

REVISIÓN

Tumores neuroendocrinos familiares secretantes de catecolaminas.

Catecholamine-Secreting Neuroendocrine Familial Tumors

Lupi, Susana N.

División Endocrinología del Hospital de Agudos "J. M. Ramos Mejía".

Resumen

Los tumores de la cresta neural (feocromocitomas y/o paragangliomas) son predominantemente esporádicos. Los avances en patogénesis molecular han permitido redefinir como formas heredadas algunos cuadros antes definidos como esporádicos.

Se han descrito varios síndromes familiares asociados a feocromocitomas, dependientes de mutaciones germinales de genes susceptibles: neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (MEN 2), enfermedad de Von Hippel Lindau (VHL), neurofibromatosis tipo 1 (NF1) y los síndromes paraganglionares familiares (PGL).

A excepción del protooncogen RET, con mutaciones activadoras en un sólo alelo que son las responsables del MEN 2, todos los restantes son genes supresores tumorales, es decir que, de acuerdo con el modelo de Knudson, a la mutación heredada en un alelo del gen, se le agrega la inactivación del otro alelo en el tumor por mutación o delección.

Las actuales técnicas de biología molecular permiten pesquisar mutaciones de los genes responsables, lo que lleva a diagnóstico adecuado y un tratamiento más precoz de algunos tumores, aún sin evidencias clínicas o bioquímicas de enfermedad, lo que modifica el pronóstico del paciente índice y de su familia.

Pese a que actualmente se han identificado los genes involucrados en la patogenia de estos síndromes, todavía no se conocen los mecanismos responsables de que estas mutaciones induzcan tumorigénesis.

Abstract

Neural crest tumors (pheochromocytomas and/or paragangliomas) are predominantly sporadic. Advances in the understanding of molecular pathogenesis have resulted in the reclassification of some previously conditions defined sporadic as familial forms.

Earlier age of onset and bilateral adrenal localization are more frequent in hereditary than sporadic forms.

Several familial syndromes have been described: type 2 multiple endocrine neoplasia (MEN 2), von Hippel-

Dirección Postal: Lupi, S. N. Médica de planta de la División endocrinología del Hospital de agudos J. M. Ramos Mejía, Gral. Urquiza 609 - Tel: 4331-8638

Palabras clave: Tumores Neuroendocrinos Familiares. Feocromocitoma, Paragangliomas, Genética, Tumorigénesis.

Key words: Pheochromocytoma, Genetics, Paraganglioma, Tumorigénesis.

Recibido: 1º/06/04 Aprobado: 07/09/04

Lindau disease (VHL), type 1 neurofibromatosis (NF1), and familial paraganglionic syndromes (PGL).

Most of the genes involved in these síndromes are tumoral suppressor genes, i.e., according to Knudson two-hit model, the inherited mutation in one allele is added to an inactivation of the other allele in the tumor. The exception is the protooncogene RET, which has activating mutations in only one allele responsible for MEN 2.

Current molecular biology techniques allow the detection of mutations of the responsible genes, leading to an adequate diagnosis and an earlier treatment-even without clinical or biochemical evidence of the disease. This modifies the prognosis for both the patient and his/her family.

Once pheochromocytoma and/or paraganglioma are diagnosed in patients younger than 50 years old, genetic study for the VHL gene should be initiated. The reported frequencies must be taken into account, but in the case of extra-adrenal localization, mutational analyses for the SDHD gene should be done first.

In spite of current identification of the genes involved in the pathogenesis of these syndromes, the responsible mechanisms for induction of tumorigenesis by the reported mutation, remain unknown.

Introducción

Los tumores neuroendocrinos secretores de catecolaminas (feocromocitomas y/o paragangliomas funcionales) son responsables de aproximadamente el 1.9% de los casos de hipertensión arterial; su morbimortalidad es muy alta si no son tratados oportuna y adecuadamente ^{1,2}. Por lo tanto, la sospecha y el diagnóstico precoz es de suma importancia.

Las células que los constituyen derivan del ectodermo neural y se denominan cromafines porque se tiñen de color oscuro en contacto con sales de cromo. Se hallan distribuidas por todo el organismo, tienen propiedades citoquímicas y ultraestructurales comunes, y están preparadas para la función neuroendocrina ya que presentan todas las enzimas necesarias para secretar aminas, hormonas y péptidos variados.

Se les denomina feocromocitomas cuando provienen de la médula adrenal y paragangliomas funcionales o feocromocitomas extradrenales cuando derivan de los ganglios del sistema nervioso simpático o son resabio de estructuras cromafines de la vida fetal (órgano de Zuckerkandl) ^{3,4}.

La mayor parte de estos tumores se presenta de manera esporádica y sólo un 10% de los casos es familiar. Sin embargo, en los últimos años, la biología molecular ha determinado importantes avances en este campo, ya que ha permitido diferenciar las formas heredadas de las esporádicas (que sólo presentan mutaciones a nivel tumoral). Estas metodologías han permitido arribar a un diagnóstico correcto y precoz que mostró que la frecuencia de formas he-

redadas era mayor a la ya descrita, lo que permite mejorar el pronóstico de esta patología en el paciente así como en su familia ⁵.

Los síndromes familiares asociados con feocromocitoma son: neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (MEN 2), enfermedad de Von Hippel Lindau (VHL), neurofibromatosis tipo 1 (NF₁), también conocida como enfermedad de von Recklinghausen, y síndromes paraganglionares familiares (PGL) ^{5,6}. Ver Tabla N°1. Todos éstos se caracterizan por presentar mutaciones germinales en genes susceptibles a la patología, y a excepción del gen RET (protooncogen) implicado en la patogénesis del MEN 2, todos los restantes son supresores tumorales, es decir que, según el modelo de dos pasos de Knudson, a la mutación heredada en un alelo del gen, se le agrega en el tumor la inactivación del otro alelo por mutación, delección o no expresión del alelo wild type ⁷.

En general, la edad de aparición más temprana y la localización adrenal bilateral son más frecuentes en las formas familiares que en las esporádicas.

Por otra parte, si bien se ha avanzado notoriamente en el diagnóstico, todavía quedan varios puntos sin explicación, e.g., ¿por qué pacientes con alguno de los síndromes mencionados e idénticas mutaciones germinales manifiestan la patología en edades tan diferentes?, a saber entre los primeros meses de vida y la octava década, o ¿por qué la tasa de prevalencia de localización bilateral de los distintos síndromes es tan variable (menos del 78% para el MEN2; menos del 50% para VHL, menos del 25% para NF1)? ⁸.

Neoplasia endocrina múltiple tipo 2

Bases genéticas

Es un trastorno dependiente de una mutación activadora del protooncogen RET heredado por línea germinal⁹. Como contrapartida, el mismo gen puede ser asiento de mutaciones germinales inactivadoras, lo que provoca casos de enfermedad de Hirshsprung, y hay casos, más raros aún, de pacientes con estas dos enfermedades que presentan mutaciones en diferentes codones^{10,11}.

El MEN 2, con una prevalencia estimada de 1 cada 35.000 habitantes, se ha clasificado en varios subtipos: MEN 2A, MEN 2B y carcinoma medular de tiroides familiar aislado (CMTFA).

La clínica del MEN 2A consiste en: carcinoma medular de tiroides, que suele estar presente en todos los casos; feocromocitoma, con una frecuencia de aparición de aproximadamente 50%; e hiperparatiroidismo primario, en el 10-20% de los casos.

La clínica del MEN 2B es: carcinoma medular de tiroides y feocromocitoma con similares porcentajes de aparición que en el subtipo 2A, asociados con hábito marfanoide, neuromas mucosos (de la cavidad bucal, párpados, conjuntivas, córnea) y ganglioneuromas gastrointestinales, pero sin hiperparatiroidismo. Por lo general, el carcinoma medular de tiroides del MEN 2B aparece a edades más tempranas y tiene un comportamiento más agresivo que el del MEN 2A y del CMTFA; representa el 5% de todos los MEN.

