



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR**

SYMARA RODRIGUES ANTUNES

**ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS E TUMORIGÊNESE DE
CÂNCER GÁSTRICO EM *Sapajus apella*.**

**BELÉM – PARÁ
2018**

SYMARA RODRIGUES ANTUNES

ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS E TUMORIGÊNESE DE
CÂNCER GÁSTRICO EM *Sapajus apella*.

Tese de Doutorado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Biologia Celular da
Universidade Federal do Pará como
requisito parcial para obtenção do
grau de Doutorado em Neurociências
e Biologia Celular.

Orientadora: Profa Dra. Bárbara do
Nascimento Borges

Belém/PA
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A627a Antunes, Symara Rodrigues
ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS E TUMORIGÊNESE DE CÂNCER GÁSTRICO EM Sapajus
apella. / Symara Rodrigues Antunes. — 2018
83 f. : il. color
- Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia celular
(PPGNBC), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Barbara do Nascimento Borges
1. câncer. 2. DNA mitocondrial. 3. mitocôndrias. 4. câncer gástrico. 5. MNU. I. Borges, Barbara
do Nascimento , *orient.* II. Título
-

CDD 616.994

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

SYMARA RODRIGUES ANTUNES

ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS E TUMORIGÊNESE DE CÂNCER
GÁSTRICO EM *Sapajus apella*.

Tese de doutorado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação de Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Neurociências e Biologia Celular, sob avaliação:

Orientadora:

Profa. Dra. Bárbara do Nascimento Borges

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Matos Carvalho Bastos (Membro Titular)
ICB - Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Danielle Cristine Azevedo Feio (Membro Titular)
Faculdade Metropolitana da Amazônia – FAMAZ

Profa. Dra. Maria Lúcia Harada (Membro Titular)
ICB - Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano (Suplente)
ICB - Universidade Federal do Pará

“Existe uma teoria que diz que, se um dia alguém descobrir exatamente para que serve o universo e por que ele está aqui, ele desaparecerá instantaneamente e será substituído por algo ainda mais estranho e inexplicável”.

“Existe uma segunda teoria que diz que isso já aconteceu”.

Douglas Adams

Dedico este trabalho aquela que me transmitiu as mitocôndrias que estão em minhas células, aquela que me ensinou o que é amar e àqueles a quem transmiti as mitocôndrias de mulheres guerreiras.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

INSTITUIÇÕES

- Universidade Federal do Pará (UFPA) – Laboratório de Biologia Molecular Francisco Mauro Salzano, Instituto de Ciências Biológicas.
- Universidade Federal do Pará (UFPA) – Laboratório de Citogenética Humana.
- Centro Nacional de Primatas (CENP) - Ministério da Saúde.

FONTES FINANCIADORAS

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – bolsa de doutorado.
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

Foi uma longa jornada chamada pós-graduação. E esta última estrada, o Doutorado, foi mais longa ainda. Muitas foram as pessoas que passaram em minha vida e me acompanharam, me ajudaram e me incentivaram. Com toda a certeza não conseguirei colocar aqui toda a gratidão que eu tenho por todos que me ajudaram nesse caminho para chegar a este título de “Ditora”.

Em primeiro lugar agradeço a Deus pelas oportunidades e dificuldades que colocou em meu caminho. Obrigada à minha mãe, Nea Farache por todo o esforço (que não foi pouco), para que eu tivesse uma excelente educação e com isso conseguisse alcançar meus objetivos. Agradeço ainda à minha mãe de coração, Dora, que apesar de não estar mais aqui fisicamente conosco, sei que com certeza onde estiver está muito feliz por mais esta conquista.

Ao meu marido, não tenho palavras para agradecer. Ele foi meu alicerce quando achei que não daria conta. Obrigada pelo incentivo inicial desde o mestrado para que eu não desistisse dos sonhos. Obrigada pela ajuda extraordinária, pela coragem que eu não tive em certos momentos, por me levantar quando eu caí. Aos meus filhos sou imensamente grata pela paciência que nem eles sabem que tem, mas foram muitos finais de semana, férias, feriados e dias que tive que dizer “hoje não”.

Obrigada aos amigos antigos, Elaine Pereira e Mariana Diniz, que mesmo distantes, sempre apoiaram essa loucura de fazer pós-graduação. Obrigada aos amigos “novos” que tem me aturado nos dias de “não vai dar certo” e me apoiaram para que eu chegasse ao dia que deu certo. Afinal, como as queridas professoras do Labiomol, Prof Claudia e Prof Margarida Lima dizem: tudo dá certo quando o fim está próximo! E o fim chegou.

