



## ORIGINAL

# Estudio genético del complejo enzimático succinato deshidrogenasa en los paragangliomas carotídeos. Implicaciones diagnósticas

F.S. Lozano Sánchez<sup>a,\*</sup>, M. Núñez Lozano<sup>b</sup>, P. Santos Gorjón<sup>c</sup>,  
A. Masegosa Medina<sup>d</sup>, Á. Muñoz Herrera<sup>c</sup> y R. González Sarmiento<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Angiología y Cirugía Vascular, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España

<sup>b</sup>Unidad de Medicina Molecular, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

<sup>c</sup>Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España

<sup>d</sup>Servicio de Angiología y Cirugía Vascular, Hospital Universitario de Albacete, Albacete, España

Recibido el 31 de agosto de 2010; aceptado el 30 de noviembre de 2010

### PALABRAS CLAVE

Paragangliomas carotídeos;  
Paragangliomas familiares;  
Paragangliomas múltiples;  
Paragangliomas malignos;  
Mutaciones genéticas;  
Complejo succinato deshidrogenasa

### Resumen

**Introducción:** Los paragangliomas (PG) en general y los carotídeos (PGC) en particular son tumores infrecuentes, generalmente únicos y de evolución benigna, que presentan controversias en su comportamiento biológico e historia natural.

**Objetivo:** Correlacionar la presencia de mutaciones de los genes del complejo enzimático succinato deshidrogenasa (SDH) con la aparición de presentaciones atípicas de PG (bilaterales, multicéntricos y malignos).

**Pacientes y método:** Estudio genético en 20 pacientes, 18 con PGC esporádico y 2 con PGC familiar; 2 pacientes presentaban localizaciones múltiples y 3 fueron de evolución maligna. Después de consentimiento informado específico, se obtuvo sangre periférica de los pacientes para realizar un estudio genómico según protocolo estándar.

**Resultados:** Se detectaron mutaciones en 6 pacientes (30% de la serie), repartiéndose de forma homogénea (2 por subunidad B, C o D). Las mutaciones fueron del 100% en las formas familiares (2/2) y del 22,2% en las esporádicas (4/18). Los 2 pacientes con PG múltiples presentaron mutaciones (SDHB y SDHC). En 2 de 3 pacientes con PG de evolución maligna se presentaron mutaciones en SDHB. En los casos familiares se estudió a 3 hijos de los pacientes, resultando positivo (SDHB) un caso. Finalmente, 3 de las 6 mutaciones descritas por nosotros no han sido referidas previamente en la literatura consultada (SDHB c.472 del A, SDHC c.A377G y SDHC c.A21G).

**Conclusiones:** La mutación de las subunidades de SDH es responsable de la tendencia a padecer un PG tanto en las formas familiares como en las esporádicas, teniendo una importante relevancia en la presencia de formas múltiples y el pronóstico evolutivo de estos tumores.

© 2010 SEACV. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

\*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: lozano@usal.es (F.S. Lozano Sánchez).

**KEYWORDS**

Carotid paragangliomas; Familial paragangliomas; Multiple paragangliomas; Malignant paragangliomas; Gene mutations; Succinate dehydrogenase complex

## Genetic study of the succinate dehydrogenase enzyme complex in carotid paragangliomas: diagnostic implications

**Abstract**

*Introduction:* Carotid paragangliomas (CPGs) are uncommon tumours which tend to be isolated and benign. However, there are controversies over their biological behaviour and natural history.

*Aim:* To correlate the presence of mutations of succinate dehydrogenase (SDH) complex genes with the appearance of atypical CPGs (bilateral, multicentral and malignant).

*Patients and methods:* We carried out mutation analyses in 18 patients with sporadic CPGs and 2 patients with familial CPGs. Two patients had multiple locations and three had a malignant outcome. After obtaining informed consent, peripheral blood was obtained to perform a genomic study according to a standard protocol.