Por definición los pacientes con CMTFA, sólo desarrollan la patología tiroidea.

El feocromocitoma asociado a MEN 2A suele aparecer entre los 30 y 40 años.

En el MEN 2, los feocromocitomas se localizan casi exclusivamente en las glándulas adrenales, a menudo son multifocales así como bilaterales, y aparecen sincrónica o asincrónicamente. En general, son benignos (menos del 5% de malignidad)¹².

Desde el punto de vista bioquímico, se caracterizan por secretar niveles exagerados de adrenalina y ácido vainillín mandélico, con niveles normales o levemente aumentados de noradrenalina. En todos los pacientes que presentan mutaciones del protooncogen RET asociado a MEN 2, se recomienda realizar screening anual (ya sea metanefrinas/ normetanefrinas fraccionadas urinarias, catecolaminas urinarias y ácido vainillín mandélico, según se disponga) para feocromocitoma.

El protooncogen RET está localizado en el brazo largo del cromosoma 10 (10q11.2) y se expresa normalmente en los tejidos tiroideo, adrenal y renal, y sistema neuroendocrino; patológicamente, en tumores derivados de la cresta neural como carcinoma medular tiroideo y feocromocitoma. Está compuesto por 21 exones con varios sitios calientes para mutaciones.

Este gen codifica para un receptor transmembrana tirosínquinasa, la proteína RET (pRET), que presenta un dominio extracelular con una región con homología a las caderinas (relacionada con la adhesión intracelular calciodependiente) y otra región rica en cisteína (importante en la conformación y dimerización del receptor); una región transmembrana simple y dos dominios intracelulares con actividad tirosín-quinasa. Esta proteína, que presenta una estructura similar a la del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), participa en el desarrollo y el mantenimiento del sistema nervioso central y periférico, y del sistema excretor renal.

La vía natural de activación del RET es la unión a su ligando. Se conocen cuatro ligandos: factor neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF), neurturina, artemina y persefina, todos estructuralmente ligados al factor transformador de crecimiento-beta (TGF β). Estos ligandos no se unen directamente al RET, sino que se unen a sus propios receptores de membrana GDNF alpha (GFR 1, 2, 3 y 4). Es el complejo GDNF unido a su receptor (GDNF/GFR) el que media la homodimerización del RET, que da por resultado la fosforilación de residuos tirosínicos del dominio intracelular. La activación del RET induce la cascada de interacciones proteicas intracelulares que causan proliferación, diferenciación y mayor motilidad celular^{13,14}.

El tipo de respuesta biológica depende del tipo celular y de la vía bioquímica activada. La fosforilación de tirosina 905 o 1096, activa la vía del RAS; la de la tirosina 1015 activa la fosfolipasa C y la de la 1063, activa la vía del inositol trifosfato quinasa (PI3)¹⁵.

En los feocromocitomas asociados con MEN 2 (MEN2-feocromocitomas), las mutaciones que le confieren activación constitutiva más frecuentes son con pérdida de sentido (missense) y, en el subtipo

2A, se localizan en los codones 609, 611, 618, 620, 634, y 790 de los exones 10, 11 y 13; mientras que en el 2B, se localizan en los codones 883 y 918 de los exones 15 y 16. En el CMTFA, las mutaciones más frecuentes se localizan en los exones 10 y 11 (algo diferentes de las del MEN 2A), 13 y 14 del protooncogen ¹⁰. Ver figura N°1.

Las mutaciones en el dominio extracelular, rico en cisteína, inducen la formación de dímeros activos (activación constitutiva) de RET, en ausencia del ligando; las del dominio intracelular alteran la especificidad de sustrato de la pRET, lo que genera una señal aberrante de transducción. Se ha observado que la activación de estas vías en varios sistemas celulares determina un fenotipo neoplásico.

Muchos trabajos han demostrado la existencia de correlación genotípica-fenotípica en los MEN2-feocromocitomas ¹⁶.

Dado que todavía no se conoce el mecanismo preciso de tumorigénesis, algunos autores han planteado que la mutación en la línea germinal del RET es obligatoria, pero que se necesitaría otro evento genético para determinar formación tumoral "in vivo" ¹⁷. En 2001, Huang y col. ¹⁸ identificaron 2 probables mecanismos de tumorigénesis (segundo evento genético), que determinaban ambos una sobreexpresión del RET:

-duplicación del alelo RET mutado por una trisomía del cromosoma 10 o

-pérdidas en el alelo wild-type que determina un desbalance alélico. Posteriormente, los mismos autores ¹⁹ demostraron un tercer mecanismo, sobreexpresión del RET mutado en una línea celular TT estable (representativa de carcinoma medular de tiroides asociado con MEN 2A), que dependía de una duplicación del alelo RET mutado pero no por triso-

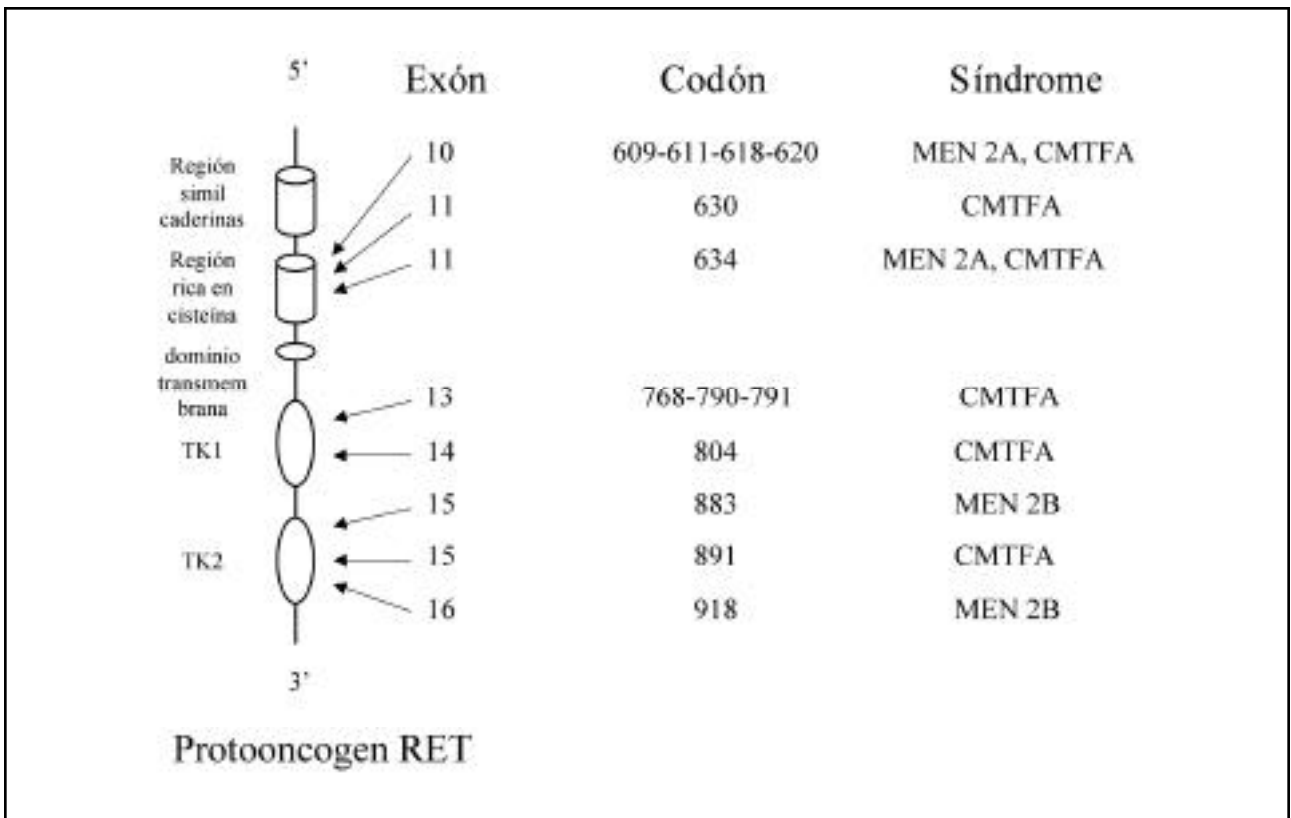


Figura N°1. El protooncogen RET constituido por el dominio extracelular (con las regiones con homología a las caderinas y la rica en cisteína), una región transmembrana simple y dos dominios intracelulares con actividad tirosinquinasa. Las mutaciones más importantes asociadas al MEN 2.