Aos meus companheiros da FAMAZ que já não aguentavam escutar sobre o doutorado que não acabava e pelos minutos de cafezinho para me ajudarem em várias questões. Obrigada Carlos Marques, Allan Malaquias, Jevanne, Gilson, Katarine, Bruna, Renata, Livia, Laine, Izabela Guerreiro, entre

tantos e tantos que me ajudaram e me incentivaram, ou simplesmente escutaram meus choros (que foram tantos!).

Agradeço também à coordenação de Pós-Graduação de Neurociências e Biologia Celular, à UFPA e à Capes pela concessão de bolsa de estudos.

A todos que em algum momento me ajudaram e torceram por mim, só tenho a agradecer.

Sumário

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS	vi
AGRADECIMENTOS	vii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUÇÃO	16
CAPÍTULO I.	18
BASES TEÓRICAS DOS PROCESSOS NEOPLÁSICOS	18
1. CICLO CELULAR E PROCESSO NEOPLÁSICO	18
2. BIOLOGIA MOLECULAR DO CÂNCER.....	22
CAPÍTULO II.....	25
O CÂNCER GÁSTRICO	25
1. EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA.	25
2. CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MOLECULAR DO CÂNCER GÁSTRICO.....	29
3. FATORES GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS ASSOCIADOS À CARCINOGENESE GÁSTRICA.....	33
CAPÍTULO 3.....	38
MODELOS EXPERIMENTAIS EM PESQUISAS ONCOLÓGICAS.....	38
CAPÍTULO IV.....	42
ALTERAÇÕES NO mtDNA, CARCINOGENESE GÁSTRICA E DIAGNÓSTICO PRECOCE.	42
JUSTIFICATIVA.....	52
OBJETIVOS.....	54
OBJETIVO GERAL	54
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
MATERIAIS E MÉTODOS	55

AMOSTRAS E DESENHO EXPERIMENTAL	55
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	57
MODELO DE ALTERAÇÃO DA PROTEÍNA.....	58
ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	58
CAPÍTULO V.....	59
RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
CONCLUSÕES	71
BIBLIOGRAFIA	72
ANEXO: APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA - PARECER MED002-10	86

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2018 POR SEXO, EXCETO PELE NÃO MELANOMA*.....	17
FIGURA 2: CICLO CELULAR E SUAS FASES.	18
FIGURA 3 - AS MARCAS DO CÂNCER PROPOSTAS EM 2011 POR HANNAHAN E WEINBERG	22
FIGURA 4 – INCIDÊNCIA DO CÂNCER GÁSTRICO AO REDOR DO MUNDO.....	25
FIGURA 5 – INCIDÊNCIA DE CASOS DE CÂNCER GÁSTRICO NOS DIFERENTES ESTADOS DO BRASIL, APRESENTANDO SUA DISTRIBUIÇÃO DISTINTA ENTRE HOMENS E MULHERES.	26
FIGURA 6 - CARCINOGENESE PROMOVIDA POR <i>H. PYLORI</i>	28
FIGURA 7 - ANATOMIA E HISTOLOGIA DO ESTÔMAGO HUMANO.	29
FIGURA 8 - CORTES HISTOPATOLÓGICOS DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO DO TIPO DIFUSO (SEGUNDO CLASSIFICAÇÃO DE LAUREN, 1965), CORADOS EM H&E.	30
FIGURA 9 – CASCATA PRÉ-CANCEROSA PROPOSTA POR CORREA, EM 1975.	31
FIGURA 10 – ADENOCARCINOMA GÁSTRICO DO TIPO INTESTINAL. TRÊS TIPOS TUMORAIS SÃO MOSTRADOS COM FORMAÇÃO IRREGULAR DE GLÂNDULAS, TÚBULOS E PAPILAS.	32
FIGURA 11 – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS SUBTIPOS DE CARCINOMAS GÁSTRICOS. CIN= TUMOR COM INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA. EBV= TUMORES INFECTADOS POR EPSTEIN-BARR. CIMP= FENÓTIPO DE ILHAS CpG METILADAS MSI = TUMORES COM INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITE.	33
FIGURA 12 – ALTERAÇÕES GENÉTICAS E EPIGENÉTICAS ASSOCIADAS AO CÂNCER GÁSTRICO.	35
FIGURA 13 - ESTRUTURA QUÍMICA DO MNU (N-METIL-N-NITROSUREA).....	39
FIGURA 14 - REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE MNU A PARTIR DA CREATININA.....	40
FIGURA 15 – CROMATOGRAMA DO GENE ND1 EVIDENCIANDO A MUDANÇA DE UMA CITOCINA PARA TIMINA, CORRESPONDENTE À POSIÇÃO 3594 DO mTDNA. NO CROMATOGRAMA SUPERIOR É APRESENTADO A AMOSTRA PG100-7, SEM A ALTERAÇÃO, E NO INFERIOR A AMOSTRA ACP03-14, COM ALTERAÇÃO.	61

