FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E ANATOMIA

Ribeirão Preto, 01 de dezembro de 2017.

PARECER

Programa de Pós Graduação em Cirurgia

Aluna: Claudia Tarcila Gomes Sares

Programa de Pós-graduação em Cirurgia

Orientador: Rodolfo Borges dos Reis

Declaro que a aluna Claudia Tarcila Gomes Sares, cumpriu com suas obrigações e desenvolveu o trabalho intitulado **“Avaliação da contaminação do sequenciamento do genoma mitocondrial por inserções nucleares de origem mitocondrial (NUMTs) no carcinoma renal de células claras”**. O trabalho encontra-se em condições de ser avaliado, pela comissão julgadora, e a aluna, nível doutorado, em condições de apresentá-lo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodolfo Borges dos Reis

Divisão de Urologia do Departamento de Cirurgia e Anatomia

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CLÁUDIA TARCILA GOMES SARES

Avaliação da contaminação do sequenciamento do genoma mitocondrial por inserções nucleares de origem mitocondrial (NUMTs) no carcinoma renal de células claras.

Ribeirão Preto
2017

CLÁUDIA TARCILA GOMES SARES

**Avaliação da contaminação do sequenciamento do
genoma mitocondrial por inserções nucleares de
origem mitocondrial (NUMTs) no carcinoma renal de
células claras.**

Tese de doutorado apresentada a
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de doutor.

Área de concentração: Morfologia e
Cirurgia experimental.

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo Borges dos
Reis

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou pesquisa, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Sares, Cláudia Tarcila Gomes

Avaliação da contaminação do sequenciamento do genoma mitocondrial por inserções nucleares de origem mitocondrial (NUMTs) no carcinoma renal de células claras / Cláudia Tarcila Gomes Sares; orientador Rodolfo Borges dos Reis. - Ribeirão Preto, 2017.

p.94 : Il.; 30cm

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Sub-área: Morfologia e Cirurgia experimental) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2017.

1. Carcinoma renal de células claras
2. DNA mitocondrial
3. Pseudogenes nucleares
4. Sequenciamento

FOLHA DE APROVAÇÃO

SARES, C.T.G. Avaliação da contaminação do sequenciamento do genoma mitocondrial por pseudogenes inserções nucleares de origem mitocondrial (NUMTs) no carcinoma renal de células claras.
2017. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2017.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os meus familiares, em especial a minha filha **Manuela Sares dos Santos**, que me fez conhecer o verdadeiro significado da palavra amor e trouxe um novo sentido a minha vida.

Ao meu esposo **Alexandre Duarte dos Santos**, por todo carinho, amor e dedicação a nossa família e por me apoiar em todos os momentos.

Aos meus pais **Maria Salomé Gomes Sares** (*in memoriam*) e **Victor Manuel Estêvão Sares**, por me conduzirem sempre no caminho do bem me proporcionando condições de avançar nos estudos e a nunca desanimar com as intempéries da vida. Obrigada por todo exemplo, amor e confiança.

Ao meu irmão **Helder Augusto Gomes Sares** e sua família, pelas palavras de apoio e carinho e por acreditar nos meus objetivos.

A família do meu esposo pela atenção, amor e dedicação a nossa família em especial a netinha e sobrinha Manuela.

A minha tia **Margareth Barros Diniz**, por me acolher muitas vezes como mãe e por me ajudar nos momentos em que mais precisei do colo materno, obrigada por seu amor.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela oportunidade de viver e pelo exemplo de amor a humanidade, fatos que me impulsionam a ser uma pessoa melhor a cada dia e recomeçar a cada queda.

Ao meu orientador **Rodolfo Borges dos Reis**, pela confiança, respeito e esmero durante esses oito anos de convivência e por me ensinar a realizar a pesquisa de forma ética com dedicação, respeito e amor à medicina, o senhor é um grande exemplo do esforço e dedicação ao bem estar e qualidade de vida dos que mais necessitam.

À Profa. Dra. **Cláudia Ferreira da Rosa Sobreira**, pela amizade, confiança e principalmente por todas as oportunidades a mim concedidas durante esses dez anos de convivência, por ser exemplo de seriedade, ética, respeito ao próximo e dedicação para oferecer o melhor em prol dos pacientes.

À amiga **Silvia Helena Andrião Escarso**, por sempre estar ao meu lado nos momentos mais difíceis da pesquisa e por me ensinar a nunca desistir dos meus objetivos. Em especial agradeço pelos dez anos de amizade e ensinamentos e pela ajuda crucial no desenvolvimento técnico deste trabalho.

Aos amigos do Departamento de Neurologia Aplicada e Experimental, **Sandra Elisabete Marques, Giuliana França Teixeira Mandia Grossi, Antônio Renato Meirelles, Daiana Oliveira de Souza, Thaísa Tognati, Maria Cristina Lopes Schiavoni, Aracy Edwirges Vieira S. Dias, Dr.**

Pedro José Tomaselli por todos os anos de amizade e por estarem sempre prontos a ajudar.

Aos amigos do Departamento de Cirurgia e Anatomia, **José Carlos Vanni, Paulo Roberto Castilho, Danniely Nair da Silva Barros, Ariane Mirela Saranzo Sant'ana, Daniel Mazzetto, Cristiana Carolina Padovan, Renata Danielle Scchieri, Luana Grupioni Lourenço Antônio, Ronaldo Vicente Martins, Paula Payão Ovidio, Stella Felipe de Freitas, Lilian Eslaine Costa Mendes da Silva, Paulo Alves Júnior, Hermes Murtha Oliveira**, pela amizade construída e pelos momentos de apoio e descontração no ambiente de trabalho.

Á amiga **Vanessa de Souza Nakagi**, pela amizade construída e pelo apoio e incentivo no desenvolvimento deste trabalho, além das trocas de experiência materna que nos ajudam a cada dia com nossos bebês. Obrigada pela amizade.

Á amiga e secretária do Departamento de Pós-Graduação de Cirurgia e Anatomia, **Juliana da Silva Pischotin** por sua dedicação, zelo e primor nos trabalhos desenvolvidos em prol dos alunos e principalmente por sua amizade e apoio.

Ás funcionárias e amigas do setor de CPD do Departamento de Cirurgia e Anatomia, **Laucéa Conrado Silva e Tania Beatriz Chiari** pela amizade construída e pelos momentos de diálogo.

Aos amigos de pós-graduação do Laboratório de Urologia- Biologia Molecular, **Renato Mendes Rossi de Lucca e Kelly Gomes Duarte** pela amizade, apoio e convivência.

Aos **pacientes** que fizeram parte deste trabalho, por acreditarem e serem um contributo para o desenvolvimento e progresso das pesquisas científicas. O meu eterno agradecimento.

Aos **residentes e médicos urologistas** do ambulatório de Uro-oncologia pelo apoio na coleta das amostras tumorais no Centro Cirúrgico e a equipe de enfermagem pela colaboração nos procedimentos.

Ao Prof. Dr. **Adauto José Cologna** pelos ensinamentos e incentivo á pesquisa e principalmente pelo exemplo de amor e dedicação aos pacientes e respeito a todos os funcionários do ambulatório do HC-FMRP.

Ao Laboratório de Bioquímica Clínica do Departamento de Farmácia, por ceder gentilmente os aparelhos para realização do sequenciamento genético, em especial ao Prof. Dr. **Sérgio Akira Uyemura** e o especialista de laboratório **Emerson de Souza Santos** que me auxiliou nos trabalhos técnicos e análise de resultados.

Aos amigos do Hemocentro- Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática, Prof. Dr. **Wilson Silva Junior**, **Luisa Ferreira de Araújo**, **Kamila Chagas Peronni Zueli**, **Anemarie Dinarte** e **Ana Júlia Marchry**, pela amizade, e apoio no desenvolvimento do trabalho.

Á **CAPES**, pelo apoio financeiro disponibilizado a mim durante o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

SARES, C.T.G. **Avaliação da contaminação do sequenciamento do genoma mitocondrial por inserções nucleares de origem mitocondrial (NUMTs) no carcinoma renal de células claras.** 2017. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2017.

Introdução: O carcinoma renal de células claras é o tumor renal maligno mais frequentemente diagnosticado nos adultos. Uma série de defeitos genéticos tem sido observada no tecido tumoral renal e tais achados podem estar envolvidos na gênese ou progressão desses tumores. Alterações metabólicas e genéticas da mitocôndria são fatores que contribuem para muitas doenças humanas, incluindo o câncer. **Objetivo:** Estabelecer método para extração mitocondrial sem contaminação pelo DNA nuclear; verificar se existe contaminação por inserções nucleares de origem mitocondrial (NUMTs) no sequenciamento do genoma mitocondrial no carcinoma renal de células claras. **Métodos:** Para o estudo foram selecionados quatro pacientes portadores de carcinoma renal de células claras. Após a cirurgia obtivemos de cada paciente um fragmento de tumor e um fragmento de parênquima renal sem comprometimento neoplásico, as amostras de cada paciente foram extraídas de forma que ao final pudéssemos obter quatro amostras de DNA, sendo duas com isolamento da mitocôndria e duas sem o isolamento da mitocôndria. As amostras obtidas foram submetidas às seguintes análises genéticas: Sequenciamento completo do mtDNA; Reação em cadeia da polimerase para avaliação da contaminação do mtDNA obtido com isolamento da organela por DNA nuclear; avaliação do número de cópias do mtDNA (depleção) e patogenicidade das mutações. **Resultados:** Com os resultados obtidos neste estudo podemos afirmar que é possível a realização da extração do DNA mitocondrial sem a contaminação do genoma nuclear; e que o DNA mitocondrial extraído de maneira clássica do DNA total não apresentou contaminação por inserções nucleares de origem mitocondrial (NUMTs).

Palavras-chave: Carcinoma renal de células claras, DNA mitocondrial, pseudogenes nucleares de origem mitocondrial (NUMTs), sequenciamento genético.

ABSTRACT

Sares, C.T.G. **Evaluation of the mitochondrial genome sequencing contamination by nuclear inserts of mitochondrial origin (NUMTs) in clear cell renal carcinoma.** 2017. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2017.

Introduction: Clear cell renal carcinoma is the most frequently diagnosed malignant renal tumor in adults. A number of genetic defects have been observed in renal tumor tissue and such findings may be involved in the genesis or progression of these tumors. Metabolic and genetic changes in mitochondria are contributing factors to many human diseases, including cancer. **Objective:** To establish a method for mitochondrial extraction without nuclear DNA contamination; check for contamination by nuclear inserts of mitochondrial origin (NUMTs) in the sequencing of the mitochondrial genome in clear cell renal carcinoma. **Methods:** Four patients with clear cell renal carcinoma were selected for the study. After surgery, we obtained from each patient a tumor fragment and a renal parenchyma fragment without neoplastic involvement, the samples from each patient were extracted so that in the end we could obtain four DNA samples, two with mitochondrial isolation and two without the mitochondria isolation of mitochondria. The obtained samples were submitted to the following genetic analyzes: Complete sequencing of mtDNA; Polymerase chain reaction to evaluate the contamination of mtDNA obtained with organelle isolation by nuclear DNA; evaluation of mtDNA copy number (depletion) and pathogenicity of mutations. **Results:** With the results obtained in this study we can affirm that it is possible to perform mitochondrial DNA extraction without contamination of the nuclear genome; and that the mitochondrial DNA extracted from the classical DNA of the total DNA was not contaminated by nuclear inserts of mitochondrial origin (NUMTs).

Key words: Clear cell renal carcinoma, mitochondrial DNA, nuclear mitochondrial pseudogenes (NUMTs), genetic sequencing.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Genoma mitocondrial humano.....	23
FIGURA 2- Segregação mitótica do DNA mitocondrial	26
FIGURA 3- Esquema da cadeia transportadora de elétrons	28
FIGURA 4- Diagrama dos efeitos metabólicos da fosforilação oxodativa	33
FIGURA 5- Desenho esquemático do estudo	37
FIGURA 6- Método de purificação AMPure Agencourt®.....	42
FIGURA 7- Etapas da construção da biblioteca	43
FIGURA 8- Sistema de montagem da biblioteca de sequenciamento.....	44
FIGURA 9- Processo de amplificação clonal.....	45
FIGURA 10- Gel de agarose 2,5% da amplificação negativa para o éxon 44	50
FIGURA 11- Gel de agarose 2,5% da amplificação positiva para o éxon 44	51
FIGURA 12- Gel de agarose 2,5% das reações de PCR para amplificação de 8000bp do mtDNA.....	52
FIGURA 13- Gel de agarose 2,5% para amplificação de 9000bp do mtDNA.....	53
FIGURA 14 - Dados gerados no sequenciamento genético.....	54
FIGURA 15- Distribuição das mutações não sinônimas nos complexos da cadeia respiratória das amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido com isolamento da mitocôndria (CI).....	57
FIGURA 16- Distribuição das mutações não sinônimas nos genes do mtDNA das amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido com isolamento da mitocôndria (CI). 58	
FIGURA 17- Distribuição das mutações não sinônimas nos complexos da cadeia respiratória das amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido sem isolamento da mitocôndria (SI)	58
FIGURA 18- Distribuição das mutações não sinônimas nos genes do mtDNA das amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido sem isolamento da mitocôndria (SI) 59.	
FIGURA 19- Distribuição das mutações não sinônimas nos complexos da cadeia respiratória das amostras de parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido com isolamento da mitocôndria (CI).....	59

FIGURA 20- Distribuição das mutações não sinônimas nos genes do mtDNA das amostras de parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido com isolamento da mitocôndria (CI).....	60
FIGURA 21- Distribuição das mutações não sinônimas nos complexos da cadeia respiratória das amostras de parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido sem isolamento da mitocôndria (SI).....	60
FIGURA 22- Distribuição das mutações não sinônimas nos genes do mtDNA das amostras de parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido sem isolamento da mitocôndria (SI).....	61
FIGURA 23- Número de cópias do mtDNA nos tecidos estudados.....	69
FIGURA 24- Modelo da estrutura terciária da proteína do gene ND4 com sítio resultante da troca do aminoácido arginina por glutamina.	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Sequência dos oligonucleotídeos (<i>primers</i>) utilizados na amplificação do mtDNA.....	41
TABELA 2- Descrição dos <i>primers</i> utilizados na PCR quantitativa (qPCR)	47
TABELA 3- Sexo, idade, diâmetro máximo do tumor e tipo de cirurgia.....	49
TABELA 4- Deleções encontradas no mtDNA extraído do DNA, com e sem a isolamento mitocondrial (CI;SI), do tecido tumoral	54
TABELA 5- Deleções encontradas no mtDNA extraído do DNA, com e sem a isolamento mitocondrial (CI;SI), obtido do parênquima renal sem acometimento neoplásico	54
TABELA 6- Mutações do tipo deleção encontradas no mtDNA do tecido tumoral, extraído do DNA obtido com e sem a extração mitocondrial	55
TABELA 7- Mutações do tipo deleção e substituição encontradas no mtDNA do parênquima renal sem acometimento neoplásico, extraído do DNA obtido com e sem a extração mitocondrial	55
TABELA 8- Mutações do tipo deleção e inserções encontradas no mtDNA do tecido tumoral, extraído do DNA total com e sem a extração mitocondrial.....	56
TABELA 9- Mutações do tipo deleção e substituição encontradas no mtDNA, do parênquima renal sem acometimento neoplásico, extraído do DNA obtido com e sem a extração mitocondrial.....	56
TABELA 10- Mutações do tipo deleção e inserções encontradas no mtDNA do tecido tumoral, extraído do DNA obtido com e sem a extração mitocondrial.....	56
TABELA 11- Mutações do tipo deleção e substituição encontradas no mtDNA do parênquima renal sem acometimento neoplásico, extraído do DNA obtido com e sem a extração mitocondrial.....	57
TABELA 12- Paciente 1: Mutações não sinônimas encontradas nas amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido do DNA sem a extração mitocondrial	62
TABELA 13- Paciente 1: Mutações não sinônimas encontradas no parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido do DNA sem a extração mitocondrial.....	62
TABELA 14- Paciente 1: Mutações não sinônimas encontradas nas amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido do DNA com a extração mitocondrial.....	62
TABELA 15- Paciente 1: Mutações não sinônimas encontradas no parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido do DNA com a extração mitocondrial.....	63