Síndrome	von Hippel Lindau	Neoplasia Endocrina Múltiple		Neurofibromatosis	PARAGANGLIOMAS			
		MEN 2A	MEN 2B	tipo 1	PGL1	PGL2	PGL3	PGL4
Gen	VHL		RET	NF1	SDHD	desconocido	SDHC	SDHB
locus	3p25-26		10q11.2	17q11	11q23	11q13	1q21-23	1p36
Lesiones Asociadas	Hemangioblastomas del SNC, Angiomas Retinianos, CA Renal, Quistes Pancreáticos, Tumores del Saco Endolinfático, Cistoadenoma epididimario.	Ca Medular de tiroides Hiperparatiroidismo.	Neuromas mucosos, Ganglioneuromas intestinales, hábito marfanioide	Manchas café con leche, neurofibromas de nervios periféricos nódulos de Lisch	Tumores del glomus de base de cerebro, cuello y mediastino	Desconocida	Ninguna	Desconocida
Riesgo de feocrom.	10-20%	50%	50%	1%		20%	estimado	
Edad de Aparición	20-30 años		30-40 años	+ de 35 años		20-30 años		20-30 años
Enfermedad adrenal	++		++	+		+		+
Enfermedad Adrenal Multifocal	++		++	+		+		-
Enfermedad Extra-adrenal	--		+	+		++		++

TABLA N°1. Clasificación y características de los síndromes familiares asociados con feocromocitomas y paragangliomas.

mía del cromosoma 10, sino por duplicación en tándem del mencionado alelo.

Sin embargo, la falta de este desbalance alélico en algunos casos y el hallazgo relativamente frecuente (50%) de pérdida de heterocigocidad a nivel del locus VHL llevó a algunos investigadores a evaluar otras alteraciones genéticas. Algunas comunicaciones describen mutaciones somáticas bialélicas del gen VHL en pacientes con MEN2-feocromocitomas (mecanismo epigenético por interacción de dos genes); éstas determinarían que la función de la proteína VHL esté reducida o ausente, lo que causa menor degradación proteica, incluida la de la pRET, con la consiguiente acumulación secundaria. No obstante, se requieren más estudios para clarificar si las alteraciones genéticas del gen VHL en MEN2-feocromocitomas pueden participar en la tumorigénesis o en la

progresión tumoral ²⁰. Por otra parte, se han comunicado pérdidas alélicas en los cromosomas 1, 3 y 22 en feocromocitomas asociados con este síndrome hereditario, cuyo significado se desconoce ²⁰. Tampoco se han descrito mutaciones de GDNF, ni alteraciones del complejo GDNF/GFR en estos tumores ¹⁶.

Enfermedad de Von Hippel Lindau

Es un trastorno autosómico dominante dependiente de mutaciones en el gen VHL. Los pacientes afectados tienen alto riesgo de presentar tumores benignos tanto como malignos: hemangioblastomas del sistema nervioso central y de la retina, cáncer renal de células claras, feocromocitoma, tumores de los islotes pancreáticos y cistoadenomas papilares

de páncreas, epididimo, ligamento ancho y saco endolinfático del oído medio. Su prevalencia es de 1 cada 36.000 individuos, de los cuales alrededor del 20 a 30% desarrolla feocromocitoma ²⁰.

La enfermedad de VHL es clínicamente heterogénea. Se clasifica en: tipo 1, con alto riesgo de manifestaciones de VHL, excepto feocromocitoma; y tipo 2, con feocromocitoma. Este último se subdivide, a su vez, en subtipo 2A con baja probabilidad de carcinoma de células renales; subtipo 2B, con alta probabilidad de este tumor; y subtipo 2C, cuya única manifestación clínica es el feocromocitoma. Este último puede tener antecedentes familiares de feocromocitoma, sin ningún otro estigma de VHL; por ahora, son pocas las familias descritas en este subgrupo. Ver figura N°2.

En el VHL, los tumores cromafines suelen localizarse en la adrenal, y ser multifocales y bilaterales (50%); se han comunicado paragangliomas torácicos

asociados; en cambio, los tumores cervicales son extremadamente raros. La edad de aparición suele ser más temprana que en los otros síndromes familiares asociados a feocromocitoma. El riesgo de malignidad parece ser similar al del MEN 2, pero difiere en su perfil bioquímico, porque secretan predominantemente noradrenalina ²⁰. En todo paciente con diagnóstico de VHL se debe realizar screening para feocromocitoma a partir de los 5 años de edad.

VHL

El gen supresor tumoral VHL, cuyo locus se encuentra en el cromosoma 3 (3p25-26), está mutado en la mayoría de los casos. Es un gen muy pequeño y está constituido por 3 exones. Como todo gen supresor tumoral, presenta una inactivación bialélica del mismo. La pérdida del alelo normal parece ser un

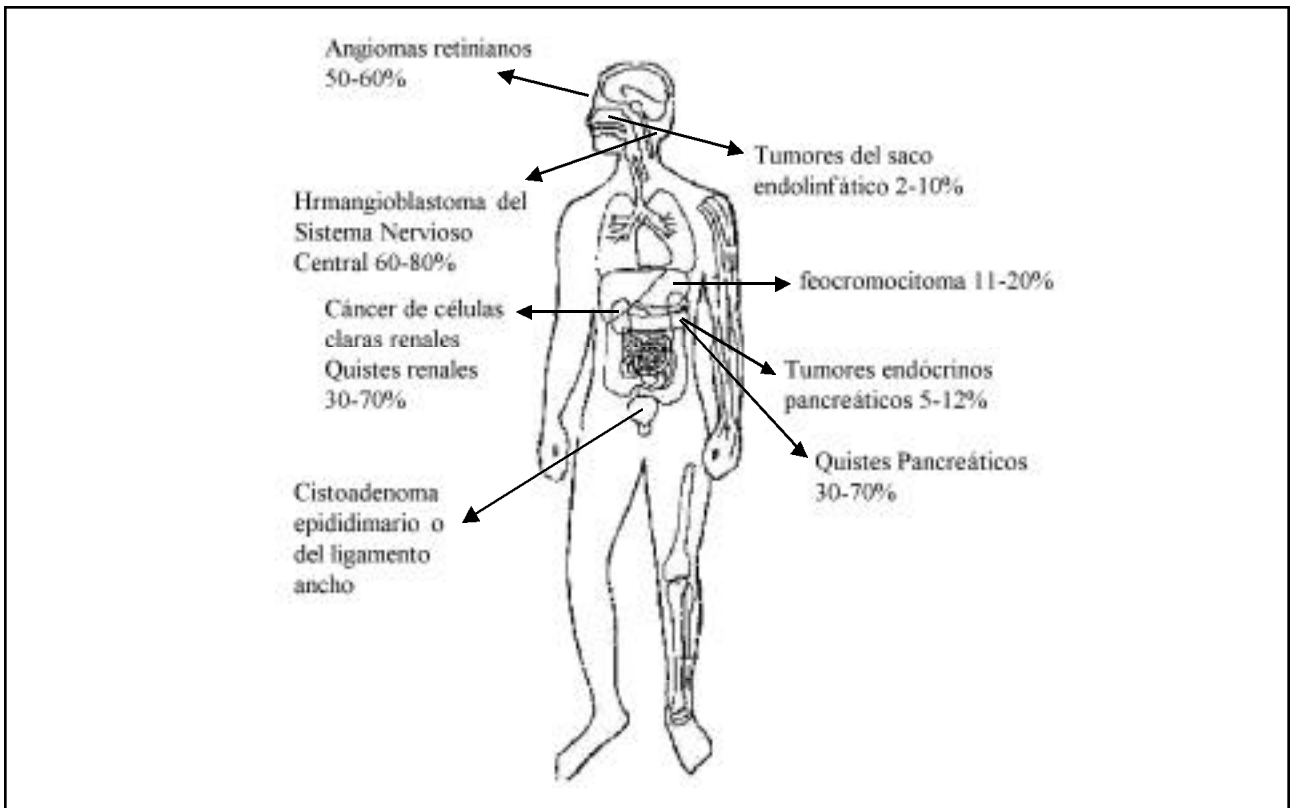


Figura N°2. Frecuencia de las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Von Hippel Lindau.

evento temprano en la tumorigénesis, ya que se detecta en quistes renales antes de las transformaciones malignas. Hay comunicaciones de alelo wild-type silenciado por hipermetilación en algunos tumores asociados con VHL, pero no en feocromocitomas ^{21,22,23,24}.

