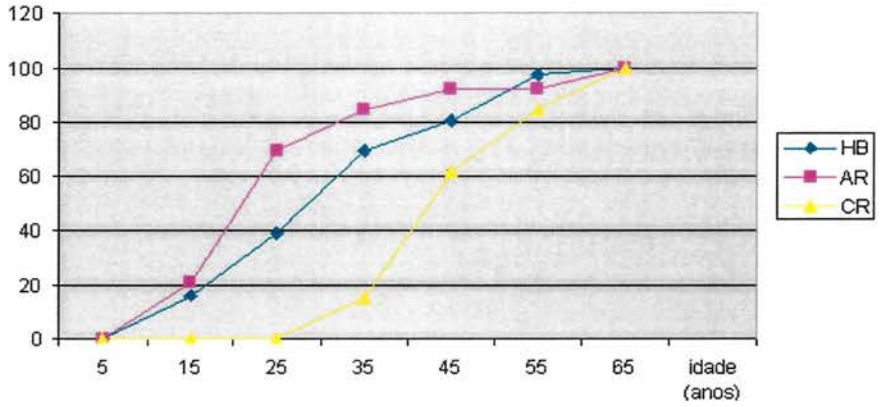
Manifestação clínica	No de pacientes afetados (%)	Idade média ao diagnóstico	1ª manifestação de VHL (%)
HB	25 (62,5)	30	44,1
AR	12 (30,7)	24	23,5
CR	11 (27,5)	44	11,7
FE	6 (15,0)	27	14,8

Tabela 6 – Freqüência das lesões nos pacientes com VHL, a idade média do diagnóstico das lesões e freqüência das lesões como primeira manifestação de VHL.

A média de idade do diagnóstico foi de 30 anos para HB (variando dos 10 aos 57 anos), 24 anos para AR (dos seis aos 57 anos), 44 anos para CR (29 aos 64 anos) e 27 anos para FE (17 aos 37 anos), conforme mostrado na **Tabela 6**. O HB foi o primeiro diagnóstico em 15 pacientes (44,1%), o AR foi a primeira manifestação da doença em oito pacientes (23,5%), o CR em 4 pacientes (11,7%), FE em cinco pacientes (14,8%) e tumores pancreáticos em apenas dois pacientes (5,9%). No entanto, se avaliarmos separadamente o grupo de pacientes com VHL tipo 2, o diagnóstico de FE foi a primeira manifestação da doença em 83,3% dos casos.

A distribuição das lesões de acordo com a idade do diagnóstico é mostrada na ***Figura 22***. O diagnóstico de FE não foi incluído devido ao restrito número de casos.

Lesões multicêntricas sincrônicas num mesmo órgão foram registradas como uma única lesão para evitar desvios da análise, enquanto que lesões metacrônicas foram registradas individualmente. Cinqüenta e nove lesões ocorreram nos 49 indivíduos.



	0 até 5	6 até 15	16 até 25	26 até 35	36 até 45	46 até 55	56 até 65
HB (36)	0	6	8	11	4	6	1
AR (13)	0	3	6	2	1	0	1
CR (11)	0	0	0	2	6	3	2

Figura 22 – Distribuição das lesões oculares (AR), do sistema nervos central (HB) e do carcinoma renal (CR) ocorridas nos pacientes com VHL.

Com pode ser observado no gráfico, a faixa etária de maior incidência de HB foi entre 26 e 35 anos, enquanto que no AR foi mais precoce (entre 16 e 25 anos) e mais tardia no CR (entre 36 e 45 anos). Em relação ao CR esporádico, cuja incidência é maior a partir dos 50 anos, o CR associado à doença de VHL tendeu a ocorrer em idade mais precoce e freqüentemente era múltiplo ou bilateral.

Em um paciente com VHL (VH16A) foi constatada através de laudos anátomo-patológicos a ocorrência de astrocitoma cerebelar e de seminoma de testículo em associação com outras manifestações de VHL, como HBs cerebelares e espinhal, AR, CR bilateral e cistos múltiplos (renais, pancreáticos, de epidídimo e hepático). Apesar de associações com lesões fora do espectro das manifestações clínicas de VHL serem consideradas coincidentes em vista da raridade de relatos na literatura (**HORTON et al. 1976; BECKER et al. 1993**), os tumores desenvolvidos neste mesmo paciente são considerados raros e o papel do gene *VHL* na tumorigênese deveria ser investigado.

6 – CONCLUSÕES FINAIS

A taxa de detecção de mutação germinativa de 100% obtida neste estudo tornou o Brasil o terceiro país a alcançar esta marca, depois dos EUA (Stolle) e da Itália (relato verbal da Dra. Alessandra Murgia). A possibilidade de diagnosticar virtualmente todas as mutações no gene *VHL* permitiu o diagnóstico molecular da doença de todos os casos, mesmo faltando critérios clínicos sindrômicos.

Os estudos clínicos e moleculares mostraram que a doença de VHL no Brasil tem aspectos muito semelhantes ao resto do mundo no que tange ao espectro das manifestações clínicas e aos tipos de mutação germinativa. No entanto, um padrão de distribuição das mutações pontuais concentradas nos exons 1 e 2 do gene *VHL* (81,2% dos casos) podem indicar diferenças peculiares da população Brasileira. Oito mutações germinativas nunca descritas anteriormente também foram detectadas nas famílias Brasileiras. Isto poderia ser explicado pela origem étnica da nossa população e da alta miscigenação das nossas raças, predominantemente de origem portuguesa, mas também africana, ameríndia e tantas outras que povoaram nosso país. Uma análise mais abrangente da doença no Brasil será necessária para confirmação destes achados.

Desde o início do projeto criou-se um banco de dados sobre a doença no Brasil. A colaboração de outros centros de genética do país tornou possível a criação de um Registro Brasileiro de VHL. Baseado nos dados de incidência da doença em outras populações são estimados que existam mais de 150 famílias com VHL no Brasil.

Este estudo revelou a dificuldade de diagnóstico desta doença, não só pela sua raridade, mas também pela sua diversidade de apresentações clínicas que dificultam o seu reconhecimento médico. Por outro lado, a falta do diagnóstico médico de um paciente com VHL inviabiliza a detecção e o tratamento precoce de lesões nos familiares e de casos novos. A divulgação do projeto com aulas e palestras em instituições de ensino e congressos contribuiu para aumentar o diagnóstico de VHL pelos médicos.

O diagnóstico diferencial com VHL em duas famílias revelou que outras morbidades podem simular o diagnóstico de VHL. Recentemente, **MCNEIL et al. (2001)** mostraram que foram induzidos ao diagnóstico de VHL em uma adolescente com quadro de ataxia espino-cerebelar do tipo 2 cuja mãe apresentava VHL A

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE BIBLIOTECA

síndrome de hemangioma cavernoso familial foi outro diagnóstico diferencial de VHL estabelecido neste estudo.

Ao final do projeto, foi realizado no dia 25/04/2002 o 1° Encontro Brasileiro de Famílias com VHL, no Hospital do Câncer A.C. Camargo. Este evento reuniu famílias com VHL, interessados e profissionais de saúde e contou com a presença da Presidente da VHL Family Alliance, Joyce Graff. Foram realizadas palestras educativas e discutidos aspectos de interesse do público sobre a doença, tratamento e prevenção. O momento de confraternização das famílias mostrou que por trás desta doença tão mórbida, existe muita esperança e vontade de viver.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Astuti D, Douglas F, Lennard TWJ, et al. Germline SDHD mutation in familial phaeochromocytoma. (Research letter) **Lancet** 2001; 375:1181-2.

Atuk NO, McDonald T, Wood T, et al. Familial pheochromocytoma, hypercalcemia, and von Hippel-Lindau disease. A ten year study of a large family. **Medicine (Baltimore)** 1979; 58(3):209-18.

Bar M, Friedman E, Jakobovitz O, et al. Sporadic phaeochromocytomas are rarely associated with germline mutations in the von Hippel-Lindau and RET genes. **Clin Endocrinol** 1997; 47:707-12.

Becker R, Bauer BL, Mennel HD, et al. Cerebellar primitive neuroectodermal tumor with multipotent differentiation in a family with von Hippel-Lindau disease. **Clin Neuropathol** 1993; 12:107-11.

Bender BU, Gutsche M, Glasker S, et al. Differential genetic alterations in von Hippel-Lindau syndrome-associated and sporadic pheochromocytomas. **J Clin Endocrinol Metab** 2000; 85:4568-74.

Blankenship C, Naglich JG, Whaley JM, Seizinger B, Kley N. Alternate choice of initiation codon produces a biologically active product of the von Hippel Lindau gene with tumor suppressor activity. **Oncogene** 1999; 18:1529-35.

Bradley JF, Collins DL, Schimke RN, Parrott HN, Rothberg PG. Two distinct phenotypes caused by two different missense mutations in the same codon of the VHL gene. **Am J Med Genet** 1999; 87(2):163-7.

Brauch H, Kishida T, Glavac D, et al. von Hippel-Lindau (VHL) disease with pheochromocytoma in the Black Forest region of Germany: evidence for a founder effect. **Hum Genet** 1995; 95:551-6.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Astuti D, Douglas F, Lennard TWJ, et al. Germline SDHD mutation in familial phaeochromocytoma. (Research letter) **Lancet** 2001; 375:1181-2.

Atuk NO, McDonald T, Wood T, et al. Familial pheochromocytoma, hypercalcemia, and von Hippel-Lindau disease. A ten year study of a large family. **Medicine (Baltimore)** 1979; 58(3):209-18.

Bar M, Friedman E, Jakobovitz O, et al. Sporadic phaeochromocytomas are rarely associated with germline mutations in the von Hippel-Lindau and RET genes. **Clin Endocrinol** 1997; 47:707-12.

Becker R, Bauer BL, Mennel HD, et al. Cerebellar primitive neuroectodermal tumor with multipotent differentiation in a family with von Hippel-Lindau disease. **Clin Neuropathol** 1993; 12:107-11.

Bender BU, Gutsche M, Glasker S, et al. Differential genetic alterations in von Hippel-Lindau syndrome-associated and sporadic pheochromocytomas. **J Clin Endocrinol Metab** 2000; 85:4568-74.

Blankenship C, Naglich JG, Whaley JM, Seizinger B, Kley N. Alternate choice of initiation codon produces a biologically active product of the von Hippel Lindau gene with tumor suppressor activity. **Oncogene** 1999; 18:1529-35.

Bradley JF, Collins DL, Schimke RN, Parrott HN, Rothberg PG. Two distinct phenotypes caused by two different missense mutations in the same codon of the VHL gene. **Am J Med Genet** 1999; 87(2):163-7.

Brauch H, Kishida T, Glavac D, et al. von Hippel-Lindau (VHL) disease with pheochromocytoma in the Black Forest region of Germany: evidence for a founder effect. **Hum Genet** 1995; 95:551-6.

Brauch H, Kishida T, Glavac D, Lernam MI, Zbar B, Neumann HPH, et al. von Hippel-Lindau disease with pheochromocytoma in the Black Forest region in Germany. Evidence for a founder effect. **Hum Genet** 1995; 95:551-6.

Brauch H, Weirich G, Brieger J, et al. VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. **Cancer Res** 2000; 60:1942-8.

Brooks KA. Cancer risk assessment in the community practice setting. **J S C Med Assoc** 1998; 94:251-3.

Chambers TP, Fishman EK, Hruban RH. Pancreatic metastases from renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau disease. **Clin Imaging** 1997; 21:40-2

Chatha RK, Johnson AM, Rothberg PG, et al. Von Hippel-Lindau disease masquerading as autosomal dominant polycystic kidney disease. **Am J Kidney Dis** 2001; 37:852-8

Chen F, Kishida T, Duh FM, et al. Suppression of growth of renal carcinoma cells by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. **Cancer Res** 1995a; 55:4804-07.

Chen F, Kishida T, Yao M, et al. Germline mutations in von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype. **Hum Mutat** 1995b; 5:66-75.

Choyke PL, Glenn GM, Walther MM, et al. von Hippel-Lindau disease: genetic, clinical and imaging features. **Radiology** 1995; 194:629-42.

Church GM, Gilbert W. Genomic sequencing. **Proc Natl Acad Sci USA** 1984; 81:1991-5.

Clifford SC, Cockman ME, Smallwood AC, et al. Contrasting effects on HIF-1alpha regulation by disease-causing pVHL mutations correlate with patterns of tumourigenesis in von Hippel-Lindau disease. **Hum Mol Genet** 2001; 10(10):1029-38.

Clifford SC, Prowse A, Affara NA, et al. Inactivation of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene and allelic losses at chromosome arm 3p in primary renal cell carcinoma: evidence for a VHL-independent pathway in clear cell renal tumourigenesis. Genes Chromosomes **Cancer** 1998; 22:200-9.

Clinical Research Group for VHL in Japan. Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in Japanese VHL. **Hum Mol Genet** 1995; 4(12):2233-7.

Cohen AJ, Li FP, Berg S, et al. Hereditary renal-cell carcinoma associated with a chromosomal translocation. **N Eng J Med** 1979; 301: 592-5.

Collins ET. Intra-ocular growth (two cases, brother and sister, with peculiar vascular new growth, probably retinal, affecting both eyes). **Trans Ophthalmol Soc** 1894; 14:141-9.

Conway JE, Chou D, Clatterbuck RE, et al. Hemangiolblastomas of the central nervous system in von Hippel-Lindau syndrome and sporadic disease. **Neurosurgery** 2001; 48:55-63.

Crossey PA, Eng C, Ginalska-Malinowska M, et al. Molecular genetic diagnosis of von Hippel-Lindau disease in familial phaeochromocytoma. **J Med Genet** 1995; 32:885-6.

Crossey PA, Richards FM, Foster K, et al. Identification of intragenic mutations in the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and correlations with disease phenotype. **Hum Molec Genet** 1994; 3:1303-8.

Cushing H, Bailey P. Hemangiomas of cerebellum and retina (Lindau's disease), with a report of a case. **Arch Ophthalmol** 1928; 57:447-63.

Decker HJ, Neuhaus C, Jauch A, et al. Detection of a germline mutation and somatic homozygous loss of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene in a family with a de novo mutation. A combined genetic study, including cytogenetics, PCR/SSCP, FISH, and CGH. **Hum Genet** 1996; 97:770-6.

Duan DR, Pause A, Burgess WH, et al. Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein. **Science** 1995; 269:1402-6.

Ellis LA, Taylor CF, Taylor GR. A comparison of fluorescent SSCP and denaturing HPLC for high throughput mutation scanning. **Hum Mutat**. 2000; 15(6):556-64.

Fill WL, Lamiell JM, Polk NO. Radiographic manifestations of von Hippel-Lindau disease. **Radiology** 1979; 133:289-95.

Filling-Katz MR, Choyke PL, Oldfield E, et al. Central nervous system involvement in von Hippel-Lindau disease. **Neurology** 1991; 41:41-6.

Flamme I, Krieg M, Plate KH. Up-regulation of vascular endotelial growth factor in stromal cells of hemangioblastomas is correlated with up-regulation of the transcription factor HRF/HIF 2α. **Am J Pathol** 1998; 153:25-9.

Friedrich CA. Genotype-phenotype correlation in von Hippel-Lindau syndrome. **Hum Mol Genet** 2001;10:763-7.

Gasker S, Bender BU, Apel TW, et al. The impact of molecular genetic analysis of the VHL gene in patients with haemangioblastomas of the central nervous system. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 1999; 67:758-62.

Garcia A, Matias-Guiu X, Cabezas R, et al. Molecular diagnosis of von Hippel-Lindau disease in a kindred with a predominance of familial phaeochromocytoma. **Clin Endocrinol** 1997; 46:359-63.

Genetic counseling. **Am J Hum Genet** 1975; 27:240-2.

Ginzburg BM, Montanera WJL, Tyndel FJ, et al. Diagnosis of von Hippel-Lindau disease in a patient with blindness resulting from bilateral optic nerve hemangioblastomas. **AJR** 1992; 159:403-5.

Glavac D, Neumann HPH, Chen F, et al. Mutations in the VHL tumor suppressor gene and associated lesions families with von Hippel-Lindau disease from central Europe. **Hum Genet** 1996; 98:271-80.

Glenn GM, Choyke PL, Zbar BH, et al. Von Hippel-Lindau disease: clinical aspects and molecular genetics. In: Anderson EE. editor. **Problems in urologic surgery: benign and malignant tumors of the kidney.** Philadelphia: Lippincott & Willians, 1990; 312-337.

Glenn GM, Linehan WM, Hosoe S, et al. Screening for von Hippel-Lindau by DNA polymorfism analysis. **JAMA** 1992; 67:1226-31.

Gnarra JR, Ward JM, Porter FD, et al. Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997; 94(17): 9102-7.

Gnarra JR, Zhou S, Merrill MJ, et al. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor suppressor gene. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93(20):10589-94.

Gnarra JR, Tory K, Weng Y, et al. Mutationa of the VHL tumor suppressor gene in renal carcinoma. **Nat Genet** 1994; 7:85-90.

Goodman MD, Goodman BK, Lubin MB, et al. Cytogenetic characterization of renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau syndrome. **Cancer** 1990; 65:1150-4.

Goto T, Nishi T, Kunitoku N, et al. Suprasellar hemangioblastoma in a patient with von Hippel-Lindau disease confirmed by germline mutation study: case report and review of the literature. **Surg Neurol** 2001; 56:22-6.

Hammel PR, Vilgrain V, Terris B, et al. Pancreatic involvement in von Hippel-Lindau disease. The Groupe Francophone d'Etude de la Maladie de von Hippel-Lindau. **Gastroenterology** 2000; 119:1087-95.

Herman JG, Latif F, Weng Y, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1994; 91:9700-4.

Hes F, Zewald R, Peeters T, et al. Genotype-phenotype correlations in families with deletions in the von Hippel-Lindau (VHL) gene. **Hum Genet** 2000; 106:425-31.

Hoffman MA, Ohh M, Yang H, et al. Von Hippel-Lindau protein mutants linked to type 2C VHL disease preserve the ability to downregulate HIF. **Hum Mol Genet** 2001; 10:1019-27.

Horton WA, Wong V, Eldridge R. Clinical and pathological manifestations in nine families with 50 affected members. **Arch Intern Med** 1976; 136:769-77.

Huson SM, Harper PS, Hourihan MD, et al. Cerebellar haemangioblastoma and von Hippel-Lindau disease. **Brain** 1986; 109:1297-310.

Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, et al. Tumor suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. **Nature Med** 1995; 1:822-6.

Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, et al. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93:10595-9.

Iliopoulos O, Ohh M, Kaelin WG. pVHL19 is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:11661-6.

Ivanov SV, Kuzmin I, Wei MH, et al. Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:12596-601.

Jennings CM, Gaines PA. The abdominal manifestation of von Hippel-Lindau disease and a radiological screening protocol for an affected family. **Clin Radiol** 1988; 39(4):363-7.

Kaelin WG, Iliopoulos O, Lonegan KM, et al. Functions of the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein. **J Intern Med** 1998; 243:535-9.

Kamura T, Koepp DM, Conrad MN, et al. Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. **Science** 1999; 284:657-61.

Karasawa Y, Sakaguchi M, Minami S, et al. Duodenal somatostatinoma and erythrocytosis in a patient with von Hippel-Lindau disease type 2A. **Intern Med** 2001; 40:38-43.

Klein B, Weirich G, Brauch H. DHPLC-based germline mutation screening in the analysis of the VHL tumor suppressor gene: usefulness and limitations. **Hum Genet** 2001; 108(5):376-84.

Knudson AGL. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1971; 68:820-3.

Kondo K, Klco J, Nakamura E, et al. Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. **Cancer Cell** 2002; 1:237-46.

Kopito RR. ER quality control: the cytoplasmic connection. **Cell** 1997; 88:427-30.

Kovacs G, Emanuel A, Newmann HP, et al. Cytogenetics of renal cell carcinomas associated with von Hippel-Lindau disease. Genes Chromosomes **Cancer** 1991; 3:256-62.

Kovacs G, Hoene E. Loss of der(3) in renal carcinoma cells of a patient with constitutional t(3;12). **Hum Genet** 1988; 78:148-50.

Krijger RR, Dinjens WNM, Bruining HA, et al. Germline mutations in the VHL-gene in patients presenting with apparently sporadic pheochromocytomas [Abstract 222]. **Proc Am Assoc Cancer Res** 1998; 39:33.

Krumm A, Groudine M. Tumor suppression and transcription elongation: the dire consequenses of changing partners. **Science** 1995; 269:1400-1.

Kuzmin I, Duh FM, Latif F, et al. Identification of the promoter of the human von Hippel-Lindau tumour suppressor gene. **Oncogene** 1995; 10:2185-94.

Langsley DG, Wolton RV, Goodman TA. A family with a hereditary fatal disease: psychological studies of a family with Lindau's disease. **Arch Gen Psychiatry** 1964; 10:647-52.

Latif F, Tory K, Gnarra J, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. **Science** 1993; 260:1317-20.

Lee S, Chen DYT, Humphrey JS, et al. Nuclear/cytoplasmatic localization of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product is determined by cell density. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 92:6459-63.

Lee JY, Dong SM, Park WS, et al. Loss of heterozygosity and somatic mutations of the VHL tumor suppressor gene in sporadic cerebellar hemangioblastomas. **Cancer Res** 1998; 58:504-8.

Li FP, Decker HJH, Zbar B, et al. Clinical and genetic studies of renal cell carcinomas in a family with a constitutional chromosome 3;8 translocation. **Ann Int Med** 1993; 118:106-11.

Libutti SK, Choyke PL, Bartlett DL, et al. Pancreatic neuroendocrine tumors associated with von Hippel-Lindau disease: diagnostic and management recommendations. **Surgery** 1998; 124:1153-9.

Lindau A. Zur Frage der Angiomatosis retinae und ihrer Huncomplikation. **Acta Opthalmol (Copenh)** 1927; 4:193-226.

Lui WO, Chen J, Glasker S, et al. Selective loss of chromosome 11 in pheochromocytomas associated with the VHL syndrome. **Oncogene** 2002; 21:1117-22.

Londrini S, Lasio G, Cimino C, et al. Hemangioblastomas: clinical characteristics, surgical results and immunohistochemical studies. **J Neurosci** 1991; 35:179-85.

Lonergan KM, Iliopoulos O, Ohh M, et al. Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. **Molec Cell Biol** 1998; 18:732-41.

Los M, Jansen GH, Kaelin WG, Lips CJ, Blijham GH, Voest EE. Expression pattern of the von Hippel-Lindau protein in human tissues. **Lab Invest** 1996; 75:231-8.

Los M, Kerckhaert OAJ, Zewald R, Kristian H, van Amstel P, Voest EE. Mutational analysis of endothelial cells derived from von Hippel-Lindau related renal cancer. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:1688-9.

Maddock IR, Moran A, Maher ER, et al. A genetic register for von Hippel-Lindau disease. **J Med Genet** 1996; 33:120-7.

Maher ER, Webster AR, Richards FM, et al. Phenotypic expression in von Hippel-Lindau disease: correlations with germline VHL gene mutations. **J Med Genet** 1996; 33(4):328-32.

Maher ER, Yates JRW, Fergunson-Smith MA. Statistical analysis of the two stage mutation model in von Hippel-Lindau disease and in sporadic cerebellar hemangioblastoma and renal cell carcinoma. **J Med Genet** 1990; 27:311-4.

Maher ER, Yates JRW. Familial renal cell carcinoma: clinical and molecular genetic aspects. **Br J Cancer** 1991; 63:176-9.

Maher ER, Iselius L, Yates JRW, et al. von Hippel-Lindau disease: a genetic study. **J Med Genet** 1991; 28:443-47.

Maher ER, Kaelin WG. von Hippel-Lindau disease. **Medicine** 1997; 76:381-91.

Manski TJ, Heffner DK, Gladys MG, et al. Endolymphatic sac tumors. A source of morbid hearing loss in von Hippel-Lindau disease. **JAMA** 1997; 277:1461-6.

Maranchie JK, Vasselli JR, Riss J, et al. The contribution of VHL substrate binding and HIF1- α to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. **Cancer Cell** 2002; 1:247-55.

Martz CH. von Hippel-Lindau disease: a genetic condition predisposing tumor formation. **Oncol Nurs Forum** 1991; 18(3):545-51.

Mattocks C, Tarpey P, Bobrow M, Whittaker J. Comparative sequence analysis (CSA): a new sequence-based method for the identification and characterization of mutations in DNA. **Hum Mutat** 2000; 16(5):437-43.

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW et al. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. **Nature** 1999; 399:271-5.

McNeil DE, Linehan WM, Glenn GM. Comorbid genetic diseases, von Hippel-Lindau disease and spinocerebellar ataxia type 2, confounding the diagnosis of cerebellar dysfunction in an adolescent. **Clin Neurol Neurosurg** 2001; 103:216-9.

Melbon KL, Rosen SW. Lindau's disease. Review of the literature and study of a large kindred. **Am J Med** 1964; 36:595-617.

Meyer AJ, Hernandes A, Flori AR, et al. Novel mutations of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene and rare DNA hypermethylation in renal-cell carcinoma cell lines of the clear-cell type. **Int J Cancer** 2000; 87:650-3.

Moore PS, Missiaglia E, Antonello D, et al. Role of disease-causing genes in sporadic pancreatic endocrine tumors: MEN1 and VHL. **Genes Chromosomes Cancer** 2001; 32:177-81.

Mulvihill JJ, Ferrel RE, Carty SE, et al. Familial pheochromocytoma due to mutant von Hippel-Lindau disease gene. **Arch Intern Med** 1997; 157:1390-1.

Murgia A, Martella M, Vinanzi C, Polli R, Perilongo G, Opocher G. Somatic mosaicism in von Hippel-Lindau Disease. **Hum Mutat** 2000; 15:114.

Mukhopadhyay D, Knebelmann B, Cohen HT, Ananth S, Sukhatme VP. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product interacts with Sp1 to repress vascular endothelial growth factor promoter activity. **Mol Cell Biol** 1997; 17:5629-39.

Nelson JB, Oyasu R, Dalton DP. The clinical and pathological manifestations of renal tumors in von Hippel-Lindau disease. **J Urol** 1994; 152:2221-6.

Neumann HP, Eggert HR, Weigel K, Friedburg H, Wiestler OD, Schollmeyer P. Hemangioblastomas of the central nervous system: a 10-year study with special reference to von Hippel-Lindau syndrome. **J Neurosurg**. 1989; 70:24-30.

Neumann HP, Lips CJ, Hsia YE, et al. Von Hippel-Lindau syndrome. **Brain Pathol** 1995; 5:181-93.

Newmann HP, Wiestler OD. Clustering of features of von Hippel-Lindau syndrome: evidence for a complex genetic locus. **Lancet** 1991; 337:1052-4.

Newmann HP, Eggert HR, Scheremet R, et al. Central nervous system lesions in von Hippel-Lindau syndrome. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 1992; 55:898-901.

Nichols KE, Li FP, Haber DA, Diller L. Childhood cancer predisposition: applications of molecular testing and future implications. **J Pediatr** 1998; 132(3 Pt 1):389-97.

Offit K. Genetics in clinical cancer care: scope of cancer genetic counseling. In: **Thirty-third Annual Meeting**; 1997 May 17-20; Denver-Colorado. Denver: ASCO; 1997. p.317-20. (Educational book).

Ohh M, Yauch RL, Lonergan KM, et al. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assemblyof an extracellular fibronectin matrix. **Mol Cell** *1998; 1:959-68.*

Ohh M, Kaelin WG. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: new perspectives. **Mol Med Today** 1999; 5:257-63.

Olschwang S, Boisson C, Richard S, Resche F, Thomas G. DNA-based presymptomatic diagnosis for the von Hippel-Lindau disease by linkageanalysis. **Eur J Hum Genet** 1995; 3:108-15.

Olschwang S, Richard S, Boisson C, et al. Germline mutation profile of the VHL gene in von Hippel-Lindau disease and in sporadic hemangioblastoma. **Hum Mutation** 1998; 12:424-30.

Pack SD, Zbar B, Pak E, et al. Constitutional von Hippel-Lindau (VHL) gene deletions detected in VHL families by fluorescence in situ hybridization. **Cancer Res** 1999; 59(21):5560-4.

Page KA, Wayson K, Steinberg GK, Adler JR Jr. Stereotaxic radiosurgical ablation: an alternative treatment for recurrent andmultifocal hemangioblastomas. A report of four cases. **Surg Neurol** 1993; 40:424-8

Pause A, Lee S, Lonergan KM, Klausner RD. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene is required for cell cycle exit upon serum withdrawal. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:993-8.

Peters JA, Stopfer BE. Role of genetic counselor in familial cancer. **Oncology** 1996; 10:159-66.

Phillips JL, Ghadimi BM, Wangsa D, et al. Molecular cytogenetic characterization of early and late renal cell carcinomas in von Hippel-Lindau disease. **Genes Chromosomes Cancer** 2001; 31:1-9.

Reiser G, Schaeffer GB. Gene testing for cancer susceptibility. **Nebr Med J** 1996; 81:416-8.

Richard S, Beigelman C, Duclos J, et al. Pheochromocytoma as the first manifestation of von Hippel-Lindau disease. **Surgery** 1994; 116:1076-81.

Richards FM, Payne SJ, Zbar B, et al. Molecular analysis of de novo germline mutations in the von Hippel-Lindau disease gene. **Hum Mol Genet** 1995; 4:2139-43.