TABELA 16- Paciente 2: Mutações não sinônimas encontradas nas amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido do DNA sem a extração mitocondrial.....	63
TABELA 17- Paciente 2: Mutações não sinônimas encontradas no parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido do DNA sem a extração mitocondrial.....	63
TABELA 18- Paciente 2: Mutações não sinônimas encontradas nas amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido do DNA com a extração mitocondrial.....	64
TABELA 19- Paciente 2: Mutações não sinônimas encontradas no parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido do DNA com a extração mitocondrial.....	64
TABELA 20- Paciente 3: Mutações não sinônimas encontradas nas amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido do DNA sem a extração mitocondrial.....	64
TABELA 21- Paciente 3: Mutações não sinônimas encontradas no parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido do DNA sem a extração mitocondrial.....	65
TABELA 22- Paciente 3: Mutações não sinônimas encontradas nas amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido do DNA com a extração mitocondrial.....	65
TABELA 23- Paciente 3: Mutações não sinônimas encontradas no parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido do DNA com a extração mitocondrial.....	65
TABELA 24- Paciente 4: Mutações não sinônimas encontradas nas amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido do DNA sem a extração mitocondrial.....	66
TABELA 25- Paciente 4: Mutações não sinônimas encontradas no parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido do DNA sem a extração mitocondrial.....	66
TABELA 26- Paciente 4: Mutações não sinônimas encontradas nas amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido do DNA com a extração mitocondrial.....	66
TABELA 27- Paciente 4: Mutações não sinônimas encontradas no parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido do DNA com a extração mitocondrial.....	67
TABELA 28- Descrição dos índices de patogenicidade das mutações do mtDNA encontradas no tecido tumoral dos pacientes portadores de CCRcc.....	70

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	19
1.1 – Epidemiologia do câncer renal	19
1.2 – Etiologia	20
1.2.1 – Fatores de risco do câncer renal	20
1.2.2 – Fatores genéricos	20
1.2.3 – Fatores ambientais e ocupacionais	21
1.3 – Diagnóstico	22
1.4 – Estratégias de tratamento do CCR	22
1.5 – Genoma mitocondrial	22
1.5.1 – Função energética da mitocôndria	26
1.5.2 – Disfunção mitocondrial e câncer	28
1.5.3 – Fatores bioenergéticos da mitocôndria	29
1.6 – Pseudogenes e inserções nucleares de origem mitocondrial (NUMTs)	31
1.7 – Hipótese	33
2 – OBJETIVOS	35
2.1 – Objetivos	35
3 – PACIENTES E MÉTODOS	36
3.1 – Casuística	37
3.1.1 – Desenho do estudo	37
3.1.2 – Amostras tumorais	38
3.1.3 – Aspectos éticos	38
3.2 – Métodos	38
3.2.1 – Coleta da amostra tumoral	39
3.2.2 – Microdissecção das amostras congeladas e preparo dos fragmentos para extração de DNA	39
3.2.3 – Extração do DNA total das amostras congeladas	39

3.2.4 – Extração do DNA mitocondrial das amostras congeladas	39
3.3 – Amplificações das amostras por PCR longo (<i>Long Range PCR</i>) e sequenciamento do genoma mitocondrial através da plataforma Ion Torrent – Personal Genome Machine PGM (<i>Life Technologies</i>)	40
3.3.1 – Amplificações das amostras por PCR longo (<i>Long Range PCR</i>)	40
3.3.2 – Sequenciamento do genoma mitocondrial através plataforma Ion Torrent – Personal Genome Machine PGM.....	41
3.4 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para análise de contaminação do DNA nuclear nas amostras de mtDNA isoladas	46
3.5 – Avaliação do número de cópias de mtDNA	47
4 – RESULTADOS	49
4.1 – Caracterização dos pacientes do estudo.....	49
4.2 – Avaliação molecular	49
4.2.1 – Amplificação do material genético pela reação em cadeia da polimerase (PCR)	49
4.3 – Sequenciamento do genoma mitocondrial	53
4.4 – Análise da instabilidade do genoma mitocondrial nas mutações do tipo deleção; inserção e substituição.....	0
4.5 – Mutações não sinônimas encontrada nas amostras de tumor e parênquima renal dos pacientes do estudo.....	57
4.6 – Estratificação das mutações não sinônimas por paciente.....	61
4.6.1 – Análise comparativa das mutações não sinônimas encontradas no mtDNA do tecido tumoral e do parênquima renal sem acometimento neoplásico com e sem a extração mitocondrial....	67
4.7 – Análise do número de cópias do mtDNA	68
4.8 – Patogenicidade das mutações encontradas	69

5 – DISCUSSÃO	73
6 – CONCLUSÕES.....	
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
8- APÊNDICE	

1 - INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER RENAL

A incidência do carcinoma de células renais (CCR) vem aumentando globalmente nos últimos anos. Atualmente responde por aproximadamente 2-3% das neoplasias malignas viscerais em adultos, causando cerca de 100.000 mortes anualmente em todo o mundo (SIEGEL *et al.*, 2016). Aproximadamente 40% dos pacientes com CCR morrem devido à progressão da doença, tornando este tumor a lesão maligna urológica mais letal (LJUBERG, *et al.*, 2011). Nos Estados Unidos são estimados cerca de 63.990 casos novos deste tumor para 2017, com cerca de 14.400 mortes no mesmo período (*National Cancer Institute-NCI* 2017). No Brasil os dados sobre a incidência desta neoplasia são escassos, uma vez que Instituto Nacional do Câncer (INCA) não publicou dados referentes ao câncer renal em seu documento de estimativas de câncer para o ano de 2016 (Inca, 2016). Dados mais antigos estimam a incidência do CCR no Brasil entre 7 a 10 casos por 100.000 habitantes/ano nas áreas mais industrializadas, com taxas menores em regiões menos desenvolvidas (POMPEO, 2006).

Atualmente, o CCR é diagnosticado com maior frequência de forma incidental, na sexta e sétima década de vida, acometendo com maior frequência o sexo masculino na razão de 3:1 em relação ao sexo feminino, (SIEGEL, 2017). Uma das razões do aumento da incidência do câncer renal reside no fato da ampla utilização dos métodos de imagem em todo o mundo nas últimas décadas (HOWLADER *et al.*, 2012). O CCR de células claras (CCRcc) é o tipo histológico mais frequente, sendo responsável por 85% dos tumores diagnosticados, apresenta conteúdo citoplasmático lipídico resultando em citoplasma claro na microscopia óptica, macroscopicamente, são frequentemente amarelados devido ao elevado teor em lipídios. Análises genéticas de CCRcc revelaram que deleções e translocações no cromossomo 3 (3p) são as mais frequentes, no entanto, outras alterações genéticas como inserções, deleções e inativação de genes ocorrem em aproximadamente 60% dos RCC esporádicos (THIESEN, 2017).

1.2 ETIOLOGIA

A etiologia do CCR ainda não está completamente elucidada. Fatores ocupacionais (tabagismo, hipertensão arterial, obesidade, síndrome metabólica); ambientais (exposição a agentes químicos) e genéticos têm sido imputados na origem do CCR (CHOW *et al.*, 2010).

1.2.1 FATORES DE RISCO DO CÂNCER RENAL

1.2.2 FATORES GENÉTICOS

O CCR pode estar relacionado a síndromes hereditárias, representando cerca de 4% de todos os tumores renais (SIEGEL *et al.*, 2013). Dentre as síndromes genéticas mais frequentes destacam-se a síndrome de *Von Hippel-Lindau*, síndrome de *Birt-Hogg-Dubé* e carcinoma papilar renal hereditário (BRIAN *et al.*, 2006).

O gene VHL que está localizado no cromossomo 3p25 e codifica uma proteína supressora tumoral composta por 213 aminoácidos que desempenha papel fundamental na regulação da via de resposta à hipoxia, a qual é vital para a sobrevivência tumoral em condições de baixo teor de oxigênio intracelular (COWEY & RATHMELL, 2009).

Em condições normais (normóxia) a proteína VHL se liga ao fator indutor de hipóxia 1 (HIF-1) promovendo a degradação pelo processo de ubiquitinação, porém, em condições de anormais de oxigênio (hipóxia) ou perda na funcionalidade da proteína VHL níveis de HIF-1 ficam aumentados e acumulam-se dentro das células, ocasionando o aumento da expressão de uma série de proteínas angiogênicas responsáveis por fatores de crescimento envolvidos na formação de novos vasos sanguíneos e na proliferação e sobrevivência de células endoteliais chamados fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), além de outros fatores responsáveis pelo transporte de glicose, diferenciação epitelial e regulação do ciclo celular (WEINAN, *et al.*, 2017).

A síndrome de *Von Hippel-Lindau* (VHL), causada por mutações no gene de VHL, é uma síndrome familiar transmitida de forma autossômica dominante e é caracterizada pela presença de hemangiomas de retina e cerebelo, hemangioblastomas capilares no sistema nervoso central, cistos e/ou tumores renais do tipo células claras, tumores pancreáticos, cistos de epidídimo e feocromocitoma, normalmente as lesões são bilaterais e multifocais, a apresentação desta síndrome é bastante heterogênea com média de idade do diagnóstico entre 20 a 24 anos. (RICKETTS & LINEHAN, 2017). Tumores esporádicos também apresentam mutações no gene supressor tumoral *VHL* em cerca de 50 a 80% dos casos (FOSTER *et al.*, 1994; NICKERSON *et al.*, 2008).

A síndrome de *Birt-Hogg-Dubé* (BHD) apresenta uma condição clínico-patológica rara e é transmitida de forma autossômica dominante, localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p11.2) o gene *BDH* codifica uma proteína chamada foliculina, acredita-se que esta desempenhe papel importante no desenvolvimento de neoplasias renais e possivelmente em outras lesões associadas. Além de tumores renais os portadores desta síndrome apresentam tumores benignos de pele, fibrofoliculomas e cistos (LANG *et al.*, 2015), (GUPTA *et al.*, 2017).

O carcinoma papilar renal hereditário é representado pelo desenvolvimento de inúmeros tumores renais bilaterais com aspecto histológico papilar, sua transmissão é autossômica dominante, com origem na ativação do gene *MET* localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q31) que codifica um receptor de tirosina quinase o qual na sua forma mutada ativa um receptor independente; este tipo de carcinoma corresponde a 10 a 15% dos tumores de células renais, sendo o segundo tipo mais freqüente e caracterizado por metástases freqüentes. É mais comum em indivíduos idosos e naqueles residentes em zonas urbanas (ZBAR *et al.*, 1994), (KURODA *et al.*, 2003).

1.2.3 FATORES AMBIENTAIS E OCUPACIONAIS

Existem inúmeros fatores de risco notadamente relacionados ao aparecimento do CCR. Os principais são: idade, raça, tabagismo, condição sócio econômica, obesidade, hipertensão, uso de fármacos, terapia renal substitutiva (EDGE *et al.*, 2009), (SHOW, 2010).

Pacientes com massa corporal elevada tem maior tendência a desenvolver o CCR, a obesidade desencadeia inúmeras alterações no indivíduo como aumento nos níveis de colesterol, estrógeno, insulina e hipertensão, estes fatores apresentam grande associação para o desenvolvimento do CCR (LIPWORTH *et al.*, 2006). O uso de medicações diuréticas e anti-hipertensivas e fatores ocupacionais como exposição ao asbesto, gasolina e tricloroetileno também apresentam maior incidência de CCR (LIPWORTH *et al.*, 2006).

1.3 DIAGNÓSTICO DO CCR

Nas últimas décadas o CCR vem apresentando aumento de sua incidência principalmente pelo aumento no número de diagnósticos incidentais por exames de imagem como ultrassom e tomografia computadorizada, sendo este tipo de achado responsável por cerca de 50% a 80% dos CCRs diagnosticados, atualmente a tríade clássica, dor no flanco, hematúria macroscópica e massa abdominal palpável, é raramente encontrada (6-10%). Sinais como hematúria macroscópica, massa palpável, surgimento agudo de varicocele ou edema bilateral de membros inferiores, aumentam a suspeita de presença de tumores renais. Entretanto, apesar do avanço e disseminação dos métodos de imagem, aproximadamente 30% dos pacientes sintomáticos já apresentam doença metastática no momento do diagnóstico (LEROY *et al.*, 2007), (CHANG *et al.*, 2011).

Os critérios clássicos utilizados na classificação de risco dos tumores renais localizados são: tipo histológico, presença de diferenciação sarcomatóide, presença de invasão angiolinfática, presença de necrose tumoral, grau de diferenciação celular (grau de Fhurman) e a estádio TNM (Tumor Node and Metastasis) (Apêndice 1 e 2) (VOLPE *et al.*, 2012).

1.4 ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO do CCR

O câncer renal é uma doença cujo procedimento cirúrgico tem papel central no plano terapêutico. Tumores menores de 7 cm podem ser tratados com cirurgia poupadora de néfrons (nefrectomia parcial), já pacientes portadores de tumores são submetidos a nefrectomia radical. Doentes metastáticos são tratados com inibidores de Tirosina quinase e imunoterapia (FISHER & LARKIN, 2013); (COPPIN, *et al.*; 2005).

1.5 GENOMA MITOCONDRIAL

A mitocôndria possui material genômico próprio e as proteínas sintetizadas em seu interior são codificadas na própria organela, para que a organela mitocondrial possa exercer adequadamente suas funções, são necessários dois sistemas genéticos distintos para que haja a codificação das proteínas mitocondriais; a grande maioria dos genes localiza-se no núcleo das células, porém alguns genes são extra-nucleares e compõem o genoma mitocondrial, portanto, é necessário que haja a interação do núcleo, citoplasma e da mitocôndria, para que suas funções sejam desempenhadas adequadamente (JOHNS, 1995). Cada organela mitocondrial apresenta de duas a dez cópias de um cromossomo circular de fita dupla, composto na espécie humana por 16.569 pares de base (bp) e 37 genes que codificam: 2 RNAs ribossômicos (12S e 16S), 22 RNAs transportadores e 13 polipeptídeos (figura 1).

Figura 1: GENOMA MITOCONDRIAL HUMANO. DNA circular de fita dupla com 16.569bp, 2 RNAs ribossômicos (16S e 12S), 22 RNAs transportadores (F, V, L1, I, M, W, D, K, G, R, H, S1, L2, T, P, E, S2, Y, C, N, A, e Q), 13 polipeptídeos codificados pelo RNA mensageiro: (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6) do complexo I, 1 subunidade (citocromo b) do complexo III, 3 subunidades (COXI, COXII, COXIII) do complexo IV e 2 subunidades (ATPase 6 e ATPase 8) do complexo V da cadeia respiratória, região (D-loop) responsável por fatores envolvidos no controle da replicação, região promotora da cadeia leve (LSP), região promotora da cadeia pesada (HSP), origem de replicação da cadeia leve (OL), origem de replicação da cadeia pesada (OH). Figura adaptada de (PARK & LARSSON, 2011).

Estes polipeptídeos fazem parte da cadeia respiratória e localizam-se na membrana mitocondrial interna em conjunto com os polipeptídeos que são codificados pelo DNA nuclear. Os 13 polipeptídios codificados pelos RNAs mensageiros são responsáveis pela produção de proteínas integrantes do sistema de fosforilação oxidativa, incluindo 7 subunidades (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6) do complexo I da cadeia respiratória, 1 subunidade (citocromo b) do complexo III, 3 subunidades (COXI, COXII, COXIII) do complexo IV e 2 subunidades (ATPase 6 e ATPase 8) do complexo V da cadeia respiratória. Os quatro complexos da cadeia respiratória também possuem subunidades codificadas pelo DNA nuclear, as quais são importadas do citoplasma para a mitocôndria, no entanto é válido ressaltar que o complexo II contém apenas subunidades codificadas pelo DNA nuclear (FARAH, 2007; DIMAURO *et al.*, 2003). Durante a formação da célula-ovo, o espermatozoide contribui com uma cópia do DNA nuclear, e o óvulo contribui com a segunda cópia do DNA nuclear e inúmeras cópias do DNA mitocondrial (mtDNA). Isto se deve ao fato de que todas as mitocôndrias são transmitidas pelo óvulo, portanto, o DNA mitocondrial tem herança exclusivamente materna, assim a herança materna torna-se altamente sugestiva de defeitos no genoma mitocondrial (ANDERSON *et al.*, 1981). O genoma mitocondrial é composto por duas cadeias denominadas: a) cadeia pesada H composta pelas purinas adenina e guanina, b) cadeia leve L, composta pelas pirimidinas citosina e timina. Cada cadeia possui sua origem de replicação distinta; há uma região com aproximadamente 1.100 pares de base (bp), chamada região D-loop (*displacement loop*) ou região controle, responsável por regular a transcrição dos genes dentro da região codificadora, bem como a replicação do genoma mitocondrial, nesta região ocorre a origem de replicação para cadeia pesada (OH), já a origem de replicação da cadeia leve (OL) ocorre entre os nucleotídeos 5721-5781 no interior da que codifica os cinco RNAs transportadores (MORAES *et al.*, 1989).

Durante a divisão celular as mitocôndrias se auto-duplicam e sua segregação ocorre ao acaso entre as células filhas. Este processo denominado segregação mitótica explica o fato de que, durante a divisão celular as mitocôndrias e os genomas mitocondriais nelas contidos dividem-se de maneira aleatória. Portanto, se existe uma mutação no mtDNA, a transmissão de mtDNAs mutantes ocorrerá neste processo e o fator determinante será a proporção de mutação capaz de afetar as células e comprometer suas características funcionais (DIMAURO & DAVIDZON,

2005). Desta forma, quando há uma mutação no DNA mitocondrial a célula poderá apresentar duas ou mais populações de mtDNAs distintos (normal ou com mutação), condição esta denominada heteroplasmia, ou ainda poderá apresentar populações de mtDNAs idênticas com 100% de mtDNA mutante ou 100% de mtDNA selvagem, fenômeno denominado homoplasmia (PARK & LARSSON, 2011) (Figura 2).