El gen VHL codifica para la proteína VHL (pVHL). Las mutaciones del gen VHL son: mutaciones con pérdida de sentido, mutaciones sin sentido (nonsense), mutaciones intrónicas, pequeñas y grandes deleciones intragénicas, que generan todas ellas cierto grado de pérdida de la función de pVHL ²⁵.

Hay correlación entre el fenotipo clínico de la enfermedad y las mutaciones halladas ^{26,27}.

La variante 2 se asocia más frecuentemente (>96%) con mutaciones con pérdida de sentido que suelen cursar con pérdida parcial de la función de la proteína VHL; mientras que en la variante 1 se han descrito todas las mencionadas y, por lo general, hay pérdida total de su función. De esta manera, parecería que la desaparición total de la funcionalidad de la proteína es incompatible con el desarrollo de feocromocitoma. Algunas mutaciones con pérdida de sentido (e.g., Tyr98His; Tyr111His) se asocian con bajo riesgo de carcinoma renal (fenotipo 2A), mientras que otras implican un riesgo muy alto (fenotipo 2B). Alrededor del 50% de los casos de feocromocitoma familiar aislado presenta muta-

ciones idénticas a las observadas en el fenotipo 2B, y se asume que estos pacientes presentarán otras manifestaciones clínicas de VHL en el transcurso de su vida. En apariencia, el fenotipo 2C se caracteriza por mutaciones exclusivas ¹⁶. Algunos autores plantean que las mutaciones de este subtipo podrían otorgarle a la proteína mutada características de ganancia de función ²⁰. Ver Tabla N°2.

Se ha comunicado que otros eventos genéticos de feocromocitomas asociados con VHL (VHL-feocromocitoma) son sobreexpresión de algunos polimorfismos en el gen de la Cullina 2 (Cul2) ²⁸; sin embargo, por ahora no se conoce su significado. No se han hallado mutaciones somáticas del RET en VHL-feocromocitoma ²⁹. Se han observado frecuentemente pérdidas en el cromosoma 11, pero todavía no se ha identificado ningún gen ³⁰.

Se han descrito 2 isoformas de pVHL: pVHL30 (de 213 aminoácidos) y pVHL19 (de 160 aminoácidos). Ambas son biológicamente activas y se localizan en el citoplasma ³¹. Esta proteína participa en muchos procesos, como control del ciclo celular, estabilidad del RNA mensajero, ensamble de la matriz extracelular de fibronectina y regulación de los genes inducibles por hipoxia ^{32,33,34}.

“In vivo”, pVHL forma un complejo intracelular, con las subunidades B y C de la Elonguina (factor

	VHL	VHL		
	tipo1	2A	2B	2C
Clínica Feocromocitoma	-	+	+	+
Hemangioblastoma SNC	+	+	+	-
Angiomas Retinianos	+	+	+	-
Cáncer renal	+	-	+	-
Tumores endocrinos Pancreáticos	+	-	+	-
Mutaciones germinales	todas las descriptas	fundamentalmente mutaciones missense		

Tabla N°2. Correlación genotípica fenotípica clínicas de la enfermedad de Von Hippel Lindau.

de transcripción de elongación), y Cullina 2, que regula la elongación de la RNA polimerasa II. El complejo tiene una actividad ubiquitina ligasa (E3) y lleva a la ubiquitinación y proteólisis de sustratos específicos^{35,36}. La pVHL actúa como sustrato receptor de este complejo. Estudios cristalográficos han mostrado que presenta 2 dominios principales: el dominio alfa (del residuo 155 al 192), que se une a la Elonguina C (asiento de gran número de mutaciones), y el dominio beta (del residuo 63 al 154 y del 194 al 213), que forma una superficie para las interacciones proteína-proteína con sustratos específicos³⁷.

Los primeros sustratos reconocidos específica-

mente y ubiquitinados por el complejo son las subunidades alfa de los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF). Estas son extremadamente inestables en presencia de oxígeno.

Cuando hay concentraciones normales de oxígeno, las subunidades alfa del HIF suelen ser indetectables, dado que la hidroxilación de dos prolinas de su dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD), que se localiza entre los aminoácidos 557 y 571, sirve como señal para que la pVHL se les una y, como resultado de este proceso, sean rápidamente ubiquitinadas (marcadas para su destrucción) y degradadas por proteosomas. La hipoxia estabili-