*Results:* We identified SHD mutations in six patients (30%, 100% in familial CPGs (2/2) and 22.2% in sporadic CPGs (4/18). Both patients with multiple CPGs showed mutations in SDH (SDH subunit B and SDH subunit C). Two of three patients with CPGs and malignant outcome showed mutation in the SDH subunit B gene. In familial CPGs, we studied three children and we found a positive case (SDHB). Finally, we identified three novel SHD mutations (SDHB c.472 del A, SDHC c.A377G; and SDHC c.A21G).

*Conclusion:* SDH mutations are responsible for the trend to suffer CPGs in both familial and sporadic forms and may play an important role in multiple CPGs and malignant PGs.

© 2010 SEACV. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

**Introducción**

Los paragangliomas (PG) son tumores poco frecuentes, distribuidos desde la base del cráneo hasta el suelo pélvico, afectando con algo más de frecuencia a la región cervicocéfálica. Por orden de frecuencia, asientan en el cuerpo carotídeo (60-70%), el bulbo yugular, el nervio vago, etc.<sup>1</sup>.

Los tumores que asientan sobre el cuerpo carotídeo se denominan actualmente paragangliomas carotídeos (PGC) y sus características habituales son: baja incidencia, únicos, muy vascularizados, no funcionantes, delimitados pero no encapsulados y benignos. Afortunadamente sólo en muy pocas ocasiones invaden la pared de las arterias carótidas<sup>2</sup>.

Entre las controversias de los PG en general y los PGC en particular está su comportamiento biológico e historia natural. En este sentido, también existen presentaciones atípicas: bilaterales (5-10%) y multicéntricas tanto sincrónicas

(2%) como metacrónicas a la localización carotídea, e incluso situaciones de evolución maligna (10%)<sup>3</sup>. Todas esas posibilidades modifican el planteamiento diagnóstico y complican el tratamiento de los PG.

Estudios llevados a cabo en los últimos años sobre los patrones de herencia y las características clínicas de los feocromocitomas y el resto de PG han puesto de manifiesto que pueden aparecer bien en síndromes hereditarios caracterizados por la presencia de otros tumores, como son la neoplasia endocrina múltiple tipo 1 (MEN 1), la neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (MEN 2), la enfermedad de Von Hippel Lindau (VHL) y la neurofibromatosis tipo 1 (NF1), bien en síndromes en los que la manifestación principal es el PG, como son los síndromes PGL1, PGL2, PGL3 y PGL4 (tabla 1). De los cuatro síndromes de PG, tres, PGL1, PGL3 y PGL4, muestran una asociación muy fuerte con mutaciones germinales en los genes de las subunidades del complejo enzimático succinato deshidrogenasa (SDH)<sup>4</sup>.

**Tabla 1** Genes implicados en el desarrollo de paragangliomas y feocromocitomas

| Síndrome            | Gen   | Localización | Proteína           |
|---------------------|-------|--------------|--------------------|
| MEN 1               | MEN 1 | 11q13        | Menin              |
| MEN 2               | RET   | 10q11        | Ret                |
| Von Hippel Lindau   | VHL   | 3p26         | VHL                |
| Neurofibromatosis 1 | NF1   | 17q11        | Neurofibromina     |
| PGL1                | SDHD  | 11q23        | Subunidad D de SDH |
| PGL2                | ?     | 11q13        | ?                  |
| PGL3                | SDHC  | 1q21         | Subunidad C de SDH |
| PGL4                | SDHB  | 1p36         | Subunidad B de SDH |

MEN: neoplasia endocrina múltiple; SDH: succinato deshidrogenasa.

**Tabla 2** Datos moleculares y clínicos de los pacientes con mutaciones

| Gen  | Exón | Secuencia ADN | Secuencia proteína | Diagnóstico (localización) | Historia familiar | Evolución del tumor |
|------|------|---------------|--------------------|----------------------------|-------------------|---------------------|
| SDHB | 5    | c.472 del A   | STOP codon         | 1 PG = C                   | No                | Maligno             |
| SDHB | 6    | c.T574C       | p.C192R            | 2 PG = C + V               | Si*               | Maligno             |
| SDHC | 5    | c.A377G       | p.Y126C            | 1 PG = C                   | No                | —                   |
| SDHC | 1    | c.A21G        | No                 | 3 PG = 2 C + Y             | Si                | —                   |
| SDHD | 3    | c.C204T       | No                 | 1 PG = C                   | No                | —                   |
| SDHD | 3    | c.C204T       | No                 | 1 PG = C                   | No                | —                   |

\*Paciente que tiene uno de sus hijos afectado por la misma mutación.  
C: carótida; PG: paraganglioma; V: vago; Y: yugular.