Figura 2. Esquema da segregação mitótica do genoma mitocondrial com variação fenotípica em homoplasmia (apenas moléculas com DNAm selvagem ou DNAm mutante) e heteroplasmia (moléculas variadas de DNA mt selvagem e mutante em diferentes proporções) (Figura adaptada de (PARK & LARSSON, 2011))

1.5.1 FUNÇÃO ENERGÉTICA DA MITOCÔNDRIA

A organela mitocondrial desempenha um papel de notável importância para o metabolismo celular e a sua principal função é produzir energia em forma de ATP (adenosina trifosfato) através do sistema de fosforilação oxidativa (OXPHOS), além de ser responsável por diversas reações metabólicas fundamentais para a existência da célula na membrana externa da mitocôndria encontramos uma bicamada fosfolipídica e uma série de proteínas, estes canais proteicos permitem a difusão de pequenas moléculas no interior do espaço intermembrana tornando-a permeável a todos os solutos presentes no citosol (CHINERRY & SHON, 2003).

A membrana interna é constituída por uma bicamada lipídica impermeável apresentando permeabilidade somente a moléculas de oxigênio, gás carbônico e água, pois o transporte de substratos no interior da membrana é seletivo apresentando carreadores de ânion, equivalente redox e cátions, além de conter os componentes responsáveis pelo funcionamento da cadeia transportadora de

elétrons, no interior da membrana existem compartimentos chamados de cristas mitocondriais que são responsáveis por expandir a superfície da membrana aumentando o número de proteínas envolvidas na geração de energia (ATP) (DIMAURO *et al.*, 2003).

No espaço delimitado pelas invaginações ou cristas mitocondriais encontramos a matriz mitocondrial. Nela estão presentes centenas de enzimas envolvidas nos complexos enzimáticos responsáveis pela geração de energia, ribossomos mitocondriais, tRNAs (ácido ribonucléico transportador) e algumas cópias de DNAm (ácido desoxirribonucléico mitocondrial). Além disso, a organela mitocondrial também produz outras enzimas envolvidas com a biossíntese do grupamento heme da hemoglobina e pirimidinas por meio de enzimas específicas e produção de radicais livres (FINSTERER, 2004).

Nas cristas mitocondriais está localizada a cadeia respiratória e o processo chamado de fosforilação oxidativa, responsável pelo transporte de elétrons de equivalentes redutores: NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) e succinato para o oxigênio molecular, durante este processo há uma grande perda de energia livre, porém, grande parte desta energia é conservada através da fosforilação do ADP (Adenosina difosfato), para produzir energia em forma de ATP (RUSTIN *et al.*, 1994).

A cadeia respiratória é composta por quatro complexos enzimáticos situados na membrana mitocondrial interna, dois carreadores de elétrons denominados citocromo c e ubiquinona (coenzima Q10), e para completar a via final da fosforilação oxidativa existe um quinto complexo denominado complexo V (ATP sintetase); o complexo I (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido [NADH]-coenzima Q oxidorreductase é o maior complexo por ser constituído por aproximadamente quarenta e duas subunidades (MACHIN *et al.*, 1994)

Este complexo está alocado na membrana mitocondrial interna e seu sítio de ligação do NADH localiza-se na matriz mitocondrial, de tal forma que possa interagir com o NADH produzido por qualquer desidrogenase da matriz; no Complexo I, a entrega de elétrons não é direta, há primeiro uma transferência de um par de equivalentes redutores do NADH para seu grupo prostético FMN (flavina mono nucleotídeo), que entrega os elétrons aos centros de Ferro-Enxofre ao qual está associada, e só então estes são entregues à UQ (ubiquinona oxidada) (DIMAURO *et al.*, 2003). O Complexo II (succinato-ubiquinona oxidorreductase), possui quatro

subunidades e a acetilcoenzima A, que é responsável pela oxidação do succinato e está ligada à membrana interna mitocondrial no ciclo do ácido cítrico, sua oxidação acontece através das reações do ciclo de Krebs e é através dele que os elétrons são doados a FAD (flavina adenina dinucleotídeo) para então serem entregues à ubiquinona oxidada via ferro-enzofre. Desta forma, os elétrons que chegam à cadeia respiratória através da FADH_2 (flavina adenina dinucleotídeo reduzido) serão responsáveis pelo bombeamento de prótons a partir do Complexo III, pois o complexo II não é responsável pelo influxo de nenhum próton para o espaço intermembrana, daí a síntese de um ATP a menos pelo FADH_2 em comparação a NADH (CHINNERY & SCHON, 2003; DIMAURO *et al.*, 2003). O Complexo III (ubiquinona-citocromo *c* oxidorreductase), funciona como uma bomba de prótons em razão da orientação assimétrica do complexo, além de possuir os citocromos *b* e *c*, uma proteína Ferro-Enxofre e onze subunidades proteicas, as proteínas estão assimetricamente dispostas na membrana mitocondrial interna, sendo os citocromos e a proteína Ferro-enzofre localizados na superfície externa da organela; os prótons produzidos quando a ubiquinona é oxidada são liberados para o espaço intermembrana, produzindo uma diferença na concentração de prótons transmembrana; a ubiquinona pode se mover ao longo da bicamada lipídica, assim, após receber elétrons oriundos dos outros complexos, passa-os ao complexo III, que é responsável por recebê-los e repassá-los ao citocromo *c* (CHINNERY & SCHON, 2003). O citocromo *c* é livre e, portanto, se movimenta ao longo da superfície interna da membrana, carregando os elétrons recebidos do complexo III ao IV, no entanto, este processo só ocorrerá quando houver o acúmulo de quatro elétrons; no decorrer da reação, após os elétrons passarem pelo citocromo *a* e a_3 , serão doados a quatro hidrogênios e a um oxigênio da matriz mitocondrial, sintetizando desta forma duas moléculas de água. No complexo IV COX (citocromo-*c*-oxidase) ocorre, então, a redução do oxigênio, este complexo possui treze subunidades. O complexo V (ATP sintetase) possui dezesseis subunidades e a enzima ATP sintetase, presente na via final da fosforilação oxidativa. No complexo V, a enzima utiliza a energia armazenada num gradiente de prótons existente através da membrana para realizar a síntese de ATP a partir de ADP e P_i (fosfato inorgânico). Possui dois componentes principais denominados fatores F_1 e F_0 . O fator F_0 é a porção da ATP sintase condutora de prótons, que confere sensibilidade à oligomicina, um inibidor potente deste complexo enzimático e, portanto, da fosforilação oxidativa. O fator F_1 isolado é

responsável por hidrolisar ATP em ADP e P_i , no entanto, sua função biológica é catalisar a condensação do ADP e P_i para formar ATP (CHINNERY & SCHON, 2003) (Figura 3).

Figura 3. Esquema da cadeia transportadora de elétrons e seus respectivos complexos proteicos I, II, III, IV e V responsáveis pela produção de ATP. (Figura adaptada de SHON *et al.*, 2012).

1.5.2 DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL E CÂNCER

O câncer é caracterizado por uma série de mecanismos genéticos e epigenéticos que influenciam diretamente no metabolismo energético dos tumores, alterações metabólicas mecanismos de transformação celular, alterações da atividade das enzimas da cadeia respiratória e do DNA mitocondrial (mtDNA) são achados frequentes em células de diferentes tumores (LI *et al.*, 2017).

A organela mitocondrial é responsável reações metabólicas imprescindíveis para a viabilidade celular, desta forma, alterações genéticas no genoma mitocondrial contribuem de forma decisiva para o desenvolvimento do câncer, estudos recentes propuseram que as mutações no mtDNA possam ser utilizadas como marcadores moleculares para detecção precoce do câncer, auxiliando na predição de recorrência e prognóstico após a cirurgia radical (CAUDRON *et al.*, 2017). A atividade da cadeia respiratória está diretamente relacionada ao bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna, o gradiente de eletromecânico gerado pode ser dissipado em calor ou o fluxo de elétrons ocasionando a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), os quais podem agir como mensageiros celulares secundários ou promover efeitos tóxicos celulares, mutações somáticas no mtDNA possuem proteínas que apresentam suas sequências alteradas causando danos na

instabilidade proteica, essas alterações resultam em defeitos nos complexos da cadeia respiratório levando a deficiência de OXPHOS; proteínas supressoras tumorais presentes na mitocôndria também estão relacionadas a mecanismos que interferem diretamente nos processos funcionais da célula como a apoptose que é um dos principais mecanismos envolvidos na gênese tumoral. (SHULZE & HARRIS, 2012).

Estudos recentes evidenciam que as substituições de nucleotídeos únicos estão diretamente ligadas ao desenvolvimento do câncer, dadas as suas possíveis conexões com as mudanças proteicas, no entanto a instabilidade genômica da mitocôndria abrange uma série de variações estruturais como deleções e duplicações (DAMAS *et al.*, 2014). Os mecanismos moleculares dos complexos HIF-1 e HIF-2 (fator indutor de hipóxia) são os principais fatores de transcrição responsáveis pela mudança de expressão gênica na resposta celular a hipóxia, alterações neste mecanismo resultam na transcrição de inúmeros genes que tem papel conhecido no desenvolvimento da tumorigênese e fatores angiogênicos (LEE *et al.*, 2017).

As funções da mitocôndria são profundamente alteradas em células com potencial mutagênico, alterações no número de cópias do mtDNA são importantes nos processos de carcinogênese, o mtDNA é vulnerável a mutações, portanto, o número de cópias de mtDNA por célula podem apresentar números variados (LARMAN, *et al.*, 2012), estudos demonstram a ocorrência de redução do número de cópias do mtDNA (depleção do mtDNA) em vários tipos de tumores, incluindo tumores ovarianos, gástricos, hepáticos e de mama. Tais estudos sugerem que a depleção do mtDNA possa contribuir de alguma forma para a gênese tumoral (CZARNECKA *et al.*, 2009).

1.5.3 FATORES BIOENÉRGICOS DA MITOCÔNDRIA

Os fatores bioenergéticos da mitocôndria estão diretamente relacionados às suas características funcionais mais conhecidas como produção de energia através da OXPHOS, geração de ROS e regulação da morte celular programada; a OXPHOS fornece energia para o citoplasma das células e a glicólise anaeróbia para o núcleo, este compartimento apresenta maior susceptibilidade à deficiência de ATP, tanto em células normais como tumorais (VANDER HEIDEN *et al.*, 2009). A perda de

ATP no interior do núcleo de células tumorais gera consequências graves a funcionalidade da célula, alterando fatores de transcrição e replicação do DNA (CROCIANI *et al.*, 2017).

Em condições anaeróbicas as células diferenciadas produzem grandes quantidades de lactato através da via anaeróbica, em contraste com essa condição a maioria das células cancerosas produz grande quantidade de lactato independente da disponibilidade de oxigênio, sendo referida como glicólise aeróbica; na década de 30, o famoso bioquímico alemão Otto Warburg enunciou uma das mais importantes teorias sobre o desenvolvimento e crescimento do câncer: impedimento respiratório; a primeira observação foi que na ausência de oxigênio, tanto o tecido tumoral como o tecido normal, utilizam glicose e produzem ácido láctico no processo chamado de glicólise anaeróbia, geralmente, mas não sempre, o tecido tumoral produz mais ácido láctico que o tecido normal, a segunda observação foi que ambos os tecidos, normal e neoplásico, produzem menos ácido láctico na presença de oxigênio (glicólise aeróbia) do que na presença de nitrogênio (glicólise anaeróbia), Warburg chamou este fenômeno de Efeito Pasteur, baseado na observação do famoso cientista francês, na qual a levedura cessa a fermentação quando exposta ao oxigênio (SCHULZE e HARRIS, 2012). De acordo com Warburg “Enquanto que as células normais morrem se forem mantidas em glicólise anaeróbia, as células tumorais não somente continuam a existir, mas são capazes de crescer a uma extensão sem limite, com a energia química proveniente da glicólise” (WARBURG, 1956). Com as hipóteses Otto Warburg propôs que o câncer estimularia as células a mudar o processo de geração de energia para a via da glicólise anaeróbica, independente das condições aeróbicas, sendo assim a conversão de glicose em ácido láctico, na presença de O₂, foi chamado de “Efeito Warburg” (Figura 4) essa observação levou a hipótese de que o processo de carcinogênese resultaria em defeitos no metabolismo tumoral, gerando defeitos nas atividades metabólicas como, por exemplo, inibição da apoptose, inibição descontrolada das vias de sinalização inibitórias do crescimento celular, disseminação da metástase e manutenção da proliferação das células (OLIVOTTO, 2008).

Figura 4. Diagrama esquemático dos efeitos metabólicos da fosforilação oxidativa, glicólise anaeróbica e glicólise aeróbica. A: Na presença de oxigênio o tecido diferenciado metaboliza a glicose em piruvato e em seguida, oxida o piruvato na mitocôndria durante a OXPHOS. Em condições limitadas de oxigênio, as células direcionam a síntese do piruvato pela glicólise através da geração de lactato. B: Na glicólise aeróbica a conversão de glicose em lactato ocorre independente das condições de oxigênio, fenômeno observado nas células proliferativas tumorais. Adaptada de (VANDER HEIDEN *et al.*, 2009).

1.6 PSEUDOGENES E INSERÇÕES NUCLEARES DE ORIGEM MITOCONDRIAL (NUMTs)

Os pseudogenes foram descritos pela primeira vez em 1977 e suas sequências genéticas são homólogas aos genes reais e não produzem proteínas funcionais, sendo considerado como estrutura biologicamente inativa por alguns estudiosos (MURO *et al.*, 2011). O genoma humano possui aproximadamente 18.000 pseudogenes dos quais dois terços são pseudogenes processados, a distribuição dos pseudogenes comparados aos genes são altamente irregulares, apenas 10% dos genes humanos tem um pseudogene homólogo (MACDONELL *et al.*, 2012).

Os pseudogenes classificam-se em três tipos: pseudogenes não processados que são derivados de duplicações de genes; pseudogenes processados derivados de retrotransposição: neste caso o RNA mensageiro é transcrito de forma inversa numa sequência de DNA que é integrado ao genoma; e pseudogenes unitários, que surgem através de mutações espontâneas em genes que codificam proteínas (PINK *et al.*, 2011).

Inserções nucleares de origem mitocondrial (NUMTs) são comuns nos eucariotos e ocorrem através da transferência ou "transposição" de sequências de DNA mitocondrial citoplasmáticos no genoma nuclear, essa transferência de material genético da mitocôndria para o núcleo e sua integração no genoma nuclear é um

processo contínuo e dinâmico; os fragmentos de DNA mitocondrial (mtDNA) no genoma nuclear são incorporados como sequências não codificadas chamadas de pseudogenes mitocondriais nucleares (NUMT- Pseudogenes) e podem levar a amplificações acidentais de fragmentos nucleares com “primers” projetados especificamente para o mtDNA; dependendo da homologia de cada NUMT para o mtDNA, este problema pode ser mais ou menos relevantes (CALVIGNAC *et al.*, 2011).

A integração dos fragmentos de DNA mitocondrial para o genoma nuclear pode ocorrer durante o reparo de quebras de fita dupla do DNA nuclear (nDNA) decorrente da ação de agentes endógenos e exógenos; os aparecimentos de novas inserções nucleares de origem mitocondrial apontam não só a mudança da estrutura do genoma nas áreas de sua aplicação, bem como, podem apresentar um impacto significativo relacionado à informação genética; a integração dos NUMTs no genoma nuclear pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de doenças e envelhecimento celular, no entanto, os pseudogenes nucleares podem acarretar erros relacionados à análise do mtDNA livre e do DNA total utilizado com frequência nas técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tendo como resultado a co-amplificação de fragmentos de pseudogenes nucleares (JU *et al.*, 2015).

Uma série de fatores como deleções, inserções, mutações e *stop codons* prematuros estão relacionados à incapacidade da realização de tradução de proteínas funcionais pelos pseudogenes, no entanto, esta inabilidade biológica vem se tornando atualmente contestada, pois os mecanismos de manutenção e as sequências alélicas do DNA pertencentes aos pseudogenes sugerem um extraordinário papel funcional nestas estruturas, a maioria dos pseudogenes está associada a algumas famílias de genes amplamente expressas como, por exemplo, genes que codificam proteínas ribossômicas e genes associados a múltiplos pseudogenes que codificam enzimas metabólicas como a citocromo C, algumas características específicas dos pseudogenes estão envolvidas na patogênese do câncer humano, em alguns casos os transcritos de pseudogenes são mais frequentes no tecido tumoral (SUNDARAM *et al.*, 2012).

Aspectos importantes relacionados à numtogenese é o grau de polimorfismo presente nos NUMTs, as variantes alélicas dessas inserções podem fornecer marcadores para análises filogenéticas humanas e contribuindo com a susceptibilidade a doenças genéticas e ao desenvolvimento do câncer; em muitos

tipos de câncer as alterações dos genes mitocondriais ligados a região controle tiveram relação com o processo de tumorigênese, nas células cancerosas a inserção somática de NUMTs no genoma nuclear estão diretamente ligadas a instabilidade genética, esses fragmentos de DNA que escapam da mitocôndria e invadem o núcleo podem gerar mudanças no genoma nuclear através de inserções causando mutações (DAYAMA et al., 2014). Estas alterações genéticas podem estar relacionadas ao processo de tumorigênese e podem se manifestar através da inativação de supressores tumorais, ativação de proto-oncogenes e desregulação epigenética de qualquer tipo de gene. O acúmulo de mtDNA no genoma nuclear pode promover mudanças progressivas no proteoma celular e consequentemente causar o desenvolvimento do câncer (GASPARE et al., 2013).