Richards FM, Crossey PA, Phipps ME, et al. Detailed mapping of germline deletions of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. **Hum Mol Genet** 1994; 3:595-8.

Richards FM, Latif F, Lerman MI, Zbar B, Maher ER. Taq1 and Pst1 RFLPs in the von Hippel-Lindau disease gene (VHL). **Hum Mol Genet** 1993; 2:1750.

Richards FM, Phipps ME, Latif F, et al. Mapping the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene: identification of germline deletions by pulsed field gel eletrophoresis. **Hum Mol Genet** 1993; 2:879-82.

Richardson RG, Griffin TW, Parker RG. Intramedullary hemangioblastoma of the spinal cord: definitive management withirradiation. **Cancer** 1980; 45:49-50.

Ritter MM, Frilling A, Crossey PA, et al. Isolated familial pheochromocytoma as a variant of von Hippel-Lindau disease. **J Clin Endocrinol Metab** 1996; 81(3):1035-7.

Rothberg PG, Bradley JF, Baker DW, Huelsman KM. Is the P25L a "real" VHL mutation? **Mol Diagn** 2000; 6(1):49-54.

Sakashita N, Takeya M, Kishida T, Stackhouse TM, Zbar B, Takahashi K. Expression of von Hippel-Lindau protein in normal and pathological human tissues. **Histochem J** 1999; 31:133-44.

Schoenfeld A, Davidowitz EJ, Burk RD. A second major native von Hippel-Lindau gene product, initiated from an internal translation start site, functions as a tumor suppressor. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:8817-22.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE BIBLIOTECA

Schuin T, Kondo K, Torigoe S, et al. Frequent somatic mutations and loss of heterozigozity of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in primary human renal cell carcinoma. **Cancer Res** 1994; 54:2852-55.

Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LJ, et al. von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. **Nature** 1988; 332:268-9.

Seizinger BR, Smith DI, Filling-Katz MR et al. Genetic flanking markers refine diagnostic criteria and provide insights intothe genetics of Von Hippel Lindau disease. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1991; 88:2864-8.

Sgambati MT, Stolle C, Choyke PL et al. Mosaicism in von Hippel-Lindau disease: lessons from kindreds with germline mutations identified in offspring with mosaic parents. **Am J Hum Genet** 2000; 66:84-91.

Shiao YH, Rice JM, Anderson LM, et al. Von Hippel-Lindau gene mutations in N-nitrosodimethylamina-induced rat renal epithelial tumors. **J Natl Cancer Inst** 1998; 90:1720-3.

Shokeir ML. Von Hippel-Lindau syndrome: a report on three kindreds. **J Med Genet** 1970; 7:155-7.

Singh AD, Nouri M, Shields CL, Shields JA, Smith AF. Retinal capillary hemangioma: a comparison of sporadic cases and cases associated with von Hippel-Lindau disease. **Ophthalmology** 2001; 108:1907-11.

Statement of the American Society of Clinical Oncology: genetic testing for cancer susceptibility, Adopted on February 20, 1996. **J Clin Oncol** 1996; 14:1730-40.

Stebbins C, Kaelin WG, Pavletich NP. Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. **Science** 1999; 284:455-61.

Stolle C, Glenn G, Zbar B, et al. Improved detection of germline mutations in the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. **Hum Mutation** 1998; 12:417-23.

Symon L, Murota T, Pell M, Bordi L. Surgical management of haemangioblastoma of the posterior fossa. **Acta Neurochir**. 1993; 120:103-10.

Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. **EMBO J** 2000; 19:4298-309.

Teyssier JR, Henry I, Dozier C, et al. Recurrent delection of the short arm of chromosome 3 in human renal cell carcinoma: shift of the c-raf 1 locus. **J Natl Cancer Inst** 1986; 77:1187-95.

The Human Gene Mutation Database – Cardiff. Von Hippel-Lindau syndrome. 2002. Disponível em: http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/120488.html. Acesso em: 25/04/2002.

Tory K, Brauch H, Linehan M, et al. Specific genetic change in tumours associated with von Hippel-Lindau. **J Natl Cancer Inst** 1989; 81:1097-101.

van der Harst E, de Krijger RR, Dinjens WN, et al. Germline mutations in the vhl gene in patients presenting with phaeochromocytomas. **Int J Cancer** 1998; 77(3):337-40.

von Hippel E. Ueber einer seher seltene Erkrankung der Nethaut. **Graefes Arch Ophthalmol** 1904; 59:83-106.

Vortmeyer AO, Huang SC, Pack SD, et al. Somatic point mutation of the wild-type allele detected in tumors of patients with VHL germline deletion. **Oncogene** 2002; 21(8):1167-70.

Vortmeyer AO, Gnarra JR, Emmert-Buck MR, et al. von Hippel-Lindau gene deletion detected in the stromal cell component of a cerebellar hemangioblastoma associated with von Hippel-Lindau disease. **Hum Pathol** 1997; 28:540-3.

Wizigmann-Voos S, Plate KH. Pathology, genetics and cell biology of hemangioblastomas. **Histol Histopathol** 1996; 11:1049-61.

Woodward EM, Eng C, McMahon R, et al. Genetic predisposition to phaeochromocytoma: analysis of candidate genes GDNF, RET and VHL. **Hum Molec Genet** 1997; 6:1051-6.

Yamakawa K, Morita R, Takahashi E, et al. A detailed mapping of the short arm of chromosome 3 in sporadic renal cell carcinoma. **Cancer Res** 1991; 51:4707-11.

Ye Y, Vasavada S, Kuzmin I, et al. Subcelular localization of the von Hippel-Lindau disease gene product is cell cycle-dependent. **Int J Cancer** 1998; 78:62-9.

Yoshida M, Ashida S, Kondo K, et al. Germ-line mutation analysis in patients with von Hippel-Lindau disease in Japan: an extended study of 77 families. **Jpn J Cancer** 2000; 91:204-12.

Zbar B, Kishida T, Chen F, et al. Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in families from North America, Europe and Japan. **Hum Mutat** 1996; 8:348-57.

ANEXO 1

FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

- Doença de von Hippel-Lindau -

Identificação:

Nome: _____

_____ Idade (anos): ____ Sexo:___ M/F

Endereço: _____

Cidade:_____ Estado: __ CEP:_____Telefone: ___-_____

Médico: _____CRM:_____Especialidade:_____

Tel.: ___-_____ E-mail:_____

Manifestações Clínicas: (marcar com um **X** as manifestações confirmadas)

		Único	Múltiplo	Bilateral	Idade ao diagnóstico	Não avaliado
( )Hemangioblastoma	( )Cerebelo	( )	( )	( )		( )
	( )Espinhal	( )	( )	( )		( )
	( )Cerebral	( )	( )	( )		( )
( )Angioma de retina		( )	( )	( )		( )
( )Carcinoma Renal de cél.claras		( )	( )	( )		( )
( )Feocromocitoma		( )	( )	( )		( )
( )Cisto	( )Pancreático	( )	( )	( )		( )
	( )Epidídimo	( )	( )	( )		( )
	( )Renal	( )	( )	( )		( )
( )Cistoadenoma de Epidídimo		( )	( )	( )		( )
( )Tumor da ilhota pancreática		( )	( )	( )		( )
( )Outros:		( )	( )	( )		( )

Exames Realizados:

( )Fundo de olho ( )TC ( )RM de crânio ( )US( ) TC de abdome

( )VMA urinário ( ) catecolaminas ( )Biópsia de:_____

( )Cirurgia:_____

( ) outros: _____

História Familial:

Existe algum outro membro da família com alguma das manifestações clínicas acima?

( )Sim ( )Não Em caso positivo complete o quadro a seguir.

Nome(Iniciais)	Sexo	Idade	Grau de parentesco	vivo/falecido	Manifestação clínica

ANEXO 2

Hospital A C Camargo - Fundação Antonio Prudente

Rua Prof. Antonio Prudente, 211 - Tel. 3272-5000 - FAX 3272-5088

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos - Resolução No 196 de 10.10.1996 - CNS)

I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

NOME DO PACIENTE _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE No_____SEXO (M) (F) NASCIMENTO_____

ENDEREÇO_____N°_____Complemento_____

CIDADE_____ESTADO_____CEP_____TEL._____

RESPONSÁVEL (pacientes menores de 18 anos)_____

GRAU DE PARENTESCO_____DOC.IDENTIDADE No_____

ENDEREÇO_____N°_____ Complemento_____

CIDADE_____ESTADO_____CEP_____TEL._____

II. DADOS SOBRE O ESTUDO

1. TÍTULO: **"DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA DOENÇA DE VON HIPPEL-LINDAU EM FAMÍLIAS BRASILEIRAS "**.
2. PESQUISADOR: Dr. JOSÉ CLÁUDIO CASALI DA ROCHA CRM 52 50167-1
   LABORATÓRIO DE GENÉTICA - INSTITUTO LUDWIG DE PESQUISA SOBRE O CÂNCER.
   APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA EM 09/10/ 1998.
   INÍCIO DO ESTUDO: 09/10/ 1998.

III. EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

1. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA PESQUISA: Este estudo visa realizar o diagnóstico molecular da doença de von Hippel-Lindau , identificar e caracterizar as mutações no gene *VHL* nos indivíduos portadores da doença.

2. PROCEDIMENTOS QUE SERÃO UTILIZADOS E PROPÓSITOS, INCLUINDO A IDENTIFICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS QUE SÃO EXPERIMENTAIS: Serão coletados 10mL de sangue do paciente para estudo de DNA. O gene VHL será analisado por técnicas de biologia molecular visando a detecção de mutação.

3. COMPLICAÇÕES E RISCOS ESPERADOS: A doença de von Hippel-Lindau é uma doença hereditária, afetando igualmente homens e mulheres em qualquer idade, mas geralmente com manifestação após os 25 anos. As principais manifestações clínicas são tumores benignos no cerebelo e na retina (hemangioblastomas), cistos múltiplos renais e pancreáticos - no sexo masculino também podem ocorrer cistos no epidídimo-, feocromocitoma e carcinoma renal do tipo de células claras. Todas estas lesões podem ser curadas se detectadas nos estádios iniciais e por isso o diagnóstico precoce da doença é tão importante. O teste genético visa identificar a mutação no gene *VHL* e confirmar o diagnóstico ou suspeita clínica da doença. O impacto psicológico causado pela doença nos indivíduos afetados e nas famílias com a doença de von Hippel-Lindau pode ser significativo: negação, ansiedade, medo,

isolamento, culpa, distúrbios da personalidade e superproteção são observados. Porém, em cerca de 10% dos casos não é possível detectar mutação pelos métodos atuais.

4. BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS: Este estudo possibilita o diagnóstico molecular da doença de von Hippel-Lindau em famílias brasileiras, confirmando o diagnóstico clínico e caracterizando as mutações do gene VHL. Desde que identificada a mutação, possibilita posteriormente o rastreamento de familiares assintomáticos e o aconselhamento genético das famílias acometidas.

O teste genético é de significado clínico especial para os pacientes com manifestações clínicas da síndrome de VHL e ausência de história familiar. Desta forma casos novos da doença VHL poderão ser confirmados, bem como terem suas mutações caracterizadas.

A realização do teste permite que sejam rastreados pacientes portadores de VHL no grupo de pacientes com tumores aparentemente esporádicos. É possível que futuramente possam ser estabelecidos critérios baseados no risco para VHL neste grupo de pacientes.

A caracterização da mutação no gene VHL pode determinar o risco para algumas manifestações e, portanto, permite definir o acompanhamento clínico mais apropriado para estes indivíduos. Contribui para um maior entendimento dos mecanismos fundamentais da doença de VHL e das várias manifestações clínicas.

A detecção de mutação permite caracterizar o risco do paciente como alto risco, quando o resultado for positivo, ou como baixo risco quando o exame for negativo.

5. Fui esclarecido sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados coma pesquisa e o tratamento do indivíduo.

SIM **NÃO**

6. Fui esclarecido sobre a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo quanto à continuidade do meu tratamento.

SIM **NÃO**

7. Fui esclarecido de que não haverá remuneração financeira além do previsto para as despesas do estudo.

SIM **NÃO**

8. Fui esclarecido sobre a segurança de que minha identidade será preservada, mantendo-se todas as informações em caráter confidencial.

SIM **NÃO**

IV. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido dos riscos e benefícios deste estudo clínico, conforme definido nos itens 1 a 9, do inciso III, consinto em participar, na qualidade de paciente, do Projeto de Pesquisa referido no inciso II.

São Paulo, _____ de _____ de _____

_____ _____

Assinatura do paciente ou responsável legal Assinatura e carimbo do Pesquisador

ANEXO 3

TOTAL: 100 pacientes

- 83 pacientes pertencentes a 20 famílias com diagnóstico clínico de VHL
- 7 pacientes pertencentes a 2 famílias encaminhadas suspeitas de VHL
- 8 pacientes com tumores aparentemente esporádicos associados a VHL
- 2 familiares assintomáticos de uma paciente com HB aparentemente esporádico

20 famílias com VHL:

- 17 famílias tipo 1: 15 com padrão familial e 2 casos sem história familial de VHL
- 3 famílias tipo 2A: 2 com padrão familial e 1 caso sem história familial de VHL

2 famílias suspeitas de VHL: não foi detectado mutação no gene *VHL* e posteriormente estabeleceram-se os seguintes diagnósticos:

- Ataxia espino-cerebelar. O probando apresentava carcinoma renal tipo células claras bilateral. No seguimento, o probando apresentou câncer de próstata.

OBS: o probando, por apresentar CR bilateral foi analisado conjuntamente com o grupo de pacientes com CR aparentemente esporádicos.

- Hemangioma cavernoso familial

8 tumores aparentemente esporádicos aparentemente esporádicos:

- 1 paciente com angioma de retina esporádico na infância
- 5 pacientes com carcinoma de células claras renais (CR) esporádicos bilaterais ou multicêntricos
- 1 paciente com feocromocitoma associado com cistos de epidídimo
- 1 paciente com hemangioblastoma esporádico sem história familial

OBS: 1 paciente com CR bilateral (probando de uma das famílias suspeitas de VHL) foi incluído na análise.

2 familiares assintomáticos de uma paciente com HB esporádico

ANEXO 4

Lista de probandos e familiares pertencentes às famílias com diagnóstico de VHL.

ID	STATUS	TIPO VHL	MUTAÇÃO	RISCO	CLÍNICA	OBS
VH1A	ASS		SIM	ALTO	xxxxxxxx	
VH1B	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH2A	VHL	1	SIM	ALTO	CR	
VH2B	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH3A	VHL	1	SIM	ALTO	CR, CiR, CiP	OBITO
VH3B	ASS		em curso	ALTO	xxxxxxxx	
VH3C	ASS		em curso	ALTO	xxxxxxxx	
VH3D	VHL	1	SIM	ALTO	CR, HC, HS, AdR	
VH3E	VHL	1	em curso	ALTO	HC, HS	
VH4A	VHL	1	SIM	ALTO	CR, HT, CiP, CiR	
VH4B	VHL	1	SIM	ALTO	AdR, HC, HS, CiR	OBITO
VH4C	VHL	1	SIM	ALTO	HC, HS, AR, CiP	
VH4D	ASS		SIM	ALTO	CiP, CiR	
VH4E	ASS		SIM	ALTO	xxxxxxxx	
VH4F	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH4G	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH4H	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH5A	VHL	1	SIM	ALTO	AR	
VH6A	VHL	1	SIM	ALTO	HC,CiP,CiR,CiOv,CiM	
VH6B	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH6C	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH8A	ASS		SIM	ALTO	xxxxxxxx	
VH8B	VHL	1	SIM	ALTO	HC, AR	
VH8C	VHL	1	SIM	ALTO	HC	
VH8D	ASS		SIM	ALTO	xxxxxxxx	
VH8E	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH8F	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH8G	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH8H	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH8I	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH9A	VHL	1	SIM	ALTO	HC, CR, CiR,CiE	
VH9B	VHL	1	SIM	ALTO	HC,CR,CiR,CiP,CiE	
VH9C	VHL	1	SIM	ALTO	HC, AR, ASR, CiP	
VH9D	VHL	1	SIM	ALTO	HC,HS,AR,CR,CiP,CiR	OBITO
VH9E	VHL	1	SIM	ALTO	AR,CiE	
VH9F	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH9G	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH9H	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH9I	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH9J	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH9K	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH9L	ASS		SIM	ALTO	xxxxxxxx	
VH9M	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH9N	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH9O	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH9P	ASS		SIM	ALTO	xxxxxxxx	
VH10A	VHL	1	SIM	ALTO	HC, CiP, CiR	
VH10B	VHL	1	SIM	ALTO	HC, CiP	
VH10C	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH11A	VHL	2A	SIM	ALTO	HC, FE bil	
VH11B	VHL	2A	SIM	ALTO	FE bil	
VH11C	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH11D	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH11E	VHL	2A	SIM	ALTO	HC, FE, CiR	
VH11F	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH11G	ASS		SIM	ALTO	xxxxxxxx	
VH12A	VHL	2A	SIM	ALTO	FE bil, HB	
VH12B	VHL	2A	SIM	ALTO	FE	

VH13A	VHL	1	SIM	ALTO	CiP, CiR, AdP	
VH13B	VHL	1	SIM	ALTO	CiP, AdP	
VH13C	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH13D	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH13E	ASS		SIM	ALTO	xxxxxxxx	
VH14A	VHL	1	SIM	ALTO	CiR, CiP	
VH14B	ASS		SIM	ALTO	xxxxxxxx	
VH14C	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH14D	ASS		SIM	ALTO	xxxxxxxx	
VH15A	VHL	1	SIM	ALTO	CR	
VH15B	VHL	1	SIM	ALTO	HC	
VH15C	ASS		SIM	ALTO	xxxxxxxx	
VH15D	VHL	1	SIM	ALTO	AR	
VH16A	VHL	1	SIM	ALTO	HC,AR,CR,FE,CiP,CiR,CiE,CiH,AstrC, SemT	
VH16B	ASS		SIM	ALTO	xxxxxxxx	
VH17A	VHL	1	SIM	ALTO	HC,HS AR,AdR,CiP	
VH17B	ASS		SIM	ALTO	xxxxxxxx	
VH17C	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH18A	VHL	1	SIM	ALTO	HC,AR,CiP,CiR	
VH20A	VHL	1	SIM	ALTO	HC,CiP	
VH20B	ASS		NÃO	BAIXO	xxxxxxxx	
VH21A	VHL	2A	SIM	ALTO	Feo bil, AR	
VH21B	ASS		em curso	ALTO	NA	
VH21C	ASS		em curso	ALTO	NA	
VH22-A	VHL	1	SIM	ALTO	HC,CiP	

ANEXO 5 – Lista de pacientes com tumores aparentemente esporádicos e seus familiares.

ID	EXON 1	EXON 2	EXON 3	SB	STATUS	CLÍNICA	OBS
AR1	SEM MUT	SEM MUT	SEM MUT		SPO	AR	
CR1	PARAFINA	SEM MUT	PARAFINA	xxxxxxxx	SPO	CR	OBITO
CR2	SEM MUT	SEM MUT	SEM MUT		SPO	CR	
CR3	SEM MUT	SEM MUT	SEM MUT		SPO	CR	
CR4	SEM MUT	SEM MUT	SEM MUT		SPO	CR	
CR5A (VH19A)	SEM MUT	SEM MUT	SEM MUT	SEM MUT	SPO	Atax. cereb, CR, Cpróst	
CR5B	SEM MUT	SEM MUT	SEM MUT	SEM MUT	ASS	xxxxxxxx	
CR5C	SEM MUT	SEM MUT	SEM MUT	SEM MUT	ASS	xxxxxxxx	
CR6	SEM MUT	SEM MUT			SPO	CR	
CR7	SEM MUT	SEM MUT	SEM MUT		SPO	CR, Insulinoma	
FE1	SEM MUT	SEM MUT	SEM MUT		SPO	Feo uni, CiE	
HB1A	Pro25Leu	SEM MUT	SEM MUT	xxxxxxxx	SPO	HB	
HB1B	SEM MUT	xxxxxxxx	xxxxxxxx	xxxxxxxx	ASS	xxxxxxxx	
HB1C	SEM MUT	xxxxxxxx	xxxxxxxx	xxxxxxxx	ASS	xxxxxxxx	

ANEXO 6 – Lista de pacientes com alto risco, manifestações e achados clínicos durante programa de rastreamento de lesões.

ID	STATUS	MUTAÇÃO	RISCO	CLÍNICA	RASTREAMENTO	OBS
VH1A	ASS	SIM	ALTO	xxxxxxx	negativo	
VH2A	VHL	SIM	ALTO	CR	CiR,CiP,HC	
VH3A	VHL	SIM	ALTO	CR, CiR, CiP	xxxxxxx	OBITO
VH3D	VHL	SIM	ALTO	CR, HC, HS, AdR	NA	
VH4A	VHL	SIM	ALTO	CR, HT, CiP, CiR	negativo	
VH4B	VHL	SIM	ALTO	AdR, HC, HS, CiR	xxxxxxx	OBITO
VH4C	VHL	SIM	ALTO	HC, HS, AR, CiP	HS, AR	
VH4D	ASS	SIM	ALTO	CiP, CiR	HC, Hce, CiR	
VH4E	ASS	SIM	ALTO	xxxxxxx	negativo	
VH5A	VHL	SIM	ALTO	AR	CiP	
VH6A	VHL	SIM	ALTO	HC,CiP,CiR,CiOv,CiM	CR, AdP	
VH8A	ASS	SIM	ALTO	xxxxxxx	negativo	
VH8B	VHL	SIM	ALTO	HC, AR	HC, CiR	
VH8C	VHL	SIM	ALTO	HC	AdP, CiP, CR	
VH8D	ASS	SIM	ALTO	xxxxxxx	CiR, CiP	
VH9A	VHL	SIM	ALTO	HC, CR, CiR,CiE	NA	
VH9B	VHL	SIM	ALTO	HC,CR,CiR,CiP,CiE	NA	
VH9C	VHL	SIM	ALTO	HC, AR, ASR, CiP	NA	
VH9D	VHL	SIM	ALTO	HC,HS,AR,CR,CiP,CiR	xxxxxxx	OBITO
VH9E	VHL	SIM	ALTO	AR,CiE	NA	
VH9L	ASS	SIM	ALTO	xxxxxxx	NA	
VH9P	ASS	SIM	ALTO	xxxxxxx	NA	
VH10A	VHL	SIM	ALTO	HC, CiP, CiR	NA	
VH10B	VHL	SIM	ALTO	HC, CiP	NA	
VH11A	VHL	SIM	ALTO	HC, FE bil	NA	
VH11B	VHL	SIM	ALTO	FE bil	NA	
VH11E	VHL	SIM	ALTO	HC, FE, CiR	NA	
VH11G	ASS	SIM	ALTO	xxxxxxx	NA	
VH12A	VHL	SIM	ALTO	FE bil, HB	NA	
VH12B	VHL	SIM	ALTO	FE	NA	
VH13A	VHL	SIM	ALTO	CiP, CiR, AdP	AR	
VH13B	VHL	SIM	ALTO	CiP, AdP	CiH	
VH13E	ASS	SIM	ALTO	xxxxxxx	negativo	
VH14A	VHL	SIM	ALTO	CiR, CiP	negativo	
VH14B	ASS	SIM	ALTO	xxxxxxx	NA	
VH14D	ASS	SIM	ALTO	xxxxxxx	NA	
VH15A	VHL	SIM	ALTO	CR	NA	
VH15B	VHL	SIM	ALTO	HC	NA	
VH15C	ASS	SIM	ALTO	xxxxxxx	NA	
VH15D	VHL	SIM	ALTO	AR	NA	
VH16A	VHL	SIM	ALTO	HC,AR,CR,FE,CiP,CiR,CiE,CiH,AstrC, SemT	HS,CR meta	
VH16B	ASS	SIM	ALTO	xxxxxxx	NA	
VH17A	VHL	SIM	ALTO	HC,HS AR,AdR,CiP	HS	
VH17B	ASS	SIM	ALTO	xxxxxxx	NA	
VH18A	VHL	SIM	ALTO	HC,AR,CiP,CiR	NA	
VH20A	VHL	SIM	ALTO	HC,CiP	NA	
VH21A	VHL	SIM	ALTO	Feo bil, AR	NA	
VH22A	VHL	SIM	ALTO	HC,CiP	NA	
VH3B	ASS	em curso	ALTO	xxxxxxx	CiP, CiR	
VH3C	ASS	em curso	ALTO	xxxxxxx	HS	
VH3E	VHL	em curso	ALTO	HC, HS	NA	
VH21B	ASS	em curso	ALTO	NA	NA	
VH21C	ASS	em curso	ALTO	NA	NA	

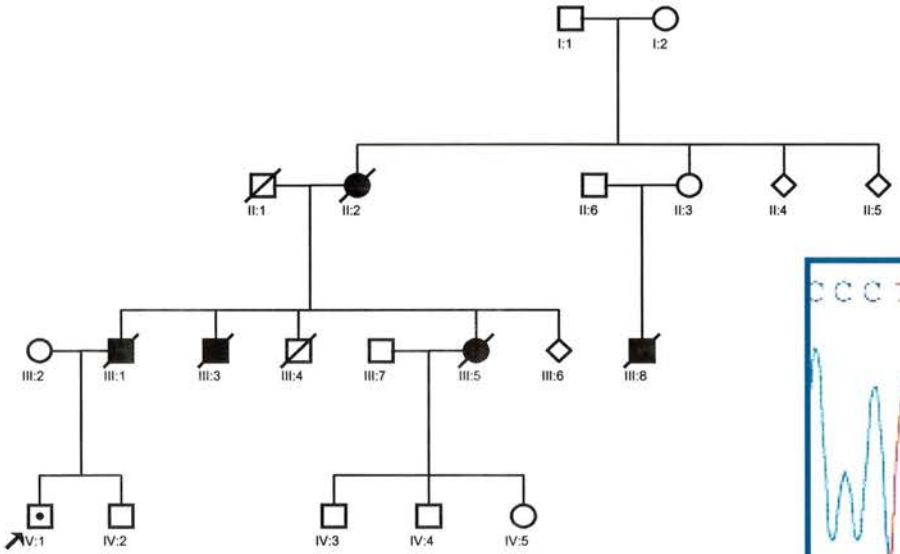
ANEXO 7

Heredogramas das famílias com diagnóstico ou suspeita de VHL

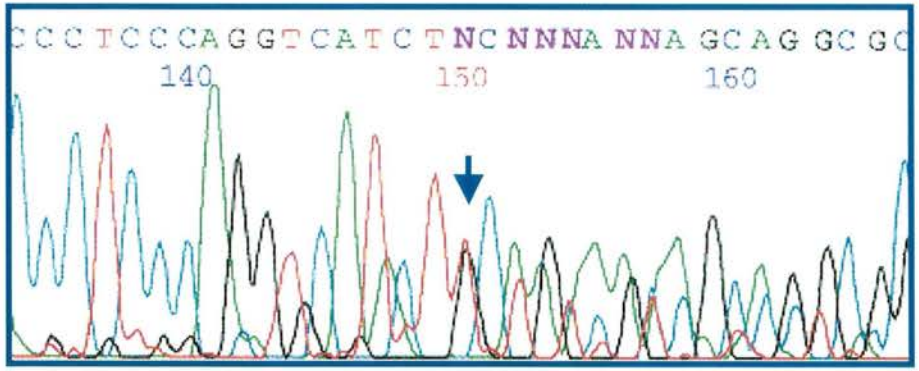
Heredograma da família da paciente HB1A

Mutações germinativas e polimorfismos encontrados nas famílias

Família VH1

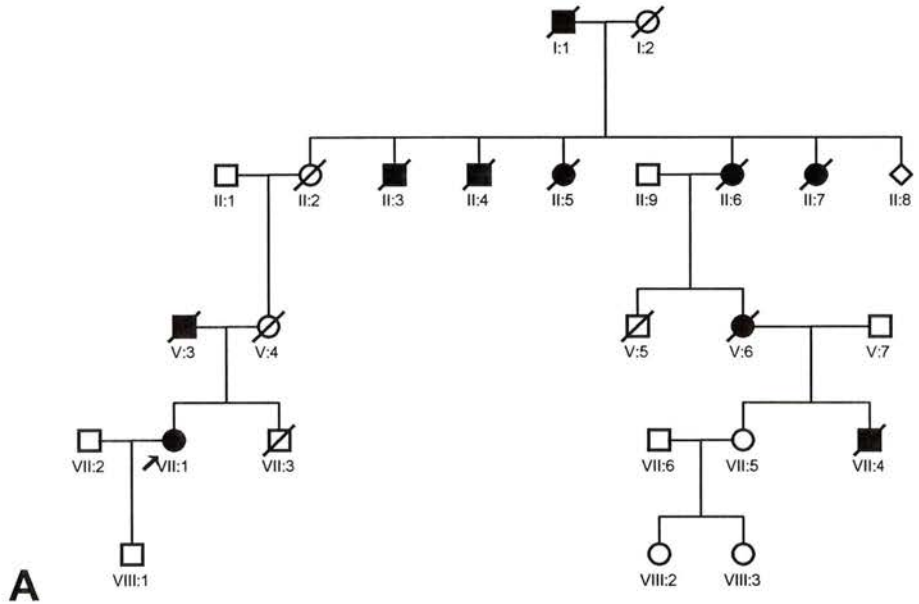


Heredograma da Família VH1

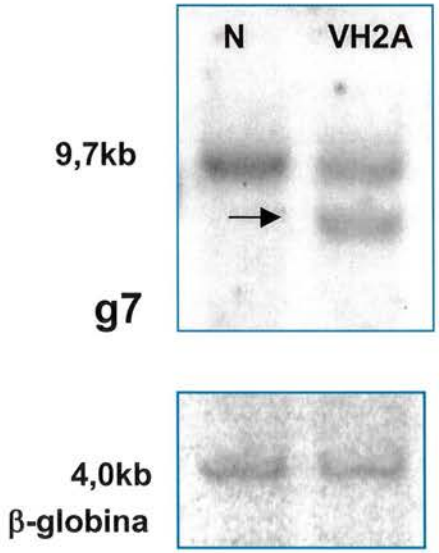


VHL: mutação delPhe76, consistindo na
deleção de 3nt envolvendo os codons 76-77do exon 1
ATCTtctGC (Ile-Phe-Cys) > ATCTGC (Ile-Cys)

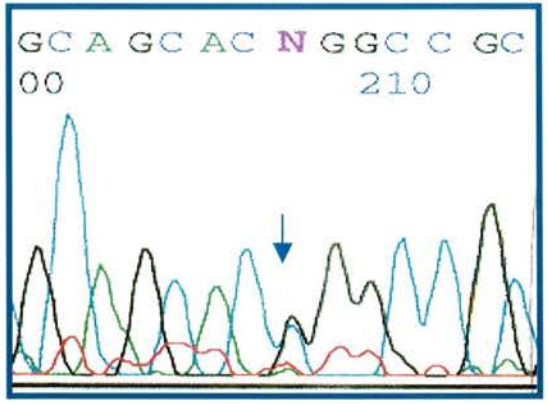
Família VH2



A



B

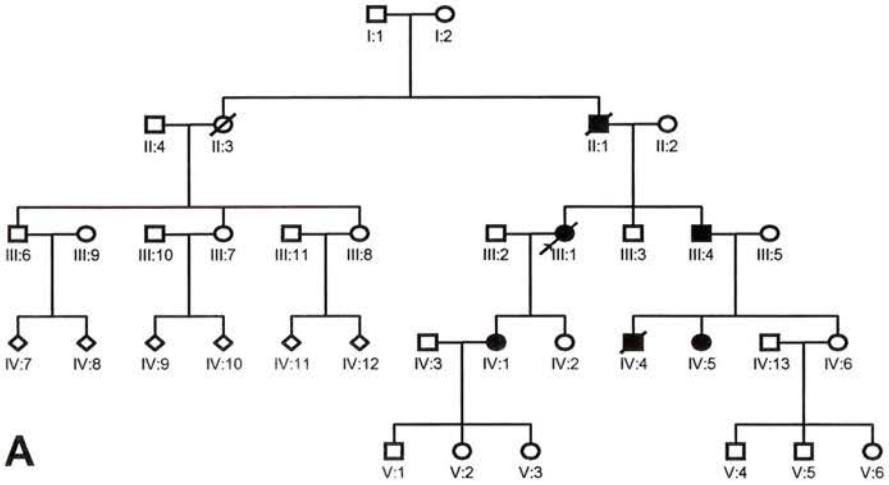


C

A - heredograma da Família VH2. **B** - *Southern-blot* quantitativo utilizando as sondas g7 e de β-globina mostrando rearranjo detectado no indivíduo VH2A indicado pela seta, consistente com uma deleção parcial do gene *VHL*. **C** – Eletroferograma mostra o polimorfismo detectado no códon 61 do exon 1 do gene *VHL* (com iniciador antisenso) com troca CCC(Pro) > CCG (Pro).