El objetivo del presente trabajo es investigar la relación entre la presencia de estas mutaciones (SDH) y la existencia o aparición de presentaciones atípicas de PG, sobre todo en los que se refieren a las formas bilaterales, multicéntricas (sincrónicas y/o metacrónicas) y de evolución maligna.

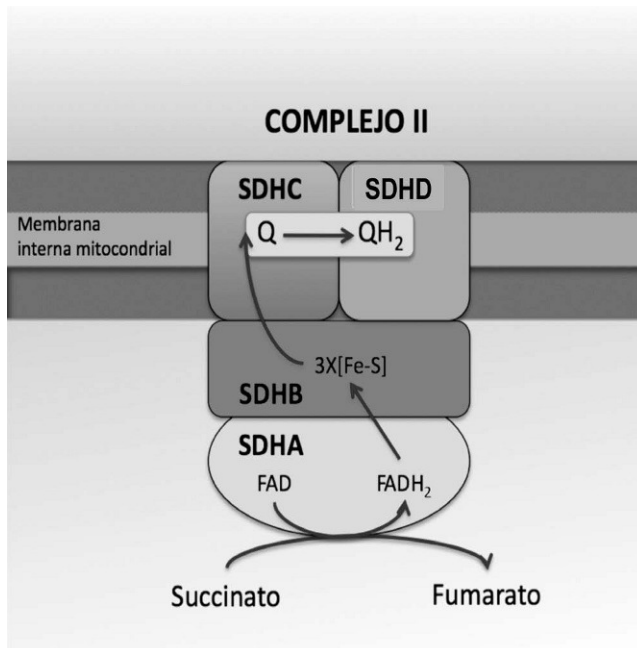
## Material y métodos

Se realiza un análisis genético en 20 pacientes diagnosticados de un PGC en el Hospital Universitario de Salamanca (13 casos) y el Hospital Universitario de Albacete (7 casos). Excepto 2 casos, el resto no tenía historia familiar y por tanto fueron considerados como formas esporádicas de PG.

Presentaron un PGC unilateral o único 18 pacientes, y los 2 pacientes restantes mostraron PG múltiples: un caso con 2 localizaciones (carótida y vago) y otro con 3 (carótideo bilateral y yugulotimpánico). En 2 pacientes se registró una evolución maligna del PG.

Previo al inicio de la investigación genética se obtuvo un consentimiento informado específico para dicho estudio. Conjuntamente, en los 2 casos familiares, se realizó estudio genético a 3 de los hijos de los pacientes.

Se obtuvo sangre periférica (10 ml) para estudiar el genoma ADN en búsqueda de mutaciones en los genes SDHB, SDHC y SDHD. Se realizó una amplificación de 8 (SDHB), 6 (SDHC) y 4 exones (SDHD) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El producto del PCR se amplificó mediante análisis con electroforesis en gel sensible a conformación (CSGE) y finalmente se procedió a una secuenciación (migración anormal de las bandas del ADN).



**Figura 1** Estructura del complejo succinato deshidrogenasa (SDH), donde se aprecia la disposición de sus cuatro subunidades. A y B forman parte del núcleo catalítico y se colocan hacia la parte exterior de la membrana mitocondrial interna (estroma). C y D son las subunidades de anclaje del complejo a dicha membrana. Conjuntamente, en la figura se aprecia la reacción catalizada por el complejo SDH en el ciclo de Krebs.

## Resultados

Se detectaron mutaciones en 6 pacientes (30% de la serie), repartiéndose de forma homogénea (2 por subunidad SDHB, SDHC o SDHD). Las mutaciones existieron en el 100% de las formas familiares (2/2) y el 22,2% de las esporádicas (4/18). Los 2 pacientes con PG múltiples presentaron mutaciones (SDHB y SDHC). Entre los pacientes con PG de evolución maligna, 2 de los 3 presentaron mutación SDHB.