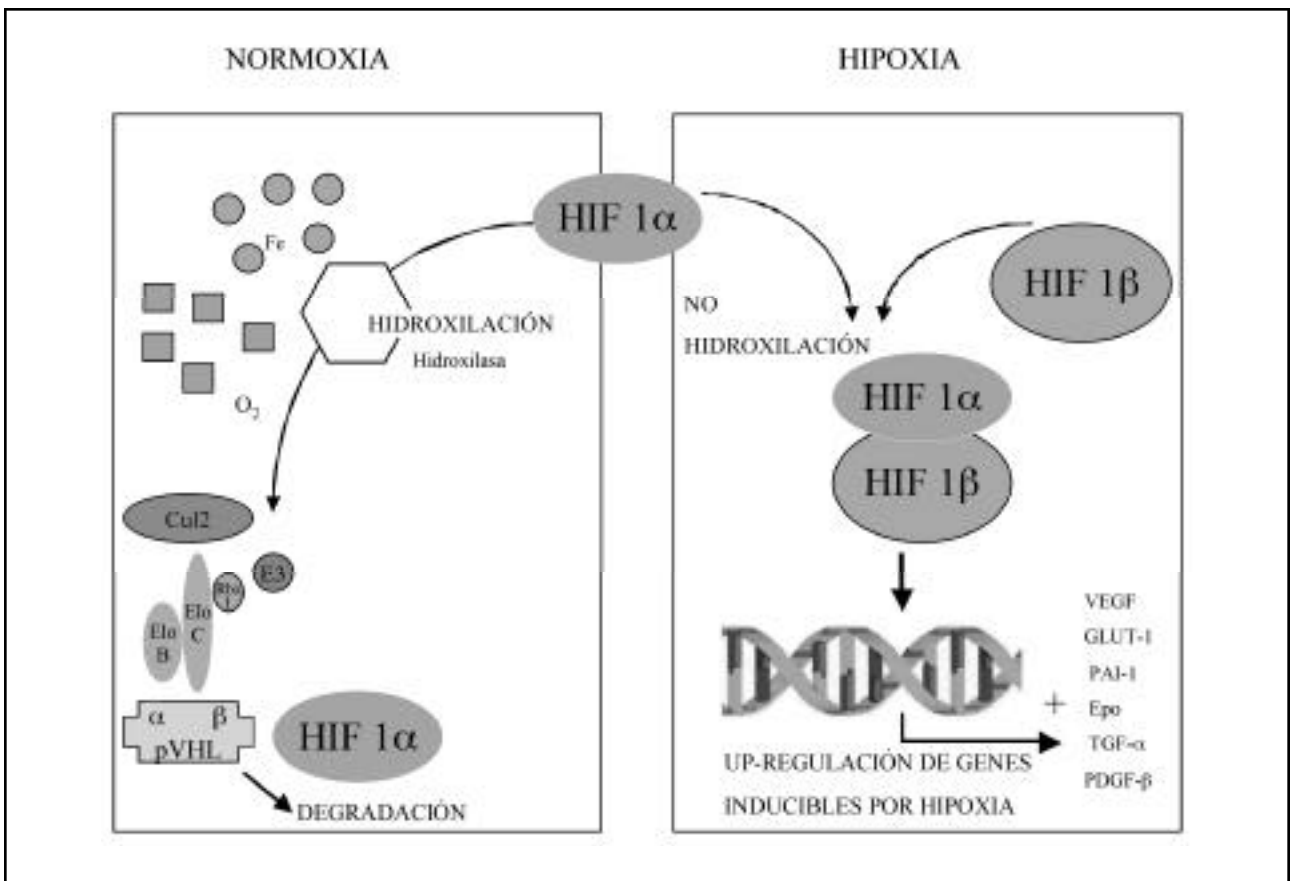


Figura N°3. Sensor de Oxígeno y regulación del Factor hipoxia inducible. Frente a concentraciones normales de oxígeno, las subunidades alfa del HIF suelen ser indetectables, dado que son rápidamente captadas y ubiquitinadas por el complejo pVHL-Cul-Elo y posteriormente degradadas por la proteasa. En condiciones de hipoxia, las subunidades alfa HIF pueden interactuar con las respectivas subunidades beta para formar el heterodímero transcripcionalmente activo HIF y aumentar la expresión de genes inducidos por hipoxia.

[VEGF] factor de crecimiento del endotelio vascular, [GLUT 1] Transportador de glucosa 1, [PAI 1] Inhibidor del activador del plasminógeno 1, [Epo] Eritropoyetina, [TGF] factor transformante de crecimiento alfa y [PDGF] factor de crecimiento derivado de plaquetas-beta.

za e incrementa instantáneamente la vida media de las subunidades alfa, lo que permite detectarlas en el núcleo. En estas condiciones, HIF 1, 2 y 3 pueden interactuar con las respectivas subunidades beta (HIF 1, 2 y 3) para formar el heterodímero transcripcionalmente activo HIF y aumentar la expresión de genes inducidos por hipoxia. Ver figura N°3.

De modo similar, la pérdida de la función de la pVHL también determina estabilización, sobreexpresión y transactivación de HIF y los genes mencionados.

Hay muchos polipéptidos inducidos por hipoxia, e.g., proteínas pro-angiogénicas y factores de crecimiento (como el factor de crecimiento del endotelio vascular [VEGF], la eritropoyetina y el factor de crecimiento tumoral alfa [TGF- β]), factores metabólicos (como el transportador de glucosa 1 y otras enzimas glucolíticas) y polipéptidos relacionados con el remodelado de la matriz extracelular (como las metaloproteasas)^{16,38}. Una hipótesis que debe ser demostrada es que la sobreexpresión de estos factores puede llevar a la formación de tumores renales y hemangioblastomas.

A diferencia de lo descrito en los subtipos 2A y 2B, las mutaciones 2C, generan una proteína que mantiene la capacidad de unirse y ubiquitinar HIF "in vivo" e "in vitro", pero con un ensamblaje defectuoso de la matriz de fibronectina³⁹. Probablemente, esas mutaciones determinan abolición de la interacción entre pVHL y otros sustratos distintos del HIF. La hipótesis sería que la desregulación de estos sustratos puede ser responsable de la aparición de feocromocitomas¹⁶.

Neurofibromatosis tipo 1

Es un trastorno hereditario autosómico dominante, con penetrancia completa, pero con una expresión muy variable. Su prevalencia es de 1 en 3000 a 4000 individuos, aparece generalmente en la infancia, mientras que los feocromocitomas asociados, de los cuales menos del 20% es adrenal bilateral, afectan a menos del 2% de los pacientes con NF1 en la edad adulta. Por lo general, son benignos^{16,20,40}.

Los criterios diagnósticos son: neurofibroma cutáneo o subcutáneo, manchas café con leche en piel de aparición temprana, glioma óptico, hamartoma benigno del iris (nódulos de Lisch)⁴⁰ y lesiones

óseas displásicas específicas. Los pacientes pueden presentar macrocefalia, retardo de crecimiento y trastornos cognitivos.

En pacientes con NF1, los feocromocitomas suelen ser de aparición más tardía que en aquellos con MEN 2 o VHL, de localización adrenal unilateral, aunque también bilateral y menos frecuentemente extraadrenales. La mayoría de las veces secretan noradrenalina y, más raramente, adrenalina. El feocromocitoma no se asocia con neurofibromatosis tipo 2 (NF2), la cual se caracteriza por neuromas acústicos, meningiomas múltiples y schwannomas.

Los pacientes con NF1 tienen alto riesgo de desarrollar tumores malignos de la vaina de los nervios periféricos, leucemia mieloide mielomonocítica juvenil y rhabdomyosarcoma⁴¹.

La enfermedad es causada por mutaciones del gen NF1. Este gen supresor tumoral se localiza en el cromosoma 17q11.2, y está formado por 59 exones. Las mutaciones están distribuidas a lo largo de todo el gen y, a menudo, no hay correlación entre fenotipo y genotipo. Los análisis genéticos demostraron mutaciones sin sentido, con pérdida de sentido y grandes deleciones.

El gen codifica para una proteína llamada neurofibromina, que se localiza en distintos compartimientos, e.g., retículo endoplásmico, mitocondrias y microtúbulos. Esta proteína tiene similitudes con la familia de proteínas activadoras de las GTP_{asa} y ejerce autorregulación negativa (down-regulation) de la actividad Ras. Este gen participa en el control del crecimiento y la diferenciación celular.

El 50% de los ratones heterocigotos, para un alelo mutado NF1, presenta feocromocitoma, lo que indica una participación patogénica de este gen. Aunque el NF1 actúa como gen supresor tumoral y ambos alelos están comprometidos en una variedad de tumores malignos asociados a NF1, la haplo-insuficiencia de NF1 sólo puede ser suficiente para conferir riesgo tumoral⁴².

Tanto en los feocromocitomas asociados a NF1 como en los no asociados, se ha comunicado pérdida de expresión de neurofibromina. Por otra parte, se observó disminución o ausencia de la expresión del gen NF1 en 1 de 4 feocromocitomas esporádicos.

Se requieren más estudios para dilucidar la vía patogénica molecular exacta de desarrollo tumoral en feocromocitomas asociados a NF1^{16,20}.

Si bien se disponen de test genéticos moleculares para mutaciones del NF1, el diagnóstico generalmente se realiza por la clínica ⁴².

Paraganglioma familiar

Es una enfermedad hereditaria autosómica dominante caracterizada por la producción de tumores del sistema paraganglionar. Este fue descrito ya en 1974 por Glenner y Grimley, quienes lo clasificaron

en 4 grupos: branquiomérico, intravagal, aortosimpático y vísceroautonómico (correspondiente a la médula adrenal) ⁴³.