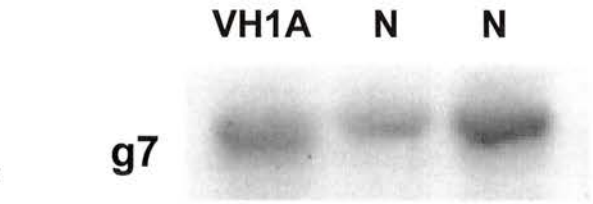
FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE BIBLIOTECA

Família VH3

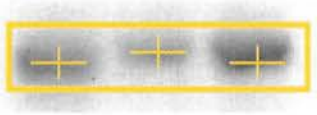


A

A - Heredograma da Família VH3.
B - Southern-blot quantitativo.
C - análise das bandas por densitometria.



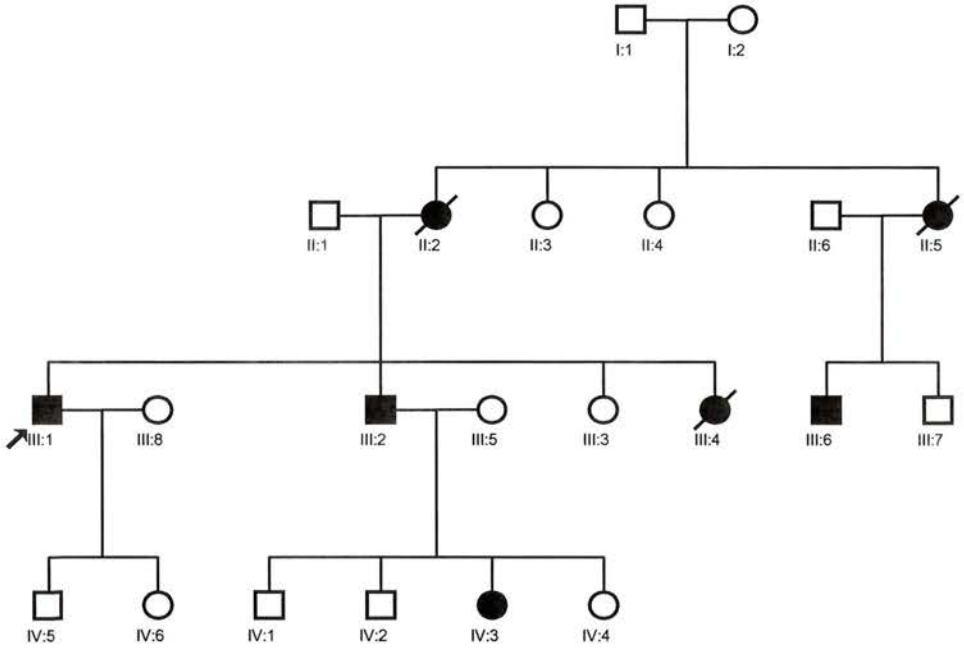
B



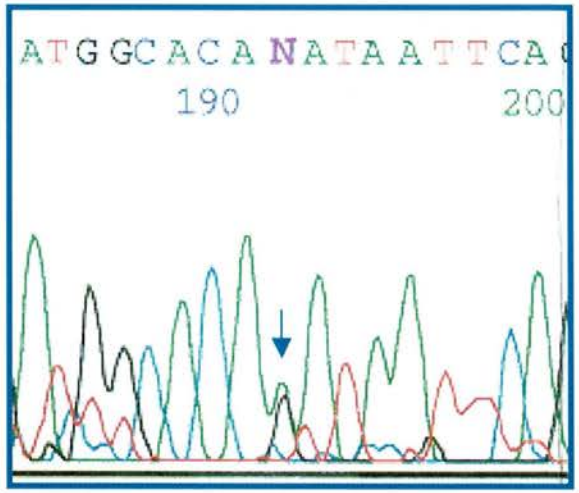
Mass (%)	g7	β-glob	Ratio g7/ β-glob
D1	74.6	126	0.59
N	50	47.9	1.04
N	100	100	1

C

Família VH4

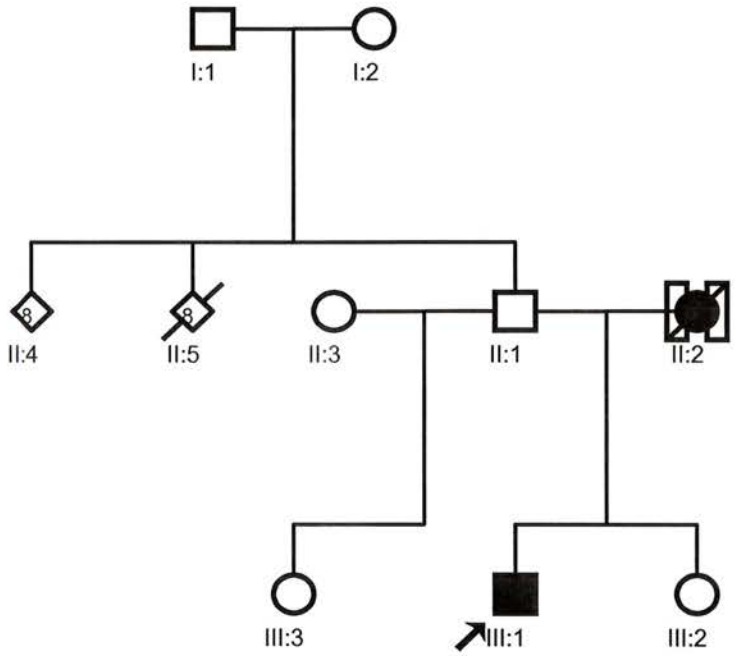


Heredograma da Família VH4

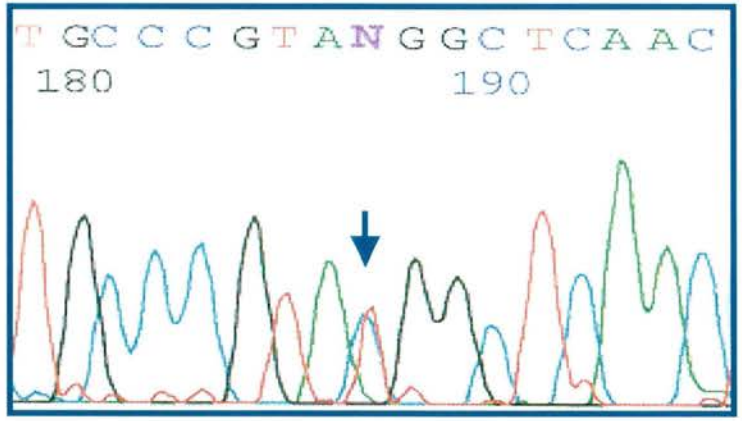


VHL: mutação Phe136Ser, consistindo da mutação missense no codon 136 do exon 2
TTT (Phe) > TCT (Ser)

Família VH5

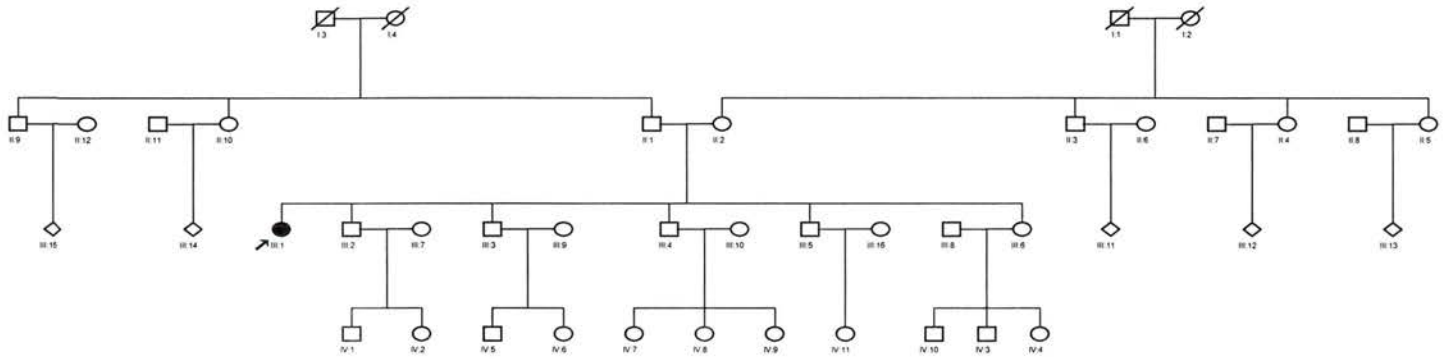


Heredograma da Família VH5

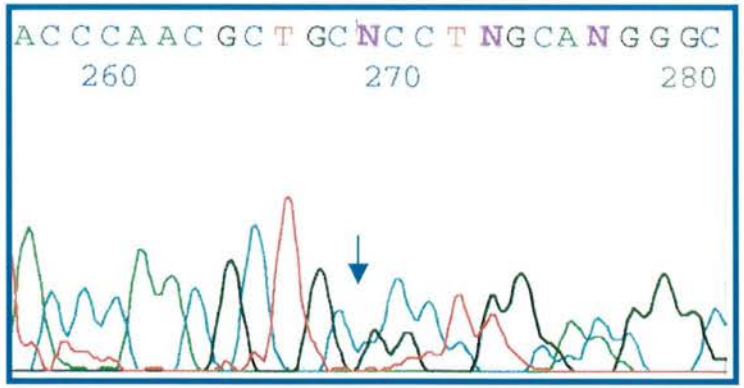


VHL: mutação Trp88Arg, correspondendo à mutação missense no codon 88 do exon 1
TGG (Trp) > CGG (Arg)

Família VH6

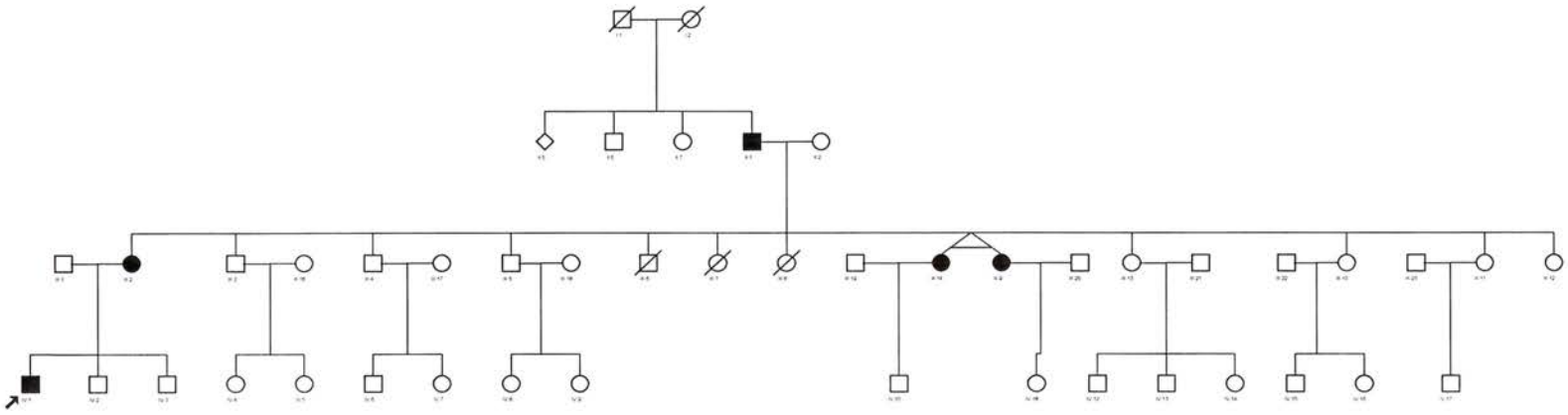


Heredograma da Família VH6

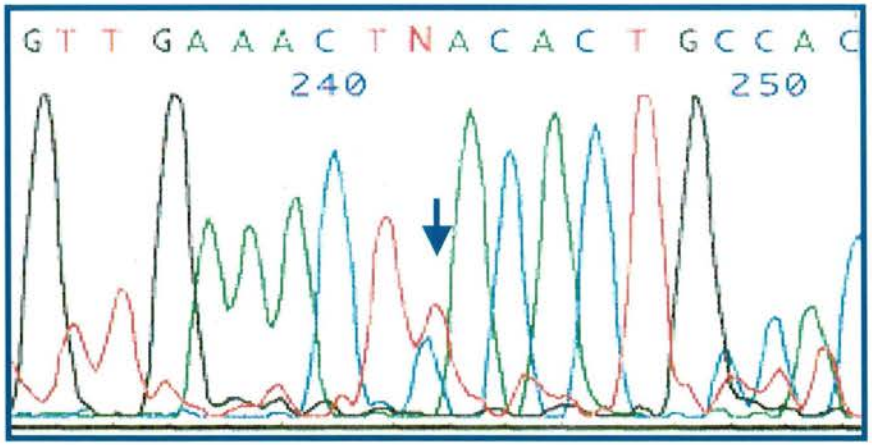


VHL: mutação 305delC, correpondendo à
deleção de 1nt no codon 102 do exon 1
CTGCcGCCT (Leu-Pro-Pro…) > CTGCGCCT (Leu-Arg-Leu…stop codon)

Família VH7

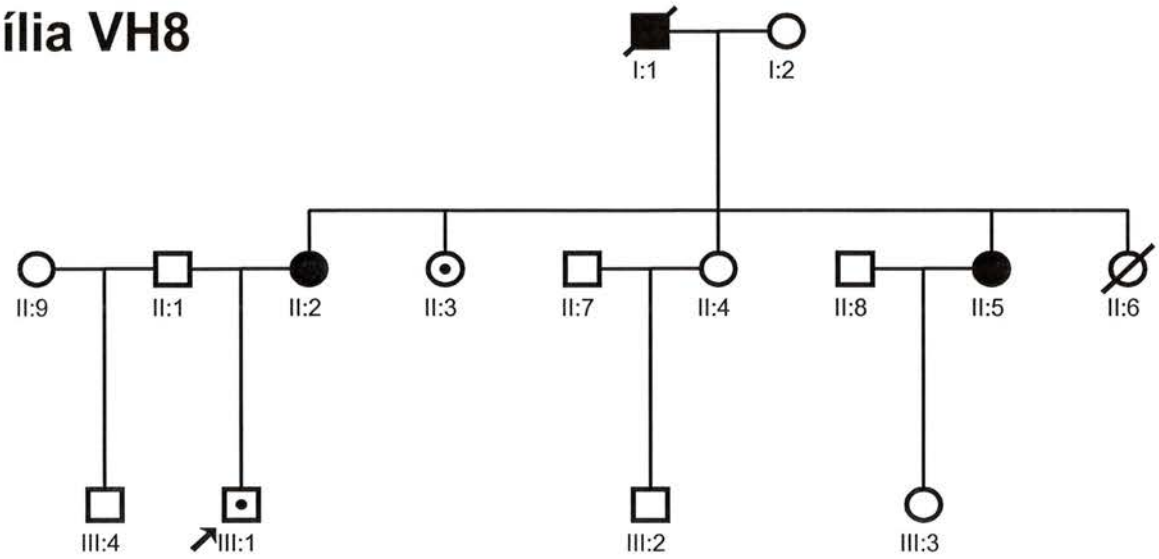


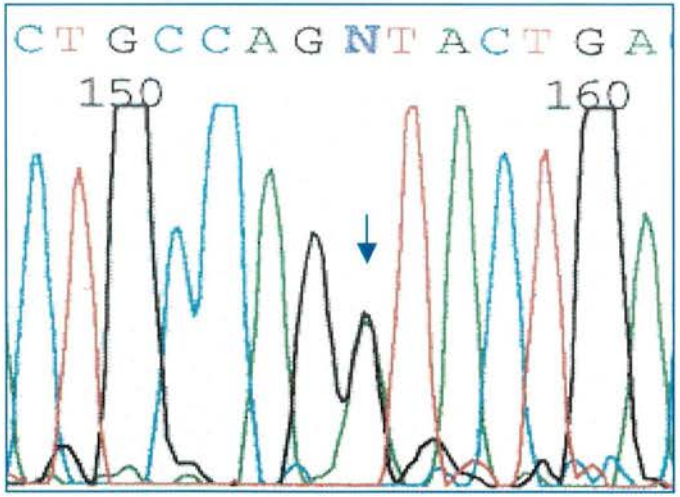
Heredograma da Família VH7
Diagnóstico de síndrome de hemangioma cavernoso familial.
O seqüenciamento e o *Southern-blot* do gene *VHL* mostrou apenas um polimorfismo intrônico.



Polimorfismo intrônico: nt 8863
TGAagatttctgttgaaact(t > c)

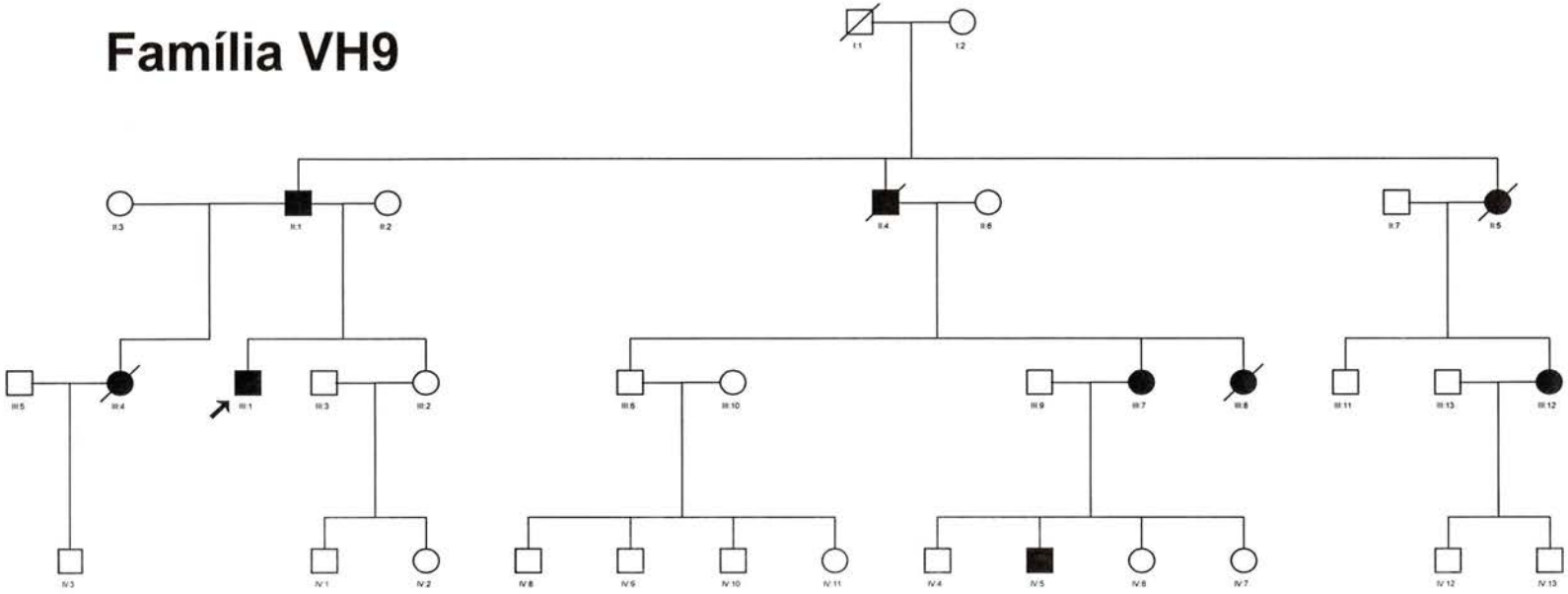
Família VH8

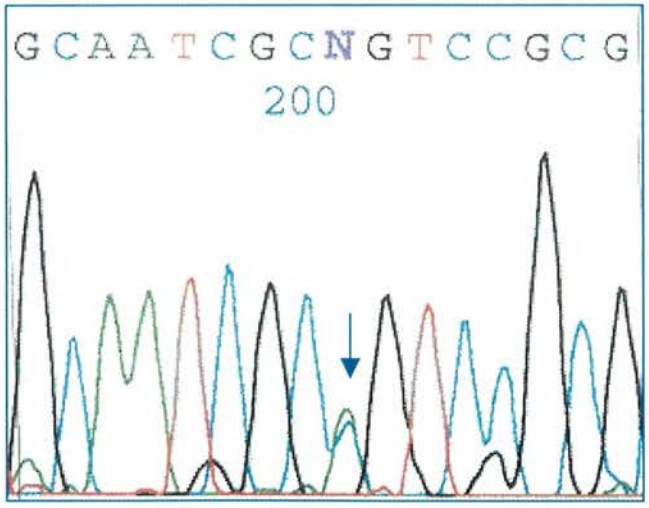




VHL: mutação IVS2+1G>A no sítio de splice na região 3'no nucleotídeo localizada –1 do exon 2 (g>a) IVS2+1G>A

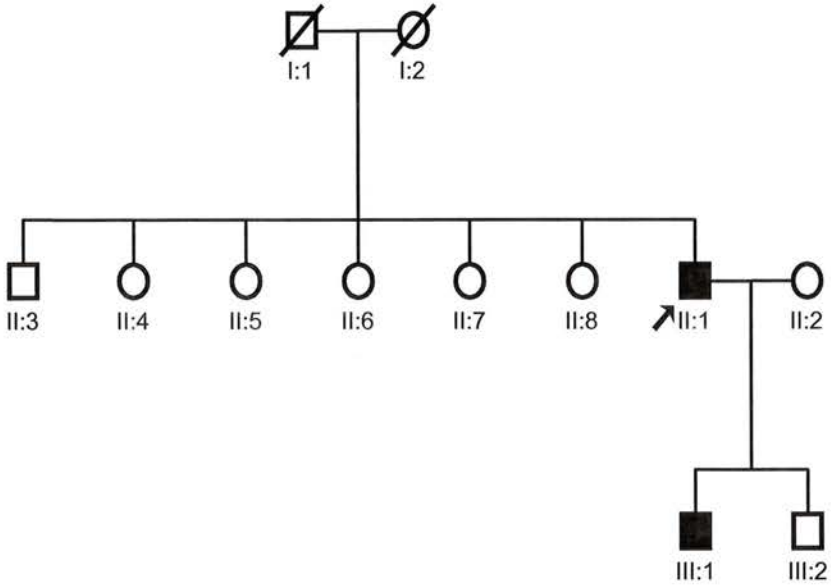
Família VH9



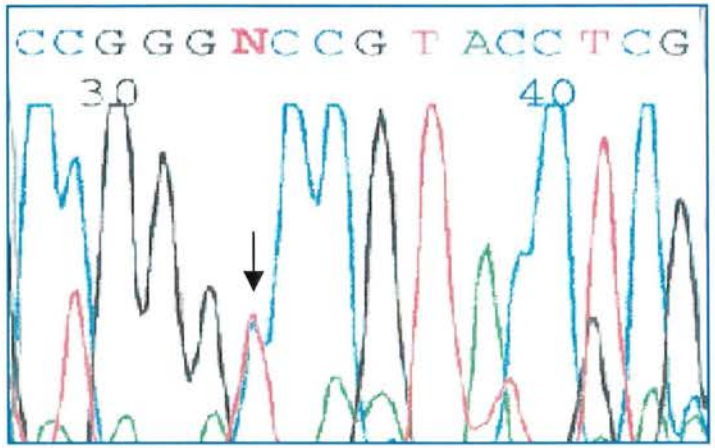


VHL: mutação Ser80Arg, consistindo na mutação *missense* no codon 80 do exon 1
AGT (Ser) > CGT (Arg)

Família VH10



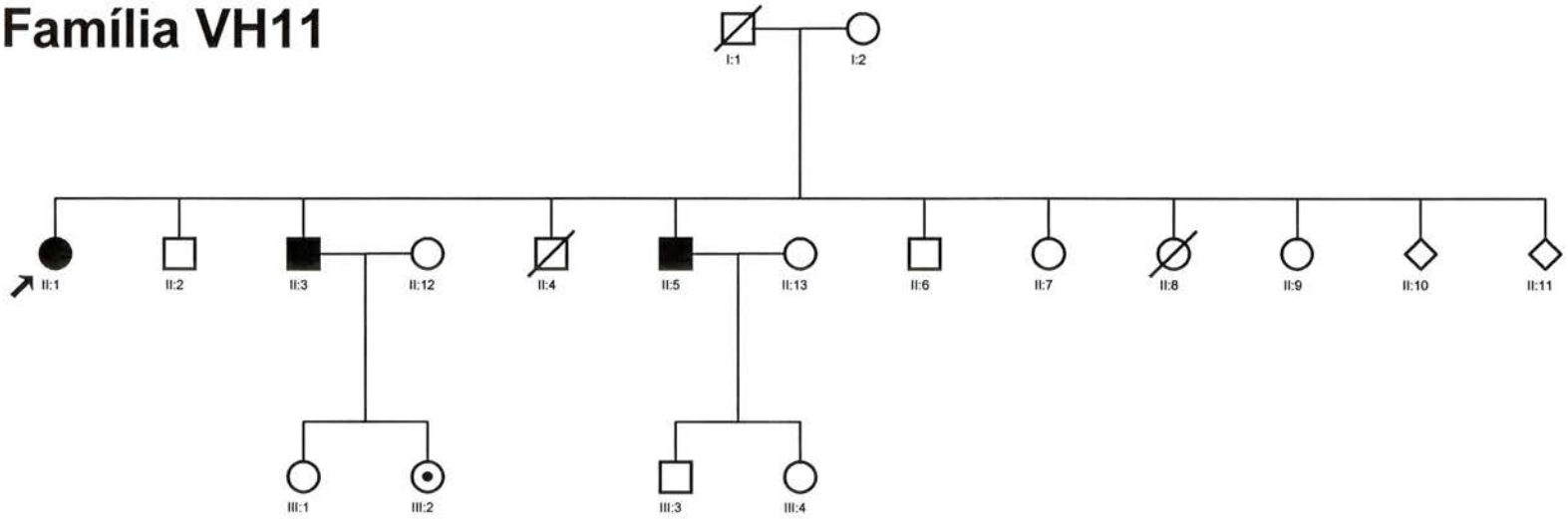
Heredograma da família VH10

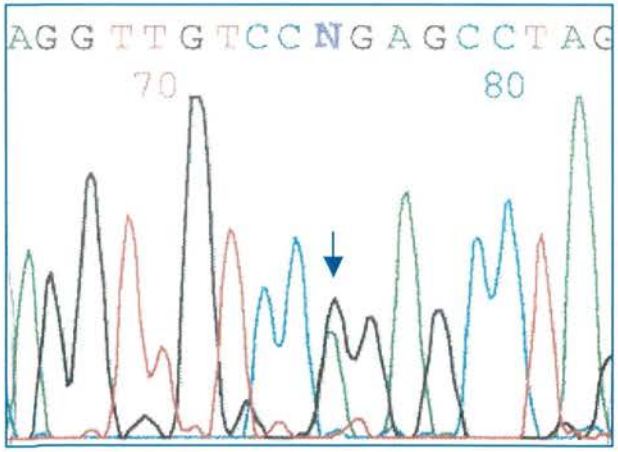


VHL: mutação IVS1+7G>A, localizada no íntron 1 na região de *splicing* (iniciador reverse).