1.7 HIPÓTESE

A relação do mtDNA com a manutenção do processo de carcinogênese tem sido estudada em diversas neoplasias. A contaminação do sequenciamento do mtDNA por inserções nucleares de origem mitocondrial (NUMTs) pode potencialmente afetar os resultados.

2 - OBJETIVO

- **2. OBJETIVOS**

- **2.1– Objetivos:**

- Estabelecer método para a extração mitocondrial sem contaminação pelo DNA nuclear;
- Verificar se existe contaminação por inserções nucleares de origem mitocondrial (NUMTs) no sequenciamento do genoma mitocondrial no carcinoma renal de células claras.

3 - PACIENTES E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

3.1.1 Desenho do estudo

Figura 5. Desenho esquemático do estudo.

3.1.2 Amostras tumorais

Foram selecionadas prospectivamente amostras tumorais de quatro pacientes portadores de CCRcc, sem componente sarcomatóide, operados (nefrectomia total ou parcial) no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). As amostras obtidas foram armazenadas no Biorrepositório da Divisão Urologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Critérios de exclusão: Recusa do paciente em participar do estudo, histologia diferente de células claras, terapia prévia para o tumor, uso de medicação que sabidamente alterasse a função mitocondrial, presença de história familiar de doença mitocondrial ou síndrome genética relacionada ao CCRcc.

3.1.3 Aspectos Éticos:

Os pacientes do estudo foram contatados para obtenção de permissão, e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo FMRP-USP relativo ao processo número 1.138.994/ 2014.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Coleta da amostra tumoral

As amostras de tecido foram coletadas no centro cirúrgico do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, com tempo de isquemia não superior a cinco minutos. O procedimento cirúrgico foi realizado por uma equipe de profissionais médicos da Divisão de Urologia. Após a retirada da peça cirúrgica, a mesma foi “aberta” sendo obtido um fragmento de tecido tumoral e outro do parênquima renal sem acometimento macroscópico pelo tumor. As amostras foram imediatamente congeladas em isopentano resfriado em nitrogênio líquido, e armazenadas no Bio repositório da Divisão de Urologia da FMRP – USP em freezer -80°C.

3.2.2 Microdissecção das amostras congeladas e preparo dos fragmentos para extração de DNA.

Após congelamento prévio em nitrogênio líquido a -196°C , cortes histológicos do tumor renal e parênquima renal foram obtidos em criostato a -22°C . Cortes consecutivos com 10 μm de espessura foram microdissecados, sendo que uma amostra (lamina) foi corada pela hematoxilina e eosina servindo como guia. Em seguida as lâminas restantes foram analisadas por um médico patologista para análise do grau de diferenciação celular e diagnóstico histológico. Após a microdissecção os fragmentos congelados de tumor e fragmentos de parênquima renal sem acometimento tumoral foram pulverizados com auxílio de um pistilo e cadinho de porcelana contendo nitrogênio líquido, em seguida o material triturado foi dividido em dois tubos previamente preparados em gelo seco e nitrogênio para que as amostras não perdessem a temperatura, os tubos contendo o material pulverizado foram utilizados para extração do DNA total com clorofórmio fenol e extração do mtDNA integro com o Kit de extração *Biovision*®.

3.2.3 Extração do DNA, sem isolamento mitocondrial (SI) das amostras congeladas:

O DNA total foi obtido de fragmentos previamente pulverizados de tecido renal tumoral e parênquima renal sem acometimento tumoral através da homogeneização do tecido em solução de proteinase K e extração por fenol clorofórmio de acordo com o método (modificado de SAMBROOK *et al.*, 1989).

3.2.4- Extração do mtDNA com isolamento mitocondrial (CI) das amostras congeladas:

Para obtenção do mtDNA integro, realizamos a extração do DNA mitocondrial presente nos fragmentos previamente pulverizados das amostras coletadas com o Kit *Mitochondrial DNA Isolation kit* BIOVISION® *Catalog#* K280-50. Esta técnica baseia-se em várias macerações e uso de tampões específicos nas amostras. Após o procedimento de microdissecção, as amostras foram pulverizadas com o auxílio de um pistilo e mantidas em nitrogênio líquido para posterior extração.

Para iniciarmos o procedimento de extração o material pulverizado mantido em nitrogênio líquido foi depositado em um tubo de ensaio de vidro com bastão fornecido pelo kit para maceração. 2,0 mL de solução de extração mitocondrial com

Cytosol (Kit) foram depositados no macerador para romper a membrana das células, a homogeneização foi feita girando o pistilo de vidro por no mínimo 40 vezes para ruptura completa da célula. O homogenado obtido foi transferido para um microtubo de 2,0 mL, em seguida foi centrifugado por 10 minutos a 700 XG a 4°C. O sedimento foi descartado e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 2,0 mL, em seguida pipetamos 1 mL de solução de extração mitocondrial com Cytosol (Kit) no microtubo e centrifugamos o tubo por 30 minutos a 10000 XG à 4°C. O sobrenadante foi descartado e no sedimento obtivemos a mitocôndria isolada. No tubo contando o pellet de mitocôndria pipetamos 30ul da solução tampão de lise mitocondrial (kit) e incubamos por 10 minutos no gelo; adicionamos em seguida 5ul do reagente enzima B mix (kit) e incubamos no banho Maria a 50°C por 60 minutos até que a solução ficasse clara, após a incubação adicionamos ao tubo 100ul de etanol absoluto e incubamos o tubo a -20°C por 10 minutos. Após este período o tubo foi centrifugado por 5 minutos em temperatura ambiente; o sobrenadante foi descartado e no pellet obtido havia o DNA mitocondrial integro. No pellet de DNA mitocondrial integro obtido adicionamos 1 ml de etanol 70% para lavagem. Após a lavagem o DNA foi colocado no banho seco a 37°C por 5 minutos e em seguida foi hidratado com 20ul de água. Após o procedimento o DNA mitocondrial foi estocado em freezer -20°C para posteriores procedimentos.

3.3 Amplificações das amostras por PCR longo (*Long- Range PCR*) e Sequenciamento do genoma mitocondrial através da Plataforma *Ion Torrent – Personal Genome Machine PGM* (Life Technologies)

3.3.1 - Amplificações das amostras por PCR longo (*Long- Range PCR*)

A reação de PCR foi realizada utilizando quatro *primers* (oligonucleotídeos) correspondentes às regiões 8.273-8.305, 9.028-9.043 do mtDNA (tabela 1) para que pudéssemos obter a sequência completa do mtDNA de aproximadamente 16.569 Pb (pares de base). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio e observados em transiluminador com luz ultravioleta (Kodak digital science 120™). A reação de PCR foi preparada à temperatura de aproximadamente 4°C no banho de gelo, utilizando-se 100 ng de DNAm_t de cada paciente, 2 pmoles dos *primers* direto e reverso, tampão de PCR 10X (Sigma Aldreich™), 20 mM de dGTP, dCTP, dTTP e dATP, 2,5 U/μL da enzima

Jump Start (Sigma Aldreich™), q.s.p. 50µL de água deionizada e autoclavada obtida no sistema Milli-Q (Millipore Corporation™), a reação de amplificação foi realizada no termociclador Mastercycler Pro (*Eppendorf*) com as seguintes condições para o PCR de 8Kb: Desnaturação Inicial: 94°C por 1 minuto; desnaturação: 64°C por 2 minutos; temperatura de anelamento: 68°C por 8 minutos (25 ciclos); extensão final: 68°C por 30 minutos; 4°C∞. Para o PCR de 9 KB as condições foram: Desnaturação inicial 94°C por 1 minuto; desnaturação: 62°C por 2 minutos; temperatura de anelamento: 68°C por 8 minutos (25 ciclos), extensão final: 68° por 30 minutos; 4°C∞.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos (*primers*) utilizados na amplificação do mtDNA:

IDENTIFICAÇÃO DO PRIMER	POSIÇÃO 5' DOS PRIMERS	SEQUÊNCIA 5' → 3' DOS PRIMERS
7440 F (8 Kb)	7425	CCC GTA TAC ATA AAA TCT AGA CAA AAA AG
16459 B (8 Kb)	16459	GGC CCG GAG CGA GGA GAG TAG CAC
16184 F (9 Kb)	16184	CCC CCT CCC CAT GCT TAC AAG C
8020 B (9 Kb)	8020	CGG GAG TAC TAC TCG ATT GTC AAC GTC

*Kb: Unidade de medida molecular equivalente a 1000 pares de base (1kilobase).

3.3.2 Sequenciamento do genoma mitocondrial através da Plataforma *Ion Torrent – Personal Genome Machine PGM* (Life Technologies)

3.3.2.1 Purificação das amostras obtidas através do PCR longo (*Long- Range PCR*)

Para realização do procedimento de purificação das amostras amplificadas utilizamos o reagente *Agencourt® AMPure®* (*Beckman Coulter*). Nesta etapa as amostras purificadas foram transferidas individualmente para um tubo *LoBind Eppendorf®*, dentro de cada tubo adicionamos 20 µl de produto de PCR + 36 µl de reagente *Agencourt® AMPure®*; após a homogeneização com pipetador as amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente, em seguida foram

colocadas na estante magnética durante 3 minutos até que a solução ficasse límpida, com os tubos mantidos na estante o sobrenadante de cada tubo foi retirado cuidadosamente e as *beads* com as amostras ficaram aderidas a parede do tubo. Em seguida pipetamos 500 µl de etanol (70%) em cada tubo e incubamos por 30 segundos, girando por 2x os tubos na estante magnética para purificar as amostras, o sobrenadante foi descartado e repetiu-se mais uma vez a lavagem com etanol 70%; após a lavagem descartamos o sobrenadante e deixamos o sedimento contendo as *beads* secarem por 5 minutos fora da estante magnética, com cuidado para que não sofressem rachaduras por terem secado demais. O sedimento contendo as *beads* foi hidratado com 25 µl de Low TE e em seguida os tubos foram colocados novamente na estante magnética até que a solução ficasse límpida, em seguida retiramos o sobrenadante contendo 20 µl das amostras purificadas (Figura 6).

Figura 6. Método de purificação utilizando reagente *Agencourt® AMPure®*: 1- Produto de PCR com resíduos; 2- adição de *Agencourt* contendo as beads; 3- Ligação dos amplicons com as bead atraídas pelo magnetismo; 4- lavagem com etanol 70%; 5- Separação dos amplicons que estavam ligados as beads; 5- Solução purificada.

3.3.2.2 Quantificação das amostras de PCR que foram purificadas

As amostras purificadas foram quantificadas através do equipamento de fluorímetro *Qubit® 2.0* (Life Technologies), para realização do procedimento preparamos um mix de solução contendo 199 µl de *HS Buffer* e 1 µl de fluoróforo para cada amostra. Em cada tubo *Qubit®* pipetamos 199 µl da solução do mix e 1 µl da amostra, após 2 minutos de incubação realizamos a leitura.

3.3.2.3 Construção da biblioteca

Para o preparo das amostras realizamos inicialmente a digestão enzimática do DNA a fim de obtermos os fragmentos com tamanhos iguais, em seguida houve a ligação dos adaptadores em cada extremidade dos fragmentos de DNA contendo regiões de ligação para os primers, um adaptador P1 que complementa a cadeia de DNA foi utilizado para ligar-se nas esferas de ISPs (*Ion Sphere Particles*). Os códigos de barra específicos para identificação de cada amostra (*Barcodes*) se ligaram aos adaptadores capazes de permitir o sequenciamento de diferentes amostras no mesmo chip (Figura 7).

Figura 7. Etapas de construção da biblioteca (Adaptada de Ion Torrent™ Sequencing Workflow; Thermo Fisher, 2016).

Para o preparo da construção da biblioteca foi utilizado o sistema semi-automático *AB Library Builder* (Life Technologies). Este sistema de preparo necessita de reagentes que são fornecidos através de kits com *strips* (Figura 8), que já vem preenchido com alguns reagentes, de forma que ao final do procedimento iremos a obter a biblioteca já construída.

Figura 8. Representação do cartucho contendo os *strips* com reagentes para serem utilizados no sistema *AB Library Builder* (Life Technologies).

Após obtermos os valores das concentrações das amostras através de cálculos estabelecidos em programa *Microsoft Office Excel*, realizamos as diluições com volume final de 50 μ l e concentração final de 100 ng, em seguida preparamos os reagentes para serem adicionados aos poços do cartucho. No poço 12 pipetamos os volumes anteriormente calculados de tampão E1 e a amostra; no poço 11 colocamos os tubos com os códigos de barra líquidos (*Barcodes*), no poço 10 adicionamos 500 μ l do reagente *Agencourt® AMPure®*. Os demais poços: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 já vêm preenchidos com reagentes. Após o carregamento do cartucho realizamos a inicialização do equipamento e programamos o sistema *AB Library Builder* para obtenção de fragmentos com cerca de 200 pares de base. Ao final do processo de construção da biblioteca retiramos os tubos contendo as amostras para serem quantificadas, após a quantificação das amostras fragmentadas e normalização das mesmas realizamos a purificação da biblioteca amplificada como descrito no item 3.3.2.

3.3.2.4 Preparo do *Template*

Os templates foram produzidos através de um sistema em emulsão utilizando o kit *Ion OneTouch 200 Template Kit*, em seguida as amostras foram processadas no equipamento *Ion OneTouch System* (Life Technologies). Esse procedimento é essencial para promover a ligação de um único fragmento de 200pb em um único Ion Sphere Particles (ISPs). Nesse mesmo sistema, uma reação de PCR emulsão foi realizada para haver a amplificação clonal de cada fragmento, uma reação de enriquecimento foi realizada para excluir os ISPs que não se ligaram a nenhum fragmento de DNA, ao final desta etapa obtivemos as ISPs ligadas a vários fragmentos idênticos prontos para o sequenciamento (Figura 9).

Figura 9. Diagrama esquemático do processo de amplificação clonal através das etapas do PCR emulsão e enriquecimento das amostras para obtenção das ISPs positivas. (Adaptada de KOHN *et al.*, 2013).

3.3.2.5 Reação de sequenciamento de nova geração (*Next-Generation Sequencing- NGS*)

Para o preparo da reação de sequenciamento utilizamos o kit *Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit* (Life technologies). Esta reação ocorre através da ligação específica de um *primer* ao seu respectivo adaptador, assim cada fragmento enriquecido com ISPs poderá ser sequenciado. A reação de sequenciamento ocorreu no interior de um chip semicondutor 316 V2, com capacidade para sequenciar até 300 Mb. Cada chip contém milhões de microporos formados por uma camada sensível a variações iônicas e um sensor iônico. Cada microporo é preenchido por uma ISPs. O Ion PGM adiciona um tipo de base de cada vez, se o nucleotídeo for incorporado haverá liberação de H^+ e consequente alteração iônica. Caso o nucleotídeo não seja incorporado, não haverá alteração iônica. Por meio dessas variações iônicas, o chip capta qual nucleotídeo foi incorporado em cada microporo ocorrendo o processo de sequenciamento de cada fragmento. Essas variações químicas são transformadas pelo Ion PGM em informação digital, ou seja, em sequências de DNA para posterior análise.

3.3.2.6 Análise de bioinformática dos dados

Os resultados obtidos do sequenciamento foram transmitidos através do sistema *Torrent Suite do Ion Reporter Software* (Life Technology), que transfere os resultados através de arquivos no formato BAM (*Binary Alignment Map*); em seguida as sequências obtidas no sequenciamento foram alinhadas a sequência do genoma mitocondrial (rCRS, NC_012920) e visualizadas no software *Integrative Genomics Viewer v.2.3. (IGV)*. Selecionamos alguns *plugins* de análise de bioinformática disponíveis no sistema *Ion Reporter* no momento da programação dos dados da corrida. Após a análise dos resultados submetemos as sequências ao site de banco de dados, MITOMAP: *mtDNA Control Region Sequence Polymorphisms* (<http://mitomap.org/MITOMAP>), que é um banco de dados que contém um grande número de informações do genoma mitocondrial tendo armazenado a sequência do mtDNA de mais de 24000 indivíduos, para confirmação das alterações encontradas.

3.3.2.7 Análise de patogenicidade das mutações encontradas:

As mutações detectadas foram avaliadas quanto a patogenicidade utilizando o banco de dados MitImpact 2.9 <http://mitimpact.css-mendel.it/>, que reúne predições de patogenicidade pré-calculadas para todas as mudanças de nucleotídeos que causam substituições não sinônimas em genes de codificação de proteínas mitocondriais humanas. A presença de informações funcionais e estruturais já descritas, relacionadas as mutações encontradas, foram avaliadas através do banco de dados UNIPROT: <http://www.uniprot.org/>.