FIGURA 16 – CROMATOGRAMA EVIDENCIANDO ALTERAÇÕES NO GENE <i>ND1</i> LEVANDO À MUDANÇA DE UMA GUANINA PARA ADENOSINA NA POSIÇÃO 3693 DO <i>MTDNA</i> . NA PARTE SUPERIOR DA FIGURA OBSERVAMOS O CROMATOGRAMA DA AMOSTRA PG100-7, SEM A ALTERAÇÃO, E NA PARTE INFERIOR DA AMOSTRA ACP03-14, ALTERADA.	63
FIGURA 17 – CROMATOGRAMA EVIDENCIANDO ALTERAÇÃO NO GENE <i>ND3</i> DE GUANINA PARA ADENOSINA, NA POSIÇÃO 10398 DO <i>MTDNA</i> . NA PORÇÃO SUPERIOR, CROMATOGRAMA DA AMOSTRA PG100-7, SEM A ALTERAÇÃO, E NA PARTE INFERIOR A AMOSTRA ACP03-14, ALTERADA.	63
FIGURA 18 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS PROTEÍNAS CODIFICADAS PELO GENE <i>ND3</i>	65
FIGURA 19 – CROMATOGRAMA EVIDENCIANDO A ALTERAÇÃO NO GENE <i>ND3</i> DE GUANINA PARA ADENOSINA, NA POSIÇÃO 10398 DO <i>MTDNA</i> . PORÇÃO SUPERIOR DA FIGURA CORRESPONDE À AMOSTRA PG100-7, SEM A ALTERAÇÃO E NA PARTE INFERIOR A AMOSTRA PG100-MNU.	66
FIGURA 20 – CROMATOGRAMA EVIDENCIANDO A HETEROPLASMIA NO GENE <i>ND1</i> NA POSIÇÃO 3594 DO <i>MTDNA</i> . CROMATOGRAMA SUPERIOR DA AMOSTRA PG100-7, SEM A ALTERAÇÃO E NA PARTE INFERIOR A AMOSTRA PG100-MNU.	68
FIGURA 21 – CROMATOGRAMA EVIDENCIANDO A HETEROPLASMIA NA POSIÇÃO 3698. CROMATOGRAMA SUPERIOR DA AMOSTRA PG100-7, SEM ALTERAÇÃO E NA PARTE INFERIOR DA AMOSTRA PG100-MNU.	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS DE LINHAGENS INOCULADAS EM <i>SAPAJUS APELLA</i>	56
TABELA 2 - INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS COM AS RESPECTIVAS REFERENCIAS DE ORIGEM DAS SEQUENCIAS.	57
TABELA 3 – AMOSTRAS COM OS SEUS RESPECTIVOS GENES ANALISADOS E RESULTADOS OBTIDOS POR GENE. NP=POSIÇÃO DE NUCLEOTÍDEO	59
TABELA 4 – RELAÇÃO DE AMOSTRAS DE LINHAGENS ASSOCIADAS COM AS ALTERAÇÕES EM GENES MITOCONDRIAIS ENCONTRADAS. ESTÁ INDICADO A ALTERAÇÃO DE AMINOÁCIDOS RELACIONADO A ALTERAÇÕES DE UMA ÚNICA BASE IDENTIFICADAS NAS AMOSTRAS.....	61
TABELA 5 – HETEROPLASMIAS IDENTIFICADAS NA AMOSTRA PG100-MNU DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO	67

RESUMO

Câncer é o nome dado a uma variedade de doenças que podem ocorrer em diferentes regiões do corpo, que se caracteriza principalmente pela proliferação desregulada de células. Uma organela muito importante, tanto em células normais quanto em células mutadas, é a mitocôndria, responsável pela maior parte da produção de ATP na célula. Mutações no DNA mitocondrial podem acarretar apoptose ou influenciar na eficiência da formação de ATP. Considerando diversas estimativas diferentes, o câncer gástrico sempre figura entre os cinco mais incidentes na população mundial, bem como na população brasileira e paraense. Dessa forma, entender o comportamento tumoral torna-se importante para o combate dessa patologia. O objetivo do trabalho, portanto, é analisar a presença de alterações no DNA mitocondrial de linhagens de carcinoma gástrico implantadas em um modelo animal. Foram analisados quatro genes mitocondriais (*COI*, *ATPase 8*, *ND1* e *ND3*) de quatro linhagens de câncer gástrico (AGP01, ACP02, ACP03 e PG100) e uma controle (Carcinossarcoma 256 de Walker) para avaliar as possíveis mutações do DNA mitocondrial. Essas linhagens foram inoculadas em primatas não humanos da espécie *Sapajus apella*, sendo que alguns animais receberam concomitantemente com as linhagens a substância carcinogênica N-metil-N-nitrosurea (MNU). Os tumores gástricos que se desenvolveram nos animais foram retirados cirurgicamente, após isso foi feita a extração do DNA, amplificação e sequenciamento das sequências de interesse. Foram observadas alterações nos genes *ND1* e *ND3*. As duas transições encontradas em *ND1*, uma na posição 3594 (C→T) e 3693 (G→A) do DNA mitocondrial, não possuíam registro associado a nenhuma patologia, tendo sido relacionadas com marcadores populacionais. Os resultados sugerem que alterações nos genes codificadores de proteínas que participam do Complexo I da cadeia respiratória são mais frequentes que em outras porções do mtDNA nas linhagens de carcinoma gástrico analisadas.