FUNDAÇÃO ... PRUDENTE BIBLIOTECA

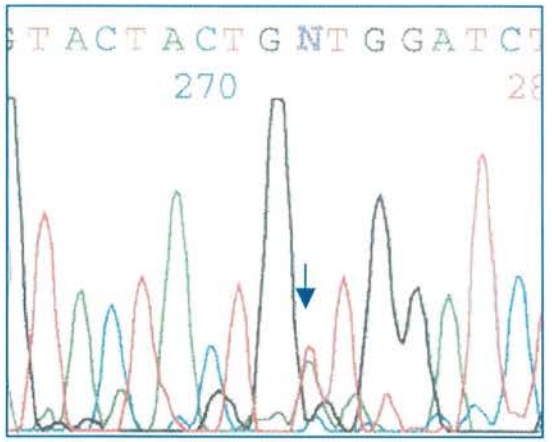
Família VH11



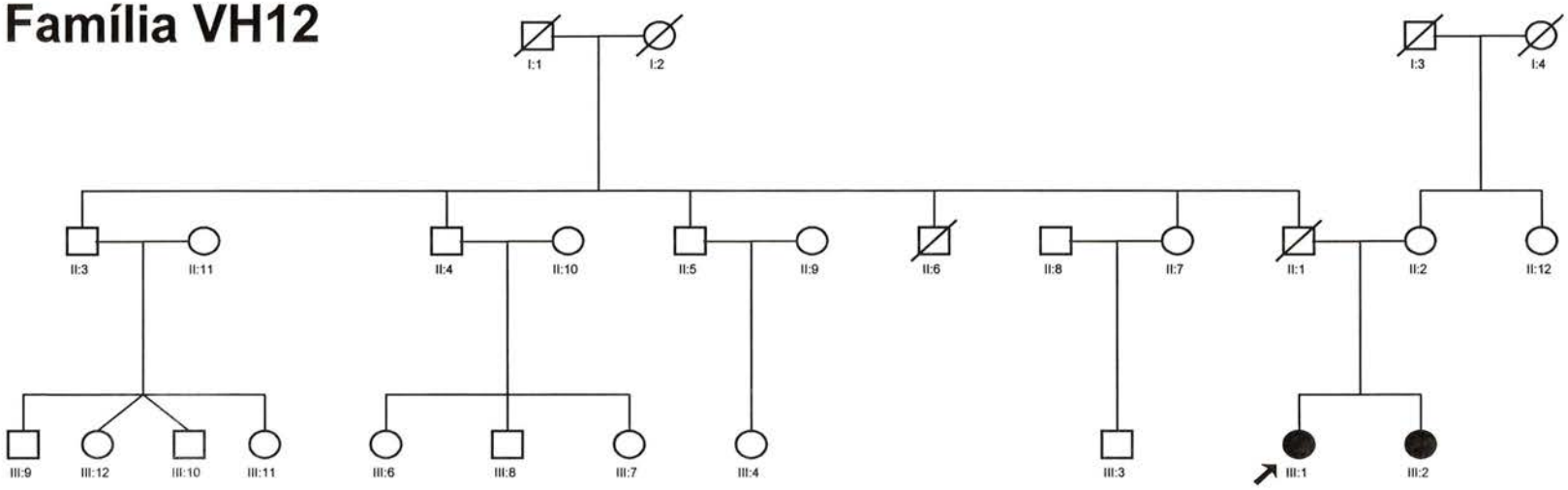


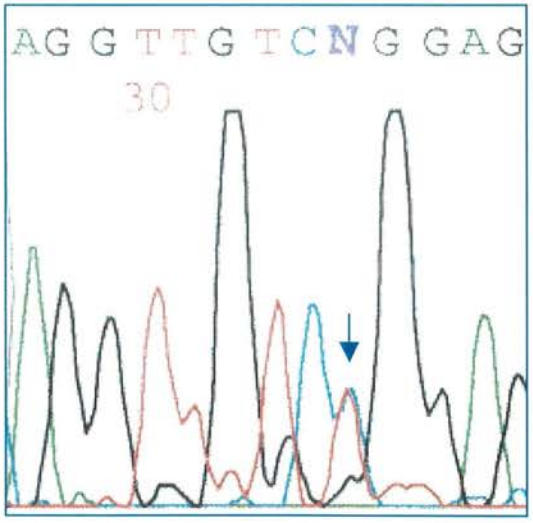
VHL: mutação Arg167Gln
mutação missense no codon 167
do exon 3
CGG (Arg) > CAG (Gln)

Polimorfismo IVS –94T>A no intron 2



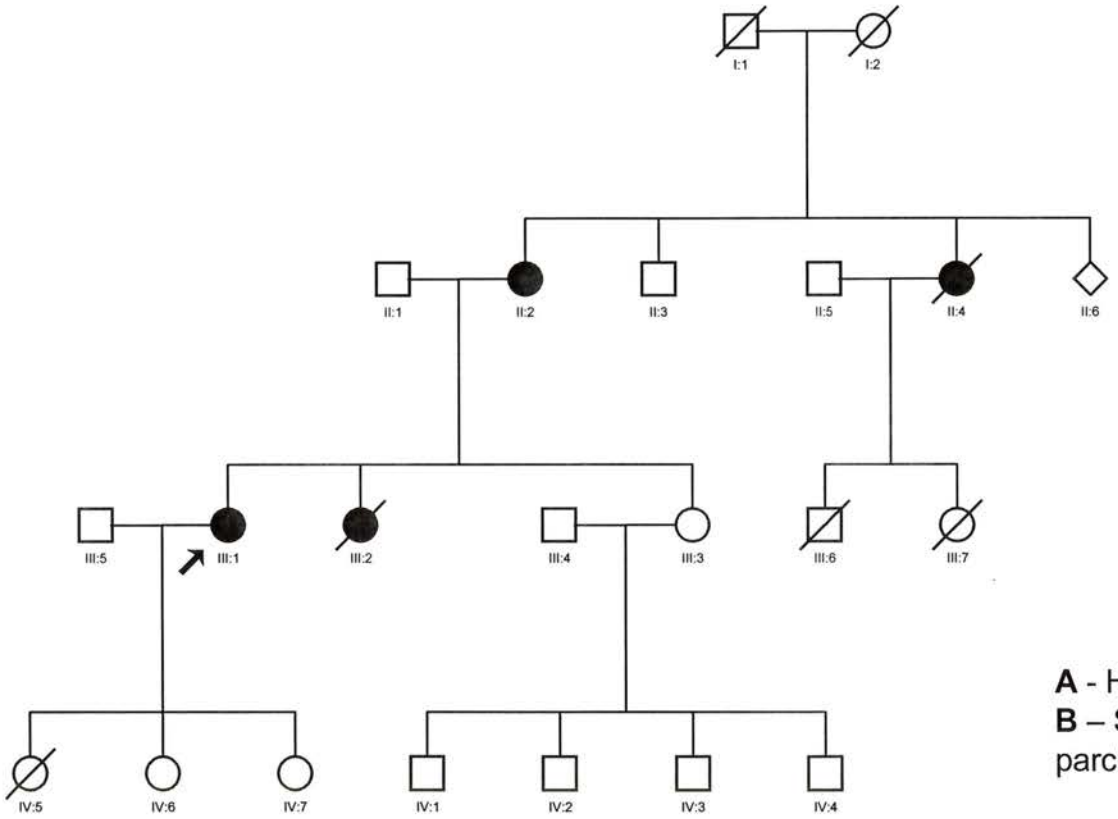
Família VH12

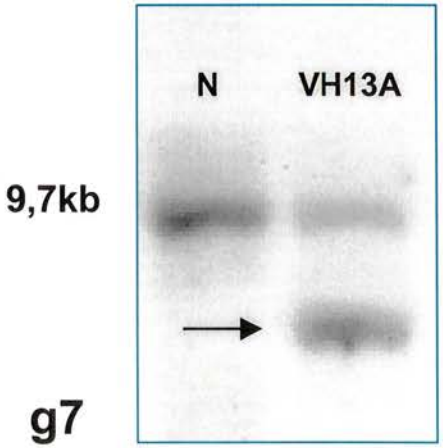




VHL: mutação Arg167Trp,
mutação missense no codon 167 do exon 3
CGG (Arg) > TGG (Trp)

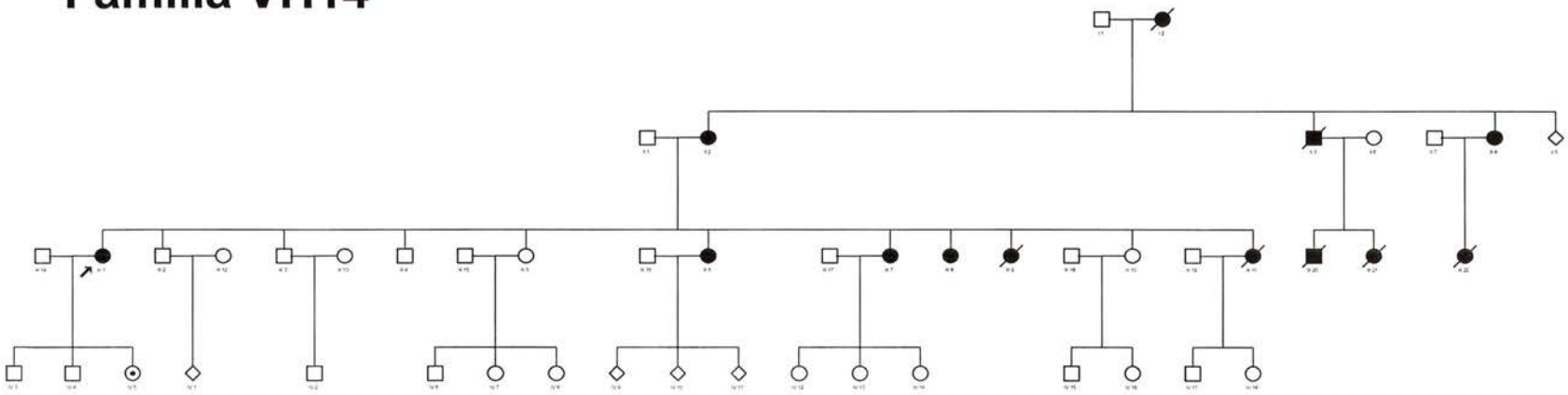
Família VH13

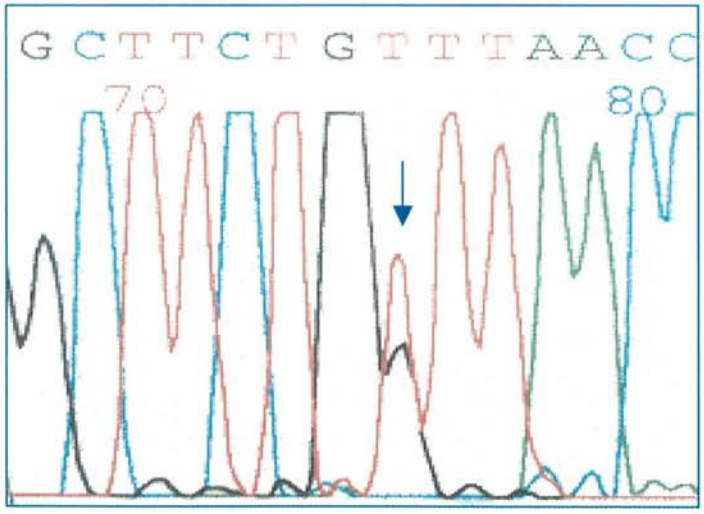




A - Heredograma da Família VH13.
B – Southern-blot mostrando uma deleção parcial envolvendo o gene *VHL*.

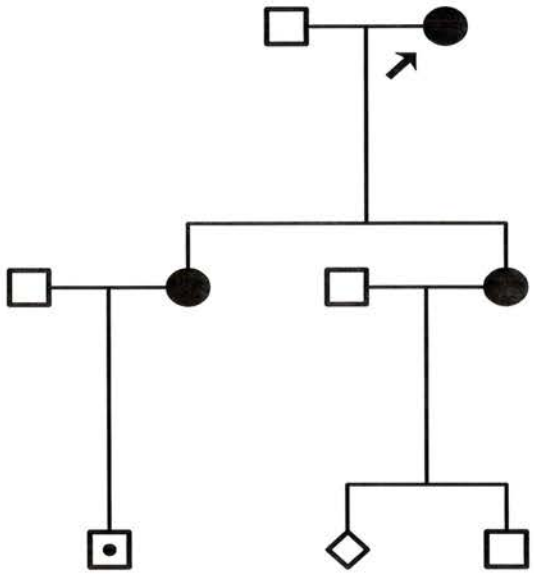
Família VH14

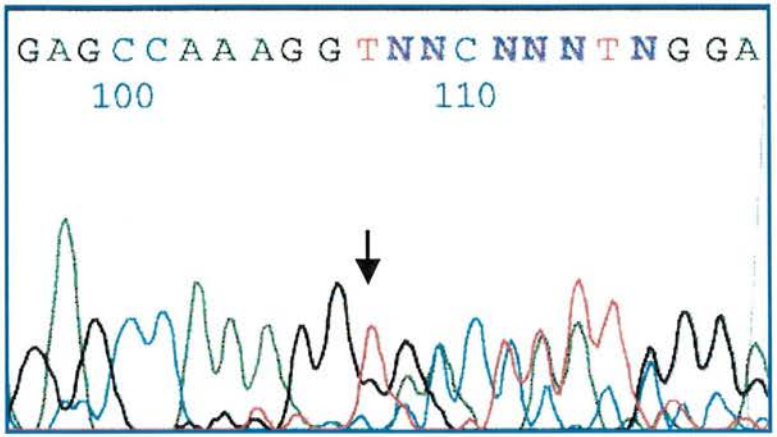




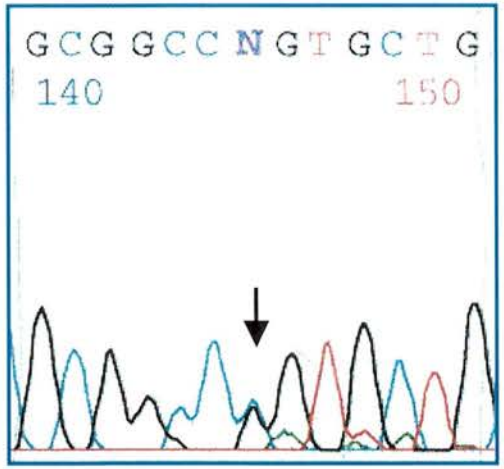
VHL: mutação Val130Phe,
mutação missense no codon 130 do exon 2
GTT (Val) > TTT (Phe)

Família VH15





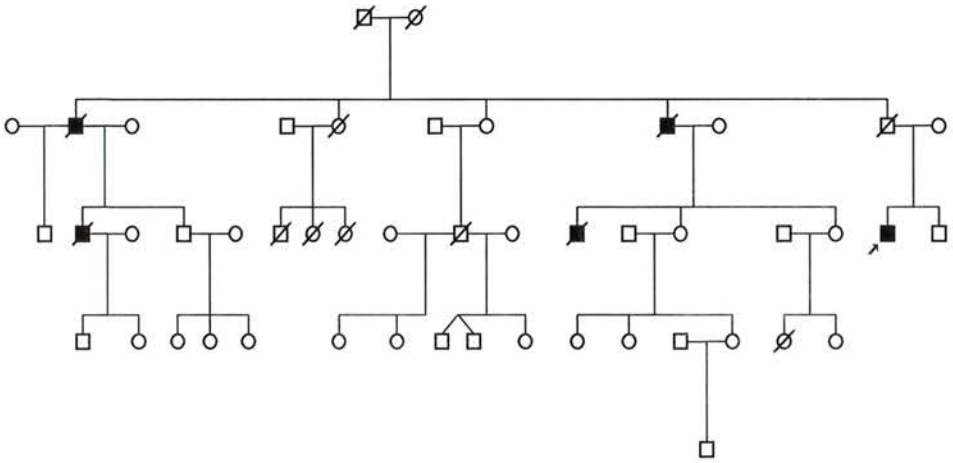
VHL: mutação 344delA, consistindo na deleção de 1nt no codon 115.



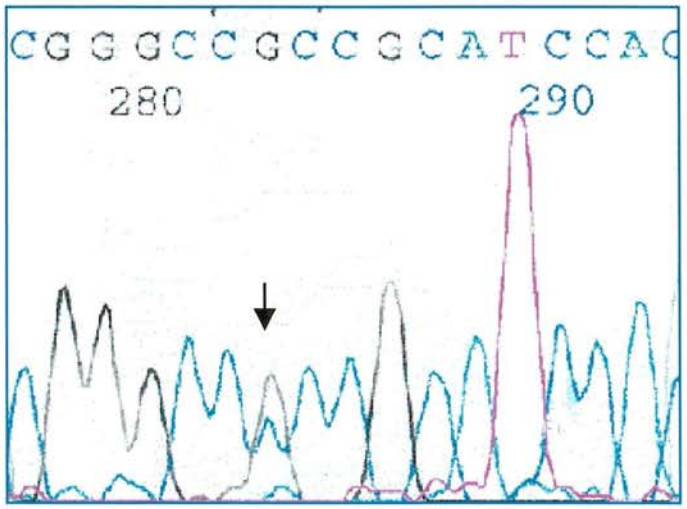
Polimorfismo: no codon 61
CCC(pro) > CCG(pro)
"mutação silenciosa"

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE BIBLIOTECA

Família VH16

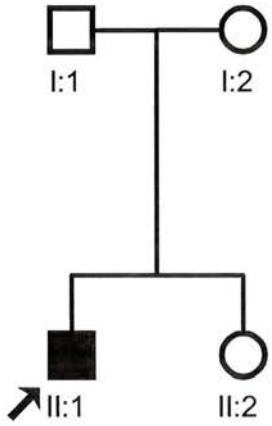


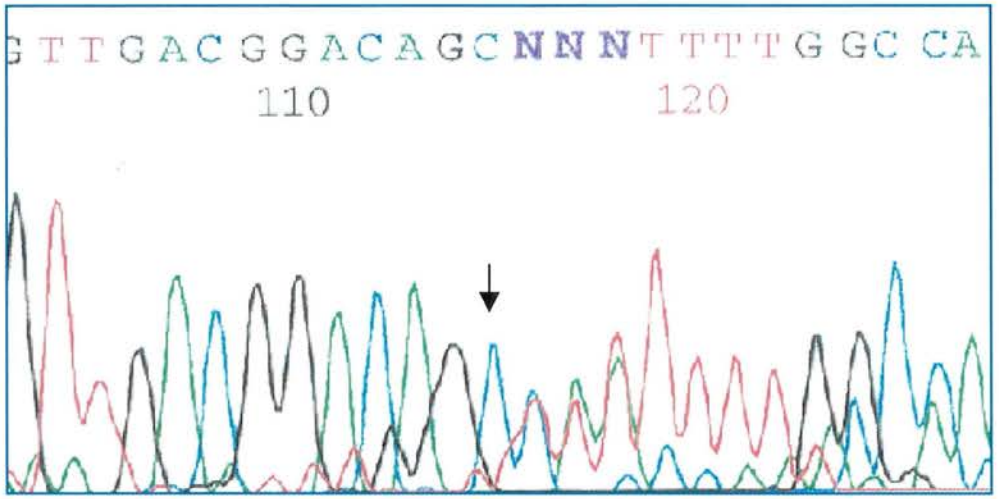
VHL: mutação Arg107Pro, correspondendo à mutação missense no codon 107 G>C



Mutação: tipo *missense* no codon 107
CGC(arg)>CCC(pro)

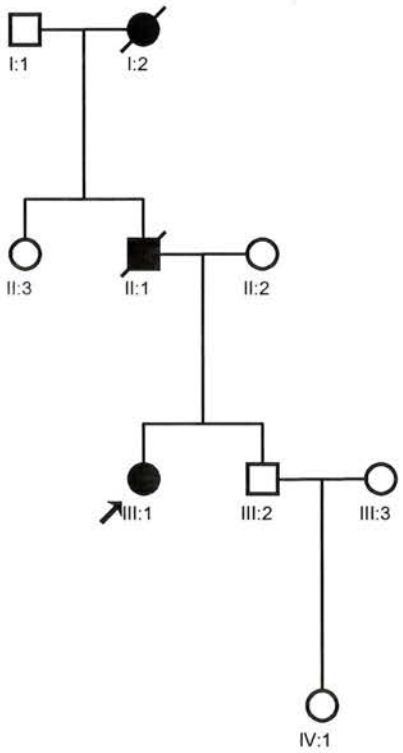
Família VH17

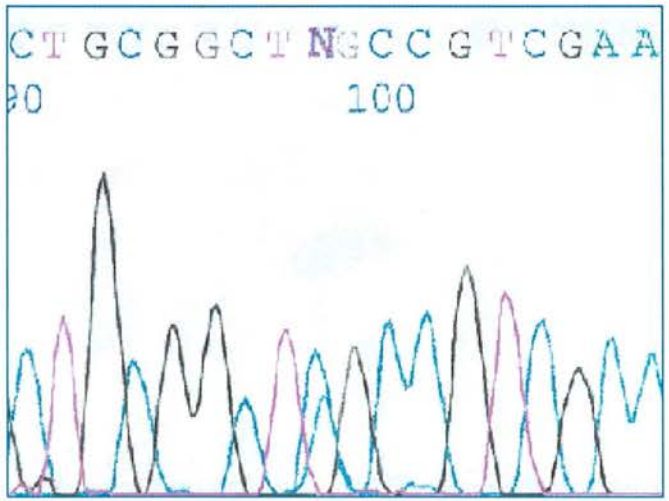




Mutação: tipo *frameshift* no codon 146
Deleção de 1 nt C, levando à alteração da fase de leitura

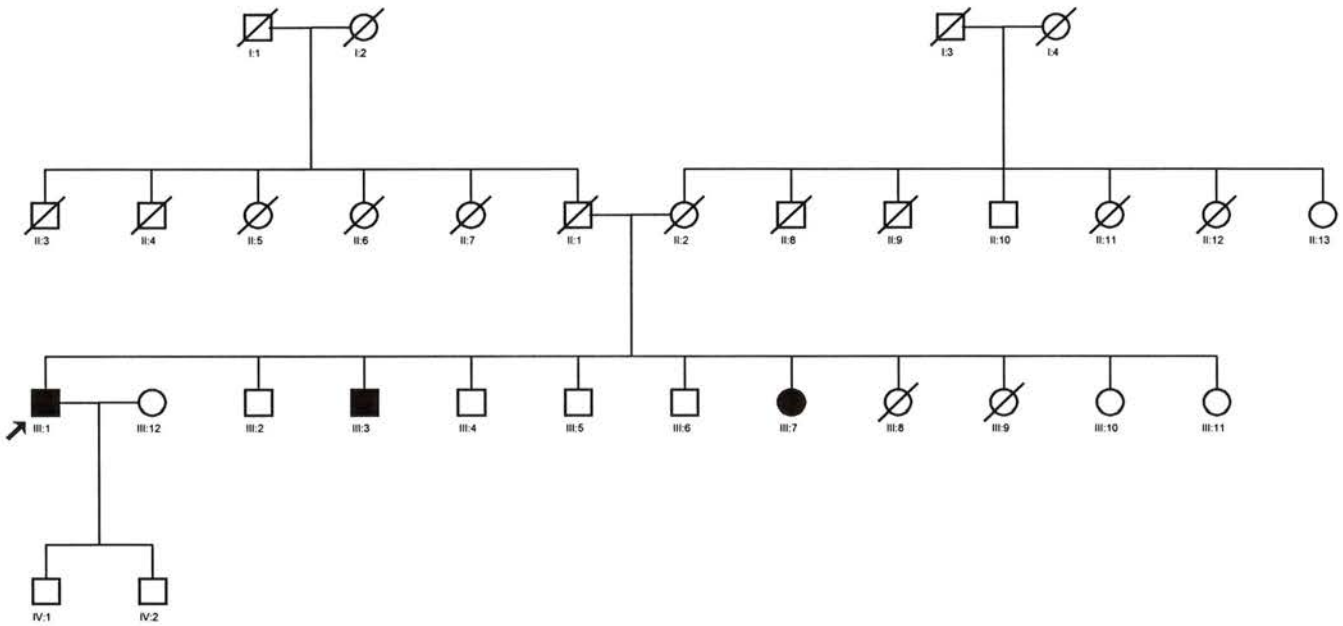
Família VH18





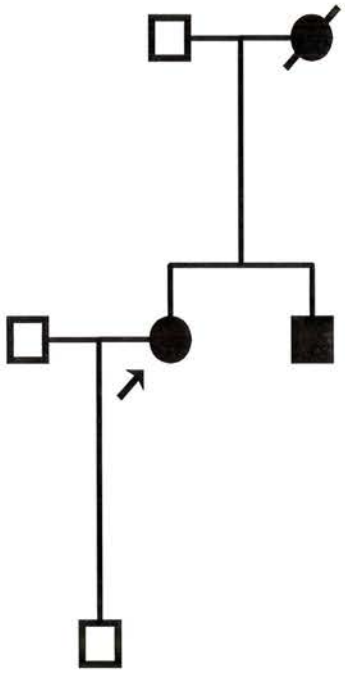
VHL: mutação Glu94Stop, correspondendo a uma mutação tipo *nonsense* que introduz um códon de terminação precoce no códon 94.

Família VH19

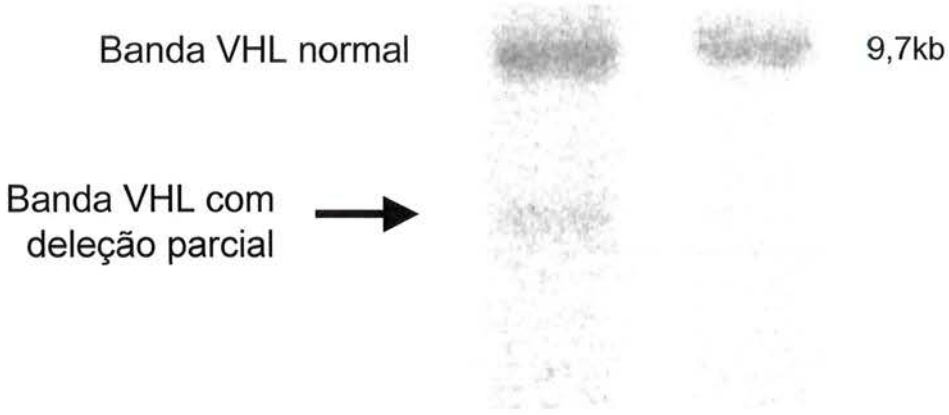


Heredograma da família VH19, suspeita de VHL. O seqüenciamento e o *Southern-blot* do gene *VHL* foram normais. O diagnóstico definitivo foi de Ataxia espino-cerebelar. O probando, que apresentava CR bilateral desenvolveu posteriormente adenocarcinoma de próstata.

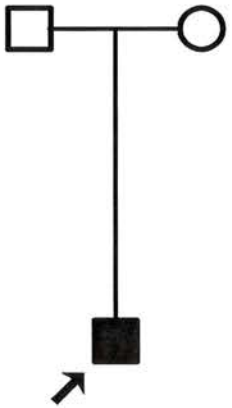
Família VH20

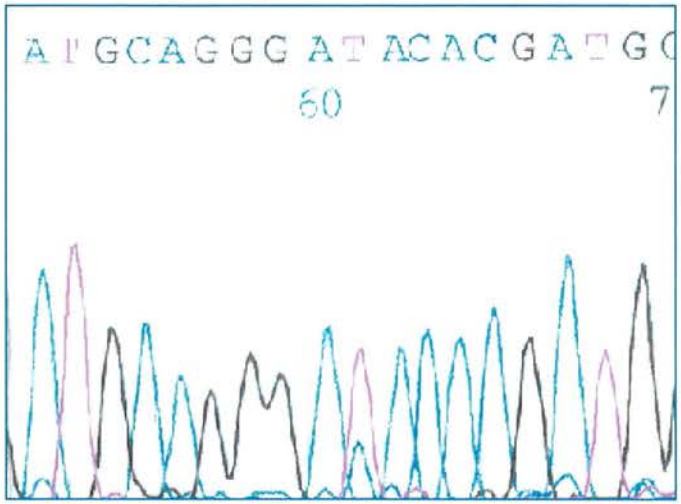


Mutação: Deleção partial envolvendo o gene VHL, por *Southern-blot*.