3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para análise de contaminação do DNA nuclear nas amostras de mtDNA isoladas

Para exclusão de contaminação do genoma nuclear nas amostras de mtDNA isoladas através do Kit descrito no item 3.2.4, realizamos a reação de PCR com o éxon 44 do genoma nuclear que apresenta 426 bp. A reação de PCR foi preparada à temperatura de aproximadamente 4°C no banho de gelo, utilizando-se 100 ng de DNAm_t de cada paciente, 2 pmoles do *primer* correspondente, tampão de PCR 10X (Sigma Aldrich™), 20 mM de dGTP, dCTP, dTTP e dATP, 2,5 U/μL da enzima *Taq polymerase* (Bioneer™), q.s.p. 50μL de água deionizada e autoclavada obtida no sistema Milli-Q (Millipore Corporation™), a reação de amplificação foi realizada no termociclador *Mastercycler Pro* (Eppendorf) com as seguintes condições para o PCR

de 426bp: Desnaturação Inicial: 94°C por 30 segundos; desnaturação: 72°C por 30 segundos; temperatura de anelamento: 60°C por 30 segundos (50 ciclos); extensão final: 72°C por 15 minutos; 4°C ∞ .

3.5 - Avaliação do número de cópias de mtDNA

O número total de cópias do mtDNA (em comparação ao DNA nuclear) foi quantificado por PCR em tempo real (qPCR) através do equipamento 7500 Fast Real Time PCR system (*Life Technologies*), para determinar o número de cópias do genoma mitocondrial foi utilizado os valores de Ct (*cycle threshold*) do mtDNA em relação ao Ct do DNA nuclear nas amostras testadas. Utilizamos para a avaliação do número de cópias *primers* específicos do mtDNA e do DNA nuclear (Tabela 2) adaptada de (VENEGAS *et al.*, 2011). Para realização das reações utilizamos o reagente Power SYBR Green PCR Master Mix (*Life Technologies*) de acordo com orientação do fabricante. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software *Graf Pad Prism* (versão 5.0, 2007),

Tabela 2. Descrição dos *primers* utilizados na PCR quantitativa (qPCR)

PRIMERS	SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS	TEMPERATURA DE ANELAMENTO (C°)	TAMANHO DO FRAGMENTO (Pb)
Mt I	F: TCTCCATCTATTGATGAGGGTCT R: GTAGTAAGGCT GGAGGGTG	57.5°C	141pb
Mt II	F: TCTCCATCTATTGATGAGGGTCT R: TGTAGCCGTTGAGTTGTGGT	59°C	183pb
HPRT	F-1650 R-1651	59°C	101pb
TUBB	F-1652 R-1653	59°C	241pb

*Pb: Unidade de medida molecular equivalente a 2 nucleotídeos.

As mutações encontradas no genoma mitocondrial foram classificadas conforme a sua apresentação em deleções, inserções e substituições. A análise da instabilidade do genoma mitocondrial foi estimada dividindo-se o número de mutações de cada gene pelo número de pares de base do gene. A análise global da instabilidade do mtDNA foi obtida dividindo-se o total de mutações pelo total de pares de base do genoma mitocondrial.

4 – RESULTADOS

4. Resultados

4.1- Caracterização dos pacientes do estudo:

As amostras tumorais dos quatro pacientes avaliados, apresentaram diagnóstico histológico de CCRcc (critério de inclusão) e foram submetidos à nefrectomia radical (NR) ou nefrectomia parcial (NP). A média de idade dos pacientes foi de 60 anos (57 a 64 anos) e a média do diâmetro máximo das lesões foi de 4,75cm. A tabela 3 descreve a idade, o diâmetro máximo das lesões, o tipo de cirurgia realizada e o grau de Fhurman dos pacientes estudados.

Tabela 3. Sexo, idade, diâmetro máximo do tumor e tipo de cirurgia realizada:

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Diâmetro máximo do tumor (cm)	Tipo de Cirurgia	<i>Grau de Fhurman</i>
1	M	62	3,8	NR	II
2	F	64	5,2	NR	II
3	M	57	6,0	NR	II
4	M	57	4,5	NP	III

*M:Masculino; *F: Feminino; *NR: Nefrectomia radical; *NP: Nefrectomia parcial.

4.2 AVALIAÇÃO MOLECULAR:

4.2.1 Amplificação do material genético pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

4.2.1.1 Amplificação do mtDNA obtido com isolamento da organela (CI)

A avaliação molecular do mtDNA, das amostras de tumor e parênquima renal sem acometimento neoplásico, obtidas após o procedimento de isolamento da mitocôndria descrito no item 3.2.4, realizada pelo método de PCR, permitiu a identificação da ausência de contaminação do genoma nuclear. A figura 10 exemplifica o método de extração do mtDNA das amostras com eficácia em 100% dos fragmentos, indicando a ausência da banda de 426bp referente ao éxon 44 do DNA nuclear em todas as amostras extraídas.

Figura 10. Gel de agarose 2,5% das reações de PCR com resultado negativo para amplificação do éxon 44 de 426bp. 100bp: marcador de peso molecular (Tiangen). C+: Controle positivo; T: mtDNA de tumor; PR: Parênquima renal.

4.2.1.2 Amplificação do mtDNA obtido sem o isolamento da organela (SI)

A avaliação molecular do mtDNA das amostras de tumor e parênquima renal obtidas do procedimento de extração de DNA por Fenol Clorofórmio descrito no item 3.2.3, realizada pelo método de PCR, permitiu a identificação da presença da banda de 426bp do éxon 44 do genoma nuclear nas amostras, confirmando a presença do DNA nuclear. A figura 11 exemplifica o método de extração do DNA total das amostras com eficácia em 100% dos fragmentos, indicando a presença da banda de 426bp do DNA nuclear em todas as amostras extraídas.

Figura 11. Gel de agarose 2,5% das reações de PCR com resultado positivo para amplificação do éxon 44 de 426bp. 100bp: marcador de peso molecular (Tiangen). C+: Controle positivo; T: DNA total de tumor; PR: Parênquima renal.

4.2.1.3 Amplificação do genoma mitocondrial, obtido do DNA extraído sem isolamento da organela, por PCR longo nas amostras de tumor e parênquima renal sem acometimento neoplásico.

A PCR dos fragmentos de 8000bp e 9000bp do mtDNA foram realizadas em todas as amostras do estudo, a figura 12 exemplifica a presença da banda de 8000bp nas amostras de tumor e parênquima renal obtidas do DNA total. O fragmento amplificado foi utilizado no sequenciamento das amostras através do Ion Torrent PGM descrito no item 3.3.2.5. Todas as amostras seguiram a mesma padronização de amplificação, a qualidade dos fragmentos foi avaliada através do fluorímetro *Qubit® 2.0* (Life Technologies).

Figura 12. Gel de agarose 2,5% das reações de PCR indicando a amplificação de 8000bp do mtDNA. 1Kb: marcador de peso molecular (Invitrogen); T:Tumor; PR: Parênquima renal.

4.3.1.4 Amplificação do genoma mitocondrial, obtido do isolamento das organelas, por PCR longo nas amostras de tumor e parênquima renal sem acometimento neoplásico.

A PCR dos fragmentos de 8000bp e 9000bp do mtDNA foram realizadas em todas as amostras do estudo, a figura 13 exemplifica a presença da banda de 9000bp nas amostras de tumor e parênquima renal obtidas do mtDNA. O fragmento amplificado foi utilizado no sequenciamento das amostras através do Ion Torrent PGM descrito no item 3.3.2.5. Todas as amostras seguiram a mesma padronização de amplificação, a qualidade dos fragmentos foi avaliada através do fluorímetro *Qubit® 2.0* (Life Technologies)

Figura 13. Gel de agarose 2,5% das reações de PCR indicando a amplificação de 9000bp do mtDNA. 1Kb: marcador de peso molecular (Invitrogen); T: Tumor; PR: Parênquima Renal.

4.3. Sequenciamento do genoma mitocondrial

No total foram sequenciados dezesseis genomas mitocondriais dos quatro pacientes estudados. Para cada paciente o mtDNA foi sequenciado nas situações abaixo:

- Tecido tumoral: mtDNA extraído do DNA obtido com e sem isolamento mitocondrial.
- Parênquima renal sem acometimento neoplásico: mtDNA extraído do DNA obtido com e sem isolamento mitocondrial.

O genoma mitocondrial das 16 amostras gerou um total de 220,013 *reads* (43,9Mb). A cobertura média para as amostras testadas foi de 2,194X. Apesar do baixo número de *reads* produzidos na corrida o resultado do sequenciamento não foi comprometido, pois a cobertura obtida apresentou qualidade Phred score Q20 em todas as bases alinhadas (Figura 14).

Figura 14: Dados gerados no sequenciamento genético.

4.4 Análise do genoma mitocondrial

Paciente 1:

As tabelas 4 e 5 descrevem as deleções encontradas no mtDNA, do tecido tumoral e parênquima renal sem acometimento neoplásico, detectadas no mtDNA extraído com e sem isolamento mitocondrial.

Tabela 4: Deleções encontradas no mtDNA extraído do DNA, com e sem a isolamento mitocondrial (CI;SI), do tecido tumoral

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Tipo de mutação	Ploidia	Localização no mtDNA	Material genômico
MT-ND4	11032	A- del	DEL	HT	Complexo I	mtDNA- T(SI)
MT-ND4	11032	A- del	DEL	HT	Complexo I	mtDNA –T (CI)

*DEL: Deleção; *HM: Mutação em homoplasma; *HT: Mutação em heteroplasma; *T: tumor; *SI: Sem isolamento mitocondrial; *CI: Com isolamento mitocondrial.

Tabela 5: Deleções encontradas no mtDNA extraído do DNA, com e sem a isolamento mitocondrial (CI;SI), obtido do parênquima renal sem acometimento neoplásico.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Tipo de mutação	Ploidia	Localização no mtDNA	Material genômico
MT-CR	514	CA-del	DEL	HM	D-Loop	mtDNA-PR(SI)

*DEL: Deleção; *HM: Mutação em homoplasma; *PR: Parênquima renal sem acometimento neoplásico; *SI: Sem isolamento mitocondrial.

Paciente 2:

As tabelas 6 e 7 descrevem as deleções e substituições encontradas no mtDNA, do tecido tumoral e parênquima renal sem acometimento neoplásico, detectadas no mtDNA extraído com e sem isolamento mitocondrial.

Tabela 6: Mutações do tipo deleção encontradas no mtDNA do tecido tumoral, extraído do DNA obtido com e sem a extração mitocondrial.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Tipo de mutação	Ploidia	Localização no mtDNA	Material genômico
MT-CR	514	CA-Del	DEL	HM	D-Loop	mtDNA-T(CI)
MT-CR	514	CA-Del	DEL	HM	D-Loop	mtDNA –T (SI)

*DEL: Deleção; *HM: Mutação em homoplasma; *HT: Mutação em heteroplasma; *T: tumor;; *SI: Sem isolamento mitocondrial; *CI: Com isolamento mitocondrial.

Tabela 7: Mutações do tipo deleção e substituição encontradas no mtDNA do parênquima renal sem acometimento neoplásico, extraído do DNA obtido com e sem a extração mitocondrial.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Tipo de mutação	Ploidia	Localização no mtDNA	Material genômico
MT-CR	72	TA>CG	SUB	HT	D-Loop	mtDNA-PR(CI)
MT-CR	514	CA-Del	DEL	HM	D-Loop	mtDNA-PR(CI)
MT-CR	72	TA>CG	SUB	HT	D-Loop	mtDNA-PR(SI)
MT-CR	514	CA-Del	DEL	HM	D-Loop	mtDNA-PR(SI)

*DEL: Deleção; *SUB: Substituição *HM: Mutação em homoplasma; *HT: Mutação em heteroplasma; *PR: Parênquima renal sem acometimento neoplásico; *SI: Sem isolamento mitocondrial; *CI: Com isolamento mitocondrial.

Paciente 3

As tabelas 8 e 9 descrevem as deleções e inserções encontradas no mtDNA, do tecido tumoral e parênquima renal sem acometimento neoplásico, extraído do DNA obtido com e sem a extração mitocondrial.

Tabela 8: Mutações do tipo deleção e inserções encontradas no mtDNA do tecido tumoral, extraído do DNA total com e sem a extração mitocondrial.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Tipo de mutação	Ploidia	Localização no mtDNA	Material genômico
MT-ATT	357	DEL>A ACCCCCTCT-	INS	HT	D-Loop	mtDNA-T(CI)
MT-NC7	8271	DEL	DEL	HM	RNC	mtDNA-T(CI)
MT-CR	16180	AA-DEL	DEL	HM	D-Loop	mtDNA-T(CI)

*DEL: Deleção; *INS: Inserção *HM: Mutação em homoplasma; *HT: Mutação em heteroplasma;
*RNC: Região não codificante de proteína; *T: tumor; *CI: Com isolamento mitocondrial.

Tabela 9: Mutações do tipo deleção e substituição encontradas no mtDNA, do parênquima renal sem acometimento neoplásico, extraído do DNA obtido com e sem a extração mitocondrial.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Tipo de mutação	Ploidia	Localização no mtDNA	Material genômico
MT-NC7	8271	ACCCCCTCT- DEL	DEL	HM	RNC	mtDNA-PR(SI)
MT-NC7	8271	ACCCCCTCT- DEL	DEL	HM	RNC	mtDNA-PR(CI)
MT-NC7	8271	ACCCCCTCT- DEL	DEL	HM	RNC	mtDNA-PR(SI)

*DEL: Deleção; *HM: Mutação em homoplasma; *RNC: Região não codificante de proteína; *PR: Parênquima renal; *SI: Sem isolamento mitocondrial; *CI: Com isolamento mitocondrial.

Paciente 4:

As tabelas 10 e 11 descrevem as deleções e inserções encontradas no mtDNA, do tecido tumoral e parênquima renal sem acometimento neoplásico, extraído do DNA obtido com e sem a extração mitocondrial.

Tabela 10: Mutações do tipo deleção e inserções encontradas no mtDNA do tecido tumoral, extraído do DNA obtido com e sem a extração mitocondrial.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Tipo de mutação	Ploidia	Localização no mtDNA	Material genômico
MT-ATT	311	DEL>C	INS	HT	D-Loop	mtDNA-T(CI)
MT-ATT	303	C>DEL	DEL	HT	D-Loop	mtDNA-T(CI)
MT-CR	514	CA-DEL	DEL	HM	D-Loop	mtDNA-T(CI)
MT-ATT	311	DEL>C	INS	HT	D-Loop	mtDNA-T(CI)
MT-ATT	303	C>DEL	DEL	HT	D-Loop	mtDNA-T(CI)
MT-CR	514	CA-DEL	DEL	HM	D-Loop	mtDNA-T(CI)

*DEL: Deleção; *INS: Inserção *HM: Mutação em homoplasma; *HT: Mutação em heteroplasma; *T: tumor; *SI; *CI: Com isolamento mitocondrial.

Tabela 11: Mutações do tipo deleção e substituição encontradas no mtDNA do parênquima renal sem acometimento neoplásico, extraído do DNA obtido com e sem a extração mitocondrial.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Tipo de mutação	Ploidia	Localização no mtDNA	Material genômico
MT-CR	514	CA-DEL	DEL	HM	D-Loop	mtDNA-PR(CI)
MT-CR	514	CA-DEL	DEL	HM	D-Loop	mtDNA-PR(SI)

*DEL: Deleção; *INS: Inserção *HM: Mutação em homoplasma; *HT; *T: *PR: Parênquima renal; *SI: Sem isolamento mitocondrial; *CI: Com isolamento mitocondrial.

4.5 Mutações não sinônimas encontradas nas amostras de tecido tumoral e parênquima renal sem acometimento neoplásico, no mtDNA obtido do DNA com (CI) e sem (SI) extração mitocondrial.

Das mutações não sinônimas encontradas no mtDNA com isolamento da mitocôndria (CI), nas amostras de tecido tumoral dos quatro pacientes do estudo observamos que o complexo I da cadeia respiratória foi o mais acometido, seguido do complexo V e complexo III, o complexo IV foi o menos afetado pelas mutações (Figura 15).

Figura 15: Distribuição das mutações não sinônimas nos complexos da cadeia respiratória das amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido com isolamento da mitocôndria (CI).

Das mutações não sinônimas encontradas no mtDNA com isolamento da mitocôndria (CI), nas amostras de tecido tumoral dos quatro pacientes do estudo

observamos que o gene ATP-6 e CYB, foram os mais afetados pelas mutações quando comparados aos outros genes (Figura 16).

Figura 16: Distribuição das mutações não sinônimas nos genes do mtDNA das amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido com isolamento da mitocôndria (CI).

Das mutações não sinônimas encontradas no mtDNA sem isolamento da mitocôndria (SI), nas amostras de tecido tumoral dos quatro pacientes do estudo observamos que o complexo I e complexo V da cadeia respiratória foram o mais acometidos, seguido do complexo III; o complexo IV foi o menos afetado pelas mutações (Figura 17).

Figura 17: Distribuição das mutações não sinônimas nos complexos da cadeia respiratória das amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido sem isolamento da mitocôndria (SI).