En las formas familiares se estudió a 3 hijos de los pacientes, resultando positivo un caso (mutación a nivel SDHB).

Finalmente, 3 de las 6 mutaciones no han sido referidas previamente en la literatura revisada (SDHB c.472 del A, SDHC c.A377G y SDHC c.A21G).

Las diferentes características moleculares y clínicas pueden apreciarse en la tabla 2.

## Discusión

Los PG muestran una intensa asociación con mutaciones germinales en los genes de 3 de las 4 subunidades del complejo enzimático SDH<sup>5</sup>.

El complejo enzimático SDH (fig. 1) está localizado en la membrana mitocondrial, forma parte de la cadena transportadora de electrones (complejo II) y participa en el ciclo de Krebs<sup>6,7</sup>. Como otras secuencias enzimáticas, está codificado genéticamente.

La causa de que mutaciones en los genes SDH produzcan PG todavía no se ha aclarado definitivamente, habiéndose postulado varias teorías<sup>8-13</sup>.

Las mutaciones en los genes SDHB y SDHD son las principales responsables de la aparición de PG, contribuyendo al 70% de los casos familiares y quizá hasta un 8% en los aparentemente esporádicos<sup>14,15</sup>. La frecuencia de mutaciones en SDHC es muy variable, determinándose una baja frecuencia o incluso no encontrándose esta mutación<sup>14-17</sup>, lo que contrasta con lo encontrado en nuestra serie. Con la aplicación de nuevas técnicas, se ha puesto de manifiesto la existencia de grandes deleciones en los genes SDH, habiéndose sugerido que este tipo de alteración puede llegar a representar hasta el 12% de las alteraciones en el gen SDHB. Este tipo de alteración sólo se ha descrito, hasta el momento, en pacientes portadores de PG esporádico<sup>18</sup>.

Existe una base de datos que pretende ser una herramienta útil para el estudio clínico de PG<sup>19</sup>. Dicha base incluye 120 variantes de las secuencias germinales de los genes, de las cuales 98 se cree son patogénicas y 22 corresponderían a variantes no funcionales o polimorfismos. Las mutaciones de cambio de aminoácido (missense) son relativamente frecuentes en el gen SDHB, agrupándose en torno al sitio catalítico de la subunidad, mientras que las mutaciones truncantes son más frecuentes en SDHD, afectando en este caso a los tres dominios transmembrana. SDHC, como ya se ha apuntado, muestra un menor número de mutaciones registradas que los anteriores genes. Tres de nuestras mutaciones no estaban recogidas en esta base de datos.

Aunque cada vez se describe un mayor número de mutaciones en estos genes en pacientes con PG esporádico y hereditario, no se ha encontrado una correlación con el fenotipo de los pacientes<sup>20</sup>. De hecho, inicialmente no se encontraron mutaciones en el gen SDHD en pacientes con feocromocitoma, mientras que las mutaciones en SDHB parecían ser recurrentes tanto en pacientes con feocromocitoma como con PG; posteriormente también se han descrito mutaciones en el gen SDHD en pacientes con feocromocitoma. Hasta la fecha, estudios poblacionales han intentado determinar diferentes características clínicas de los pacientes diagnosticados tanto de PG como de feocromocitoma, observándose que los individuos portadores de mutaciones en el gen SDHD desarrollan tumores de forma más frecuente<sup>21</sup>, mientras que la aparición de mutaciones en SDHB se asocia con la aparición de PG o feocromocitomas más agresivos y malignos<sup>22</sup>.

Un amplio estudio europeo y americano, que incluyó 83 PG de cabeza y cuello<sup>22</sup>, llegó a las siguientes conclusiones: *a*) en la mutación SDHD son más frecuentes los PG multifocales, incluidos los silentes, y *b*) en la mutación SDHB son más frecuentes las situaciones malignas. Este último hecho ha sido corroborado en otra amplia serie<sup>23</sup>. Nuestra mantiene esta misma línea.