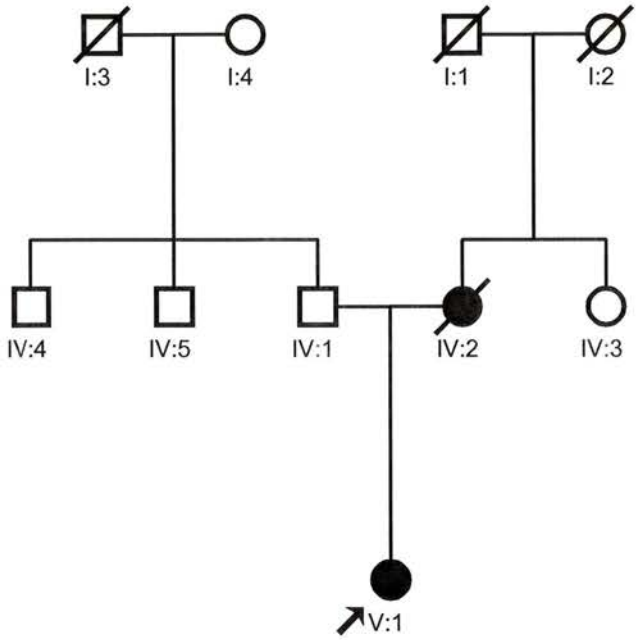
Família VH21

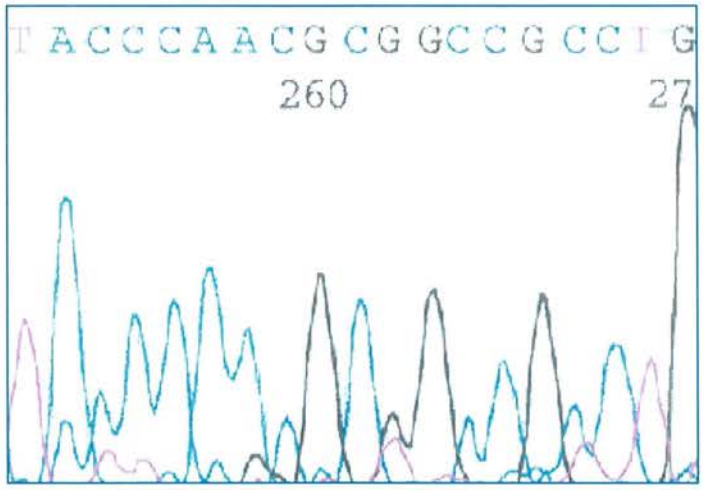




VHL: mutação Thr124Ile, correspondendo a uma mutação do tipo missense no codon 124.

Família VH22

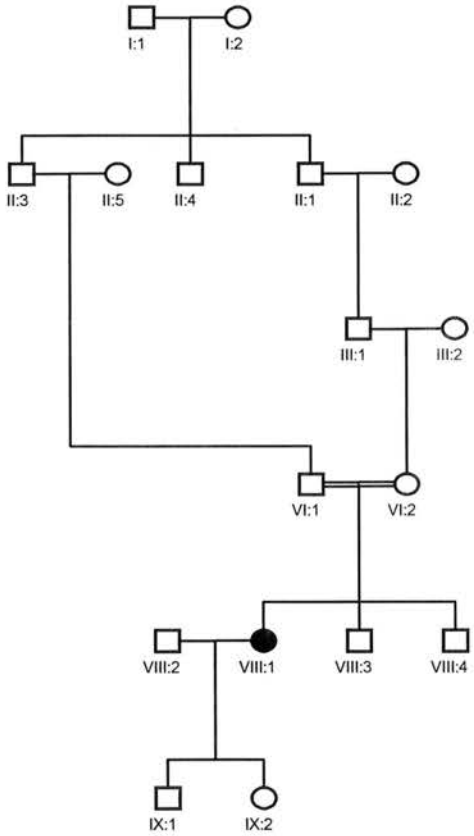


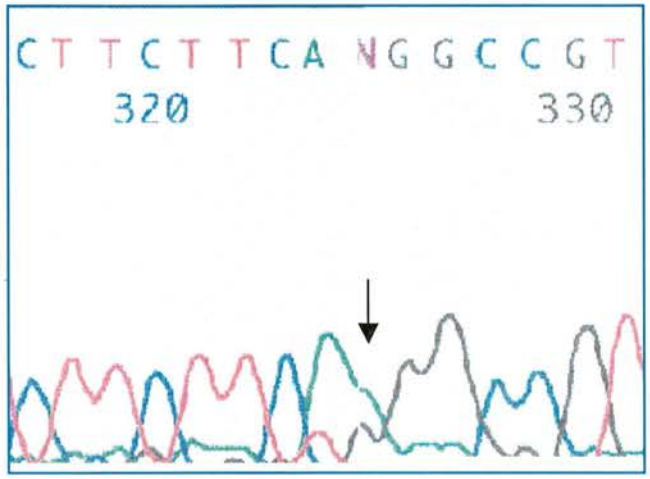


VHL: mutação Leu101Arg, correspondendo à uma mutação missense no codon 101.

FUNDAÇÃO ANTÓNIO PRUDÊNCIO BIBLIOTECA

Família HB1





Paciente HB1A com hemangioblastoma aparentemente esporádico
Mutação: *missense* no codon 25
Iniciador reverse
CCT(pro) > CTT(leu)

ANEXO 8

Capítulo "Doença de von Hippel-Lindau" (autor)

Em "Genética Molecular do Câncer". Sociedade Brasileira de Cancerologia. Novembro de 2000, Agosto de 2002 (segunda edição). ISBN 85-88092-01-8

Iúri Drumond Louro, Juan Clinton Llerena Jr.,
Mauro Sérgio Vieira de Melo, Patrícia Ashton-Prolla,
Nívea Conforti-Froes

GENÉTICA MOLECULAR DO CÂNCER

São Paulo
MSG Produção Editorial
2002

GENÉTICA MOLECULAR DO CÂNCER

Copyrights © by MSG Produção Editorial Ltda.

Apoio:
Sociedade Brasileira de Cancerologia

Coordenação Editorial:
Sandra Galeotti

Ilustração da Capa:
Barbara Eckstein
(Ilustração de capa feita originalmente para o site
www.medicinamolecular.com Direito de cópia cedido pelos proprietários
e pela autora a esta Editora)

Capa e Diagramação:
M&C

Ilustrações:
Morandini Design e Arte Ltda., M&C

Editores:
Iúri Drumond Louro
Dr. Médico – Faculdade de Medicina - UFES
Ph.D. em Genética Molecular, University of Alabama at Birmingham, Postdoc Fellow,
Departamento de Bioquímica - Departamento de Hematologia e Oncologia
University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA,
Research Assistant Professor
Micro Array Lab Director

José Cláudio Casali da Rocha
Titular do Departamento de Oncogenética – Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo - São Paulo
Doutorando em Ciências – área de Oncologia / Genética –Fundação Antônio Prudente

Mauro Sérgio Vieira de Melo
Médico Cancerologista (TECa) com Área de Concentração em Oncologia Clínica.
Professor Assistente - Faculdade de Medicina de Petrópolis – RJ
Professor – Curso de Pós-graduação de Cancerologia (Prof. Carlos Alberto Moraes de Sá),
Instituto de Pós-graduação Médica Carlos Chagas, Rio de Janeiro(RJ)

Patrícia Ashton-Prolla
Médica Geneticista, Doutora em Bioquímica, UFGRS
e Postdoc Fellow, American College of Medical Genetics.
Hospital das Clínicas de Porto Alegre e Hospital Santa Rita, ISCMPA - RS.

Nívea D. F. Conforti- Froes
Mestre e Doutor em Genética (UNESP)
Pós- Doutor pela Universidade do Texas, Deptº de Medicina Preventiva, Ramo Médico de Galveston, EUA
Professora de Graduação e Pós-Graduação – UNESP/Campus S.J.Rio Preto – SP

G328
GENÉTICA MOLECULAR DO CÂNCER/ Louro, Iúri D.; Llerena Jr., Juan C.; Vieira de Melo, Mauro S.; Ashton-Prolla, Patrícia; Conforti-Fróes, Nívea.
São Paulo
MSG Produção Editorial, LTDA-ME. Primeira Edição: novembro de 2000. Segunda Edição: agosto de 2002

ISBN 85-88092-01-8

Inclui Bibliografia
1. Câncer – Aspectos Genéticos 2. Câncer – Aspectos Moleculares. I. Louro, Iúri Drumond

CDD-616.994

Proibida, sob a forma da Lei de Proteção aos Direitos Autorais e Propriedade Intelectual,
a reprodução total ou parcial desta obra, por quaisquer meios, sem a prévia autorização escrita
dos autores e da Editora MSG Produção Editorial Ltda.
Rua Maria Figueiredo, 374 040002-002 São Paulo - SP
Tel./Fax:(11) 3744-0710 e-mail: galeotti@terra.com.br

Parte IV — O Câncer em Síndromes Hereditárias

Capítulo 18
Síndrome de Von Hippel-Lindau

José Cláudio Casali da Rocha

Introdução

A *angiomatosis retinae* (ou angioma de retina) foi descrita em 1904 por von Hippel em dois irmãos, reconhecendo inclusive seu caráter hereditário. Lindau, em 1927, relatou que os hemangioblastomas (HB) de cerebelo e da retina representavam a mesma patologia, porém em sítios diferentes[21]. A doença de von Hippel-Lindau (VHL) é uma doença hereditária multissistêmica, causada por mutação germinativa no gene VHL que predispõe o portador a manifestações benignas e malignas em diversos órgãos. O início dos sintomas pode ocorrer a partir da infância, já nos primeiros anos de vida e incluem: angioma de retina, HB de sistema nervoso central (SNC), feocromocitoma, carcinoma renal do tipo células claras e cistos múltiplos renais, pancreáticos, hepáticos e de epidídimo. O aconselhamento genético, o avanço dos métodos diagnósticos e de tratamento vêm mudando o curso desta enfermidade com a diminuição da morbidade e da mortalidade, contribuindo para a melhoria da qualidade de vida das famílias afetadas por esse mal. O aconselhamento genético das famílias com VHL contribui para o entendimento da doença, estabelece riscos e programas de rastreamento.

Epidemiologia e Genética

A doença VHL tem sido encontrada em todos os grupos étnicos. Estudos epidemiológicos realizados na Inglaterra[23] e na Alemanha[9] revelam uma incidência de 1/39.000 a 1/53.000 nascimentos e uma prevalência de 1/85000 a 1/31000. Devido à raridade e à diversidade clínica desta doença, é provável que muitos casos sejam subestimados. A penetrância é de 97% em torno dos 60 anos e praticamente todos os indivíduos portadores da mutação irão desenvolver alguma manifestação da doença no decorrer da vida. A síndrome VHL é hereditária e segue um padrão autossômico dominante afetando igualmente ambos os sexos.

Raramente uma mutação de novo no gene ocorre na ovogênese, espermatogênese - ou mesmo nas fases iniciais da embriogênese - dando origem a um indivíduo afetado sem história familiar. A incidência de mutação de novo é em torno de 5% das mutações detectadas[33], mas é provável que este número esteja subestimado, pela dificuldade de diagnóstico clínico.

A razão da tendência para desenvolver tumores em determinados tecidos alvo (olho, SNC, rim, adrenal, pâncreas e epidídimo) não é conhecida. Como apenas um evento mutacional é necessário para a formação de tumores nos pacientes que herdam 1 alteração dos pais, os tumores são tipicamente e com maior freqüência bilaterais e multicêntricos, ocorrendo em uma idade mais precoce do que em seus correspondentes esporádicos[24].

É recomendado que pacientes e familiares de risco sejam encaminhados para aconselhamento genético com um geneticista/oncologista clínico para orientação e conduta baseadas nos riscos individuais e familiares.

Manifestações Clínicas

As lesões podem surgir a partir dos 3 anos de idade, porém a média de idade dos primeiros sintomas é em torno 25-26 anos. O angioma de retina e o

HB de cerebelo são geralmente a primeira manifestação da doença em 25% e 34% dos casos, respectivamente. Uma característica peculiar desta síndrome é a combinação de tumores malignos e benignos em mais de dez órgãos alvo diferentes. Em geral os portadores sintomáticos apresentam tumores em 1 ou 2 sítios. Aproximadamente 60.2% dos pacientes desenvolvem HB cerebelar, 41% angioma de retina, 25.3% carcinoma renal de células claras (CR), 14.5% HB espinhal e 14.5% feocromocitoma[23].

Clinicamente, o HB de cerebelo desenvolve-se quase invariavelmente antes dos 50 anos [12], sendo a idade média de diagnóstico 29 anos. Os HB são tumores altamente vascularizados de características morfologicamente benignas - muitas vezes assintomáticos - e tendem a ocorrer de forma múltipla, afetando principalmente o cerebelo e a medula espinhal e, mais raramente, o cérebro. Apenas 2% dos HB do sistema nervoso central ocorrem no parênquima cerebral.

O angioma de retina é indistinguível morfologicamente do HB do cerebelo, sendo de apresentação comum na doença VHL. O oftalmologista tem um papel crítico no diagnóstico da doença - uma vez que 43% dos pacientes apresentam angioma de retina como primeira manifestação clínica.

O tipo histológico dos CR de pacientes com VHL é tipicamente de células claras e em 35% das vezes se apresenta clinicamente com componente cístico[28]. Em comparação com o seu correspondente esporádico, o CR associado a síndrome de VHL ocorre em uma idade menor (45 contra 62 anos), é mais freqüentemente bilateral (mais de 75% dos pacientes portadores de VHL) e multicêntrico em 87% dos casos[7]. Além disso, o CR da doença de VHL parece apresentar uma taxa de crescimento menor e metástase mais tardia em relação a forma esporádica[3].

A média de idade ao diagnóstico de feocromocitoma em VHL é de 29 ± 14 anos (5 a 62 anos), de acordo com o estudo francês[34] que analisou 36 casos da doença. Tumor bilateral foi documentado em 42% dos casos, paraganglioma estava associado com feocromocitoma adrenal em 4 casos e feocromocitoma maligno ocorreu em 3 casos. Em 6 casos, feocromocitoma foi a primeira manifestação da doença.

Outras complicações viscerais freqüentes incluem cistos renais, pancreáticos e de epidídimo. Adenomas, adenocarcinoma e tumores neuro-endócrinos pancreáticos podem ocorrer em pequeno número de pacientes. É descrito policitemia paraneoplásica associada com HB do cerebelo ou com CR.

Recentemente, tem sido descrita a associação de tumores de saco endolinfático - extremamente raros na população geral - em 11% dos pacientes com doença VHL, ocasionando perda auditiva, zumbido e paresia facial[26].

Diagnóstico Clínico

Na presença de uma história familiar positiva para a doença de VHL, o diagnóstico clínico pode ser feito pela identificação de uma única manifestação característica da síndrome: angioma de retina ou HB do SNC, CR, feocromocitoma, cistoadenoma do epidídimo e cistos pancreáticos. Já nos casos onde não há história familiar, são necessários pelo menos dois angiomas ou HBs (de retina ou de SNC) ou um único angioma ou HB associado a uma outra manifestação clínica característica da síndrome de VHL[27].

Classificação de VHL - As famílias com VHL apresentam variações quanto à apresentação dos tumores, sendo que qualquer combinação das lesões pode resultar num fenótipo familiar específico. Porém, foi observado que, enquanto os angiomas, cistos e tumores ocorriam indistintamente na maioria das famílias, apenas algumas famílias apresentavam agregação de casos de feocromocitoma. Em decorrência da sua enorme heterogeneidade, a síndrome VHL foi classificada pelo Instituto Nacional do Câncer dos EUA (NCI) em VHL tipo 1 (sem feocromocitoma) e VHL tipo 2 (com feocromocitoma). Posteriormente, com o estudo das mutações e correlação com o fenótipo, o grupo 2 foi subdividido em tipo 2A (com feocromocitoma, sem CR ou cistos pancreáticos) e tipo 2B (com feocromocitoma, com CR e cistos pancreáticos). Mais recentemente, o feocromocitoma familiar vem sendo chamado de tipo 3.

O Gene VHL - O locus do gene responsável pela doença de von Hippel- Lindau foi mapeado no cromossoma 3, na região 3p25-26 através de análise de ligação e o gene VHL foi clonado em 1993 [19,36]. Estudos de perda de heterozigosidade (LOH) reve-

lam perda do alelo selvagem nos tumores associados ao VHL, demonstrando que o gene VHL comporta-se como um gene supressor de tumor[39]. Estes achados são compatíveis com a hipótese de Knudson de tumorigênese em duas etapas: a primeira é constituída pela herança de uma mutação germinativa no gene VHL proveniente de um dos pais afetados[15]. A segunda etapa ocorre quando uma célula somática sofre uma mutação ou deleção do alelo selvagem remanescente, possibilitando a formação de tumores. A inativação da única cópia funcional do gene VHL libera a célula da função supressora de tumor do gene VHL.

O gene VHL é composto por 3 exons e produz uma proteína de 213 aminoácidos, sendo que o exon 2 sofre "splicing" alternativo numa proporção 2:1 gerando uma proteína de 160 aminoácidos[19]. A maior expressão nos tecidos adultos ocorre no cérebro, rim, glândula adrenal, próstata, pulmão e coração.

O primeiro alvo funcional da proteína VHL (pVHL) identificado foi a Elongina-C, que juntamente com a Elongina-B formam o complexo Elongina-SIII. Este complexo funciona como fator transcricional celular estando envolvido na regulação negativa do alongamento do mRNA. Portanto, o gene VHL mutado interfere favorecendo o alongamento do mRNA, acelerando o processo transcricional e favorecendo o crescimento celular[6,18]. O papel da pVHL na angiogênese tumoral coloca o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) como outro alvo da pVHL[13, 22]. Além disso, a proteína VHL tem sido implicada na formação da matriz extracelular[30], regulação do pH extracelular[14] e regulação da saída do ciclo celular[31].

Diagnóstico Molecular e Correlação Genótipo-Fenótipo - O diagnóstico molecular de VHL possibilita detectar a mutação em membros assintomáticos da família, selecionando os indivíduos considerados como de alto risco e, portanto candidatos ao programa de rastreamento. A pesquisa de mutação de novo no gene VHL é particularmente importante nos indivíduos com tumores "típicos" de VHL e sem história familiar. Até o momento foram registradas 205 mutações germinativas no banco de mutações do The Human Gene Mutation Database - Cardiff (http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/120488.html) caracterizadas na América do Norte, Europa e Japão.

Até hoje, mais de 550 famílias com VHL foram identificadas na Europa, Estados Unidos e Japão sendo caracterizadas 205 mutações germinativas no gene. Historicamente, a detecção de mutações esperadas nos casos variava de 36% a 82%, dependendo das técnicas utilizadas[1,5,9,34,35,43]. Mais recentemente, com a combinação das técnicas de seqüenciamento, Southern-blot quantitativo e FISH tem sido possível detectar mutações germinativas no gene VHL em 73% a 100% dos probandos[37,42].

Aproximadamente 60% da mutações são *missense* e 40% resultam em uma proteína truncada (http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/120488.html). No entanto, quando classificamos as famílias como VHL tipo 1 e tipo 2, pela ausência ou presença de feocromocitoma respectivamente, observamos que existe uma associação entre o tipo da mutação e o espectro de manifestações clínicas apresentado na família tipo 2. Nas 114 famílias estudas por Chen, o tipo das mutações significativamente diferia entre os dois grupos. Os pacientes com VHL tipo 1 apresentavam mutações que resultavam em um produto gênico truncado (microdeleções e inserções, mutações nonsense e deleções) em mais de 50% dos casos, enquanto que 96% do grupo com VHL tipo 2 tinha mutações do tipo missense. Posteriormente, a classificação do VHL foi subdividida em tipo 2A (com feocromocitoma e sem CR ou cistos pancreáticos) e tipo 2B (com feocromocitoma e com CR e cistos pancreáticos).

Em 1996 Crossey analisou a relação entre genótipo e fenótipo em 65 famílias. Mutações que causam um produto truncado foram detectadas em 70% das famílias sem feocromocitoma e em apenas 16% das famílias com feocromocitoma 5. Por outro lado, 80% das famílias com feocromocitoma apresentavam mutações missense, comparando com apenas 25% nas famílias sem feocromocitoma. Principalmente a substituição da Arginina no codon 167 é associada ao alto risco (62%) de desenvolver feocromocitoma.

O estudo realizado no Japão mostra diferenças no padrão de mutações germinativas naquela população. Cerca de 49% das mutações encontradas nunca haviam sido detectadas em outras populações [42].

Em 2000 Hes também observou que famílias com grandes deleções do gene VHL tem baixo risco de feocromocitoma e que as deleções parciais e completas do gene VHL exibem um fenótipo associado com uma predominância de HB do SNC [11].

Aconselhamento Genético e Rastreamento Clínico

O aconselhamento do risco de câncer familiar serve tanto para analisar os fatores de risco para o desenvolvimento dos tumores nos membros das famílias, bem como para informar as opções disponíveis para a prevenção e para o tratamento precoce das lesões. É recomendado o rastreamento de doença oculta nos familiares de indivíduos portadores da síndrome.

Nos membros assintomáticos da família o enfoque principal é o preventivo. A identificação dos indivíduos de alto risco na família permite ao geneticista dirigir o programa de rastreamento clínico para estes indivíduos para prevenção e detecção precoce das lesões, com impacto positivo na redução da morbidade e na mortalidade da doença[29]. Os indivíduos assintomáticos de 1° e 2° grau relacionados ao paciente têm um risco elevado, sendo portanto considerados para avaliação molecular com o teste genético para detecção de mutação germinativa no gene VHL. O teste positivo define a população de alto risco para a doença VHL que deve seguir um estreito acompanhamento em programa especial de rastreamento clínico.

Os exames recomendados para o rastreamento clínico de indivíduos de alto risco são detalhados na Tabela 1 e incluem a realização periódica de tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM) de crânio e da coluna; ultra-sonografia (US) ou TC de abdome; exame oftalmológico com fundoscopia, dosagem de catecolaminas e ácido vanil mandélico (VMA) urinários; exame clínico com atenção especial ao exame neurológico e do epidídimo. Na presença de zumbido, tinido ou diminuição da acuidade auditiva, a RM do ouvido médio é indicada para investigação de tumor do saco endolinfático.

Perspectivas

A doença VHL é uma doença multissistêmica, envolvendo a participação de diversas especialidades médicas, como oncologia clínica, genética, oftalmologia, neurologia e neurocirurgia, endocrinologia, urologia, radiologia entre outras, acopladas ao laboratório de genética. O acompanhamento ideal do paciente afetado requer portanto, uma abordagem multidisciplinar - inclusive com acompanhamento psicológico - de acordo com as necessidades do paciente.

No Brasil o diagnóstico molecular da doença de VHL têm sido realizado desde 1998, confirmando o diagnóstico clínico e caracterizando as mutações do gene VHL. Desde que identificada a mutação, possibilita posteriormente o rastreamento de familiares

Tabela 1 – Programas de rastreamento clínico de lesões associadas à doença de von Hippel-Lindau instituídos pelo *National Institute of Health* (EUA), pela Universidade de Cambridge (Inglaterra) e pelo 2° Simpósio de VHL ocorrido no Havaí em 1996, este último é o atualmente recomendado.

Teste	NIH	CAMBRIDGE, U.K	HAWAII
Catecolaminas urinárias	A partir de 2 anos, a cada 1-2 anos	Anualmente	No mínimo uma vez ou se PA elevada
Oftalmoscopia	A partir da infância, anualmente	A partir de 5 anos, anualmente	A partir de 6 anos, anualmente
Angiografia fluoresceínica	Não é rotina	Rotina a partir de 10 anos. anualmente	Não é rotina
RM cerebral e espinhal	A partir de 11 anos, a cada 2 anos; Após 60 anos, a cada 3-5 anos a cada 10 anos	A partir da adolescência, a cada 3 anos até 50 anos, depois a cada 5 anos	Iniciar após 20 anos, no mínimo a cada 10 anos
TC ou ultrassonografia abdominal	A partir de 11 anos, US anualmente. A partir de 20 anos, TC anualmente ou a cada 2 anos (US complementar aos achados de TC)	A partir da adolescência, US anual, TC a cada 3 anos	Iniciar com 15-20 anos, repetir US a cada ano

assintomáticos e o aconselhamento genético das famílias acometidas. Nas 15 famílias já estudadas no Brasil, 13 (86,6%) cursavam sem feocromocitoma (VHL tipo 1) e duas tinham feocromocitoma bilateral (13,4%) entre outras manifestações típicas de VHL, porém sem tumor renal ou pancreático (VHL tipo 2A). Foi detectado mutação germinativa no gene VHL em 100% dos probandos com VHL estudados, sendo 4 mutações novas. As duas famílias com feocromocitoma apresentavam mutação do códon 167 do gene VHL, se correlacionando com o fenótipo já descrito anteriormente na literatura. Foram identificados cinco indivíduos portadores assintomáticos que foram incluídos no programa de rastreamento. Por outro lado, o teste molecular negativo isentou de risco 16 familiares, antes considerados de alto risco por serem parentes diretos de indivíduos com VHL. Os benefícios tornaram-se claros especialmente no caso de uma paciente com VHL que, no seguimento de duas lesões sólidas no seu único rim, foi submetida à cirurgia conservadora com exérese das lesões por laparoscopia, preservando o tecido renal e contribuindo para a qualidade de vida da paciente.

Como todos os tumores associados à doença de VHL também ocorrem de forma esporádica, o diagnóstico clínico de casos de novo pode ser dificultado ou mesmo pode ser retardado por muitos anos até que critérios mínimos sejam conseguidos. Assim, na ausência de história familiar, estes tumores podem equivocadamente ser considerados de origem esporádica. Estima-se que aproximadamente 30% dos casos de HB cerebelar "aparentemente esporádicos" tenham mutações germinativas no gene VHL. A prevalência de indivíduos com angioma de retina esporádicos com mutação germinativa no gene VHL é estimativa de 20%. Vários relatos na literatura descrevem a presença de mutação germinativa do gene VHL com tumores esporádicos, principalmente quando manifestados em idade jovem, múltiplos e bilaterais.

Portanto, o diagnóstico molecular da doença de VHL deve ser considerado nos pacientes com história familiar de VHL e de feocromocitoma; e pode ser importante no rastreamento dos casos esporádicos de angioma de retina e de HB de SNC; e no CR e feocromocitoma de apresentação multifocal, bilateral e de ocorrência em idade jovem. Desta forma casos "de novo" da doença VHL poderão ser confirmados. É possível que futuramente possam ser estabelecidos critérios baseados no risco para VHL neste grupo de pacientes.

GRUPOS DE APOIO

- VHL Family Aliance: www.vhl.org
- Departamento de Oncogenética – Hospital do Câncer A.C. Camargo: jccrocha@luwig.org.br

Bibliografia

1. Brauch H, Kishida T, Glavac D, Chen F, et cols. von Hippel-Lindau (VHL) disease with pheochromocytoma in the Black Forest region of Germany: evidence for a founder effect. Hum Genet 95:551-6, 1995.
2. Chen F, Kishida T, Yao M, et cols. Germline mutations in von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with Phenotype , 1995.
3. Choyke PL, Glenn GM, Walther MM, et cols. von Hippel-Lindau disease: genetic, clinical and imaging features. Radiology 194:629-42,1995.
4. Crossey PA, Eng C, Ginalska-Malinowska M, et cols. Molecular genetic diagnosis of von Hippel-Lindau disease in familiar phaeochromocytoma. J Med Genet 32(11):885-86, 1995.
5. Crossey PA, Richards FM, Foster K, Green JS, et cols. Identification of intragenic mutations in the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and correlations with disease phenotype. Hum Molec Genet 3(8):1303-8, 1994.
6. Duan DR, Pause A, Burgess WH, et cols. Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein. Science 269:1402-6, 1995.
7. Fili WL, Lamiel JM, Polk NO. Radiographic manifestations of von Hippel-Lindau disease. Radiology 133:289, 1979.
8. Glavac D, Neumann HPH, Chen F, Zbar B, Brauch H, et cols. Mutations in the VHL tumor suppressor gene and associated lesions families with von Hippel-Lindau disease from central Europe. Hum Genet 98:271-80, 1996.
9. Glavac D, Neumann HPH, Wittle C, et cols. Mutations in VHL tumor suppressor gene and associated lesions in families with von Hippel-Lindau disease from central Europe. Hum Genet 98:271-80,1996.
10. Goodman MD, Goodman BK, Lubin MB, et cols. Cytogenetic characterization of renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau syndrome. Câncer 65:1150-4, 1990.
11. Hes F, Zewald R, Peeters T, et cols. Genotype-phenotype correlations in families with deletions in the von Hippel-Lindau (VHL) gene. Hum Genet Apr;106(4):425-31, 2000.
12. Huson SM, Harper PS, Hourihan MD, et cols. Cerebellar haemangioblastoma and von Hippel-Lindau disease. Brain 109(Pt 6):1297-310, 1986.
13. Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, et cols. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. Proc Natl Acad Sci 93:10595-99, 1996.*
14. Ivanov S et cols. Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrase in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von

Hippel-Lindau transgenes. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 95: 12596-601, 1998.