Los paragangliomas simpáticos (últimos dos grupos) suelen secretar catecolaminas y son denominados por muchos autores feocromocitomas adrenales y extraadrenales. Los ganglios correspondientes a los dos primeros grupos a menudo son de origen parasimpático y, por lo general, se localizan en cabeza y cuello (desde la base del cuello hasta el cayado aórtico), por lo que reciben el nombre de para-

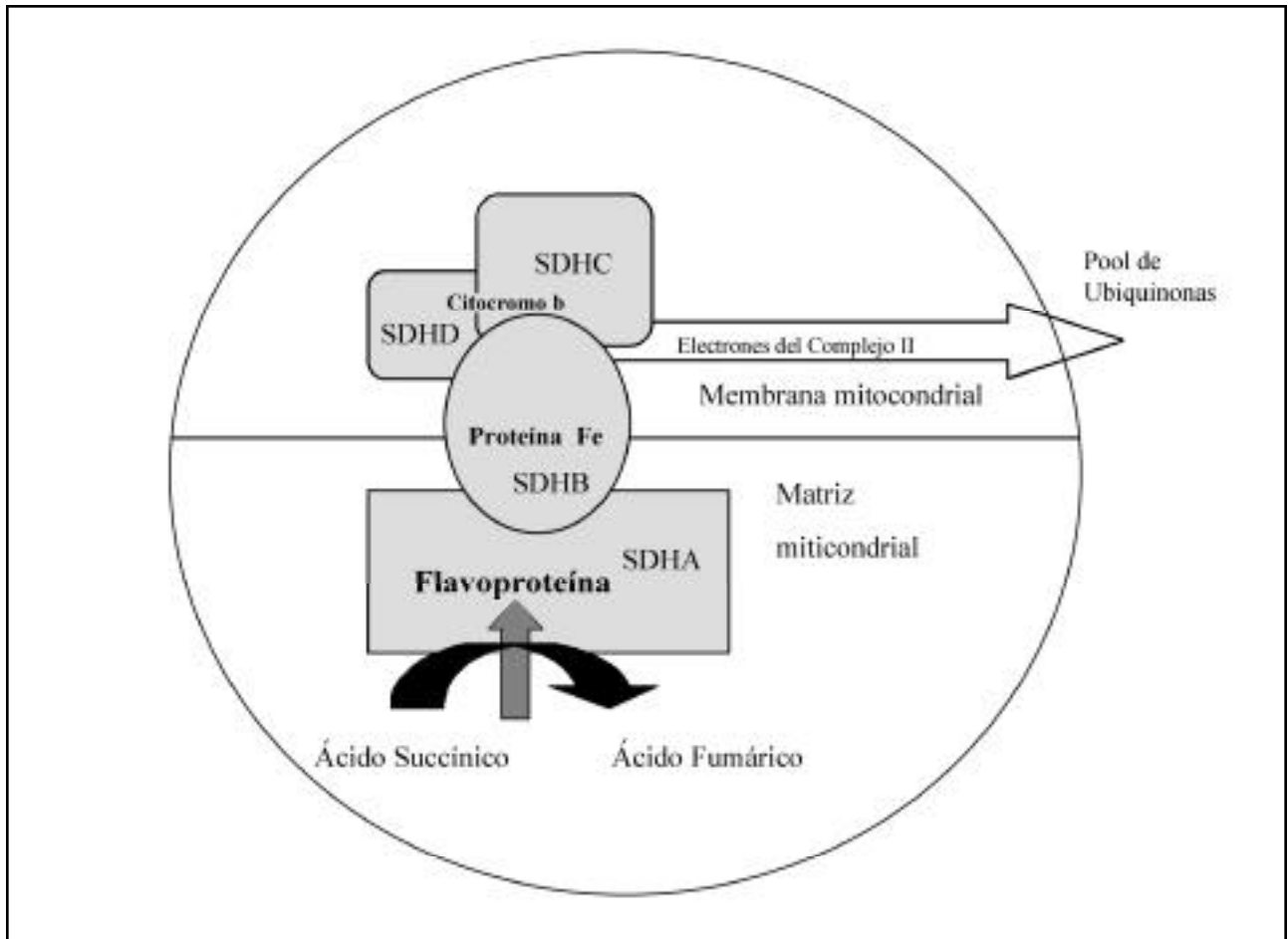


Figura N°4. Estructura de la Succinato Deshidrogenasa. Está compuesta por 4 subunidades: A (flavoproteína hidrofílica), **SDHA** y B (proteína hierro sulfurada), **SDHB** constituyen la enzima SDH del ciclo de Krebs; las dos subunidades hidrofóbicas C, **SDHC** y D, **SDHD** median el anclaje de las subunidades catalíticas (A y B) a la membrana mitocondrial interna. La deshidrogenasa oxida el ácido succínico a ácido fumárico y transporta los electrones reducidos a la ubiquinona (Coenzima Q) y, eventualmente, a la membrana mitocondrial externa a través de la cadena de transporte de electrones.

gangliomas no funcionales de cabeza y cuello, quemodectomas o tumores del glomus. El representante más conocido de éstos es el tumor del cuerpo carotídeo (localizado en el cuello a la altura de la bifurcación de la carótida cervical), que no secreta catecolaminas sino que sirve como órgano sensor de la hipoxia, y se agranda en situaciones de hipoxia crónica¹⁹.

Esta observación llevó a plantear la hipótesis de que, en estos trastornos, el defecto genético se relacionaba con la vía de señalización del oxígeno; recién en el año 2000, las investigaciones identificaron la alteración en los genes de las distintas subunidades de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH)⁴⁴. Esta, también denominada complejo mitocondrial II, pertenece a la cadena aeróbica de transporte de electrones y al ciclo del ácido tricarbóxico de Krebs. Está compuesta por 4 subunidades: A (flavoproteína hidrofílica) y B (proteína hierro sulfurada) constituyen la enzima SDH del ciclo de Krebs; las dos subunidades hidrofóbicas C y D median el anclaje de las subunidades catalíticas (A y B) a la membrana mitocondrial interna. Ver gráfico N°4. La deshidrogenasa oxida el ácido succínico a ácido fumárico y transporta los electrones reducidos a la ubiquinona (Coenzima Q) y, eventualmente, a la membrana mitocondrial externa a través de la cadena de transporte de electrones.

Análisis genéticos han demostrado la existencia de mutaciones genéticas en 4 loci que predisponen a paragangliomas y/o feocromocitomas: PGL1, PGL2, PGL3 y PGL4. Sus localizaciones cromosómicas son: 11q23, 11q13, 1q21-23 y 1p36, respectivamente; todos son genes supresores tumorales.

En familias con PGL1, los paragangliomas de cabeza y cuello aparecen en forma aislada o asociados, en un 5% de los casos, con feocromocitoma; la enfermedad se expresa sólo si la mutación es transmitida por el padre, lo que refuerza la posibilidad de una impronta del gen materno. El gen PGL1 está formado por 4 exones y corresponde a la subunidad D (SDHD); las mutaciones más frecuentes son las sin sentido y con pérdida de sentido^{44,45,46}.

El gen PGL2 se relaciona con paragangliomas cuya susceptibilidad genética no fue identificada.

El gen PGL3 corresponde a la subunidad C de la SDH (SDHC), está formado por 6 exones y el análisis de las mutaciones sólo ha revelado una transición de guanina a alanina en el exón 1 en una familia con paragangliomas. Los pocos casos comuni-

cados hasta la fecha no esclarecen si el feocromocitoma forma parte de este síndrome.

El gen PGL4 corresponde al de la subunidad B de la SDH (SDHB) y está compuesto por 8 exones. Los análisis mutacionales muestran mutaciones inactivadoras en feocromocitomas heredados, paragangliomas y síndromes con paragangliomas asociados a feocromocitomas^{47,48}.

Las mutaciones de la subunidad A de la SDH no se asocian con paragangliomas familiares (sí con atrofia óptica, ataxia y miopatía)¹⁶.

Si bien todavía se está elaborando el protocolo de seguimiento para aquellos pacientes con mutaciones de SDHD y SDHB, es probable que incluya screening de catecolaminas.

Aún no se sabe cómo una mutación con pérdida de función de las subunidades de la SDH induce formación tumoral, aunque plantearemos algunas de las teorías existentes que buscan justificar esta situación, pero que requieren más estudios para confirmarlas.