Das mutações não sinônimas encontradas no mtDNA sem isolamento da mitocôndria (SI), nas amostras de tecido tumoral dos quatro pacientes do estudo

observamos que o gene ATP-6 e CYB, foram os mais afetados pelas mutações quando comparados aos outros genes (Figura 18).

Figura 18: Distribuição das mutações não sinônimas nos genes do mtDNA das amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido sem isolamento da mitocôndria (SI).

Das mutações não sinônimas encontradas no mtDNA com isolamento da mitocôndria (CI), nas amostras de parênquima renal sem acometimento neoplásico dos quatro pacientes do estudo observamos que o complexo V e o complexo III da cadeia respiratória foram o mais acometidos, seguido do complexo I, o complexo IV foi o menos afetado pelas mutações (Figura 19).

Figura 19. Distribuição das mutações não sinônimas nos complexos da cadeia respiratória das amostras de parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido com isolamento da mitocôndria (CI).

Das mutações não sinônimas encontradas no mtDNA com isolamento da mitocôndria (CI), nas amostras de parênquima renal sem acometimento neoplásico dos quatro pacientes do estudo observamos que o gene ATP-6 e CYB, foram os mais afetados pelas mutações quando comparados aos outros genes (Figura 20).

Figura 20: Distribuição das mutações não sinônimas nos genes do mtDNA das amostras de parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido com isolamento da mitocôndria (CI).

Das mutações não sinônimas encontradas no mtDNA sem isolamento da mitocôndria (SI), nas amostras de parênquima renal sem acometimento neoplásico dos quatro pacientes do estudo observamos que o complexo V e o complexo III da cadeia respiratória foram o mais acometidos, seguido do complexo I, o complexo IV foi o menos afetado pelas mutações (Figura 21).

Figura 21. Distribuição das mutações não sinônimas nos complexos da cadeia respiratória das amostras de parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido sem isolamento da mitocôndria (SI).

Das mutações não sinônimas encontradas no mtDNA sem isolamento da mitocôndria (SI), nas amostras de parênquima renal sem acometimento neoplásico dos quatro pacientes do estudo observamos que o gene ATP-6 e CYB, foram os mais afetados pelas mutações quando comparados aos outros genes (Figura 22).

Figura 22: Distribuição das mutações não sinônimas nos genes do mtDNA das amostras de parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido sem isolamento da mitocôndria (SI).

4.6 Estratificação das mutações não sinônimas por paciente:

As tabelas de 12 a 27 descrevem as mutações encontradas nas amostras de tecido tumoral e parênquima renal sem acometimento neoplásico, no mtDNA obtido do DNA com e sem a extração mitocondrial dos pacientes 1,2,3 e 4.

Paciente 1:

Tabela 12. Paciente 1: Mutações não sinônimas encontradas nas amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido do DNA sem a extração mitocondrial.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Ploidia	Complexo da Cadeia Respiratória
MT-ATP8	8448	T>C	M-T	HM	V
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	HM	V
MT-ND5	13759	G>A	A-T	HM	I
MT-CYB	15326	A>G	T-A	HM	III

*HM: Mutação em homoplasmia.

Tabela 13. Paciente 1: Mutações não sinônimas encontradas no parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido do DNA sem a extração mitocondrial.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Ploidia	Complexo da Cadeia Respiratória
MT-ND2	5460	G>A	A-T	HM	I
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	HM	V
MT-TL2	12315	G>A	tRNA-Leu	HT	-
MT-CYB	15326	A>G	T-A	HM	III

*HM: Mutação em homoplasmia; *HT: Mutação em heteroplasmia.

Tabela 14. Paciente 1: Mutações não sinônimas encontradas nas amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido do DNA com a extração mitocondrial.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Ploidia	Complexo da Cadeia Respiratória
MT-ATP8	8448	T>C	M-T	HM	V
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	HM	V
MT-ND5	13759	G>A	A-T	HM	I
MT-CYB	15326	A>G	T-A	HM	III

*HM: Mutação em homoplasmia.

Tabela 15. Paciente 1: Mutações não sinônimas encontradas no parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido do DNA com a extração mitocondrial.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Ploidia	Complexo da Cadeia Respiratória
MT-ATP8	8448	G>A	M-T	HM	I
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	HM	V
MT-ND5	13759	G>A	A-T	HM	I
MT-CYB	15326	A>G	T-A	HM	III

*HM: Mutação em homoplasma.

Paciente 2:

Tabela 16. Paciente 2: Mutações não sinônimas encontradas nas amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido do DNA sem a extração mitocondrial.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Ploidia	Complexo da Cadeia Respiratória
MT-ND2	4824	A>G	T-A	HM	I
MY-CO2	8027	G>A	A-T	HM	IV
MT-ATP6	8794	C>T	H-Y	HM	V
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	HM	V
MT-ATP6	8989	G>A	A-T	HM	V
MT-ND4	11592	G>A	R-Q	HT	I
MT-CYB	14766	C>T	T-I	HM	III
MT-CYB	15326	A>G	T-A	HM	III

*HM: Mutação em homoplasma; *HT: Mutação em heretoplasma.

Tabela 17. Paciente 2: Mutações não sinônimas encontradas no parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido do DNA sem a extração mitocondrial.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Ploidia	Complexo da Cadeia Respiratória
MT-ND2	4824	A>G	T-A	HM	I
MY-CO2	8027	G>A	A-T	HM	IV
MT-ATP6	8794	C>T	H-Y	HM	V
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	HM	V
MT-ATP6	8989	G>A	A-T	HM	V
MT-CYB	14766	C>T	T-I	HM	III
MT-CYB	15326	A>G	T-A	HM	III

*HM: Mutação em homoplasma.

Tabela 18. Paciente 2: Mutações não sinônimas encontradas nas amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido do DNA com a extração mitocondrial.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Ploidia	Complexo da Cadeia Respiratória
MT-ND2	4824	A>G	T-A	HM	I
MY-CO2	8027	G>A	A-T	HM	IV
MT-ATP6	8794	C>T	H-Y	HM	V
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	HM	V
MT-ATP6	8989	G>A	A-T	HM	V
MT-CYB	14766	C>T	T-I	HM	III
MT-CYB	15326	A>G	T-A	HM	III

*HM: Mutação em homoplasma.

Tabela 19. Paciente 2: Mutações não sinônimas encontradas no parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido do DNA com a extração mitocondrial.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Ploidia	Complexo da Cadeia Respiratória
MT-ND2	4824	A>G	T-A	HM	I
MY-CO2	8027	G>A	A-T	HM	IV
MT-ATP6	8794	C>T	H-Y	HM	V
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	HM	V
MT-ATP6	8989	G>A	A-T	HM	V
MT-CYB	14766	C>T	T-I	HM	III
MT-CYB	15326	A>G	T-A	HM	III

*HM: Mutação em homoplasma.

Paciente 3:

Tabela 20. Paciente 3: Mutações não sinônimas encontradas nas amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido do DNA sem a extração mitocondrial.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Ploidia	Complexo da Cadeia Respiratória
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	HM	V
MT-ND3	10324	T>C	M-T	HM	I
MT-ND4	11177	C>T	P-S	HM	I
MT-ND5	13708	G>A	A-T	HM	I
MT-ND5	13780	A>G	I-V	HM	I
MT-CYB	14766	C>T	T-I	HM	III
MT-CYB	15326	A>G	T-A	HM	III

*HM: Mutação em homoplasma.

Tabela 21. Paciente 3: Mutações não sinônimas encontradas no parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido do DNA sem a extração mitocondrial.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Ploidia	Complexo da Cadeia Respiratória
MT-ND1	3547	A>G	I-V	HM	I
MT-ND1	4012	A>G	T-A	HM	I
MT-ND1	4232	T>C	I-T	HM	I
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	HM	V
MT-ND3	10324	T>C	M-T	HM	I
MT-ND4	11177	C>T	P-S	HM	I
MT-ND5	13708	G>A	A-T	HM	I
MT-ND5	13780	A>G	I-V	HM	I
MT-CYB	14766	C>T	T-I	HM	III
MT-CYB	15326	A>G	T-A	HM	III

*HM: Mutação em homoplasmia.

Tabela 22. Paciente 3: Mutações não sinônimas encontradas nas amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido do DNA com a extração mitocondrial.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Ploidia	Complexo da Cadeia Respiratória
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	HM	V
MT-ND3	10324	T>C	M-T	HM	I
MT-ND4	11177	C>T	P-S	HM	I
MT-ND5	13708	G>A	A-T	HM	I
MT-ND5	13780	A>G	I-V	HM	I
MT-CYB	14766	C>T	T-I	HM	III
MT-CYB	15326	A>G	T-A	HM	III

*HM: Mutação em homoplasmia.

Tabela 23. Paciente 3: Mutações não sinônimas encontradas no parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido do DNA com a extração mitocondrial.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Ploidia	Complexo da Cadeia Respiratória
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	HM	V
MT-ND3	10324	T>C	M-T	HM	I
MT-ND4	11177	C>T	P-S	HM	I
MT-ND5	13708	G>A	A-T	HM	I
MT-ND5	13780	A>G	I-V	HM	I
MT-CYB	14766	C>T	T-I	HM	III
MT-CYB	15326	A>G	T-A	HM	III

*HM: Mutação em homoplasmia.

PACIENTE 4:

Tabela 24. Paciente 4: Mutações não sinônimas encontradas nas amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido do DNA sem a extração mitocondrial.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Ploidia	Complexo da Cadeia Respiratória
MT-ND2	5460	G>A	A-T	HM	I
MT-ATP8	8448	T>C	M-T	HM	V
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	HM	V
MT-CYB	15326	A>G	T-A	HM	III

*HM: Mutação em homoplasmia.

Tabela 25. Paciente 4: Mutações não sinônimas encontradas no parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido do DNA sem a extração mitocondrial.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Ploidia	Complexo da Cadeia Respiratória
MT-ND2	5460	G>A	A-T	HM	I
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	HM	V
MT-CYB	15326	A>G	T-A	HM	III

*HM: Mutação em homoplasmia.

Tabela 26. Paciente 4: Mutações não sinônimas encontradas nas amostras de tecido tumoral no mtDNA obtido do DNA com a extração mitocondrial.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Ploidia	Complexo da Cadeia Respiratória
MT-ND1	3391	G>A	G-S	HM	I
MT-ND2	5460	G>A	A-T	HM	I
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	HM	V
MT-CYB	15326	A>G	T-A	HM	III

*HM: Mutação em homoplasmia.

Tabela 27. Paciente 4: Mutações não sinônimas encontradas no parênquima renal sem acometimento neoplásico no mtDNA obtido do DNA com a extração mitocondrial.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Ploidia	Complexo da Cadeia Respiratória
MT-ND2	5460	G>A	A-T	HM	I
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	HM	V
MT-CYB	15326	A>G	T-A	HM	III

*HM: Mutação em homoplasmia.

4.6.1 Análise comparativa das mutações não sinônimas encontradas no mtDNA do tecido tumoral e do parênquima renal sem acometimento neoplásico, com e sem a extração mitocondrial.

PACIENTE 1

O paciente 1 apresentou 4 mutações não sinônimas nos nucleotídeos 8448; 8860 ; 13759 e 15326 no mtDNA do tecido tumoral. As mesmas quatro mutações foram encontradas com e sem a extração mitocondrial (concordância de 100%). Na avaliação das mutações do parênquima renal sem acometimento tumoral foram encontradas 8 mutações não sinônimas nos nucleotídeos 8448; 8860; 13759; 15326; 5460; 12315; 5460 e 12315. Entretanto as mutações nos nucleotídeos 5460) e 12315 só foram detectadas no mtDNA do parênquima renal sem acometimento neoplásico obtido sem a extração mitocondrial (concordância de 75%).

PACIENTE 2

O paciente 2 apresentou 8 mutações não sinônimas nos nucleotídeos 4824; 8027; 8794; 8860; 8989; 14766; 15326; 11592 do mtDNA obtido do tecido tumoral. Sete delas se repetiram com e sem a extração mitocondrial. A mutação no nucleotídeo 11592 foi somente encontrada no mtDNA obtido sem a extração mitocondrial; já as mutações nos nucleotídeos 14766 e 15326 foram somente detectadas no mtDNA obtido após a extração mitocondrial (concordância de 62.5%). Na avaliação das mutações do parênquima renal foram encontradas 7 mutações não sinônimas nos nucleotídeos 4824 ; 8027; 8794; 8860; 8989; 14766; 15326 do

mtDNA. As mesmas foram encontradas no mtDNA obtido com e sem a extração mitocondrial (concordância de 100%).

PACIENTE 3

O paciente 3 apresentou 7 mutações não sinônimas nos nucleotídeos 8860; 10324; 11177; 13708; 13780; 14766; 15326 do mtDNA do tecido tumoral. As mesmas se repetiram no mtDNA obtido com e sem a extração mitocondrial (concordância de 100%). Na avaliação das mutações do parênquima renal sem acometimento neoplásico foram encontradas 10 mutações não sinônimas nos nucleotídeos 3547; 4012; 4232; 8860; 10324; 11177; 13708; 13780; 14766; (15326) do mtDNA. Entretanto as mutações nos nucleotídeos 3547; 4012; 4232 foram somente detectadas no mtDNA obtido sem a extração mitocondrial (concordância de 70%).

PACIENTE 4

O paciente 4 apresentou 4 mutações não sinônimas nos nucleotídeos 5460; 8448; 8860; 15326 do mtDNA extraído tecido tumoral. As mesmas se repetiram no mtDNA obtido com e sem a extração mitocondrial (concordância de 100%). Na avaliação das mutações do parênquima renal foram encontradas 3 mutações não sinônimas nos nucleotídeos 5460; 8860; 15326 do mtDNA. As mesmas também se repetiram no mtDNA obtido com e sem a extração mitocondrial (concordância de 100%).

4.7 Análise do número de cópias do mtDNA

No estudo realizamos a análise comparativa dos cálculos referentes ao número de cópias relativas do mtDNA com e sem a extração mitocondrial, tanto do tecido tumoral quanto do parênquima renal sem acometimento neoplásico. O resultado dessa comparação revelou que as amostras de mtDNA do tecido tumoral apresentaram número de cópias de mtDNA reduzidas quando comparadas ao

mtDNA do parênquima renal sem acometimento neoplásico, ($p=0,01$ Teste de Mann Whitney (Figura 23).

Figura 23. Número de cópias do mtDNA nos tecidos estudados. (A) Comparação do nº de cópias do mtDNA do parênquima renal (PR) sem acometimento neoplásico com isolamento da mitocôndria(CI) com o mtDNA do tecido tumoral com isolamento da mitocôndria(CI). (B) Comparação do nº de cópias do mtDNA do parênquima renal (PR) sem acometimento neoplásico sem isolamento da mitocôndria(SI) com o mtDNA do tecido tumoral obtido sem o isolamento da mitocôndria(SI).

4.8 Patogenicidade das mutações encontradas:

A patogenicidade das mutações encontradas no mtDNA do tecido tumoral e do parênquima renal sem acometimento neoplásico foram avaliadas pelo *MitImpact 2.9* <http://mitimpact.css-mendel.it/>. Escores de patogenicidade inferiores a 15 foram considerados neutros, já escores superiores a 15 foram considerados patogênicos. O escore de patogenicidade encontrado para todas as mutações descritas no nosso estudo encontra-se no apêndice. A tabela 28 descreve os índices de patogenicidade das mutações do mtDNA encontradas no tecido tumoral dos pacientes portadores de CCRcc. Escolhemos a mutação na região 8860 do mtDNA, presente no tecido tumoral e no parênquima renal sem acometimento neoplásico de todos os pacientes (escore de patogenicidade 21.9), e a mutação na região 11592 do mtDNA presente no tecido tumoral do paciente 2, devido a seu alto escore de patogenicidade (24.4), para avaliação estrutural. A análise funcional decorrente da mutação na região 8860 do mtDNA, revelou a presença de uma proteína ligada ao Complexo V da

cadeia respiratória (gene ATP 6) com índice de alteração estrutural e funcional. Já a proteína codificada na presença da mutação 11592 do mtDNA do Complexo I da cadeia respiratória (gene ND4) resulta também em uma proteína com dano funcional importante. A figura 20 a representa a proteína defeituosa gerada.

Tabela 28. Descrição dos índices de patogenicidade das mutações do mtDNA encontradas no tecido tumoral dos pacientes portadores de CCRcc.