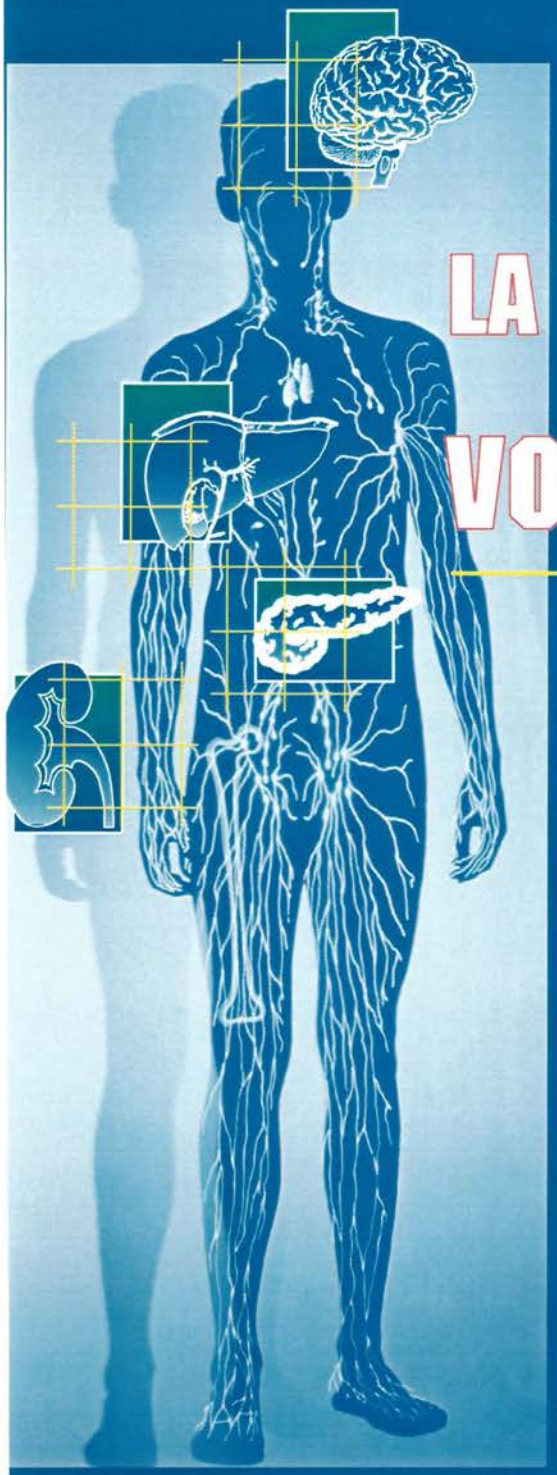
15. Knudson AGL. Mutation and câncer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci 68:820, 1971.
16. Kovacs G, Emanuel A, Newmann HP, Hung HF. Cytogenetics of renal cell carcinomas associated with von Hippel-Lindau disease. Genes Chromosomes Câncer 3:256-62, 1991.
17. Kovacs G, Hoene E. Loss of der(3) in renal carcinoma cells of a patient with constitutional t(3;12). Hum Genet 78:148-50, 1988.
18. Krumm A, Groudine M. Tumor suppression and transcription elongation: the dire consequenses of changing partners. Science 269:1400-1, 1995.
19. Latif F, Tory K, Gnarra J, Maher ER, Linehan WM, Zbar B, Lerman M, et cols. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. Science 260:1317-20, 1993.
20. Li FP, Decker HJH, Zbar B, et cols. Clinical and genetic studies of renal cell carcinomas in a family with a constitutional chromosome 3;8 translocation. Ann Int Med 118(2):106-11, 1993.
21. Lindau A. Zur Frage der Angiomatosis retinae und ihrer Huncomplikation. Acta Opthalmol (Copenh) 4:193-226, 1927.
22. Lonergan KM, Iliopoulos O, Ohh M, et cols. Regulation of hypoxia-inducible mRNA by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing Elongins B/C and Cul2. Mol Cell Biol 18(2):732-41, 1998.
23. Maddock IR, Moran A, Maher ER, et cols. A genetic register for von Hippel-Lindau disease. J Med Genet 33:120-7, 1996.
24. Maher ER, Yates JRW, Fergunson-Smith MA. Statistical analysis of the two stage mutation model in von Hippel-Lindau disease and in sporadic cerebellar hemangioblastoma and renal cell carcinoma. J Med Genet 27:311, 1990.
25. Maher ER, Yates JRW. Familiar renal cell carcinoma: clinical and molecular genetic aspects. Br J Câncer 63:176-9, 1991.
26. Manski TJ, Heffner DK, Gladys MG, et cols. Endolymphatic sac tumors. JAMA 277(18):1461-66, 1997.
27. Melbon KL, Rosen SW. Lindau's disease. Review of the literature and study of a large kindred. Am J Med 36:595-617, 1964.
28. Nelson JB, Oyasu R, Dalton DP. The clinical and pathological manifestations of renal tumors in von Hippel-Lindau disease. J Urol 152:2221-6, 1994.
29. Offit K. Genetics in clinical câncer care: scope of câncer genetic counseling. Educational book. Proc ASCO, 1997.
30. Ohh M et cols. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assemblyof an extracellular fibronectin matrix. Mol Cell 1: 959-68, 1998.
31. Pause A, Lee S, Lonergan KM e Klausner RD. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene is required for cell cycle exit upon serum withdrawal. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 95:993-98, 1998.
32. Richard S, Beigelman C, Duclos J, et cols. Pheochromocytoma as the first manifestation of von Hippel-Lindau disease. Surgery 116(6):1076-81, 1994.
33. Richards FM, Payne SJ, Zbar B, Maher R, et cols. Molecular analysis of de novo germline mutations in the von Hippel-Lindau disease gene. Human Molecular Genetics 4(11):2139-43, 1995.
34. Richards FM, Crossey PA, Phipps ME, et cols. Detailed mapping of germline deletions of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. Hum Molec Genet 3(4):595-8, 1994.
35. Richards FM, Phipps ME, Latif F, et cols. Mapping the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene: identification of germline deletions by pulsed field gel eletrophoresis. Hum Molec Genet 2(7):879-82, 1993.
36. Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LJ, Lane AH, Farmer GE, et cols. von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome3 associated with renal cell carcinoma. Nature 332:268-69, 1988.
37. Stolle C, Glenn G, Zbar B, Klausner R, et cols. Improved detection of germline mutations in the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. Human Mutation 12: 417-23, 1998.
38. Teyssier JR, Henry I, Dozier C, et cols. Recurrent delection of the short arm of chromosome 3 in human renal cell carcinoma: shift of the c-raf 1 locus. JNCI 77(6):1187-95, 1986.
39. Tory K, Brauch H, Linehan M, et cols. Specific genetic change in tumours associated with von Hippel-Lindau. J Natl Câncer Inst 81:1097, 1989.
40. von Hippel E. Ueber einer seher seltene Erkrankung der Nethaut. Graefes Arch Ophthalmol 59:83-106, 1904.
41. Yamakawa K, Morita R, Takahashi E, et cols. A detailed mapping of the short arm of chromosome 3 in sporadic renal cell carcinoma. Câncer Res 51:4707-11, 1991.
42. Yoshida M, Ashida S, Kondo K, et cols. Germ-line mutation analysis in patients with von Hippel-Lindau disiase in Japan: an extended study of 77 families. Jpn J Câncer 91(2): 204-12, 2000.
43. ZbarB, Kishida T, Chen F, et cols. Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in families from North America, Europe and Japan. Hum Mutat 8:348-57, 1996.

ANEXO 9

Capítulo "La enfermidade de von Hippel-Lindau en Brasil" (autor)

Em "La Enfermidad de von Hippel-Lindau. Una grave realidad presente en las distintas especialidades". Diretrizes da Associação Médica Brasileira. 2001. ISBN 85-89073-01-7

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
BIBLIOTECA



LA ENFERMEDAD DE VON HIPPEL-LINDAU

Una grave realidad presente en las distintas especialidades médicas

Publicación patrocinada por
COLEGIO MEDICO DE CHILE

AUSPICIA: LABORATORIOS RECALCINE S.A. RECALCINE

©VHL Family Alliance. Boston Mass.- USA Worlwide

La Enfermedad de von Hippel-Lindau
Una grave enfermedad presente en las distintas especialidades médicas

Imágenes reproducidas del Libro VON HIPPEL-LINDAU KRANKHEIT
de Hartmut P.H. Neumann

Inscripción N° 119.385
ISBN: 956-7936-03-X

Auspiciador:
Laboratorios Recalcine

Producción:

EDITORIAL iku
María Cristina Illanes
220 6810- (09) 225 1534

IMPRESO EN SANTIAGO DE CHILE
Enero 2001
Derechos Reservados/Prohibida su reproducción

La enfermedad de von Hippel-Lindau en Brasil

*José Cláudio Casali Da Rocha**

Introducción

La enfermedad VHL es una dolencia hereditaria multisistémica, que requiere la participación de diversas especialidades médicas, tales como oncología clínica, genética, oftalmología, neurología y neurocirugía, endocrinología, urología y radiología, entre otras, con apoyo del laboratorio de genética. El seguimiento ideal del paciente demanda, por lo tanto, un enfoque multidisciplinario, inclusive con apoyo psicológico según las necesidades del enfermo.

El inicio de los síntomas puede ocurrir a partir de los primeros años de vida e incluye angioma de retina, hemangioblastoma del sistema nervioso central, feocromocitoma, carcinoma renal de tipo células claras y múltiples quistes renales, pancreáticos, hepáticos y de epidídimo. La transmisión es por herencia autosómica dominante. La recomendación genética, el avance de los métodos de tratamiento y diagnóstico modificaron el curso de esta enfermedad con una disminución de morbilidad y mortalidad, contribuyendo a mejorar la calidad de vida de las familias afectadas por el mal.

La dolencia es causada por mutación germinal en el gen VHL. Hasta hoy más de 550 familias han sido diagnosticadas y se han identificado 205 mutaciones germinales en el gen VHL en América del Norte, Europa y Japón (registro del Banco de mutaciones - *The Human Gene Mutation Database - Cardiff* - <http:// www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/120488.html>).

Este es el primer estudio brasileño y tal vez sudamericano que tiene por objetivo desarrollar un soporte clínico y de laboratorio para el paciente portador de VHL y sus familiares. Quince familias con diagnóstico de VHL están en estudio en este momento. Los pacientes y familiares incluidos en el estudio recibieron soporte clínico,

* Titular do Departamento de Oncogenética - Centro de Tratamento e Pesquisa - Hospital do Câncer - São Paulo, Brasil Doutorado em Genética - Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer - São Paulo, Brasil. (Traducido del portugués).

psicológico y exámenes complementarios necesarios disponibles en la estructura del Hospital del Cáncer, en Sâo Paulo.

Los resultados parciales de los estudios en las primeras 15 familias brasileñas con VHL fueron presentados en el IV Simposio internacional de VHL realizado en la Clínica Mayo, Rochester - MI (EUA), en el período del 20 al 23 de junio de 2000, con apoyo de la **VHL Family Alliance**. Fue posible ratificar los resultados de las primeras 15 familias brasileñas con diagnóstico de VHL estudiadas hasta ahora, cuyo detalle entrego a continuación.

Resultados

Este proyecto se inició en marzo de 1998 y hasta la fecha 74 sujetos pertenecientes a 15 familias con diagnóstico clínico de VHL fueron incluidos en el estudio.

De las 15 familias estudiadas, 14 presentaban una historia familiar que afectaba a parientes en primer y segundo grado. Una presentaba un caso de VHL sin historia familiar (caso nuevo de VHL.) Trece de las 15 familias con VHL (86,67%) no tenían feocromocitoma en la presentación clínica y, por lo tanto, correspondieron al VHL tipo 1. Dos familias con feocromocitoma bilateral fueron clasificadas como VHL tipo II A (13,33%.)

Se registraron todas las manifestaciones clínicas de los sujetos afectados y junto con la historia y heredograma de cada grupo familiar, se sugirió el examen genético y se discutió los aspectos clínicos, sociales y psicológicos de la dolencia y del test molecular. El examen genético fue autorizado formalmente mediante el consentimiento informado y firmado por el paciente o su representante legal.

Se analizaron fragmentos de PCR correspondientes a los productos amplificados de los tres exones del gen VHL de los individuos incluidos en el estudio. La combinación de las técnicas de secuenciamiento y el Southern-blot cuantitativo, permitió detectar mutación germinal en 100% de las familias estudiadas que cumplían los criterios clínicos para VHL, reproduciendo el trabajo de la Dra. Catherine Stolle publicado en 1988 (Universidad de Pensilvana - EUA.) Se detectaron hasta el momento 18 mutaciones germinales en el gen VHL, entre las cuales 15 mutaciones deletéreas y tres polimorfismos.

Cinco mutaciones encontradas corresponden a mutaciones nuevas nunca descritas anteriormente en otras poblaciones y son exclusivas de la población brasileña. Las dos familias con VHL tipo 2 presentaron una muta-

ción de tipo *missense* en la región de *hot spot* del codón 167 del gen VHL, asociada al fenotipo con feocromocitoma. La paciente con diagnóstico de VHL, sin historia familiar previa, presentó una mutación jamás descrita antes. Sus padres no presentaban mutaciones y se caracterizó la mutación de esta paciente como mutación *de novo*.

Desde el inicio del proyecto fueron identificados 10 individuos portadores asintomáticos que se incluyeron en el programa de seguimiento. Por otra parte, 26 individuos examinados fueron considerados de bajo riesgo porque tuvieron resultados normales y fueron apartados del programa de seguimiento.

Varios pacientes VHL ya recibieron beneficios con el programa de seguimiento. Recientemente se detectó en una paciente con VHL sometida a tomografía computarizada abdominal, un carcinoma renal derecho y un cistoadenoma de cola de páncreas, ambos asintomáticos. Se sometió a la paciente a cirugía para resección de las lesiones con preservación de los órganos. Las funciones renales y pancreáticas fueron preservadas, garantizando una buena calidad de vida para la enferma.

Tres polimorfismos descritos en otras poblaciones también fueron encontrados en familias brasileñas, por lo cual su frecuencia está siendo determinada.

Conclusión

El seguimiento clínico y molecular de las familias con VHL, beneficia a los individuos gracias a la detección precoz y el tratamiento adecuado de los tumores.

Se encontraron mutaciones germinales en el gen VHL asociadas a la dolencia en las 15 familias estudiadas. La combinación de las técnicas de secuenciamiento y Southern-blot cuantitativo, permitió la detección de mutaciones germinales en 100% de las familias estudiadas que se ajustaban a los criterios clínicos para VHL, reproduciendo el trabajo de la Dra. Catherine Stolle de la Universidad de Pennsylvania en EUA.

Los datos analizados en este estudio corroboran el concepto que la dolencia VHL, a pesar de la enorme variación de manifestaciones clínicas inter e intra familiares, es bastante homogénea con relación a las alteraciones moleculares. Una vez que participa el gen VHL, el diagnóstico molecular se convierte en una herramienta importante para la confirmación (una vez detectada la mutación) o para la exclusión de la dolencia (cuando no se

detecta mutación), puesto que se emplean técnicas para detectar el espectro amplio de mutaciones puntuales y reordenamientos génicos.

Perspectivas

El diagnóstico molecular de la enfermedad de von Hippel-Lindau, se lleva a cabo en los países de Europa, Norteamérica y Asia en individuos con criterios diagnósticos bien definidos, así como en los casos familiares de tumores relaciones con el síndrome VHL, principalmente cuando aparecen a temprana edad, múltiples o bilaterales. Entretanto, en nuestro medio y en toda América Latina, sólo recientemente se efectúa el diagnóstico molecular. El test genético permite la detección y caracterización de las mutaciones del gen VHL en las familias afectadas, los casos nuevos (sin historia familiar) y los casos considerados de riesgo, en los que no se cumplen los criterios clínicos mínimos.

Este estudio pretende detectar y caracterizar las mutaciones del gen VHL, permitiendo confirmar los casos en individuos sintomáticos con o sin historia familiar, a más de ayudar a algunos grupos de pacientes con tumores aparentemente esporádicos con prevalencia de la enfermedad de von Hippel-Lindau.

La detección de mutaciones es útil, además, para el seguimiento de familiares asintomáticos, aconsejar el examen genético de sus familias y orientar el seguimiento de los individuos portadores de la mutación. A pesar de que el estudio se concentra principalmente en Brasil, esperamos que empiece en otros países latinoamericanos. La caracterización clínica y molecular de familias latinoamericanas permitirá establecer si existe alguna diferencia en el patrón de mutaciones de la población. Estudios epidemiológicos y moleculares mundiales demuestran la importancia de los estudios poblacionales específicos, dado que el perfil de mutaciones puede representar características propias a cada población.

La ampliación de este estudio pretende contribuir al diagnóstico precoz de VHL a través del test molecular, así como intervenir en la historia natural de la dolencia en las familias afectadas, a través del examen genético y de programas de seguimiento de lesiones. Se pretende así aumentar el número de familias con VHL estudiadas, extendiendo el estudio a todas las poblaciones de América Latina, además de analizar el riesgo de grupos de tumores 'aparentemente esporádicos' relacionados con el VHL.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE BIBLIOTECA

Agradecimientos

Joyce Graff (VHL Family Alliance)

Alessandra Murgia (Universidade de Pádua - Itália)

Grupo de apoyo en Brasil

Hospital do Câncer - São Paulo, Brasil

Dr. José Cláudio Casali da Rocha: jccrocha@ludwig.org.br

ANEXO 10

Capítulo "Câncer Familial" (autor)

Em "Projeto Diretrizes". Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina.

1ª Edição, 2001. ISBN 85-89073-01-7

Câncer Familial

Sociedade Brasileira de Genética Clínica

Elaboração Final: 13 de Agosto de 2001

Autoria: Rocha JCC, Vargas FR, Ashton-Prolla P

O Projeto Diretrizes, iniciativa conjunta da Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, tem por objetivo conciliar informações da área médica a fim de padronizar condutas que auxiliem o raciocínio e a tomada de decisão do médico. As informações contidas neste projeto devem ser submetidas à avaliação e à crítica do médico, responsável pela conduta a ser seguida, frente à realidade e ao estado clínico de cada paciente.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE COLETA DE EVIDÊNCIAS:
Foram identificados 580 artigos na pesquisa de referências bibliográficas realizada na base de dados PubMed (U.S. National Lybrary of Medicine) usando os descritores: "familial cancer, hereditary cancer, genetic counseling, cancer predisposition". Os seguintes limites foram utilizados: estudos aplicados em humanos, língua inglesa e período entre 1990 e 2001. Foi realizada a busca de referências cruzadas e artigos relacionados mais relevantes como estudos epidemiológicos multicêntricos clássicos.

GRAU DE RECOMENDAÇÃO E FORÇA DE EVIDÊNCIA:
A: Grandes ensaios clínicos aleatorizados e meta-análises.
B: Estudos clínicos e observacionais bem desenhados.
C: Relatos e séries de casos clínicos.
D: Publicações baseadas em consensos e opiniões de especialistas.

OBJETIVOS:
1. Definir os indivíduos que têm indicação de avaliação genética; baseado no risco individual e familial para o desenvolvimento de câncer ou tumores associados, propondo um algoritmo para investigação.
2. Estabelecer os princípios do aconselhamento genético oncológico.
3. Revisar a literatura atual sobre algumas síndromes hereditárias de suscetibilidade ao câncer considerando: a) o diagnóstico das formas clássicas, bem como variações das síndromes; b) fatores de confusão e controvérsias no diagnóstico e manejo das mesmas; c) prevenção primária e secundária do câncer nas mesmas; d) genes envolvidos e alterações genéticas que podem ser utilizadas como testes diagnósticos em indivíduos afetados e testes preditivos em familiares assintomáticos.

PROCEDIMENTOS:
1. História clínica abrangendo: história familial; idade ao diagnóstico dos tumores, tratamento e evolução; exposições ambientais a fatores de risco conhecidos; construção do heredograma de pelo menos três gerações.
2. Exame físico geral e especial (morfológico).
3. Estimativa do risco individual de câncer e da probabilidade de se tratar de síndrome de predisposição hereditária ao câncer na família.
4. Aconselhamento genético individualizado.
5. Programas de rastreamento baseados no risco.
6. Exames complementares gerais (bioquímicos, hematológicos) e especiais: estudos citogenéticos e moleculares para detecção de mutações na linhagem germinativa pela análise do DNA.
7. Métodos de diagnóstico por imagem: estudos radiológicos simples e contrastados; ultra-sonografias; tomografia computadorizada; ressonância magnética.
8. Métodos diagnósticos invasivos: endoscopia do trato digestivo ou do trato genito-urinário; biópsia ou punção por agulha para avaliação citopatológica ou histopatológica.

EVOLUÇÃO E DESFECHOS:
1. Estabelecimento do diagnóstico e do prognóstico individual do paciente, baseado na evolução natural da doença.
2. Estabelecimento do risco para o desenvolvimento de câncer ou tumores associados para os familiares do paciente, de acordo com cada caso.
3. Determinar limitações para o diagnóstico definitivo quando os critérios clínicos não puderem ser estabelecidos.
4. Fornecer o suporte de aconselhamento genético e de outros profissionais (equipe multidisciplinar) visando o entendimento sobre a doença e o bem- estar.
5. Instituir medidas de rastreamento precoce de tumores visando o diagnóstico precoce e o tratamento de tumores em fase inicial.
6. Instituir medidas de prevenção individualizadas, baseadas no risco genético.

PRINCIPAIS RECOMENDAÇÕES:

AVALIAÇÃO INICIAL

História clínica, exame físico e construção do heredograma:

Sempre que possível, tentar obter evidência diagnóstica e detalhes (idade ao diagnóstico, idade do óbito, multiplicidade, tipo histopatológico e estadiamento) dos casos de tumores na família, através de comprovantes médicos como: laudos cirúrgicos, anatomopatológicos ou de imagem; relatórios médicos; atestado de óbito[1](D). A história de consangüinidade é importante nas doenças autossômicas recessivas com suscetibilidade ao câncer. A origem étnica também é importante, visto a prevalência de algumas alterações genéticas em algumas populações[2,3](C)[4](B).

Classificar as famílias em uma das fontes de evidência que definem uma maior predisposição genética ao câncer:

Síndromes geneticamente determinadas com alto risco de desenvolvimento de câncer. Compreendem centenas de síndromes hereditárias relativamente raras e de etiologia monogênica, reconhecidas como "síndromes de câncer hereditário". Estima-se que representem em média 5% a 10% das ocorrências de câncer na população geral.

Agregação familial de câncer, ou "câncer familial". Evidenciada pela recorrência familial de algumas formas comuns de câncer, sem um padrão definido de herança e com alta freqüência de tumores múltiplos e em idade precoce. Etiologicamente causada por uma combinação de fatores ambientais (exposição ambiental) e genéticos (p.e. polimorfismos modificadores de risco).

Observação de risco aumentado de câncer em parentes de indivíduos com câncer em estudos populacionais[5,6](B)

- **Fatores de confusão:** pequeno número de afetados, principalmente em famílias pequenas; dificuldades de confirmação da história familial (laudos médicos, indivíduos adotados, e outros); presença de mutações espontâneas *de novo*; penetrância incompleta; variações clínicas da síndrome.

Avaliação do risco individual e familial: O risco genético para o desenvolvimento de câncer é obtido a partir de estudos populacionais e da história familial e pessoal (idade, câncer prévio, história reprodutiva, exposição ambiental e outros), caso a caso. É baseado na probabilidade genética para o desenvolvimento do fenótipo (câncer) e é quantificado através da estimativa do **risco relativo**, do **risco cumulativo, do risco mendeliano**, e por **modelos de risco empíricos**. A probabilidade Bayesiana (condicional) é usada para calcular o risco ao longo da vida (risco atual, risco em 5 ou 10 anos e risco durante toda a vida). A interpretação e compreensão apropriada da avaliação de risco é importante para a percepção adequada de risco pelo paciente[1,7](D).

Princípios do aconselhamento genético oncológico e recomendações gerais

Considerando que o câncer é uma doença complexa, o processo de aconselhamento genético baseado na estimativa do risco e as estratégias de prevenção dependem do estado: a) de conhecimentos genéticos do câncer; b) da percepção e tolerância de risco (experiência pesoal de câncer na família); c) de tecnologia; d) da "arte" em termos de manejo[8](D). Assim, entendemos que para uma abordagem adequada devem ser estimulados a criação de centros especializados em aconselhamento genético oncológico[9](A) e que é fundamental:

- Conhecer a história natural e o tratamento dos tumores associados às síndromes hereditárias, bem como dados de epidemiologia e fatores ambientais. Conhecer os fatores hereditários, o modo de herança das síndromes hereditárias de suscetibilidade ao câncer e a ocorrência de antecipação. Conhecer os critérios clínicos para o diagnóstico destas síndromes e as limitações que podem vir a dificultar o diagnóstico (fatores de confusão)[10,11](D);

- Identificar os indivíduos sob risco e estimar o risco individual para o desenvolvimento de câncer, permitindo aplicações de medidas potencialmente preservadoras da vida e preventivas. A implementação de estratégias de rastreamento para as síndromes de câncer hereditário deve considerar: a) a alta morbidade e mortalidade da doença; b) evidências de que a detecção e o tratamento precoce modificam o prognóstico e a sobrevida; c) a relação custo/benefício e vantagens/desvantagens do rastreamento[3,12](B);

- Confirmada a suspeita diagnóstica de câncer hereditário, transmitir informações que permitam ao indivíduo em processo de aconselhamento compreender: a) o diagnóstico e o risco pessoal de desenvolvimento de câncer; b) o modo de herança envolvido e o risco de recorrência; c) as opções disponíveis de manejo e controle do risco de ocorrência; d) facilitar as decisões sobre a opção de manejo mais apropriada para seu caso individual[10,11](D);

- Obter informações do paciente sobre a percepção do risco de desenvolvimento de câncer e motivação para investigação da predisposição hereditária, procurando traçar um perfil do paciente e antecipar suas reações e possíveis decisões de manejo frente a um risco real de câncer[13,14](D);

- Observar os princípios gerais que regem o aconselhamento genético: a) éticos – de autonomia, não maleficência, beneficência, justiça e proporcionalidade; b) aconselhamento não diretivo e individualizado; c) confidencialidade; d) aconselhamento pré e pós-teste e consenti-

mento informado, no caso de investigação de predisposição genética ao câncer com teste de DNA[10,11](D);

- Abordagem multidisciplinar, envolvendo profissionais médicos de diversas especialidades, psicólogo, enfermeiro e assistente social[15](D);

- Conhecer os genes envolvidos nas diversas síndromes de suscetibilidade ao câncer e estar familiarizado com os testes moleculares de DNA utilizados tanto no diagnóstico molecular como em testes preditivos. Entender a correlação genótipo-fenótipo e a penetrância da doença. Conhecer as limitações (sensibilidade e especificidade, valor preditivo), riscos e benefícios dos testes de suscetibilidade genética, custos, impacto psicológico, econômico e social, além de implicações éticas e legais[11,13,14](D). Os testes genéticos não estão indicados quando for baixa a probabilidade de uma síndrome de predisposição ao câncer e podem ser recomendados para confirmar o diagnóstico de casos suspeitos quando a probabilidade for moderada ou alta e também como teste preditivo. Quando indicados, os testes genéticos devem ser realizados preferencialmente em centros de excelência[16](D).

Recomendações em síndromes específicas de câncer hereditário

Síndromes de suscetibilidade ao câncer de mama e ovário

Conhecer as ferramentas para estimativa de risco para o desenvolvimento de câncer de mama, como o modelo de Gail, o modelo de Claus e modelos para populações especiais, bem como suas vantagens e limitações. Identificar grupos de risco segundo as ferramentas descritas acima: baixo risco (<15% durante a vida); risco intermediário (15 a 30% durante a vida); alto risco (>30% durante a vida)[6,17](B)[18](C)[19](D). Reconhecer as síndromes associadas com maior suscetibilidade ao câncer de mama, bem como o risco aumentado para outros tumores: síndrome de câncer de mama/ovário hereditário; síndrome de Li-Fraumeni, síndrome de Cowden, ataxia teleangectásica e outras. Estratégias de rastreamento de lesões associadas (como exame clínico, mamografia, auto-exame e outros) são recomendadas e variam de acordo com o risco[20-23](D)[24](C). Uma recomendação definitiva sobre estratégias de prevenção ativas como a quimioprevenção com tamoxifeno ou raloxifeno, cirurgias profiláticas; bem como influência de fatores modificadores de risco, como contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal, ainda estão por ser definidos[25,26](D)[27](B). **Genes de suscetibilidade envolvidos**: gene *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *ATM*, entre outros[28](D).

Polipose adenomatosa familial (FAP)

Observar a idade de início e localização dos adenomas, confirmando o diagnóstico com avaliação histopatológica. **Diagnóstico diferencial**: síndrome de Peutz-Jeughers e polipose juvenil. Reconhecer manifestações extra-colônicas, como tumores gastrointestinais, tumores desmóides, osteomas, hipertrofia congênita do epitélio pigmentar da retina e tumores cerebrais[29](D). Identificar variações da síndrome, como a FAP atenuada, a síndrome de Gardner e a síndrome de Turcot[30,31](B). Conhecer a alta freqüência de casos *de novo* (30%) em que não há história familial, bem como a importância de um programa de rastreamento para diagnóstico precoce de lesões associadas e indicação de colectomia redutora de risco[32-34](C)[35](D). Alguns estudos aleatorizados favorecem o uso de celecoxib e sulindac como quimioprevenção na FAP[36,37](A)[38](B). **Gene de suscetibilidade envolvido**: gene *APC* [28](D).