La mitocondria actúa mediante el complejo II de la cadena respiratoria como sensor de oxígeno y genera durante la hipoxia los radicales libres que provocan acumulación y estabilización de la proteína HIF 1 requerida para la actividad de HIF, con el consiguiente incremento de transcripción de VEGF y otros polipéptidos inducidos por la hipoxia⁴⁹. Sobre esta base, se estudió una familia con PGL1, cuyos feocromocitomas mostraron mutaciones en un alelo del gen de la SDHD y pérdidas del alelo wild-type, lo que determinaba ausencia completa de actividad de transferencia de electrones del complejo II y aumento de los niveles de HIF1, HIF2, VEGF y su receptor en el tumor. Esta actividad era normal en los casos de feocromocitomas esporádicos⁵⁰. Este probable mecanismo tumorigénico es denominado por algunos autores como "pseudohipoxia"⁵¹.

Otra explicación posible para la asociación entre mutaciones de la enzima y aparición de neoplasia, estaría relacionada con el efecto de la mitocondria en la apoptosis. Se ha planteado que los cambios en la tasa de producción de electrones pueden determinar variaciones del potencial transmembrana de la mitocondria, que a su vez modifica su síntesis de ATP y el potencial apoptótico^{5,52}. Un tercer mecanismo de tumorigénesis y disfunción del ciclo de Krebs es el incremento del estrés oxidativo y daño del DNA, que generalmente se asocia con muerte

celular. Por último, un "impulso anabólico" generalizado sería responsable de la exagerada producción de metabolitos de la glucólisis que sirve de base para la generación de ATP requerida por algunos tumores malignos ⁵¹.

Es interesante mencionar que menos del 10% de los feocromocitomas esporádicos puede presentar mutaciones somáticas de SDHD, situación similar a la observada para los genes RET y VHL (<5%).

Estudios de hibridación comparativa y análisis de microsatélites indican que las pérdidas alélicas en 1p, 3p, 3q, 17p y 22p son hallazgos comunes a feocromocitomas familiares y no familiares. Muchas de estas pérdidas alélicas no están claramente involucradas en la tumorigénesis en estas patologías. Durante la progresión tumoral, se pueden acumular mutaciones y deleciones de muchos genes ^{5,20}.

Neumann y col. ⁵³ estudiaron a 271 pacientes con feocromocitomas aislados (241), paragangliomas aislados (22), y feocromocitomas y paragangliomas asociados (8), aparentemente esporádicos, después de excluir a aquellos con síndrome genético conocido o con antecedentes familiares. Se evaluaron por análisis de polimorfismo conformacional de banda simple y secuenciamiento directo los 8 exones del gen SDHD, los 4 del SDHB, los 3 del VHL y los exones 10, 11, 13 y 16 del RET. Sesenta y seis pacientes (24%) mostraron mutaciones germinales: 30 en VHL, 13 en RET, 11 en SDHD y 12 en SDHB.

Los resultados de éste y otros estudios poblacionales sugieren que después de detectar feocromocitomas y/o paragangliomas en pacientes menores de 50 años, independientemente de la historia familiar, las manifestaciones sindrómicas o la edad de diagnóstico, se deben realizar estudios genéticos moleculares para evaluar mutaciones germinales de los 4 genes descritos: RET, VHL, SDHD y SDHB, comenzando por el VHL según las frecuencias comunicadas, mientras que si se trata de enfermedad extraadrenal se debe comenzar por análisis mutacionales de SDHD. NF1 tiene muy baja prevalencia.

Conclusión

Los feocromocitomas y los paragangliomas pueden ser esporádicos o una manifestación de un síndrome familiar.

En los últimos años, la biología molecular ha brindado una serie de herramientas, que han posibilitado un diagnóstico adecuado, en virtud de la re-clasificación de un grupo de pacientes con tumores aparentemente esporádicos por la presencia de mutaciones germinales en los genes susceptibles de desarrollar patología. La susceptibilidad genética ha permitido clasificar varios síndromes hereditarios diferentes: Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2, enfermedad de Von Hippel Lindau, Neurofibromatosis tipo 1 y varios tipos de Paragangliomas.

Entre los componentes de estos síndromes aparecen algunos tumores malignos u otros de difícil tratamiento, e.g., hemangioblastomas, carcinoma de células renales, carcinoma medular de tiroides, o tumor del cuerpo carotideo. En consecuencia, la detección precoz de los familiares portadores de genes mutados permite someterlos a tratamientos específicos aunque no presente evidencias clínicas ni bioquímicas de enfermedad, lo que modifica su pronóstico. Por ejemplo, en nuestro país la Dra. Sanso y col. ⁵⁴ comunicaron en 2002 que estudios moleculares del protooncogen RET detectó un 88% de portadores de mutaciones en menores de 21 años, pero sólo en el 13% de los adultos, sin otra evidencia de enfermedad tiroidea. Estos pacientes fueron sometidos a tiroidectomía lo más precozmente posible, a excepción de los que presentaban feocromocitoma cuya cirugía siempre debe preceder a la de tiroides.

Los estudios genéticos para investigar mutaciones del gen RET o VHL son altamente sensibles (95 y 98% respectivamente); en cambio, para otros genes, todavía se conoce poco la sensibilidad. Después de detectar feocromocitomas y/o paragangliomas en pacientes menores de 50 años, se debe iniciar el estudio genético por el gen VHL teniendo en cuenta las frecuencias comunicadas, aunque en caso de localizaciones extraadrenales corresponde comenzar por análisis mutacionales de gen SDHD.

Si bien en las últimas décadas se produjeron marcados avances científicos, aún no se ha esclarecido definitivamente la función específica de estos genes, ni cómo sus mutaciones pueden inducir tumorigénesis. Se necesitarán nuevas investigaciones para responder estos interrogantes fundamentales. En consecuencia, el mejor conocimiento del feocromocitoma heredado, permitirá ayudar a comprender el mecanismo fisiopatológico de los cuadros esporádicos.

Bibliografía

1. Bravo, E. and Tagle, R. Pheochromocytoma: State-of-the-Art and Future Prospects. *Endocrine Reviews* 24: 539-553, 2003.
2. Marston Linehan, W.; Eisenhofer, G.; McClellan y col. Recent advances in genetics, diagnosis, localization, and treatment of pheochromocytoma. *Ann Intern Med* 134: 315-329, 2001.
3. Whalen, R.K.; Alhausen, A.F.; Daniels, G.H. Extra-adrenal pheochromocytoma. *J Urol* 147: 1-10, 1992.
4. Baysal, B.E. Hereditary paragangliomas targets diverse paraganglia. *J Med Genet* 39: 617-622, 2002.
5. Maher, E.A. and Eng, C. The pressure rises: update on the genetics of phaeochromocytoma. *Hum Mol Genet* 11: 2347-2354, 2002.
6. Neumann, H.P.; Bausch, B. B.; McWhinney, S. R. y col. Germ-line mutation in nonsyndromic pheochromocytoma. *N Engl J Med* 346: 1459-1466, 2002.
7. Pacak, K.; Linehan, M.; Eisenhofer, G. y col. NHI Conference: Recent Advances in Genetics, Diagnosis, Localization and Treatment of Pheochromocytoma. *Ann Intern Med* 134: 315-329, 2001.
8. Koch, C.A.; Pacak, K.; Chrousos, G.P. The Molecular Pathogenesis of Hereditary and Sporadic Adrenocortical and Adrenomedullary Tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5367-5384, 2002.
9. Eng, C. RET proto-oncogene in the development of human cancer. *J Clin Oncol* 17: 380-393, 1999.
10. Eng, C. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The RET protooncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 and Hirschsprung's disease. *N Engl J Med* 335:943-951, 1996.
11. Vorst, M.J.; VanCamp, J.M.; Peacock, M.L y col. Mutacional analysis of multiple endocrine neoplasia type 2A associated with Hirschsprung's disease. *Surgery* 117: 386-391, 1995.
12. Gimm, O. Multiple endocrine neoplasia type 2: Clinical aspects. *Front Horm Res* 28: 103-130, 2001.
13. Mulligan, L.M.; Kwok, J.B.; Healey, C.S.y col. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 363: 458-460, 1993.
14. Takahashi, M.; Buma, Y.; Iwamoto, T. y col. Cloning and expression of the ret proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. *Oncogene* 3: 571-578, 1988.
15. Pandey, A.; Duan, H.; Di Fiore, P.P. y col. The Ret receptor protein tyrosine kinase associates with the SH2-containing adapter protein Grb10. *J Biol Chem* 270: 21461-21463, 1995.
16. Gimm, C.; Koch, C.A.; Januszewicz, A. The genetic basis of pheochromocytoma. *Front Horm Res* :31 45-60, 2004.
17. Koch, C.A.; Vortemeyer, A.O.; Zhuang, Z. y col. New insights into the Genetics of Familial Chromaffin Cell Tumors. *Ann N Y Acad Sci* 970:11-28, 2002.
18. Huang, S.C.; Koch, C.A.; Vortemeyer, A.O. y col. Duplication of the mutant RET allele in trisomy 10 or loss of the wild-type allele in multiple endocrine neoplasia type 2.associated pheochromocytoma. *Cancer Res* 60:6223-6225, 2000.
19. Huang, S.C.; Torres-Cruz, J.; Pack, S.D. Amplification and Overexpression of mutant RET in Multiple Endocrine Neoplasia Type 2-Associated Medullary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 459-463, 2003.
20. Neumann, H. P.; Hoegerle, S.; Manz, T. y col. How many pathways to pheochromocytoma?. *Semin Nephrol* 22: 89-99, 2002.
21. Latif, F.; Tor y, K.; Gnarr, J. y col. Identification of von Hippel Lindau disease suppressor gene. *Science* 260:1317-1320, 1993.
22. Kaelin, W. and Maher, E. R. The VHL tumor suppressor gene paradigm. *Trends Genet* 14: 423-426, 1998.
23. Vortmeyer, A.; Gnarr, J.; Emmert-Buck, M. y col. Von Hippel-Lindau Gene Deletion Detected in the Stromal Cell Component of a Cerebellar Hemangioblastoma Associated With von Hippel-Lindau Disease. *Hum Pathol* 28: 540-543, 1997.}
24. Herman, J.G.; Latif, F.; Weng, Y. y col. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 91: 9700-9704, 1994.
25. Neumann, H.; Bender, B. Genotype-phenotype