Pacientes N=4	Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	PATOGENICIDADE (>15) patogênico (< 15) neutro CADD SCORE
1	ATP8	8448	T>C	M-T	0,96
1	ATP6	8860	A>G	T-A	21,9
1	ND5	13759	G>A	A-T	0,69
1	CYB	15326	A>G	T-A	4,2
2	ND2	4824	A>G	T-A	8,4
2	CO2	8027	G>A	A-T	6,8
2	ATP6	8794	C>T	H-Y	15,7
2	ATP6	8860	A>G	T-A	21,9
2	ATP6	8989	G>A	A-T	3,75
2	CYB	14766	C>T	T-I	9,6
2	ND4	11592	G>A	R-Q	24,4
2	CYB	15326	A>G	T-A	4,2
3	ATP6	8860	A>G	T-A	21,9
3	ND3	10324	T>C	M-T	0,69
3	ND4	11177	C>T	P-S	8,6
3	ND5	13708	G>A	A-T	1,25
3	ND5	13780	A>G	I-V	1,28
3	CYB	14766	C>T	T-I	9,6
3	CYB	15326	A>G	T-A	4,2
4	ND2	5460	G>A	A-T	9,2
4	ATP8	8448	T>C	M-T	0,96
4	ATP6	8860	A>G	T-A	21,9
4	CYB	15326	A>G	T-A	15,7

A figura 24 representa o modelo de estrutura terciária de uma proteína danificada pela mutação G11592A no gene ND4 localizado no complexo I da cadeia respiratória. Nesta mutação houve a troca do aminoácido argina pela glutamina. A proximidade do aminoácido trocado (glutamina) gera uma ponte salina ao aspartato, portanto, além da troca gerada pela mutação esta interação pode desencadear a instabilidade das ligações proteicas causando danos patogênicos ainda maiores.

Figura 24: Modelo da estrutura terciária da proteína do gene ND4 com sítio resultante da troca do aminoácido arginina por glutamina.

5 - DISCUSSÃO

O câncer é a uma das principais causas de morte no mundo. Vários estudos têm sido conduzidos com o objetivo de compreender melhor os processos de carcinogênese e detectar possíveis alvos terapêuticos que possam ser utilizados em novas abordagens terapêuticas.

A mitocôndria é uma organela citoplasmática que apresenta diversas funções fundamentais como: produção de energia (ATP); geração de espécies reativas tóxicas de oxigênio e regulação da morte celular programada. Neste contexto alterações na cadeia respiratória resultantes de mutações do mtDNA são frequentemente relacionadas ao câncer. Em 1926 o bioquímico alemão Otto Warburg introduziu o conceito que o câncer é uma doença metabólica assumindo a mitocôndria um papel central neste processo.

Pelo fato de cada mitocôndria possuir de duas a dez cópias do seu genoma, não possuir histonas e apresentar mecanismos de reparação do DNA limitados em um microambiente rico em espécies reativas de oxigênio (ROS), o mtDNA apresenta taxa de mutação de 10 a 20 vezes maior quando comparada ao genoma nuclear (XING *et al.*, 2008). Nos últimos anos, uma série de estudos tem demonstrado alterações no genoma mitocondrial em diversas neoplasias humanas (LEE *et al.*, 2004); (WANG *et al.*, 2006). Essas alterações frequentemente se apresentam em heteroplasmia, ou seja, coexistindo com genomas mitocondriais normais. Como a proporção de mtDNAs mutantes nem sempre é elevada, uma das críticas levantadas a tais estudos é a de que o sequenciamento baseado na extração de DNA do tecido como um todo, contendo portanto DNA nuclear e mitocondrial, poderia identificar sequências nucleares semelhantes a sequências do mtDNA e não necessariamente mutações do genoma mitocondrial.

A transferência de material genético da mitocôndria para o núcleo resulta em “cópias” de fragmentos do DNA mitocondrial no DNA nuclear (inserções nucleares de origem mitocondrial - NUMTs). Este processo é considerado um fenômeno evolutivo contínuo. Nos seres humanos algumas destas inserções são relacionadas a doenças genéticas e alguns *loci* do DNA nuclear são polimórficos na presença de NUMTs.

A possível contaminação do sequenciamento do mtDNA pelos NUMTs, na vigência de vasta literatura que tem explorado as alterações do genoma mitocondrial em diversos tumores, motivou o nosso estudo.

A princípio no desenvolvimento técnico do trabalho utilizamos um Kit de isolamento mitocondrial da marca ABCAM® na tentativa de obter o isolamento e extração do mtDNA, realizamos o teste em pilotos seriados e após várias tentativas frustradas os resultados não foram satisfatórios. Em todas as amostras que testamos com este kit apareceram bandas referentes ao DNA nuclear. Encontramos no mercado um kit de isolamento e extração do mtDNA da marca BIOVISION® que garantia na descrição da execução do teste a qualidade de se obter o mtDNA de células e tecidos frescos e congelados. Realizamos os testes nas amostras do nosso estudo e obtivemos sucesso na amplificação do mtDNA sem a contaminação do DNA genômico.

O índice de concordância das mutações detectadas no mtDNA, do tecido tumoral, obtido do DNA com a extração mitocondrial comparado com ao extraído do DNA total foi de 100% nos pacientes 1,3 e 4 e de 62,5% no paciente 2. Em relação ao parênquima renal sem comprometimento neoplásico, o índice de concordância foi de 75%, 100%, 70% e 100% para os pacientes 1,2,3 e 4 respectivamente. Estes resultados, ainda não descritos, demonstraram ser possível a extração da mitocôndria sem contaminação do DNA nuclear. Entretanto nosso principal achado foi a demonstração que caso ocorra a contaminação por NUMTs do sequenciamento do mtDNA obtido da extração do DNA total, a mesma é mínima e não invalida os resultados obtidos.

Não foi objetivo do nosso estudo avaliar com maior profundidade as mutações detectadas no tecido tumoral dos pacientes estudados. O número reduzido da amostra sequenciada assim como a discreta, porém presente, heterogeneidade do grupo avaliado (grau de Fhurman II em 3 pacientes e grau de Fhurman III em 1 paciente; diâmetro máximo da lesão variando de 3,8 a 6,0 cm) foram o fatores determinantes que impediram conclusões. Entretanto três mutações presentes no tecido tumoral apresentaram índice de patogenicidade superior a 15. Destas a estrutura da proteína 11592 do Complexo I da cadeia respiratória (gene ND4) encontrava-se bastante alterada, com alterações de seus sítios de ligação comprometendo o processo de fosforilação oxidativa.

O fato de algumas mutações estarem presentes no parênquima renal e não presentes no tecido tumoral podem estar relacionadas ao envelhecimento das células renais ou a presença de outras doenças com repercussão no parênquima renal. As mutações não sinônimas codificantes detectadas e referidas no MITOMAP

como variantes da normalidade, pois apesar de resultar em troca de aminoácido não causam danos funcionais impactantes, podem ser a chave para a perpetuação e sustentação do fenótipo anaeróbico das células tumorais.

O número de cópias do mtDNA estava diminuído no tecido tumoral em comparação ao parênquima renal sem acometimento neoplásico. Este fato, já foi reportado em outros tumores, como os de mama (Mambo et al., 2005) e fígado (Lee, 2004) e mais recentemente nos tumores renais (TCGA). Uma das possíveis explicações para este achado, embora ainda não aceita universalmente, reside no fato da reduzida expressão dos genes da cadeia respiratória devido a mutações patogênicas do mtDNA. Nestes tumores, as células apresentariam fenótipo anaeróbico com produção de energia (ATP) predominantemente pela via glicolítica. Outra interpretação para este achado pode estar ligada ao número de mitocôndrias celular, pois o mesmo pode estar diminuído devido as condições encontradas no microambiente tumoral.

Salientamos que mais estudos são necessários, com casuística mais robusta, com o intuito de validar nossos achados.

Limitações:

Apesar de inédito, nosso estudo apresenta amostra reduzida fato que impede análise aprofundada e correta das mutações detectadas, tanto no tecido tumoral como no parênquima renal não acometido por neoplasia.

Apesar da alta taxa de concordância verificada nas mutações encontradas no mtDNA obtido do tecido tumoral com e sem a extração mitocondrial, o baixo carregamento do *chip* para o sequenciamento pode comprometer a análise dos dados obtidos.

6– CONCLUSÕES

Conclusões:

6. Conclusões

- É possível realizar a extração mitocondrial sem contaminação pelo DNA nuclear;
- A contaminação do mtDNA extraído do DNA total por NUMTs, caso ocorra, não compromete a interpretação dos resultados no tecido tumoral dos pacientes portadores de CCRcc.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON, S.; BANKIER, A. T.; BARRELL, B. G.; BRUIJN, M. H. L.; COULSON, A. R.; DROUIN, J.; EPERON, I. C.; NIERLICH, D. P.; ROE, B. A.; SANGER, F.; SCHREIER, P. H.; SMITH, A. J. H.; STADEN, R.; YOUNG, I. G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, 290:457-465, 1981.
2. BALDEWIJNS, M. M.; VAN VLODROP, I. J.; SCHOUTEN, L. J.; SOETEKOUW, P. M.; DE BRUINE, A. P.; VAN ENGELAND, M. Genetics and epigenetics of renal cell cancer. **Biochim Biophys Acta**. 1785 (2): 133 – 155, 2008.
3. BERTOUT, J. A.; PATEL, S.A.; SIMON, M.C. The impact of O2 availability on human cancer. **Nat Rev Cancer**, 8 (12): 967-75, 2008.
4. BECKMAN C. Instructions for use Agencourt AMPure Purification, 2013. Disponível em: <http://www.beckmancoulter.com/portal> acessado em nov. 2017.
5. COPPIN, C.; PORZSOLT, F.; AWA, A.; KUMPFT, J.; COLDMAN, A.; WILD, T. Immunotherapy for a advance renal cell cancer. **Cochrane database Syst Rev** 1:CD001425, 2005.
6. RANDON, N. P.; BRETT, D. J.: Engineering porous materials for fuel cell applications. **Philos Trans A Math Phys Eng Sci**, 15; 364 (1838): 147-59, 2006.
7. BRIAN, P. A.; NORM, D. S.; RITU, N.; XIMING, J. Y. Birt-Hogg-Dubé Syndrome: Clinicopathologic Findings and Genetic Alterations. **Arch Pathol Lab Med**, (130): 1865-70, 2006.
8. CUMBERBATCH, M.G.; ROTA, M.; CATTO, J.W.F.; VECCHIA, C.L. The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney carcinogenesis: A comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and mortality Risks. **Euro Urol** 70: 458-66, 2016.

9. BROWN, S. T.; NURSE, C.A.: Induction of HIF-2 alpha is dependent on mitochondrial O₂- consumption in O₂-sensitive adrenomedullary chromaffin cell line. **Am J Physiol Cell Physiol**, 294:C1305-1312, 2008.
10. CHINNERY, P.F.; SCHON, E.A. Mitochondria. **J Neurol Neuros Psych**, 74:1188-1199, 2003.
11. CHOW, W.H.; DONG, L.M.; DEVESA, S.S. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. **Nat Rev Urol**, 7:245-57, 2010.
1. CZARNECKA, A. M.; BARTNIK, E.: Mitochondrial DNA Mutations in tumors. In Cellular Respiration and Carcinogenesis. Edited by Apte SP, Saranganjan R. **New York City: Human Press**, 1-12, 2009.
2. CZARNECKA, A. M.; CAMPANELLA, C.; ZUMMO, G.; CAPPELLO, F.: Mitochondrial chaperones in cancer: from molecular biology to clinical diagnostics. **Cancer Biol Ther** 5:714-720, 2006.
3. CZARNECKA, A. M.; MARINO GAMMAZZA, A.; DI FELICE, V.; ZUMMO, G.; CAPPELLO, F: Cancer as a "Mitochondriopathy". **J Cancer Mol**, 3:71-79, 2007.
4. DIMAURO, S.; BONILLA, E.; MANCUSO, M.; FILOSTO, M.; SACCONI, S.; SALVATI, L.; HIRANO, M. Mitochondrial Myopathies. **Basic Appl Myol**, 13:145-155, 2003.
5. DIMAURO, S.; DAVIDZON, G. Mitochondrial DNA and disease. **Ann Med**, 37: 222-232, 2005.
6. DROGE, W.: Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, 82:47–95, 2002.
7. ERLANDSSON, R: Molecular genetics of renal cancer cell carcinoma. **Cancer Genet Cytogenet**, 104:1, 1998.

8. EDGE, S.B.; BYRD, D.R.; COMPTON, C.C.; FRITZ, A.G.; GREENE, F.L.; TROTTI, A. **AJCC cancer staging manual**. 7th ed. New York: Springer; Kidney; p.479-89, 2009.
9. EDGE, S.B.; BYRD, D.R.; FRITZ, A.G.; GREENE, F.L.; TROTTI, A. Cancer staging Manual. **AJCC cancer staging manual**. 7th ed. New York: Springer; Kidney; p.328-32, 2010.
10. EMER, J.J.; SOLOMON, S.; MERCER, S.E. Reed's syndrome: A case of multiple cutaneous and uterine leiomyomas. **J Clin Aesthet Dermatol**. 4(12):37-42, 2011.
11. FARAH, SOLANGE BENTO. **DNA segredos e mistérios**. 2^a ed. São Paulo: Sarvier, 2007.
12. FISHER, R.; GORE, M. L.J. Current and future system treatment for renal cell carcinoma. **Semin Cancer Biol**. 23(1): 38-45, 2013.
13. FUHRMAN, S.A.; LASKY, L.C.; LIMAS, C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. **Am J Surg Pathol** 6:655-63, 1982.
14. FICARRA, V.; GALFANO, A.; MANCINI, M. TNM staging system for renal cell carcinoma: current status and future perspectives. **Lancet Oncol** 8:554-8, 2007.
15. GAZIEV, A. L.; SHAIKHAIEV, G. O.: Nuclear mitochondrial pseudogenes. **Mol Biol. (Mosk)**, 44 (3), 405-17, 2010.
16. GEMMILL, R.M.; WEST, J.D.; BOLDOG, F.; TANAKA, N.; ROBINSON, L.J.; SMITH, D.I. et al. The hereditary renal cell carcinoma 3;8 translocation fuses FHIT to a patched-related gene, TRC8. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 95 (16): 9572-7, 1998.
17. HEDDI, A.; FAURE-VIGNY, H.; WALLACE, D.C.; STEPIEN, G.: Coordinate expression of nuclear and mitochondrial genes involved in energy production in carcinoma and oncocytoma. **Biochim. Biophys. Acta**, 1316, 203-209, 1996.

18. HUANG, W.C.; ELKIN, E.B.; LEVEY, A.S.; JANG, T.L.; RUSSO, P. Partial nephrectomy versus radical nephrectomy in patients with small renal tumors-is there a difference in mortality and cardiovascular outcomes. **J Urol**, 181:55-61, 2009.

19. HSU, T.B.A.; CORNELIUS, L.A.; ROSMAN, S.R.; NEMER, K.M.
Treatment of cutaneous leiomyomas with 5% lidocaine patches in a patient with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (Reed Syndrome). **JAAD Case Report**, 3:407-9, 2017.

20. ISHIKAWA, K.; TAKENAGA, K.; AKIMOTO, M.; KOSHIKAWA, N.; YAMAGUCHI, A.; IMANISHI, H.; NAKADA, K.; HONMA, Y.; HAYASHI, J: ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. **Science**, 320:661-664, 2008.

21. JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; MURRAY, T.; XU, J.; THUN MJ. Cancer Statistics. **Cancer J Clin**, 57 (1): 43 – 66, 2007.

22. JOHNS, D. R. Mitochondrial DNA and disease. **N Engl J Med**, 7:638-644, 1995.

23. JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, HAO Y, XU J, THUN MJ. Cancer Statistics. **Cancer J Clin**, 59 (1):225-49, 2009.

24. KLOSS-BRANDSTATTEA.;PACHER,SHONHERR,S.;WEISSENSTEINER, H.; BINNA, R.; SPECHT, G.; KRONENBERG, F. HaploGrep: a fast and reliable algorithm for automatic classification of mitochondrial DNA haplogroups. **Hum Mutat**, 31(1), 25-32, 2011.

25. KLATTE, T.; PANTUCK, A.J.; KLEID, M.D.; BELLDEGRUN, A.S.
Understanding the natural biology of kidney cancer: implications for targeted cancer therapy. **Rev Urol**, 9: 47-56, 2007.

26. LANDIS, S. H.; MURRAY, T.; BOLDEN, S.; WINGO, P. A. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, 49:8-31, 1999.
27. LEROY, X.Z.B.; BALLEREAU, C.; VILLERS, A.; AUBERT, S. Cell carcinoma with rhabdoid features: a aggressive neoplasm with overexpression of p53. **Arch Pathol Lab Med**, 131(1): 102-6, 2007.
28. LEE, H. C.; LI, S. H.; LIN, J. C.; WU, C. C.; YEH, D. C.; WEI, Y. H.: Somatic mutations in the D-loop and decrease in the copy number of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. **Mutat Res**, 547(1 – 2): 71 – 78, 2004.
29. LIPWORTH, L.; TARONE, R.E.; MCLAUGHLIN, J.K. The epidemiology of renal cell carcinoma. **J Urol** 176:2353-8, 2006.
30. LJUNBERG, B.; CAMPBELL S.C.; CHO, H.Y.; *et al.* The epidemiology of renal cell carcinoma. **Eur Urol**, 60:615–21, 2011.
31. MAHER, E. R.; ISELIUS, L.; YATES, J. R.; LITTLER, M.; BENJAMIN, C.; HARRIS, R.; *et al.* Von Hippel-Lidau disease: a genetic study. **J Med Genet**, 28:443-7, 1991.
32. MAMBO, A.; CHATTERJEE, M.; TALLINI, B.R. Tumor-specific changes in mtDNA content in human cancer. **Inter Jour Cancer**, 116: 920-924, 2005.
33. MCDONELL, L.; DROUIN, M.; BUREAU, T. E.: The abundance of processed pseudogenes derived from glycolytic genes is correlated with their expression level. **Genome**, (55), 147-151, 2012.
34. MEIERHOFER, D. ; MAYR, J. A. ; FOETSCHL, U. ; *et al.* . Decrease of mitochondrial DNA content and energy metabolism in renal cell carcinoma. **Carcinogenesis**, 25(6):1005–1010, 2004.
35. MERINO, M.J.; ECCLES, D.M.; LINEHAN, W.M.; *et al.* Familial renal cell carcinoma. *In*: EBLE, J.N; SAUTER, G.; EPSTEIN, J.I.; SESTERHENN, I.

editors. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon: **IARC Press**, 15-22, 2004.