Otra característica significativa de las mutaciones germinales en el gen SDHD es que solamente desarrollan fenotipo tumoral cuando el alelo se hereda por vía paterna. En este sentido, los alelos maternos también se heredan, pero la primera generación originaría portadores asintomáticos. Este hecho se debe a un efecto de transmisión autosómica dominante con impronta materna, a la cual parece estar sujeto este gen<sup>24</sup>, hecho relevante en el consejo genético de familias portadoras de estos síndromes.

Así las cosas, ¿qué implicaciones diagnósticas tiene el estudio genético? hasta ahora sabíamos que las distintas formas (esporádicas, hiperplásicas o familiares) presentan mayor o menor frecuencia de presentaciones atípicas (bilateralidad, sincronismo y malignización), a saber:

1. Formas esporádicas (80-90% del total). Más frecuente en mujeres. La bilateralidad y el sincronismo son infrecuentes. Pocos casos son malignos.
2. Formas hiperplásicas (3-5%). Distribución igual por sexos. Propia de personas que viven en altitud o pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. La bilateralidad es muy frecuente (90%) y la malignización, una excepción. Baja historia familiar.
3. Formas familiares (7-9%). Frecuentemente son bilaterales (1/3 de casos) y malignos (1/4). Con cierta frecuencia se asocian a otros PG cervicocefálicos, feocromocitomas o incluso otros tumores del sistema APUD. Frecuente en pacientes jóvenes e igualdad de sexos.

Ante estas posibles peculiaridades, es lógico que se realicen las siguientes pruebas diagnósticas adicionales en los casos familiares, obviando el resto:

1. Búsqueda de un tumor contralateral o sincrónico: exploración otorrinolaringológica, tomografía computarizada/resonancia magnética, gammagrafía con metayodobencilguanidina (MIBG) u octreotide (esta última de supuesta mayor sensibilidad), etc.
2. Despistaje en formas familiares o búsqueda de PG meta-crónicos: gammagrafía con MIBG u octreotide.

El valor añadido del estudio genético (incluso preoperatorio) es el descubrimiento de mutaciones genéticas tanto en las formas familiares como en las esporádicas, ampliando el campo diagnóstico referido a formas esporádicas que son posiblemente formas familiares ocultas. Al igual que muestra nuestra serie, alrededor de un tercio de pacientes con PG tiene una predisposición hereditaria<sup>25</sup> que es preciso investigar. Así las cosas, el conocimiento preoperatorio de esta información cambia el manejo global (diagnóstico y terapéutico) de estos pacientes, tanto en las formas familiares como esporádicas.

En conclusión, la mutación de las subunidades de SDH es responsable de la tendencia a padecer un PGC tanto en las formas familiares como en las esporádicas, teniendo una importante relevancia en la presencia de formas múltiples y el pronóstico evolutivo de estos tumores. Por todo ello, pensamos que en el momento actual está plenamente justificado realizar estudios genéticos en los pacientes diagnosticados de PG en general y PGC en particular.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Financiación

Ayuda a la investigación de la Consejería de Sanidad y Bienestar Social de la Junta de Castilla y León, 2007 (código: 166/ A/ 07).