- correlations in von Hippel-Lindau disease. *J Intern Med* 243: 541-545, 1998.
26. Maher, E.R.; Webster, A.R.; Richards, F.M. y col. Phenotypic expression in von Hippel Lindau disease: correlations with germline VHL mutations. *J Med Genet* 81: 328-332, 1996.
 27. Crossey, P.A.; Richards, F.M.; Foster, K. y col. Identification of intragenic mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene and correlation with disease phenotype. *Hum Mol Gen* 3: 1303-1308, 1994.
 28. Duerr, E.M.; Gimm, O.; Neuberg, D.S. y col. Differences in allelic distribution of two polymorphisms in the VHL-associated gene *CUL2* in pheochromocytoma patients without somatic *CUL2* mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 3207-3211, 1999.
 29. Eng, C.; Crossey, P.A.; Mulligan, L.M. y col. Mutations in the *RET* proto-oncogene and the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene in sporadic and syndromic pheochromocytomas. *J Med Genet* 32: 934-937, 1995.
 30. Lui, W. O.; Chen, J.; Glasker, S. Selective loss of chromosome 11 in pheochromocytoma associated with the VHL syndrome. *Oncogene* 21: 1117-1122, 2002.
 31. Iliopoulos, O.; Ohh, M.; Kaelin, W. pVHL19 is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 11661-11666, 1998.
 32. Ohh, M.; Yauch, R. L.; Lonergan, K.M. y col. The von Hippel Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol Cell* 1:959-968, 1998.
 33. Pause, A.; Lee, S.; Lonagan, K.M. y col. The von Hippel Lindau tumor suppressor is required for cell cycle exit upon serum withdrawal. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 95: 993-995, 1998.
 34. Ruiz-Llorente, S.; Bravo, J.; Cebrián, A. y col. Genetic characterization and structural analysis of VHL Spanish families to define genotype-phenotype correlations. *Human Mutat* 23: 160-169, 2003.
 35. Lonergan, K.M.; Iliopoulos, O.; Ohh, M. y col. Regulation of Hypoxia-Inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau Protein Requires Binding to Complexes containing Elongins B/C and Cul2. *Mol Cell Biol* 18: 732-741, 1998.
 36. Kamura, T.; Koepp, D.M.; Conrad, M.N. Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* 284:657-661, 1999.
 37. Stebbins, C.E.; Kaelin, W.G.; Pavletich, N.P. Structure of the VHL-Elongin C-Elongin B complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science* 284: 455-461, 1999.
 38. George, D.J.; Kaelin, W.G. The von Hippel Lindau, vascular endothelial growth factor, and kidney cancer. *N Engl J Med* 349: 419-423. 2003.
 39. Hoffman, M.A.; Ohh, M.; Yang, H. y col. Von Hippel-Lindau protein mutants linked to type 2C VHL disease preserve the ability to down regulate HIF. *Hum Mol Genet* 10: 1019-1027, 2001.
 40. Riccardi, V.M. von Recklinghausen neurofibromatosis. *N Engl J Med* 305:1617-27 1981.
 41. Gutmann, D.H.; Aylsworth, A.; Carey, J.C. y col. The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA* 278: 51-57, 1997.
 42. Bryant, J.; Farmer, J.; Kessler, L. y col. Pheochromocytoma: The Expanding Genetic Differential Diagnosis. *J Natl Cancer Inst* 95: 1196-1204, 2003.
 43. Glenner, G.G. and Grimley, P.M. Tumors of the extra-adrenal paraganglion system (including chemo receptors). In: *Atlas of Tumor Pathology*. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, fasc. 9, p.1, 1974.
 44. Baysal, B.E.; Ferrell, R.E.; Willett-Brozick, J.E. y col. Mutations in *SDHD*, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* 287: 848-851, 2000.
 45. Aguiar, R.C.; Cox, G.; Pomeroy, S.L. y col. Analysis of the *SDHD* gene, the susceptibility gene for familial paragangliomas syndrome (PGL1), in pheochromocytomas. *J. Clin Endocrinol Metab* 86: 2890-2894, 2001.
 46. Astuti, D.; Douglas, F.; Lennard, T.W. y col. Germline *SDHD* mutation in familial pheochromocytoma. *Lancet* 357: 1181-1182, 2001.
 47. Astuti, D.; Latif, F.; Dallol, A. y col. Mutations in the Mitochondrial Complex II Subunit *SDHB* Cause Susceptibility to Familial Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Am J Hum Genet* 69: 49-54, 2001.

48. Giménez-Roqueplo, A.P.; Favier, J.; Rustin, P. y col. Functional consequences of a SDHB gene mutation in an apparently sporadic pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4771-4774, 2002.
49. Chandel, N.S.; Maltepe, E.; Goldwasser, E. y col. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *PNAS* 95: 11715-11720, 1998.
50. Giménez-Roqueplo, A.P.; Favier, J.; Rustin, P. y col. The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paragangliomas abolishes enzymatic activity of the complex II mitochondrial respiratory chain and activates the hipoxia pathway. *Am J Hum Genet* 69: 1186-97, 2001.
51. Pollard, P.; Wortham, N. and Tomlinson, I. The TCA cycle and tumorogénesis: the examples of fumarate hydratase and succinato dehidrogenase. *Ann Med* 35: 1-8, 2003.
52. Green, D.R. and Reed, J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312, 1998.
53. Neumann, H.; Bausch, B.; McWhinney, S. y col. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *N Engl J Med* 346: 1459-1466, 2002.
54. Sanso, E.S.; Domene, H.M.; García Rudaz, M.C. y col. Detection of RET proto-Oncogene Mutations Is Crucial for Preventive Thyroidectomy in Multiple Endocrine Neoplasia Type 2A Children. *Cancer* 94: 323-330, 2002.