

**MESTRADO EM MEDICINA E ONCOLOGIA MOLECULAR DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO**



**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES
DO ADN MITOCONDRIAL E DO GRIM-19
EM ONCOCITOMAS RENAIIS: COMPARAÇÃO COM OS
TUMORES DE CÉLULAS DE HÜRTHLE DA TIREÓIDE**

Raquel Vilar Portugal

**PORTO
2007**

RESUMO EM PORTUGUÊS

Os oncocitomas renais são constituídos por células cujo citoplasma contém numerosas mitocôndrias, morfológica e bioquimicamente anormais (células oxifílicas, oncocíticas ou células de Hürthle). Tumores com fenótipo oncocítico, condicionado pela acumulação de mitocôndrias, podem ocorrer em diversos órgãos, preferencialmente em tecidos com baixo índice proliferativo. Na tireóide, onde são denominados tumores de células de Hürthle, foram identificadas alterações do ADN mitocondrial (mtDNA) e de um gene nuclear que codifica uma proteína mitocondrial (GRIM-19), com diferenças significativas em comparação com tumores não oncocíticos. Nos oncocitomas renais não há, até à data, estudos que descrevam a ocorrência destas alterações.

A acumulação de mitocôndrias no citoplasma das células pode ser consequência de uma alteração primária no mtDNA que codifica enzimas mitocondriais, ou provocada por mutações no ADN nuclear (nDNA) que codifica proteínas mitocondriais.

Na tentativa de perceber melhor a tumorigénese dos tumores oncocíticos em geral e dos oncocitomas renais em particular, estudámos uma série de 14 oncocitomas renais e o parênquima renal não neoplásico adjacente, no que diz respeito a algumas alterações do mtDNA e do nDNA. Foi efectuada a reavaliação do material anátomo-patológico e fez-se extracção de ADN dos tecidos obtidos após microdissecção do material incluído em parafina. Foram pesquisadas alterações do mtDNA como a deleção comum, mutações na região D-loop e nas subunidades 6 e 8 do complexo V (ATPase). As alterações do GRIM-19 foram avaliadas por estudo imuno-histoquímico.

A deleção comum foi detectada em 78,6% dos oncocitomas renais e em 50% dos casos também no parênquima não neoplásico. Verificou-se instabilidade na região não codificadora D-loop em 42,9% dos tumores. Foram identificadas mutações somáticas da ATPase 6 e/ou 8 em 14,3% dos casos. A expressão de GRIM-19 nos oncocitomas renais foi discretamente menos intensa do que a observada nas células dos túbulos proximais adjacentes.

As alterações encontradas no mtDNA de oncocitomas renais não se afastam substancialmente das observadas anteriormente no estudo de tumores de células de Hürthle da tireóide, tanto no que diz respeito ao tipo de alterações, como à sua frequência.

A homogeneidade celular fenotípica dos oncocitomas renais e a notável transformação oncocítica observada no parênquima renal não neoplásico na maioria (12/14) dos casos estudados leva a presumir que o evento “carcinogénico” deverá ter ocorrido numa célula com anomalia prévia do mtDNA ou do nDNA que codifica enzimas mitocondriais. Esta hipótese é favorecida pela existência da deleção comum no parênquima renal não neoplásico numa maior percentagem de casos (50%) que a observada no parênquima não neoplásico tireoideu nos casos de tumores de células de Hürthle (25-33%). É possível que a deleção comum seja um marcador das alterações que ocorrem na biogénese mitocondrial nestas condições.

As mutações na ATPase 6 parecem ocorrer preferencialmente nos tumores de células oxifílicas, pelo menos do rim e da tireóide. Os nossos resultados não favorecem a existência de um papel determinante para a instabilidade na região não codificadora D-loop na transformação oncocítica, apesar dessa alteração estar presente em 42,9% dos tumores. É provável que as mutações na região D-loop resultem, sobretudo, da produção aumentada de espécies reactivas de oxigénio pelas células tumorais em geral.

A função principal do GRIM-19 na tumorigénese renal não parece estar relacionada com a cadeia respiratória mitocondrial, ou pelo menos, não parece estar relacionada com o fenótipo oncocítico, uma vez que a expressão de GRIM-19 está significativamente mais afectada nos carcinomas de células renais que nos oncocitomas.

RESUMO EM INGLÊS

Renal oncocytomas are composed by cells whose cytoplasm is packed with an abnormally high number of biochemically and morphologically deficient mitochondria (oxyphilic, oncocytic or Hürthle cells). Tumours with an oncocytic phenotype, resulting from mitochondria accumulation, may occur in many organs, predominantly in tissues with low proliferation index. In the thyroid, where they are called Hürthle cell tumours, our group has identified alterations in the mitochondrial DNA (mtDNA) and in a nuclear gene that encodes for a mitochondrial protein (GRIM-19), with significant differences when compared to non-oncocytic tumours. Regarding renal oncocytomas there are no publications describing the occurrence of such alterations.

The mitochondria accumulation in the cytoplasm of cells may be the result of a primary alteration in mtDNA that encodes for mitochondrial enzymes, or it can be a consequence of mutations in nuclear DNA (nDNA) that encodes for mitochondrial proteins.

In an attempt to contribute to a better understanding of the tumourigenesis of oxyphilic cell tumours in general and of renal oncocytomas in particular, we studied 14 renal oncocytomas and the respective non neoplastic parenchyma regarding some mtDNA and nDNA alterations. The cases were reviewed and DNA extraction was performed in microdissected tissues obtained from the paraffin-embedded material. We searched for mtDNA alterations such as the common deletion, mutations in the D-loop non codifying region and in the subunits 6 and 8 of complex V (ATPase). GRIM-19 alterations were evaluated by immunohistochemistry.

The mtDNA common deletion was detected in 78.6% of renal oncocytomas and in 50% of the cases in the respective non neoplastic parenchyma. Instability in the D-loop region was detected in 42.9% of the tumours. We identified somatic mutations in ATPase 6 and/or 8 in 14,3% of the cases. GRIM-19 expression was slightly less intense in the oncocytomas than in the adjacent proximal renal tubules.

Our results do not differ substantially from those obtained in Hürthle cell tumours of the thyroid, namely in the kind of alteration and its relative frequency.

The homogenous cellular phenotype of renal oncocytomas and the obvious oncocytic transformation observed in the non neoplastic renal parenchyma in most of the studied cases (12/14) indicates that the “carcinogenic” event must have occurred in a

cell with a previous anomaly of mtDNA and/or nDNA that encodes for mitochondrial enzymes. This hypothesis is favoured by the presence of the common deletion in a higher percentage of the non-neoplastic parenchyma of oncocytomas (50%) than in non-neoplastic thyroid parenchyma in the cases of Hürthle cell tumours (25-33%). It is possible that the common deletion may be an indirect biomarker of the alterations occurring in mitochondrial biogenesis in these conditions.

Mutations in ATPase 6 seem to occur predominantly in oxiphylic cell tumours, at least in kidney and thyroid. Our results do not favour the existence of a determinant role for the instability of the non codifying D-loop region in the oncocyctic transformation, despite finding such alterations in 42.9% of the tumours. It is probable that mutations in the D-loop region are mainly the result of increased reactive oxygen species production by tumoural cells in general.

The main role of GRIM-19 in renal tumourigenesis does not seem to be related to the mitochondrial respiratory chain, or at least, does not seem to be related with oncocyctic features, since the expression of GRIM-19 is significantly more affected in renal cell carcinomas than in oncocytomas.