Síndrome de câncer hereditário sem polipose (HNPCC)

Reconhecer o cólon direito como localização freqüente de câncer, com implicações no diagnóstico e no rastreamento[39](D). Reconhecer os critérios de Amsterdam e de Bethesda[40,41](D). Conhecer as manifestações extracolônicas associadas, como câncer de endométrio, câncer de pelve renal, câncer de vias biliares e suscetibilidade a outros tumores (câncer de ovário e estômago, cistos sebáceos, tumores cerebrais)[42,43](C). Conhecer as variações da síndrome, como a síndrome de Muir-Torre e a síndrome de Turcot[44,45](C). O programa para rastreamento de tumores associados ao HNPCC segue as recomendações do grupo colaborativo internacional ICG-HNPCC[46](D) [47](B). **Diagnóstico diferencial:** FAP atenuada. **Genes de suscetibilidade envolvidos:** genes *hMLH1, hMSH2, hPMS1, hPMS2, hMSH6*[28](D).

Retinoblastoma hereditário

Reconhecer que cerca de 40% dos retinoblastomas são hereditários e que aproximadamente 20% a 30% destes não têm história familial e representam casos novos da doença a partir de mutações germinativas novas[48](D). Reconhecer os retinoblastomas bilaterais e os unilaterais multifocais como hereditários, correspondendo a aproximadamente 25% das ocorrências de retinoblastoma[49,50](C). Estar atento para as conseqüências do tratamento do retinoblastoma e a ocorrência de tumores secundários. Conhecer a suscetibilidade a outros tumores primários, como o osteossarcoma, sarcoma de partes moles, neoplasias linfóides malignas, tumores cerebrais, entre outros[51,52](B). O diagnóstico precoce do retinoblastoma nos indivíduos de risco pode ser estabelecido a partir do rastreamento rotineiro de lesões oftalmológicas a partir do nascimento[28,53](D). **Gene de suscetibilidade envolvido:** gene *RB1*[28](D).

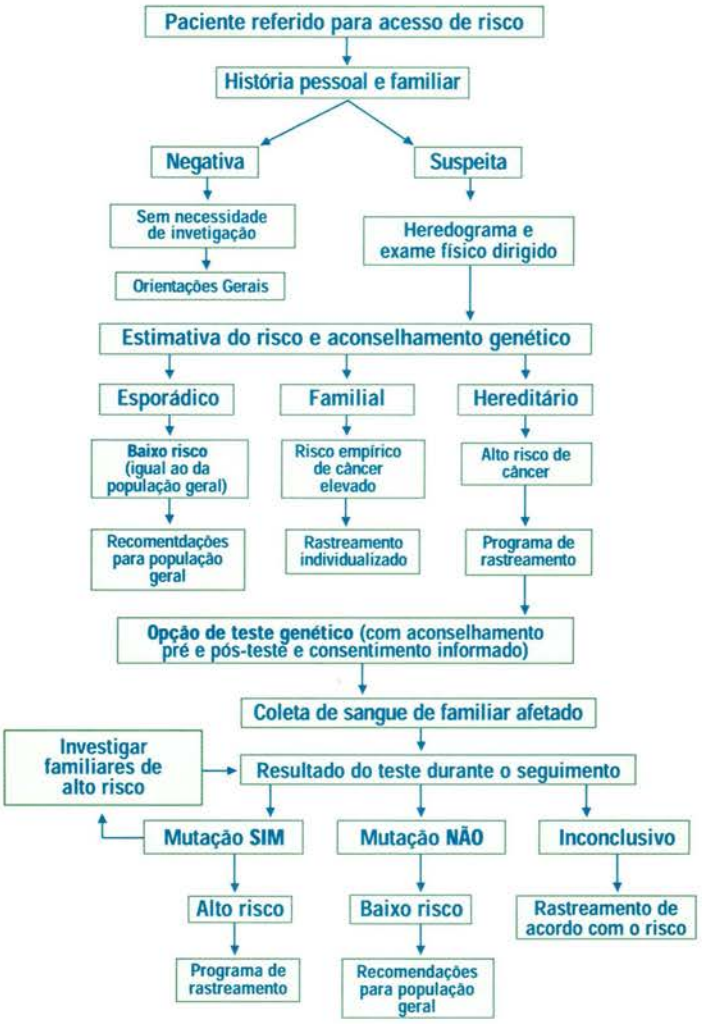
Neoplasias Endócrinas Múltiplas (MEN)

Reconhecer a expressão fenotípica das síndromes MEN 1, MEN 2A, MEN 2B e do carcinoma medular de tireóide (CMT) familial, a variação de agressividade do CMT em pacientes com MEN 2A, MEN 2B, e do CMT familial[28](D)[54](B). Entender a história natural das várias endocrinopatias associadas a estas síndromes, os métodos clínicos e bioquímicos para estabelecer o diagnóstico[55](B)[56,57](C)[58](D). Reconhecer que cerca de 25% dos CMT "aparentemente esporádicos" representam casos novos da síndrome[59](B). Embora o rastreamento bioquímico seja o método recomendado para o diagnóstico precoce do CMT, cerca de 82% dos afetados já têm carcinoma invasivo e 10% têm doença metastática ao diagnóstico[60](B). O teste genético consiste no seqüenciamento das regiões comuns de ocorrência de mutações no gene *RET* e pode ser considerado como exame de excelência, porque permite identificar os indivíduos portadores de mutação germinativa (alto risco para MEN 2 ou CMT) e intervir ativamente na redução do risco [61](D)[62](B). A tireoidectomia total profilática é o procedimento estabelecido para os indivíduos portadores de mutação, com impacto na morbidade e na mortalidade da doença[63](B) [64](A). **Genes de suscetibilidade envolvidos:** genes *MEN1* e *RET*[28](D).

Doença de von Hippel-Lindau (VHL)

Reconhecer os critérios clínicos para o diagnóstico e as formas clínicas da doença. Conhecer as manifestações clínicas associadas ao VHL como: hemangioblastoma do sistema nervoso central (SNC), angioma de retina, tumores renais e pancreáticos benignos e malignos, feocromocitoma, cistos múltiplos (renal, pancreático, hepático e epidídimo),

entre outros[65](B)[66](C). O programa de rastreamento para diagnóstico precoce dos tumores associados ao VHL tem impacto profundo na morbidade e na mortalidade da doença e segue as recomendações de consenso de especialistas [67](D). Cirurgias conservadoras que visam a preservação do órgão são recomendadas sempre que possível para os tumores renais e pancreáticos[68-70](C) . **Gene de suscetibilidade envolvido:** gene *VHL*[28](D).



Referências bibliográficas

1. Harper PS. Practical genetic counselling. 5th ed. London: Butterworth Heinemann; 1998.

2. Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, et al. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. N Engl J Med 1997; 336:1401-8.

3. Tonin PN, Perret C, Lambert JA, et al. Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in early-onset French Canadian breast cancer cases unselected for family history. Int J Cancer 2001; 95:189-93.

4. Johannsson OT, Ranstam J, Borg A, et al. Survival of BRCA1 breast and ovarian cancer patients: a population-based study from southern Sweden. J Clin Oncol 1998; 16:397-404.

5. Schneider KA. Clinical cancer genetics: risk counseling and management. New York: John Wiley; 1997. p. 370.

6. Claus EB, Risch N, Thompson WD. Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Cancer 1994; 73:643-51.

7. Offit K, Brown K. Quantitating familial cancer risk: a resource for clinical oncologists. J Clin Oncol 1994; 12:1724-36.

8. Weitzel JN. Genetic cancer risk assessment. Putting it all together. Cancer 1999; 86:2483-92.

9. Brain K, Gray J, Norman P, et al. Randomized trial of a specialist genetic assessment service for familial breast cancer. J Natl Cancer Inst 2000; 92:1345-51.

10. Genetic counseling. Am J Hum Genet 1975; 27:240-2.

11. Statement of the American Society of Clinical Oncology. Genetic testing for cancer susceptibility. J Clin Oncol 1996; 14:1730-6.

12. Burke W, Petersen G, Lynch P, et al. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. I. Hereditary nonpolyposis colon cancer. Cancer genetics studies consortium. JAMA 1997; 277: 915-9.

13. ASHG statement. Professional disclosure of familial genetic information. The American Society of Human Genetics Social Issues Subcommitee on Familial Disclosure. Am J Hum Genet 1998; 62:474-83.

14. Points to consider: ethical, legal and psychosocial implications of genetic testing in children and adolescents. American Society of Human Genetics board of directors, American College of Medical Genetics Board of Direwctors. Am J Hum Genet 1995; 57:1233-41.

15. Resource document for curriculum development in cancer genetics education. American Society of Clinical Oncology. J Clin Oncol 1997; 15:2157-69.

16. Statement on use of DNA testing for presymptomatic identification of cancer risk. National Advisory Council for Human Genome Research. JAMA 1994; 271:785.

17. Gail MH, Brinton LA, Byar DP, et al. Projecting individualized probabilities of

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE BIBLIOTECA

developing breast cancer for white females who are being examined annually. J Natl Cancer Inst 1989; 81:1879-86.

18. Ford D, Easton DF, Bishop DT, et al. Risks of cancer in BRCA1 mutation carriers. Lancet 1994; 343:692-5.

19. Hoskins KF, Stopher JE, Calzone KA, et al. Assessment and counseling for women with a family history of breast cancer. A guide for clinicians. JAMA 1995; 273:577-85.

20. Burke W, Daly M, Garber J, et al. Recommendations for follow-up care of individuals with na inherited predisposition to cancer. II. BRCA1 and BRCA2. JAMA 1997; 277: 997-1003.

21. NIH consensus development panel on ovarian cancer. NIH consensus conference. Ovarian cancer. Screening, treatment and follow-up. JAMA 1995; 273:491-7.

22. Eisinger F, Alby N, Bremond A, et al. Recommendations form medical management of hereditary breast and ovarian cancer: the French National Ad Hoc Committee. Ann Oncol 1998; 9:939-50.

23. Vasen HF, Haites NE, Evans DG, et al. Current policies for surveillance and management in women at risk of breast and ovarian cancer: a survey among 16 European family cancer clinics. Eur J Cancer 1998; 34:1922-6.

24. Warner E, Plewes DB, Shumak RS, et al. Comparison of breast magnetic resonance imaging, mammography, and ultrasound for surveillance of women at high risk for hereditary breast cancer. J Clin Oncol 2001; 19:3524-31.

25. Chlebowski RT. Reducing the risk of breast cancer. N Engl J Med 2000; 343:191-8.

26. Martin AM, Weber BL. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. J Natl Cancer Inst 2000; 92:1126-35.

27. Meijers-Heijboer H, van Geel B, van Putten WL, et al. Breast cancer after prophylactic bilateral mastectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. N Engl J Med 2001; 345:159-64.

28. Lindor NM, Greene MH. The concise handbook of family cancer syndromes. Mayo Familial Cancer Program. J Natl Cancer Inst 1996; 90:1039-71.

29. Kinzler KW, Vogelstein B. In: Vogelstein and Kinzler, editors. The genetic basis of human cancer. New York: McGraw-Hill; 1998.

30. Lynch HT, Smyrk T, McGinn T, et al. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP): a phenotypically and genotypically distinctive variant of FAP. Cancer 1995; 76:2427-33.

31. Foulkes WD. A tale of four syndromes: familial adenomatous polyposis, Gardner syndrome, attenuated APC and Turcot syndrome. Q J Med 1995; 88:853-63.

32. Morton DG, MacDonald F, Haydon J, et al. Screening practice for familial adenomatous polyposis: the potential for regional registries. Br J Surg 1993; 80:255-8.

33. Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, et al. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. Gastroenterology 1997; 112:594-642.

34. Burt RW. Screening of patients with a positive family history of colorectal cancer. Gastrointest Endosc Clin North Am 1997; 7:65-79.

35. Vasen HF, Bülow S. The Leeds Castle Polyposis Group. Guidelines for the surveillance and management of familial adenomatous polyposis (FAP): a world wide survey among 41 registries. Colorectal Dis 1999; 1:214-21.

36. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. N Engl J Med 2000; 342:1946-52.

37. Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. N Engl J Med 1993; 328:1313-6.

38. Stoner GD, Budd GT, Ganapathi R, et al. Sulindac sulfone induced regression of rectal polyps in patients with familial adenomatous polyposis. Adv Exp Med Biol 1999; 470:45-53.

39. Lynch HT, De la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. J Med Genet 1999; 36:801-18.

40. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, et al. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. Gastroenterology 1999; 116:1453-6.

41. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. J Natl Cancer Inst 1997; 89:1758-62.

42. Mecklin JP, Järvinen HJ. Tumor spectrum in cancer family syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). Cancer 1991; 68:1109-12.

43. Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, et al. Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. Int J Cancer 1995; 64:430-3.

44. Cohen PR, Kohn SR, Kurzrock R. Association of sebaceous gland tumors and internal malignancy: the Muir-Torre syndrome. Am J Med 1991;90:606-13.

45. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, et al. The molecular basis of Turcot's syndrome. N Engl J Med 1995; 332:839-47.

46. Vasen HF, Mecklin JP, Meera Khan P, et al. The International Collaborative Group on hereditary nonpolyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). Dis Colon Rectum 1991; 34:424-5.

47. Vasen HF, van Ballegooijen M, Buskens E, et al. A cost-effectiveness analysis of colorectal screening of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma gene carriers. Cancer 1998; 82:1632-7.

48. Vogel F. Genetics of retinoblastoma. Hum Genet 1979; 52:1-54.

49. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblasoma. Proc Natl Acad Sci USA 1971; 68:820-3.

50. Draper GJ, Sanders BM, Brownbill PA et al. Patterns of risk of hereditary retinoblastoma and applications to genetic counseling. Br J Cancer 1992; 66:211-9.

51. Abramson DH, Ellsworth RM, Kitchin FD, et al. Second nonocular tumors in retinoblastoma survivors. Are they radiation-induced? Ophthalmology 1984; 91:1351-5.

52. Roarty JD, McLean IW, Zimmerman LE , et al. Incidence of second neoplasms in patients with bilateral retinoblastoma. Ophthalmology 1988; 95:1583-7.

53. Noorani HZ, Khan HN, Gallie BL, et al. Cost comparison of molecular versus conventional screening of relatives at risk for retinoblastoma. Am J Hum Genet 1996; 59:301-7.

54. Skinner MA, DeBenedetti MK, Moley JF, et al. Medullary thyroid carcinoma in children with multiple endocrine neoplasia types 2A and 2B. J Pediatr Surg 1996; 31: 177-81.

55. Marx SJ, Vinik AI, Santen RJ, et al. Multiple endocrine neoplasia type I: assessment of laboratory tests to screen for the gene in a large kindred. Medicine 1986; 65:226-41.

56. Calender A, Giraud S, Cougard P, et al. Multiple endocrine neoplasia type 1 in France: clinical and genetic studies. J Intern Med 1995; 238:263-8.

57. Easton DF, Ponder MA, Cummings T, et al. The clinical and screening age-at-onset distribution for the MEN-2 syndrome. Am J Hum Genet 1989; 44:208-15.

58. Calmettes C, Ponder BAJ, Fischer JA. Early diagnosis of the multiple endocrine neoplasia type 2 syndrome: consensus statement. European Community Concerted Action. Medullary thyroid carcinoma. Eur J Clin Invest 1992; 22:755-60.

59. Farndon JR, Dilley WG, Baylin SB, et al. Familial medullary thyroid carcinoma without associated endocrinopathies: a distinct clinical entity. Br J Surg 1986; 73: 278-81.

60. Gagel RF, Tashjian AH Jr, Cummings T, et al. The clinical outcome of prospective screening for multiple endocrine neoplasia type 2A. An 18-year experience. N Engl J Med 1988; 318:478-84.

61. Ledger GA, Khosla S, Lindor NM, et al. Genetic testing in the diagnosis and management of multiple endocrine neoplasia type II. Ann Intern Med 1995; 122:118-24.

62. Lips CJ, Landsvater RM, Hopperner JWM, et al. Clinical screening as comparing with DNA analysis in families with multiple endocrine neoplasia type 2A. N Engl J Med 1994; 331:828-35.

63. Telander RL, Zimmerman D, van Heerden JA, et al. Results of early thyrodectomy for medullary thyroid carcinoma in children with multiple endocrine neoplasia type 2. J Pediatr Surg 1986; 21:1190-4.

64. Musholt TJ, Musholt PB, Petrich T, et al. Familial papillary thyroid carcinoma: genetics, criteria for diagnosis, clinical features, and surgical treatment. World J Surg 2000; 24:1409-17.

65. Maddock IR, Moran A, Maher ER, et al. A genetic register for von Hippel-Lindau disease. J Med Genet 1996; 33:120-7.

66. Glavac D, Neumann HPH, Chen F, et al. Mutations in the VHL tumor suppressor gene and associated lesions families with von Hippel-Lindau disease from central Europe. Hum Genet 1996; 98:271-80.

67. Offit K. Genetics in clinical cancer care: scope of cancer genetic counseling. Educational book. Proc ASCO, 1997.

68. Persad RA, Probert JL, Sharma SD, et al. Surgical management of the renal manifestations of von Hippel-Lindau disease: a review of a United Kingdom case series. Br J Urol 1997; 80:392-6.

69. Hes FJ, Slootweg PJ, van Vroonhoven TJ, et al. Management of renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau disease. Eur J Clin Invest 1999; 29: 68-75.

70. Hammel PR, Vilgrain V, Terris B, et al. Pancreatic involvement in Von Hippel-Lindau disease. The Groupe Francophone d'Etude de la Maladie de Von Hippel-Lindau. Gastroenterology 2000; 119:1087-95.

ANEXO 11

Artigo em periódico: "High Frequency of Novel Germline Mutations in the *VHL* Gene in the Heterogeneous Population of Brazil" (autor)

JCC Rocha, RLA Silva, BB Mendonça, S Marui, AJG Simpson, AA Camargo. J Med Genet 40:e31 (htttp://www.jmedgenet.com/cgi/content/ful/40/3/e31).

ONLINE MUTATION REPORT

High frequency of novel germline mutations in the *VHL* gene in the heterogeneous population of Brazil

J C C Rocha, R L A Silva, B B Mendonça, S Marui, A J G Simpson, A A Camargo

J Med Genet 2003;**40**:e31 (http://www.jmedgenet.com/cgi/content/full/40/3/e31)

Von Hippel-Lindau disease (VHL) (MIM 193300) is a heritable autosomal dominant disease characterised by predisposition to the development of a combination of benign and malignant tumours affecting multiple organs. The main features of the disease include retinal angiomas (RA), haemangioblastomas of the central nervous system (HB), clear cell renal carcinomas (RC), phaeochromocytomas (PH), multiple renal and pancreatic cysts, adenomas and carcinomas of the pancreas, neuroendocrine tumours, endolymphatic sac tumours, and papillary cystadenomas of the epididymis and broad ligaments.[1–5] Reported birth incidence ranges from 1:36 000 to 1:45 000.[6–8] Penetrance is essentially complete at 65 years of age and subjects at risk may develop a combination of clinical manifestations during their lifetime.[6]

Usually the disease presents with a family history, but de novo mutations have been reported in as many as 23% of VHL patients.[9] In general, the incidence of HB, AR, RC, and PH are approximately 60.2%, 41%, 25.3%, and 14.5%, respectively.[7] The diagnostic criteria for VHL are based on the presence of RA, HB, visceral lesions (RC, PH, or multiple pancreatic cysts) and a family history of similar lesions. If a family history of VHL disease is present, only one RA, HB, or visceral lesion is required to make the diagnosis of VHL. However, the presence of two or more RA/HB or one RA/HB and a visceral lesion is required in cases without a family history.[6]

The *VHL* gene was mapped to 3p25-26[10] and cloned in 1993 by an international cooperative study.[11] The gene was shown to be mutated in the germline of VHL patients and to be inactivated in most sporadic tumours associated with VHL.[12–21] The coding sequence of the *VHL* gene spans three exons and has two transcriptional start codons that result in protein products (pVHL) of 213 and 160 amino acid residues, respectively.

pVHL is multifunctional and is associated with the inhibition of angiogenesis, cell cycle exit, extracellular fibronectin matrix assembly, and proteolysis.[22 23] It forms a multimeric complex that contains, at minimum, elongin B, elongin C, Cul2 and Rbx1 (VCB), and which controls the stability and degradation of the α and β subunits of hypoxia inducible transcription factor 1 (HIF-1) in response to available oxygen levels.[24] Wild type pVHL polyubiquitinates HIF-1 subunits when oxygen is available, targeting them for degradation by the 26S proteasome. Mutation in the *VHL* gene results in constitutive expression of many HIF-1 inducible genes, including vascular endothelial growth factor (*VEGF*), erythropoietin (*EPO*), and platelet derived growth factor B chain (*PDGF-B*).[25–27] In addition, it has recently been shown that pVHL plays a crucial role in cytoskeletal organisation, focal adhesion formation, and motility.[28]

Several groups in North America, Europe, and Japan have collectively reported more than 224 distinct intragenic germline mutations (HGMD online), although the frequency of mutation detection has varied considerably among studies.[12 17 28–32] However, the recent improvement in mutation detection methodologies has raised this rate to virtually 100% in confirmed VHL patients.[33]

Phenotypes vary among families and reflect genotypic differences.[31 32 34 35] Currently, VHL is subclassified into type 1 and type 2 according to the low or high risk of developing PH, respectively. Type 2 VHL is subclassified into type 2A (low risk for RC and high risk for HB), type 2B (high risk for RC and HB), and type 2C (with familial PH).[3 25] As long as VHL type 2 is associated with missense mutations in more than 90%, most type 1 VHL families present large deletions or protein truncating mutations.[12 29 30 36]

Most deleterious *VHL* germline mutations damage the pVHL-elongin C binding α domain or affect the HIF-1 binding site at the pVHL β domain.[37] Mutations associated with RC cause complete HIF-1 deregulation and loss of p220 (fibronectin) binding, whereas the products of such type 2C VHL alleles retain the ability to downregulate HIF-1 but are defective for promotion of fibronectin matrix assembly, suggesting that loss of other pVHL functions are necessary for PH susceptibility.[38–40]

Key points

- Von Hippel-Lindau (VHL) disease (MIM 193300) is an autosomal dominant disorder caused by germline mutations in the *VHL* gene that predisposes to development of retinal and central nervous system haemangioblastomas, renal cell carcinomas, pancreatic tumours, phaeochromocytoma, as well as multiple cysts of the kidneys and pancreas.
- We report here the analysis of 20 patients with VHL, mainly from Brazil (17 familial and three without a family history), in whom we detected germline *VHL* gene mutations in every case using a combination of direct sequencing and quantitative Southern blotting.
- The mutations consisted of 16 point mutations (nine missense, three frameshift, one in frame deletion, two splice defects, and one nonsense mutation), three partial deletions, and one complete deletion of the *VHL* gene. As observed in other populations, the presence of PH (type 2 phenotype) was associated with the presence of a full length but mutated protein, whereas VHL without PH (type 1 phenotype) resulted from a truncated protein. Point mutations tended to concentrate within exons 1 and 2 (87.5%), a high proportion of which were novel (50%).
- The molecular analyses of germline mutations allowed presymptomatic identification of affected relatives, the early diagnosis of VHL in cases without complete clinical criteria, the characterisation of de novo cases, and the individualisation of risks and screening programmes based on the associated phenotype.
- This is the first study of VHL in Brazil and has contributed eight novel germline mutations in the *VHL* gene. We suggest that the Brazilian population (mostly of Portuguese origin) may also have unique features in respect to *VHL* mutations and risk of malignancies.

Here, we report the nature of *VHL* gene mutations in 20 consecutive VHL patients belonging to distinct families, mainly from Brazil. Mutations were detected in all VHL patients using a combination of direct sequencing and quantitative Southern blotting. To our knowledge, this is the first study of molecular diagnosis of VHL in Latin America. The study contributes eight novel germline *VHL* mutations and discusses whether increased risk of RC observed within these families may be attributable to mutations affecting the HIF-1 binding domain of the pVHL and/or the VCB complex.

SUBJECTS AND METHODS

Patients and clinical evaluation

Seventeen affected probands with a family history of VHL (15 from Brazil, one from Portugal, and one from Ecuador) and three Brazilian VHL patients without a family history (defined by clinical criteria) were included in this study. Fifteen of these were clinically evaluated at the Department of Oncogenetics of the Hospital do Câncer - Sao Paulo, Brazil, and the others were referred by other centres that were following the families. All families received appropriated pre- and post-test genetic counselling.

Blood samples from the affected probands were collected following receipt of signed informed consent. Clinical status was determined by physical examinations (including ophthalmoscopy), radiological evaluations, and laboratory testing according to methods described elsewhere.[3 5] Previous medical records of affected members and follow up were reviewed and registered in a database.

Amplification and sequencing of the *VHL* gene

Genomic DNA was extracted from 10 ml of peripheral blood using phenol-chloroform by standard procedures after separation of mononuclear cells and stored at 4°C. The three exons of the *VHL* gene were amplified by PCR in a total volume of 25 µl containing 50 ng of template DNA, 1 × PCR buffer (20 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/l KCl), 200 µmol/l each dNTP (Promega, USA), 1.5 mmol/l $MgCl_2$, 0.25 units of *Taq* DNA polymerase (Gibco-BRL Life Technologies, USA), and 0.5 µmol/l each primer set. Primers used for the amplification of the coding region of the *VHL* gene were: 1F 5′ CCATCCTCTACCGAGCGCGCG 3′ and 1R 5′ GGGCTTCAGACCGTGCTATCG 3′ for exon 1, yielding a fragment of 522 bp; 2F 5′ TGCCCAGCCACCGGTGTG 3′ and 2R 5′ GTCTATCCTGTACTTACCACAACA 3′ for exon 2, 232 bp; and 3F 5′ CACACTGCCACATACATGCACTC 3′ and 3R 5′ ACTCATCAGTACCATCAAAAGCTG 3′ for exon 3, 383 bp. Reactions were incubated at 95°C for five minutes and amplified for 35 cycles of 95°C for one minute, 58°C for one minute (exons 2 and 3), or 68°C (exon 1) for one minute, and 72°C for one minute, with a final extension cycle of 72°C for five minutes. PCR products were sequenced in both strands with Big Dye terminators (Applied Biosystems) and sequences were collected and analysed on an ABI Prism 377 (Applied Biosystems). The same PCR primers were used in the sequencing reactions, with the exception of exon 3, which was sequenced in the sense direction with an internal primer 31 5′ CGTTCCTTGTACTGAGACCCT 3′.

Southern blot analysis

Germline rearrangements involving part or the entire *VHL* gene were detected by quantitative Southern blotting using g7 cDNA[11] and a β globin probe, as control, as previously described.[33] In brief, 10 µg of genomic DNA were digested with the endonucleases *Eco*RI and *Ase*I and DNA fragments were separated by electrophoresis. The DNA was transferred to a nylon membrane and hybridised to random primer labelled probe specific for the *VHL* gene (g7) and for the β globin gene. Filters were exposed to *x* ray film (Kodak X-AR, USA) in a film cassette with two intensifying screens at −70°C for one to three days. Quantification was possible by comparing the intensity between the two bands. DNA from normal subjects and from patients with known rearrangements in the *VHL* gene (kindly provided by Dr Catherine Stolle, University of Pennsylvania, USA) was used as negative and positive controls, respectively. In normal subjects, a single 9.7 kb *Eco*RI and *Ase*I fragment is detected by hybridisation with the g7 probe, whereas in subjects with partial deletions of the *VHL* gene, a slower or faster migrating fragment was detected in addition to the normal sized fragment. Complete deletion of the *VHL* gene produced a single 9.7 kb band with 50% relative intensity after normalisation, which was confirmed by densitometry of the bands.

RESULTS

Twenty VHL probands and their families were evaluated in this study, of whom 17 presented with a family history (15 from Brazil, one from Portugal, and one from Ecuador). Fifteen familial VHL and two VHL patients were classified as having type 1 VHL (without PH) and two familial VHL and one VHL patient were classified as having type 2 VHL (with PH). Ten families were large enough (four or more affected subjects from at least two generations) for full phenotype analysis (table 1).

We were able to define germline *VHL* gene mutations in all probands who fulfilled the clinical criteria for VHL. In 16 cases (80%), these were point mutations involving either the coding region or exon boundaries of the *VHL* gene (nine missense, three frameshift, one in frame deletion, two splice defect, one nonsense), while four (20%) were large deletions of which three were partial deletions and one a complete deletion of the *VHL* gene (table 1). Eight of the 16 point mutations (50%) have not been previously described and thus represent novel mutations. The point mutations were not distributed uniformly along the *VHL* gene and most were concentrated within exons 1 and 2 (87.5%). The 13 point mutations associated with type 1 VHL occurred in this region in contrast to the findings of others.[29 31 42] We were able to analyse the germline mutation linkage to disease in nine families (families 2, 8, 9, 12, 14, 15, 16, 18, and 20). Four of these families carried known point mutations described before by others, two presented large deletions, and three had novel point mutations. The novel mutations 238A>C, 344delA, and IVS1+7G>A were detected in five, three, and two affected family members, respectively. The pathogenic nature of the IVS1+7G>A remains to be confirmed at the mRNA level; however, the fact that this alteration was not detected in one unaffected first degree relative (after clinical and radiological screening) suggests that it may be associated with the disease. Additionally, none of the novel mutations were represented in 120 alleles from normal subjects in the Brazilian population suggesting that these base changes are not common polymorphisms.