## Bibliografía

1. Erickson D, Kudva YC, Ebersold MJ, Thompson GB, Grant CS, van Heerden JA, et al. Benign paragangliomas: clinical presentation and treatment outcomes in 236 patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:5210-6.
2. Netterville JL, Feilly KM, Robertson D, Feiber ME, Armstrong WB, Childs P. Carotid body tumors: a review of 30 patients with 46 tumors. *Laryngoscope.* 1995;105:115-26.
3. Lozano Sánchez F, Muñoz Herrera A. Tratamiento quirúrgico de los paragangliomas carotídeos. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2009; 60 Supl 1:80-96.
4. Núñez Lozano M, González Sarmiento R. Bases genéticas y moleculares de los paragangliomas. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2009;60 Supl 1:24-8.
5. Mariman EC, van Beersum SE, Cremers CW, van Baars FM, Roppers HH. Analysis of a second family with hereditary non chromaffin paraganglioma locates the underlying gene at the proximal region of chromosome 11q. *Hum Genet.* 1993;91:357-61.
6. Baysal BE, Rubinstein WS, Tachener PE. Phenotypic dichotomy in mitochondrial complex II genetic disorder. *J Mol Med.* 2001; 79:498-503.
7. Rustin P, Munnich A, Potig A. Succinate dehydrogenase and human disease: new insights into a well-known enzyme. *Eur Hum Genet.* 2002;10:289-91.
8. Baysal BE. On the association of succinate dehydrogenase mutations with hereditary paraganglioma. *Trends Endocrinol Metab.* 2003;14:453-9.
9. Lee S, Nakamura E, Yang H, Wei W, Linggi MS, Sajjan MP, et al. Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: developmental culling and cancer. *Cancer Cell.* 2005;6:33-43.
10. Giménez-Roqueplo AP, Favier J, Rustin P, Mourad JJ, Plouin P, Corvol P, et al. The R22X mutation of SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway. *Am J Hum Genet.* 2001;69:1186-97.
11. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- $\alpha$  prolyl hydroxylase. *Cancer Cell.* 2005;7:77-85.
12. King A, Selak MA, Gottlieb E. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene.* 2006;25:4675-82.
13. Eleno N, Düwel A, Muñoz A, Paz-Bouza J, López-Novoa JM, Lozano F. Endoglin as a marker in cervical paragangliomas. *Head Neck.* 2010;32:737-43.
14. Baysal BE, Willet-Brozick J, Lawrence EC, Drovdic C, Savul S, McLeod D, et al. Prevalence of SDHB, SDHC and SDHD in clinic patients with head and neck paragangliomas. *Med Genet.* 2002; 39:178-83.
15. McWhinney SR, Pilarski RT, Forrester SR, Schneider MC, Sarquis MM, Dias EP, et al. Large germ line deletions of mitochondrial complex II subunits SDHB and SDHD in hereditary paraganglioma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:5694-9.
16. Niemann S, Müller U. Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma. *Nat Genet.* 2000;26:141-50.
17. Astuti D, Hart-Holden N, Latiff F, Laloo F, Black G, Lim C, et al. Genetic analysis of mitochondrial complex II subunits SDHD, SDHB and SDHC in paraganglioma and pheochromocytoma susceptibility. *Clin Endocrinol.* 2003;59:728-33.
18. Baysal BE, Willet-Brozick JE, Filho PA, Lawrence EC, Myers E, Ferrel RE. An alu-mediated partial SDHC deletion causes familial and sporadic paraganglioma. *J Med Genet.* 2004;41:703-9.
19. Bayley J, Devilee P, Taschner P. The SDH mutation database: an online resource for succinate dehydrogenase sequence variants involved in pheochromocytoma, paraganglioma and mitochondrial complex II deficiency. *BMC Med Genet.* 2005;6:39.
20. Neumann HP, Bausch B, McWhinney S, Bender B, Grimm O, Franke G, et al. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *N Engl J Med.* 2002;347:854-5.
21. Neumann HP, Pawlu C, Peczkowska M, Bausch B, McWhinney SR, Muresan M, et al. Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *JAMA.* 2004;8:943-51.
22. Giménez-Roqueplo AP, Favier J, Rustin P, Fleubland C, Crespín M, Nau V, et al. Mutations in the SDHB gene are associated with extra-adrenal and/or malignant pheochromocytomas. *Cancer Res.* 2003;63:5615-21.
23. Boedeker CC, Neumann HP, Maier W, Bausch B, Schipper J, Fieder GJ. Malignant head and neck paragangliomas in SDHB mutation carriers. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007;137:126-9.
24. Renald L, Godfraind C, Boon LM, Vikkula M. A novel mutation in the SDHD gene in a family with inherited paraganglioma-implications of genetic diagnosis for follow up and treatment. *Head Neck.* 2003;25:480-6.
25. Knight TT Jr, Gonzalez JA, Pary JM, Rush DS. Current concepts for the surgical management of carotid body tumor. *Am J Surg.* 2006;191:104-10.