36. MORAES, C. T.; DIMAURO, S.; ZEVIANI, M.; LOMBES, A.; SHANSKE, S.; MIRANDA, A. S.; NAKASE, H.; BONILLA, E.; WERNECK, L. C.; SERVIDEI, S.; NONAKA, I.; KOGA, Y.; SPIRO, A. J.; BROWNELL, A. K. W.; SCHIMITH, B.; SCHOTLAND, D. L.; ZUPANG, M.; DE VIVO, D. C.; SCHON, E.; ROWLAND, L. P. Mitochondrial DNA deletions in Progressive External Ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. **N Engl Med**, 320: 1293-99, 1989.

37. MOSTOFI, F. K.; DAVIS, C. J.: Histologic Typing of Kidney tumors. **Springer-Verlag**, 1998.

38. MURO, E. M.; MAH, N.; ANDRADE, N.: Functional evidence of post-transcriptional regulation by pseudogenes. **Biochimie**, 93, 1916-1921, 2011.

39. National Cancer Institute-U.S. National Institutes of Health; available at <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/kidney>, access in 2017 November.

40. PARK, C. B.; LARSSON, N. G. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. **J Cell Biol**, 193:809-818, 2011.

41. PETROS, J. A.; BAUMANN, A. K.; RUIZ-PESINI, E.; AMIN, M. B.; SUN, C. Q.; HALL, J.; LIM, S.; ISSA, M. M.; FLANDERS, W. D.; HOSSEINI, S.H.; MARSHALL, F. F.; WALLACE, D. C: mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. **Proc Natl Acad Sci USA**, 102:719-724, 2005.

42. PINK, R. C.; WICKS, K.; CALEY, D. P.; PUNCH, E. K.; JACOBS, L.; CARTER, D. R.: Pseudogenes: Pseudo-functional or key regulators in health and disease?. **RNA**, (17) 792-798, 2011.

43. POMPEO, A. C. L.; MARTINS, A. C. P.; SOUZA JR, A. E. P.; ABRANTES, A.S. ; *et al.* Diagnóstico e estadiamento. **Projeto Diretrizes**. Sociedade Brasileira de urologia SBU, 1-16, 2006.

44. RABBANI, F. *et al.*: Temporal change in risk of metachronous contralateral renal cell carcinoma: Influence of tumor characteristics and demographic factors. **J Clin Oncol**, 20:2370, 2002.

45. RALPH, S. J.; RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S.; NEUZIL, J.; SAAVEDRA, E.; MORENO-SANCHEZ: The causes of cancer revisited: “Mitochondria malignancy” and ROS-induced oncogenic transformation – Why mitochondria are targets for cancer therapy. **Mol Aspects Med**, 31:145-70, 2010.

46. SAMBROOK, J. F. E.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A laboratory manual**, 2^a ed. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

47. SANGKHATHAT, S.; KUSAFUKA, T.; YONEDA, A.; KURODA, S.; TANAKA, Y.; SAKAI, N.; FUKUZAWA, M.: Renal cell carcinoma in a pediatric patient with an inherited mitochondrial mutation. **Pediatric Surg Int**, 21 (9): 745-8, 2005.

48. SIMONNET, H.; ALAZARD, N.; PFEIFFER, K.; GALLOU, C.; BEROUD, C.; DEMONT, J.; BOUVIER, R.; SCHAGGER, H.; GODINOT, C. Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. **Carcinogenesis**. 23 (5): 759 – 768, 2002.

49. SUNDARAM, S. K.; SINHA, C. K.; SHANKAR, S.; ROBINSON, D. R.; WU, Y. M.; CAO, X.; ASANGANI, I. A.; KOTHARI, V.; PRENSNER, J. R.; LONIGRO, R. J.; LYER, M. K.; BARRETE, T.; SHANMUGAM, A.; DHANASEKARAN, S. M.; PALANISAMY, N.; CHINNAIYAN, A. M.:

Expressed pseudogenes in the transcriptional landscape of human cancers. **Cell**, 149, 1622-1634, 2012.

50. TOURMEN, Y.; BARIS, O.; DESSEN, P.; JACQUES, C.; MALTHIERY, Y.; REYNIER, P.: Structure and Chromosomal distribution of Human Mitochondrial pseudogenes. **Genomics**, (80):1, 71-77, 2002.
51. TSENG, L. M.; YIN, P.H.; CHI, C.W.; *et al.*; Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in breast cancer. **Genes Chromosomes Cancer** 45(7): 629 – 638, 2006.
52. VOLPE, A.F.A.; GILL, I.S. Rationale for percutaneous biopsy histologic characterization of renal tumors. **Eur Urol** , 62:491-504, 2012.
53. WALLACE, D. C.: A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. **Annu Rev Genet**, 39:359-407, 2005.
54. WANG, Y.; LIU, V. W.; XUE, W. C.; CHEUNG, A. N.; NGAN, H. Y.: Association of decreased mitochondrial DNA content with ovarian cancer progression. **Br J Cancer**, 95(8): 1087 – 1091, 2006.
55. WU, C. W.; YIN, P. H.; HUNG, W. Y.; *et al.* Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in gastric cancer. **Genes Chromosomes Cancer**, 44 (1):19 – 28, 2005.
56. WUNSCH, F. V. Insight on diagnosis, prognosis and screening of renal cell carcinoma. **São Paulo Med J**, 120: 163-4, 2002.
57. HOWLADER, N., NOONE, AM., KRAPCHO, M., *et al.* **SEER Cancer Statistics Review**, 1975-2009, 2012.

58. XING, J.; CHEN, M.; WOOD, C. G.; LIN, J.; SPITZ, M. R.; MA, J.; AMOS, C. I.; SHIELDS, P.G.; BENOWITZ, N. L.; GU, J.; DE ANDRADE, M.; SWAN GE, W. U. X. Mitochondrial DNA Content: Its Genetic Heritability and Association With Renal Cell Carcinoma. **J Natl Cancer Inst**, 100: 1104 – 1112, 2008.
59. ZBAR, B. *et al.*: Hereditary papillary renal cell carcinoma. **J Urol**, 151-561, 1994.
60. ZHANG, Z.; GERSTEIN, M.: Large-scale analysis of pseudogenes in the human genome. **Curr. Opin. Genet. Dev**, 14, 328-335, 2004.
61. ZHANG, Z.; GERSTEIN, M.: The human genome has 49 cytochrome *c* pseudogenes, including a relic of a primordial gene that still functions in mouse. **Gene**, (312), 61-72, 2003.

GRAU	CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA FUHRMAN
I	Núcleo arredondado e uniforme, com cerca de 10µm de diâmetro e nucléolo ausente/pequeno.
II	Núcleo levemente irregular, com diâmetro de 15µm e nucléolo visível, mas pequeno.
III	Núcleo moderadamente irregular, com diâmetro de 20µm e nucléolo grande.
IV	Núcleo acentuadamente irregular/ pleomórfico e formas multilobulares, com cromatina agrupada e diâmetro maior que 20µm.

FONTE: FUHRMAN *et al.*, 1982.

Sistema de estadiamento TMN para o câncer renal:

TUMOR PRIMÁRIO (T)	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Nenhuma evidência de tumor primário
T1	Tumor ≤ 7 cm na maior dimensão, limitado ao rim
T1a	Tumor ≤ 4 cm na maior dimensão, limitado ao rim
T1b	Tumor > 4 cm mas ≤ 7 cm na maior dimensão, limitado ao rim
T2	Tumor > 7 cm na maior dimensão, limitado ao rim
T2a	Tumor > 7 cm mas ≤ 10 cm na maior dimensão, limitado ao rim
T2b	Tumor > 10 cm, limitado ao rim
T3	O tumor se estende em veias principais ou tecidos perinefricos, mas não na glândula adrenal ipsilateral e não além da fáscia de Gerota
T3a	O tumor se estende grosseiramente na veia renal ou seus ramos segmentares (contendo músculos), ou o tumor invade a gordura do seio perirrenal e / ou renal, mas não além da fáscia de Gerota
T3b	O tumor se prolonga grosseiramente na veia cava abaixo do diafragma
T3c	O tumor se prolonga grosseiramente na veia cava acima do diafragma ou

	invade a parede da veia cava
T4	O tumor invade além da fáscia de Gerota (incluindo extensão contígua na glândula adrenal ipsilateral)
LINFONODOS REGIONAIS (N)	
Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástases linfonodais regionais
N1	Presença de metástase em linfonodos regionais
METÁSTASES À DISTÂNCIA (M)	
M0	Ausência de metástases
M1	Presença de metástases

Fonte: adaptado de ADGE *et al.*, 2010

PACIENTE 1- PATOGENICIDADE

MtDNA-(SI) TUMOR PAC1

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	PATOGENICIDADE (>15) patogênico (< 15) neutro CADD SCORE
MT-ATP8	8448	T>C	M-T	0,96
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	21,9
MT-ND5	13759	G>A	A-T	0,69
MT-CYB	15326	A>G	T-A	4,2

Mt-DNA(CI) TUMOR PAC1

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	PATOGENICIDADE (>15) patogênico (< 15) neutro CADD SCORE
MT-ATP8	8448	T>C	M-T	0,96
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	21,9
MT-ND5	13759	G>A	A-T	0,69
MT-CYB	15326	A>G	T-A	4,2

mtDNA(CI) PARENQUIMA RENAL PAC 1

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	PATOGENICIDADE (>15) patogênico (< 15) neutro CADD SCORE
MT-ND2	5460	G>A	A-T	9,2
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	21,9
MT-TL2	12315	G>A	tRNA-Leu	2,7
MT-CYB	15326	A>G	T-A	4,2

mtDNA(SI) PARENQUIMA RENAL PAC 1

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	PATOGENICIDADE (>15) patogênico (< 15) neutro CADD SCORE
MT-ND2	5460	G>A	A-T	9,2
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	21,9
MT-TL2	12315	G>A	tRNA-Leu	2,7
MT-CYB	15326	A>G	T-A	4,2

PACIENTE 2- PATOGENICIDADE
mtDNA(SI)TUMOR PAC 2

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	PATOGENICIDADE (>15) patogênico (< 15) neutro CADD SCORE
MT-ND2	4824	A>G	T-A	8,4
MY-CO2	8027	G>A	A-T	6,8
MT-ATP6	8794	C>T	H-Y	15,7
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	21,9
MT-ATP6	8989	G>A	A-T	3,75
MT-ND4	11592	G>A	R-Q	24,4
MT-CYB	14766	C>T	T-I	9,6
MT-CYB	15326	A>G	T-A	4,2

mtDNA (CI) TUMOR PAC 2

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	PATOGENICIDADE (>15) patogênico (< 15) neutro CADD SCORE
MT-ND2	4824	A>G	T-A	8,4
MY-CO2	8027	G>A	A-T	6,8
MT-ATP6	8794	C>T	H-Y	15,7
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	21,9
MT-ATP6	8989	G>A	A-T	3,75
MT-CYB	14766	C>T	T-I	9,6
MT-CYB	15326	A>G	T-A	4,2

mtDNA (SI) PARÊNQUIMA PAC 2

<i>Gene</i>	<i>Posição</i>	<i>Troca de nucleotídeo</i>	<i>Troca de aminoácido</i>	PATOGENICIDADE (>15) patogênico (< 15) neutro CADD SCORE
MT-ND2	4824	A>G	T-A	8,4
MY-CO2	8027	G>A	A-T	6,8
MT-ATP6	8794	C>T	H-Y	15,7
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	21,9
MT-ATP6	8989	G>A	A-T	3,75
MT-CYB	14766	C>T	T-I	9,6
MT-CYB	15326	A>G	T-A	4,2

mtDNA (CI) PARENQUIMA PAC 2

<i>Gene</i>	<i>Posição</i>	<i>Troca de nucleotídeo</i>	<i>Troca de aminoácido</i>	PATOGENICIDADE (>15) patogênico (< 15) neutro CADD SCORE
MT-ND2	4824	A>G	T-A	8,4
MY-CO2	8027	G>A	A-T	6,8
MT-ATP6	8794	C>T	H-Y	15,7
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	21,9
MT-ATP6	8989	G>A	A-T	3,75
MT-CYB	14766	C>T	T-I	9,6
MT-CYB	15326	A>G	T-A	4,2

PAC 3-PATOGENICIDADE

mtDNA (SI) TUMOR PAC 3

<i>Gene</i>	<i>Posição</i>	<i>Troca de nucleotídeo</i>	<i>Troca de aminoácido</i>	PATOGENICIDADE (>15) patogênico (< 15) neutro CADD SCORE
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	21,9
MT-ND3	10324	T>C	M-T	0,69
MT-ND4	11177	C>T	P-S	8,6
MT-ND5	13708	G>A	A-T	1,25
MT-ND5	13780	A>G	I-V	1,28
MT-CYB	14766	C>T	T-I	9,6
MT-CYB	15326	A>G	T-A	4,2

mtDNA (CI) TUMOR PAC 3

<i>Gene</i>	<i>Posição</i>	<i>Troca de nucleotídeo</i>	<i>Troca de aminoácido</i>	PATOGENICIDADE (>15) patogênico (< 15) neutro
-------------	----------------	-----------------------------	----------------------------	--

	CADD SCORE			
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	21,9
MT-ND3	10324	T>C	M-T	0,69
MT-ND4	11177	C>T	P-S	8,6
MT-ND5	13708	G>A	A-T	1,25
MT-ND5	13780	A>G	I-V	1,28
MT-CYB	14766	C>T	T-I	9,6
MT-CYB	15326	A>G	T-A	4,2

mtDNA (SI) PARÊNQUIMA PAC 3

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	PATOGENICIDADE (>15) patogênico (< 15) neutro CADD SCORE
MT-ND1	3547	A>G	I-V	0,94
MT-ND1	4012	A>G	T-A	0,52
MT-ND1	4232	T>C	I-T	12
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	21,9
MT-ND3	10324	T>C	M-T	0,69
MT-ND4	11177	C>T	P-S	8,6
MT-ND5	13708	G>A	A-T	1,25
MT-ND5	13780	A>G	I-V	1,28
MT-CYB	14766	C>T	T-I	9,6
MT-CYB	15326	A>G	T-A	4,2

mtDNA (CI) PARÊNQUIMA PAC 3

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	PATOGENICIDADE (>15) patogênico (< 15) neutro CADD SCORE
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	21,9
MT-ND3	10324	T>C	M-T	0,69
MT-ND4	11177	C>T	P-S	8,6
MT-ND5	13708	G>A	A-T	1,25
MT-ND5	13780	A>G	I-V	1,28
MT-CYB	14766	C>T	T-I	9,6
MT-CYB	15326	A>G	T-A	4,2

PACIENTE 4- PATOGENICIDADE

mtDNA (SI) DO TUMOR.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	PATOGENICIDADE (>15) patogênico (< 15) neutro CADD SCORE
MT-ND2	5460	G>A	A-T	9,2

MT-ATP8	8448	T>C	M-T	0,96
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	21,9
MT-CYB	15326	A>G	T-A	15,7

mtDNA (CI) TUMOR

<i>Gene</i>	<i>Posição</i>	<i>Troca de nucleotídeo</i>	<i>Troca de aminoácido</i>	<i>PATOGENICIDADE (>15) patogênico (< 15) neutro CADD SCORE</i>
MT-ND1	3391	G>A	G-S	0,48
MT-ND2	5460	G>A	A-T	9,2
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	21,9
MT-CYB	15326	A>G	T-A	4,2

mtDNA (SI) PARENQUIMA

<i>Gene</i>	<i>Posição</i>	<i>Troca de nucleotídeo</i>	<i>Troca de aminoácido</i>	<i>PATOGENICIDADE (>15) patogênico (< 15) neutro CADD SCORE</i>
MT-ND2	5460	G>A	A-T	9,2
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	21,9
MT-CYB	15326	A>G	T-A	4,2

mtDNA (CI) PARENQUIMA

<i>Gene</i>	<i>Posição</i>	<i>Troca de nucleotídeo</i>	<i>Troca de aminoácido</i>	<i>PATOGENICIDADE (>15) patogênico (< 15) neutro CADD SCORE</i>
MT-ND2	5460	G>A	A-T	9,2
MT-ATP6	8860	A>G	T-A	21,9
MT-CYB	15326	A>G	T-A	4,2