Linkage analyses were not possible in eight of the VHL families owing to the absence of live family members (families 1, 3, 4, 5, and 7) or relatives alive but not assessable (families 11, 17, and 19). Only in family 1 was genetic testing performed in a non-symptomatic boy, since no relatives were alive for testing. Although many members of this family had already presented with HB, the diagnosis of VHL was confirmed after necropsy of the proband's father, who died at 37 years from complications following emergency surgery for cerebellar HB. The necropsy showed many occult lesions related to VHL, including RC, multiple pancreatic and renal cysts, and cystadenoma of the epididymis.

From the eight families in which linkage to disease could not be established, four carried mutations previously described as having a deleterious effect (table 1), two had partial deletions of the *VHL* gene, and two had novel missense mutations. Although these two missense mutations have not been previously described, they affect amino acid residues for which

Table 1 Clinical manifestation of 20 consecutive families with von Hippel-Lindau disease (VHL). Details of germline mutations found in VHL families without (type 1) and with (type 2) phaeochromocytoma

VHL Family	VHL type	Family history	No	HB	RA	RC	PC	PH	Mutation at nt level of ORF[f]	Exon	Consequence to pVHL[f]	Type of mutation	Reference
1	1	Yes	5	4	–	2	–	–	226-228 del TCT	1	delPhe76	In frame del	41
2	1	Yes	10	7	3	3	–	–	238A>C	1	Ser80Arg	Missense	Novel[i]
3	1	Yes	2	1	1	–	–	–	262T>C	1	Trp88Arg	Missense	Novel[i]
4	1	Yes	3	2	3	–	–	–	280G>T	1	Glu94Stop	Nonsense	12
5	1	Yes	2	2	–	–	–	–	302T>G	1	Leu101Arg	Missesnse	31
6	1	No	1	1	–	1	–[d]	–	305 del C	1	Frameshift at aa 102[g]	Frameshift	Novel
7	1	Yes	5	4	3	2	–	–[e]	320G>C	1	Arg107Pro	Missense	33
8	1	Yes	2	2	–	–	–	–	IVS1+7G>A	Intron 1	–	Splicing defect	Novel
9	1	Yes	3	1	1	1	–	–	344 del A	2	Frameshift at aa 115[h]	Frameshift	Novel
10	2	No	1	–	1	–	–	1	371C>T	2	Thr124Ile	Missense	Novel
11	1	Yes	14	7	2	1	–[d]	–	388G>T	2	Val130Phe	Missense	Novel
12	1	Yes	8	7	1	2[b]	–	–	407T>C	2	Phe136Ser	Missense	12
13	1	No[a]	1	1	1	1[b]	–	–	436 del C	2	Frameshift at aa 146[h]	Frameshift	Novel
14	1	Yes	5	3	1	1	–[d]	–	IVS2+1G>A	Intron 2	–	Splicing defect	32
15	2	Yes	2	1	–	–[c]	–	2	499C>T	3	Arg167Trp	Missense	12
16	2	Yes	4	2	–	–[c]	–	3	500G>A	3	Arg167Gln	Missense	12
17	1	Yes	10	10	1	5[b]	–	–	Partial deletion	–		Rearrangement	–
18	1	Yes	5	2	1	–	–[d]	–	Partial deletion	–	–	Rearrangement	–
19	1	Yes	3	3	–	–	–	–	Partial deletion	–	–	Rearrangement	–
20	1	Yes	6	4	–	3[b]	1	–	Complete deletion	–	–	Rearrangement	–
9, 17	–	–	–	–	–	–	–	–	183C>G	1	Synonym	Polymorphism	1.16%[j]
16	–	–	–	–	–	–	–	–	IVS2 –95T>A	Intron 2	Apparently no effect	Polymorphism	1.69%[j]

[a]Further investigation showed that the mother of the patient was an asymptomatic carrier of the mutation. [b]One patient per family with renal tumour <3 cm under follow up detected by imaging. [c]Although we did not observe RC, the germline mutations are described as associated with the VHL type 2B phenotype. [d]Pancreatic cystadenoma. [e]The proband presented with one tumour which biopsy showed to be a non-functional paraganglioma. [f]Nomenclature according to Antonarakis *et al* (1998). [g]Protein stops at residue 142. [h]Protein stops at residue 157. [i]New at nucleotide level, but already described at aa level. [j]Allele frequency in normal Brazilian population.
No = number of affected members in each VHL family; HB = haemangioblastoma of CNS; RA = retinal angioma; RC = renal carcinoma; PC = pancreatic carcinoma; PH = phaeochromocytoma; nt = nucleotide; ORF = open reading frame; aa = amino acid; new site = novel germline mutation.

other different mutations have already been described.[28 29 31 43] Additionally, these mutations (Trp88Arg and Val130Phe) affect the HIF-1α binding site within the β domain of pVHL and the hydrophobic core of pVHL responsible for the structural integrity of the β sheets, respectively.[37] Thus, in both cases these novel mutations are predicted to result in significant alteration of pVHL function.

Three novel germline mutations were detected in all VHL patients with no family history: frameshift mutation 305delC, frameshift mutation 436delC, and missense mutation Thr124Ile. Both novel frameshift mutations introduce a premature stop codon leading to a truncated protein and the missense mutation was not detected in normal subjects from the Brazilian population. Following parental testing, two VHL patients were confirmed as having de novo VHL (families 6 and 10), since their mutation was not found in their parents (although no test to confirm the paternity was performed). However, in family 13, analysis of the proband's parents showed that the mutation 436delC was present in two independent samples from his asymptomatic mother and thus it cannot be considered a de novo mutation. On complete clinical investigation, however, the proband's mother was shown to have two occult HBs (one cerebellar and one spinal) as well as multiple pancreatic cysts.

In addition to the mutations described above, two variants that apparently do not interfere with the protein structure were found in three families: the synonymous mutation Pro61Pro (in families 9 and 17), previously reported as a known polymorphism, and the variant IVS2-94T>A (in family 16) that has not been previously reported. In all the families, except family 15, the variants did not segregate with the related *VHL* gene mutation. The allele frequency of each of these variants was shown to be at least 1% in normal DNA samples from the Brazilian population (a minimum of 120 alleles evaluated) (table 1). In contrast, none of the novel point mutations described in the present study were detected in normal subjects.

Genotype-phenotype correlations were consistent with those reported in other studies. Most of the mutations found in the 17 families classified as type 1 VHL resulted in a truncated protein (66%), whereas all three mutations found in families whose phenotype included PH (type 2 VHL) predicted a full length protein. There was no correlation between the type of germline mutation and the occurrence of HB or RA, since these manifestations were present in almost all families analysed. Two families harboured distinct mutations in codon 167, a VHL hotspot associated with high risk of RC, HB, and PH (type 2B). However, RC was not observed in these families, and we considered that a larger number of affected members and a longer period of follow up will be necessary for full phenotypic characterisation in these families. Eleven out of 17 type 1VHL families had a RC phenotype (table 1). Almost all mutations detected in these families affect residues in the HIF-1 binding site domain (residues 67-117), residues in the hydrophobic core important for VCB complex assembly, or are associated with the presence of a truncated form of pVHL. Interestingly, we have observed in large VHL families with a RC phenotype that although the principle cause of mortality in previous generations was HB, in younger generations this is now mostly the result of RC (data not shown).

DISCUSSION

We have studied von Hippel-Lindau disease in Brazil since 1998, and have identified 20 families with VHL. Many studies in Japanese and western populations have highlighted differences in the spectrum of *VHL* germline mutations around the world.[28 31 42] The heterogeneity of the Brazilian population, consisting mostly of descendants of Portuguese immigrants, African, and Brazilian Indians raises the possibility of a different spectrum of *VHL* germline mutations and risks of VHL associated lesions. The VHL families included in this study are representative of our population, since they came from many different regions of the country, including the south east, north east, and the central region. Also, one family from Ecuador and another from Portugal were included in our study. To our knowledge this is the first study in Portuguese speaking families and the first in Latin America.

The spectrum of known mutations in the *VHL* gene is enormous and includes missense and nonsense mutations, deletions or insertions of one to several nucleotides, splice site mutations, and rearrangements consisting of partial or complete deletion of the gene. Here, we found that by complete sequencing of the coding regions of the *VHL* gene, followed by quantitative Southern blotting when a sequence mutation could not be detected, we were able to reproduce the results obtained by Stolle *et al*,[33] in that we detected germline mutations in all 20 distinct VHL families analysed. Because of the relatively short length of the *VHL* gene, no screening method based on single stranded DNA conformation, such as SSCP or CDGE, was used before sequencing. Since not all investigators achieved the same rate of mutation detection, we consider that both methodology and patient selection are important for achieving a high efficiency of mutation detection in VHL. We believe that the high rate of mutation detection achieved in this work can also be explained by the stringent clinical criteria used for family selection. All patients selected for the study had the diagnosis of VHL confirmed by clinical, pathological, or radiological evidence.

We found that molecular screening was particularly invaluable in situations where the diagnosis of VHL could not be achieved by clinical criteria alone, such as where family data were not available, or where patients had a negative family history. In addition, the genetic test was important to determine the status of the parents in the apparently de novo VHL patients. In one case, it was possible to detect the same mutation in the mother of the patient, with implications for the risk assessment and screening of other family members. Indeed, we emphasise here that the study of the patient's parents is essential for the characterisation of de novo mutations, and for risk assessment and counselling of other relatives. Recent studies have shown that about 23% of probands have parents and sibs with no history of the disease at the time of the diagnosis.[9]

We have contributed eight novel germline mutations, including four missense mutations, three frameshift mutations, and one splice site mutation (table 1). Five novel mutations occurred with a familial pattern. However, two of them could not be analysed further in other family members: the missense mutation Trp88Arg, because the mother of the proband had died and was adopted, and the missense mutation Val130Phe, because there were no available relatives at the time of the study. Although the mutation IVS1+7G>A does not affect the invariant 3′ AG splicing donor site, segregation and population analysis presented in this work suggests it can be a pathogenic mutation. Splicing mutations outside the invariant receptor or donor site have been reported in many cancer susceptibility genes, including *VHL*, *TP53*, *BRCA1*, and *hMLH1*, and they represent as many as 27% of the splice sites mutations reported in these genes (HGMD online). None of the novel point mutations described in this study were represented in the normal population, excluding the possibility that they might be common polymorphisms.

Germline mutations in the *VHL* gene are distributed throughout the coding region of the gene. Although other groups have found that the germline mutations of the *VHL* gene tended to concentrate in exon 1 and exon 3, we observed in our series that most point mutations (87.5%) occurred in exon 1 (43.7%), exon 2 (31.3%), and the boundaries of these exons (12.5%). We found large deletions of the *VHL* gene in four of our families (20%), including three partial deletions and one complete deletion. Previous studies showed a frequency of partial *VHL* gene deletion of 25% and complete VHL gene deletion in 9% in the VHL families.[33]

In general, genotype-phenotype correlations observed in this study were consistent with those reported by others.[12 29 30 36 44] It is known that distinct phenotypes can result from almost identical mutations.[45] Here we found that the mutation Ser80Arg detected in a large family conferred a high risk for RC, HB, and RA, but no apparent risk for PH. A similar missense mutation in this same codon, Ser80Gln, has been reported to be associated with type 2C VHL (only PH). [46] It should be emphasised that new genotype-phenotype correlations are emerging for VHL and further studies such as the one presented here are necessary. Recently functional studies have shown that phenotypes could be related to loss of specific pVHL functions.

Here, we observed an increased risk of RC in most of our families, based on the family phenotype or the presence of high risk mutations. Most of these mutations directly affected the HIF-1 binding site of the pVHL and/or the proper assembly of the VCB complex. Functional studies strengthen the notion that HIF-1 deregulation plays a causal role in HB and RC and contributes to RC pathogenesis in the setting of VHL disease.[38 47 48]

Although the phenotype in VHL may vary among families, intrafamilial variability can also be observed,[34 35] suggesting that other factors could be involved, such as environmental exposure, modifier genes, or single nucleotide polymorphisms (SNPs).[49] All these factors could influence the clinical spectrum of VHL in different populations, and so far there is no satisfactory explanation for the clinical heterogeneity observed in VHL. Recently, the cyclin D1 genotype was investigated as a modifier gene in VHL, and it was found that the presence of the nucleotide G at position 870 was associated with an increased risk of RA and HB.[50 51] More molecular and epidemiological studies will be necessary for complete understanding of the phenotype associated with VHL.

The improvement of life expectancy of VHL patients in recent years is the result of the refinement of image based diagnostic methods and the development of screening programmes. We argue that this trend is now likely to be strengthened by the incorporation of accurate mutational analysis, risk assessment, and genetic counselling. Here, we have confirmed that it is now reasonable to expect to find *VHL* mutations in all affected subjects, but that the spectrum of mutations is highly population dependent. Furthermore, the phenotypic implications of specific mutations are also likely to be influenced by the genetic background of the population. Thus, we have contributed eight novel germline mutations in the *VHL* gene found in the Brazilian families whom we suspect may have unique features in respect to risk of malignancies. Continued, careful study of these and other VHL families in Latin America will be required to confirm this altered disease profile, which would have significant implications for genetic counselling and screening programmes of VHL disease on this continent.

ACKNOWLEDGEMENTS

Database information. The accession number and URL for data in this article are as follows: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/ (for VHL (MIM 193300)]), Human Gene Mutation Database - Cardiff, http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/120488.html

We are very grateful to Dr Alessandra Murgia (University of Padua, Italy) for the probes used in Southern blotting experiments and to Anna Christina Matos Salim and Valéria Paixão for dedicated technical support. We wish to extend our special thanks to Joyce Graff (VHLFA) for her outstanding support, and to all genetic centres in Brazil that collaborated with this study. JCCR is a PhD. student supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Authors' affiliations

J C C Rocha, Department of Oncogenetics, Hospital do Câncer A C Camargo, São Paulo, Brazil

J C C Rocha, R L A Silva, A J G Simpson, A A Camargo, Laboratory of Cancer Genetics, Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo, Brazil

B B Mendonça, S Marui, Laboratory of Hormones and Molecular Genetics, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence to: Dr J C C Rocha, Rua Professor Antonio Prudente 109, 4th floor, 01509-010 São Paulo, SP, Brazil; jccrocha@ludwig.org.br

FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE BIBLIOTECA

REFERENCES

1 **Melbon KL**, Rosen SW. Lindau's disease. Review of the literature and study of a large kindred. *Am J Med* 1964;**36**:595-617.
2 **Glenn GM**, Choyke PL, Zbar B, Linehan W. von Hippel-Lindau disease: clinical review and molecular genetics. *Probl Urol* 1990;**4**:312-30.
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**:629-42.
4 **Choyke PL**, Glenn GM, Wagner JP, Lubensky IA, Thakore K, Zbar B, Linehan WM, Walther MM. Epididymal cystadenomas in von Hippel-Lindau disease. *Urology* 1997;**49**:926-31.
5 **Manski TJ**, Heffner DK, Glenn GM, Patronas NJ, Pikus AT, Katz D, Lebovics R, Sledjeski K, Choyke PL, Zbar B, Linehan WM, Oldfield EH. Endolymphatic sac tumors. A source of morbid hearing loss in von Hippel-Lindau disease. *JAMA* 1997;**277**:1461-6.
6 **Maher ER**, Iselius L, Yates JR, Littler M, Benjamin C, Harris R, Sampson J, Williams A, Ferguson-Smith MA, Morton N. von Hippel-Lindau disease: a genetic study. *J Med Genet* 1991;**28**:443-7.
7 **Neumann HP**, Wiestler OD. Clustering of features of von Hippel-Lindau syndrome: evidence for a complex genetic locus. *Lancet* 1991;**337**:1052-4.
8 **Maddock IR**, Moran A, Maher ER, Teare MD, Norman A, Payne SJ, Whitehouse R, Dodd C, Lavin M, Hartley N, Super M, Evans DG. A genetic register for von Hippel-Lindau disease. *J Med Genet* 1996;**33**:120-7.
9 **Sgambati MT**, Stolle C, Choyke PL, Walther MM, Zbar B, Linehan WM, Glenn GM. Mosaicism in von Hippel-Lindau disease: lessons from kindreds with germline mutations identified in offspring with mosaic parents. *Am J Hum Genet* 2000;**66**:84-91.
10 **Seizinger BR**, Rouleau GA, Ozelius LJ, Lane AH, Farmer GE, Lamiell JM, Haines J, Yuen JW, Collins D, Majoor-Krakauer D, Bonner T, Marrew C, Rubenstein A, Halperin J, McConkie-Rosell A, Green JS, Trofatter JA, Ponder BA, Eierman L, Bowner MI, Schmike R, Oostra B, Aronin N, Smith DI, Drabkin H, Wazari MW, Hobbs WJ, Marruza RL, Conneally PM, Hsia YE, Gusella JF. von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature* 1988;**332**:268-9.
11 **Latif F**, Tory K, Gnarra J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L, Schmidt L, Zhou F, Li H, Wei MH, Chen F, Glenn G, Choyke P, Walther MM, Weng Y, Duan DSR, Dean M, Glavac D, Richards FM, Crossey PA, Ferguson-Smith MA, Le Paslier D, Chumakov I, Cohen D, Chinaut AC, Maher ER, Linehan WM, Zbar B, Lerman MI. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993;**260**:1317-20.
12 **Crossey PA**, Richards FM, Foster K, Green JS, Prowse A, Latif F, Lerman MI, Zbar B, Affara NA, Ferguson-Smith MA, Maher ER. Identification of intragenic mutations in the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene and correlation with disease phenotype. *Hum Mol Genet* 1994;**3**:1303-8.
13 **Foster K**, Prowse A, van den Berg A, Fleming S, Hulsbeek MM, Crossey PA, Richards FM, Cairns P, Affara NA, Ferguson-Smith MA. Somatic mutations of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in non-familial clear cell renal carcinoma. *Hum Mol Genet* 1994;**3**:2169-73.
14 **Gnarra JR**, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, Latif F, Liu S, Chen F, Duh FM, Lubensky I, Duan DR, Florence C, Pozzatti R, Walther MM, Bander NH, Grossman HB, Brauch H, Pomer S, Brooks JD, Isaacs WB, Lerman MI, Zbar B, Linehan WM. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 1994;**7**:85-90.
15 **Kanno H**, Kondo K, Ito S, Yamamoto I, Fujii S, Torigoe S, Sakai N, Hosaka M, Shuin T, Yao M. Somatic mutations of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in sporadic central nervous system hemangioblastomas. *Cancer Res* 1994;**54**:4845-7.
16 **Shuin T**, Kondo K, Torigoe S, Kishida T, Kubota Y, Hosaka M, Nagashima Y, Kitamura H, Latif F, Zbar B, *et al*. Frequent somatic mutations and loss of heterozygosity of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res* 1994;**54**:2852-5.
17 **Whaley JM**, Naglich J, Gelbert L, Hsia YE, Lamiell JM, Green JS, Collins D, Neumann HP, Laidlaw J, Li FP, Klein-Szanto AJP, Seizinger BR, Kley N. Germ-line mutations in the von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene are similar to somatic von Hippel-Lindau aberrations in sporadic renal cell carcinoma. *Am J Hum Genet* 1994;**55**:1092-102.
18 **Gilcrease MZ**, Schmidt L, Zbar B, Truong L, Rutledge M, Wheeler TM. Somatic von Hippel-Lindau mutation in clear cell papillary cystadenoma of the epididymis. *Hum Pathol* 1995;**26**:1341-6.
19 **Olschwang S**, Richard S, Boisson C, Giraud S, Laurent-Puig P, Resche F, Thomas G. Germline mutation profile of the VHL gene in von Hippel-Lindau disease and in sporadic hemangioblastoma. *Hum Mutat* 1998;**12**:424-30.
20 **Kawahara N**, Kume H, Ueki K, Mishima K, Sasaki T, Kirino T. VHL gene inactivation in an endolymphatic sac tumor associated with von Hippel-Lindau disease. *Neurology* 1999;**53**:208-10.
21 **Vortmeyer AO**, Huang SC, Koch CA, Governale L, Dickerman RD, McKeever PE, Oldfield EH, Zhuang Z. Somatic von Hippel-Lindau gene mutations detected in sporadic endolymphatic sac tumors. *Cancer Res* 2000;**60**:5963-5.
22 **Ohh M**, Yauch RL, Lonergan KM, Whaley JM, Stemmer-Rachamimov AO, Louis DN, Gavin BJ, Kley N, Kaelin WG Jr, Iliopoulos O. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol Cell* 1998;**1**:959-68.
23 **Pause A**, Lee S, Lonergan KM, Klausner RD. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene is required for cell cycle exit upon serum withdrawal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;**95**:993-8.
24 **Maxwell PH**, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;**399**:271-5.
25 **Gnarra JR**, Zhou S, Merrill MJ, Wagner JR, Krumm A, Papavassiliou E, Oldfield EH, Klausner RD, Linehan WM. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**:10589-94.
26 **Iliopoulos O**, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG Jr, Goldberg MA. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**:10595-9.
27 **Siemeister G**, Weindel K, Mohrs K, Barleon B, Martiny-Baron G, Marme D. Reversion of deregulated expression of vascular endothelial growth factor in human renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Cancer Res* 1996;**56**:2299-301.
28 **Clinical Research Group for VHL in Japan**. Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in Japanese VHL. *Hum Mol Genet* 1995;**4**:2233-7.
29 **Kamada M**, Suzuki K, Kato Y, Okuda H, Shuin T. von Hippel-Lindau protein promotes the assembly of actin and vinculin and inhibits cell motility. *Cancer Res* 2001;**6**:4184-9.
30 **Chen F**, Kishida T, Yao M, Hustad T, Glavac D, Dean M, Gnarra JR, Orcutt ML, Duh FM, Glenn G, Green J, Hsia YE, Lamiell J, Li H, Wei MH, Schmidt L, Tory K, Kuzmin I, Stackhouse T, Latif F, Linehan WM, Lerman MI, Zbar B. Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype. *Hum Mutat* 1995;**5**:66-75.
31 **Maher ER**, Webster AR, Richards FM, Green JS, Crossey PA, Payne SJ, Moore AT. Phenotypic expression in von Hippel-Lindau disease: correlations with germline VHL gene mutations. *J Med Genet* 1996;**33**:328-32.
32 **Zbar B**, Kishida T, Chen F, Schmidt L, Maher ER, Richards FM, Crossey PA, Webster AR, Affara NA, Ferguson-Smith MA, Brauch H, Glavac D, Neumann HP, Tisherman S, Mulvihill JJ, Gross DJ, Shuin T, Whaley J, Seizinger B, Kley N, Olschwang S, Boisson C, Richard S, Lips CH, Lerman M. Germline mutations in the Von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in families from North America, Europe, and Japan. *Hum Mutat* 1996;**8**:348-57.
33 **Glavac D**, Neumann HP, Wittke C, Jaenig H, Masek O, Streicher T, Pausch F, Engelhardt D, Plate KH, Hofler H, Chen F, Zbar B, Brauch H. Mutations in the VHL tumor suppressor gene and associated lesions in families with von Hippel-Lindau disease from central Europe. *Hum Genet* 1996;**98**:271-80.
34 **Stolle C**, Glenn G, Zbar B, Humphrey JS, Choyke P, Walther M, Pack S, Hurley K, Andrey C, Klausner R, Linehan WM. Improved detection of germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Hum Mutat* 1998;**12**:417-23.
35 **Glenn GM**, Daniel LN, Choyke P, Linehan WM, Oldfield E, Gorin MB, Hosoe S, Latif F, Weiss G, Walther M, Lerman MI, Zbar B. von Hippel-Lindau (VHL) disease: distinct phenotypes suggest more than one mutant allele at the VHL locus. *Hum Genet* 1991;**87**:207-10.
36 **Neumann HP**, Bender BU. Genotype-phenotype correlations in von Hippel-Lindau disease. *J Intern Med* 1998;**243**:541-5.
37 **Zbar B**. von Hippel-Lindau disease and sporadic renal cell carcinoma. *Cancer Surv* 1995;**25**:219-32.
38 **Stebbins CE**, Kaelin WG Jr, Pavletich NP. Structure of the VHL-elonginC-elonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science* 1999;**284**:455-61.
39 **Clifford SC**, Cockman ME, Smallwood AC, Mole DR, Woodward ER, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Maher ER. Contrasting effects on HIF-1alpha regulation by disease-causing pVHL mutations correlate with patterns of tumourigenesis in von Hippel-Lindau disease. *Hum Mol Genet* 2001;**10**:1029-38.
40 **Hoffman MA**, Ohh M, Yang H, Klco JM, Ivan M, Kaelin WG Jr. von Hippel-Lindau protein mutants linked to type 2C VHL disease preserve the ability to downregulate HIF. *Hum Mol Genet* 2001;**10**:1019-27.
41 **Hansen WJ**, Ohh M, Moslehi J, Kondo K, Kaelin WG, Welch WJ. Diverse effects of mutations in exon II of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene on the interaction of pVHL with the cytosolic chaperonin and pVHL-dependent ubiquitin ligase activity. *Mol Cell Biol* 2002;**22**:1947-60.
42 **Patel RJ**, Appukuttan B, Ott S, Wang X, Stout JT. DNA-based diagnosis of the von Hippel-Lindau syndrome. *Am J Ophthalmol* 2000;**129**:258-60.
43 **Cybulski C**, Krzystolik K, Murgia A, Gorski B, Debniak T, Jakubowska A, Martella M, Kurzawski G, Prost M, Kojder I, Limon J, Nowacki P, Sagan L, Bialas B, Kaluza J, Zdunek M, Omulecka A, Jaskolski D, Kostyk E, Koraszewska-Matuszewska B, Haus O, Janiszewska H, Pecold K, Starzycka M, Slomski R, Cwirko M, Sikorski A, Gliniewicz B, Cyrylowski L, Fiszer-Maliszewska L, Gronwald J, Toloczko-Grabarek A, Zajaczek S, Lubinski J. Germline mutations in the von Hippel-Lindau (VHL) gene in patients from Poland: disease presentation in patients with deletions of the entire VHL gene. *J Med Genet* 2002;**39**:e38.
44 **Mattocks C**, Tarpey P, Bobrow M, Whittaker J. Comparative sequence analysis (CSA): a new sequence-based method for the identification and characterization of mutations in DNA. *Hum Mutat* 2000;**16**:437-43.
45 **Hes F**, Zewald R, Peeters T, Sijmons R, Links T, Verheij J, Matthijs G, Leguis E, Mortier G, van der Torren K, Rosman M, Lips C, Pearson P, van der Luijt R. Genotype-phenotype correlations in families with deletions in the von Hippel-Lindau (VHL) gene. *Hum Genet* 2000;**106**:425-31.

46 **Bradley JF**, Collins DL, Schimke RN, Parrott HN, Rothberg PG. Two distinct phenotypes caused by two different missense mutations in the same codon of the VHL gene. *Am J Med Genet* 1999;**87**:163-7.
47 **Woodward ER**, Eng C, McMahon R, Voutilainen R, Affara NA, Ponder BA, Maher ER. Genetic predisposition to phaeochromocytoma: analysis of candidate genes GDNF, RET and VHL. *Hum Mol Genet* 1997;**6**:1051-6.
48 **Kondo K**, Klco J, Nakamura E, Lechpammer M, Kaelin WG Jr. Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell* 2002;**1**:237-24.
49 **Maranchie JK**, Vasselli JR, Riss J, Bonifacino JS, Linehan WM, Klausner RD. The contribution of VHL substrate binding and HIF1-alpha to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 2002;**1**:247-55.
50 **Webster AR**, Richards FM, MacRonald FE, Moore AT, Maher ER. An analysis of phenotypic variation in the familial cancer syndrome von Hippel-Lindau disease: evidence for modifier effects. *Am J Hum Genet* 1998;**63**:1025-35.
51 **Zatyka M**, da Silva NF, Clifford SC, Morris MR, Wiesener MS, Eckardt KU, Houlston RS, Richards FM, Latif F, Maher ER. Identification of cyclin D1 and other novel targets for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene by expression array analysis and investigation of cyclin D1 genotype as a modifier in von Hippel-Lindau disease. *Cancer Res* 2002;**62**:3803-11.

ANEXO 12

Publicações não relacionados à tese:

Artigo em periódico: "hMLH1 and hMSH2 Gene Mutation in Brazilian Families With Suspected Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer." (co-autor)
Rossi BM, Lopes A, Oliveira Ferreira F, Nakagawa WT, Napoli Ferreira CC, Casali Da Rocha JC, Simpson CC, Simpson AJ. Ann Surg Oncol 2002; 9(6):555-5561.

Capítulo "Tumor de Willms" (co-autor)
Em "Genética Molecular do Câncer". Sociedade Brasileira de Cancerologia. Novembro de 2000. ISBN 85-88092-01-8

Capítulo "Câncer do Sistema Nervoso Central" (autor)
Em "Genética Molecular do Câncer". Sociedade Brasileira de Cancerologia. Novembro de 2000. ISBN 85-88092-01-8

Capítulo "Testes Preditivos" (co-autor)
Em "Projeto Diretrizes". Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. 1ª Edição, 2001. ISBN 85-89073-01-7