Palavras chaves: câncer, DNA mitocondrial, mitocôndrias, câncer gástrico, MNU.

ABSTRACT

Cancer is the name given to a variety of diseases that can occur in different regions of the body, which is characterized primarily by the deregulated proliferation of cells. A very important organelle in both normal and mutated cells is mitochondria, responsible for most of the ATP production in the cell. Mutations in mitochondrial DNA can lead to apoptosis or influence the efficiency of ATP formation. Considering several different estimates, gastric cancer still in the five most incidental in world population, as well as in Brazilian and local population. In this way, understanding tumor behavior becomes important for fight against this pathology. With this, the objective of the present work was to analyze presence of mitochondrial DNA alterations of gastric carcinoma lines implanted in an animal model. Four mitochondrial genes (COI, ATPase 8, ND1 and ND3) from four gastric cancer strains (AGP01, ACP02, ACP03 and PG100) and one control (Carcinossarcoma 256 from Walker) were analyzed to evaluate possible mitochondrial DNA mutations. These strains were inoculated in non-human primates of the *Sapajus apella* species, and some animals received the carcinogenic substance N-methyl-N-nitrosurea (MNU) concomitantly with the strains. The gastric tumors that developed in the animals were surgically removed, after which DNA extraction, amplification and sequencing of the sequences of interest were done. Changes were observed in the ND1 and ND3 genes. The two transitions found in ND1, one at position 3594 (**C→T**) and 3693 (**G→A**) of mitochondrial DNA, had no associated pathological record and were related to population markers. The **A→G** transition at position 10398 of the ND3 gene resulted in the change from one threonine to alanine in the resulting amino acid, only in lines with more aggressive behavior or after MNU administration. Two heteroplasms were also identified in the ND1 gene at positions 3594 (C / T) and 3693 (A / G) only in the PG100 line after MNU, suggesting a difference in the DNA repair system of this line compared to the others. The results suggest that changes in the genes encoding proteins that participate in Complex I of the respiratory chain are more frequent than in other portions of the mtDNA in the analyzed gastric carcinoma strains.

Keywords: câncer, gastric cancer, mitochondria, mtDNA, MNU.

INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças crônicas não-transmissíveis, de impacto social devastador e considerado um problema de saúde pública mundial. Em 2012 foram estimados mais de 14 milhões de novos casos de câncer (excetuando o câncer de pele não melanoma) no mundo, sendo que deste total, mais de 60% dos casos ocorreriam em países em desenvolvimento. Com relação às taxas de mortalidade, este mesmo projeto estimou que 70% de um total de 8 milhões das mortes previstas ocorreriam nestes mesmos países (FERLAY, *et al.*, 2013). A Organização Mundial de Saúde, estima que ocorrerão cerca de 20 milhões de novos casos de câncer até 2025, sendo que 80% ocorrerão em países em desenvolvimento (HOWLADER, *et al.*, 2017).

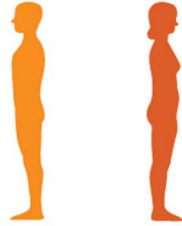
Quando se observa a distribuição de ocorrência dos tipos de câncer, tem-se que em 2012, para a região da América Latina e Caribe, o câncer de próstata era previsto o mais incidente em homens, seguido pelo de pulmão, intestino, estômago e bexiga. Nas mulheres, a distribuição estimada era da seguinte maneira: mama (27%), colo do útero (12,2%), intestino (7,9%), pulmão (5,7%) e estômago (4,3%) (FERLAY, SOERJOMATARAM, *et al.*, 2013).

No Brasil, para o biênio 2018-2019, estima-se a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer para cada um dos anos, sendo destes cerca de 170 mil de câncer de pele não melanoma e 420 mil novos casos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma, os cânceres de próstata (68 mil – 31,7%) para homens e de mama (60 mil – 29,5%) para mulheres continuam sendo os mais incidentes (Figura 1). O câncer de estômago aparece em quarto lugar na incidência de cânceres em homens no Brasil (6,3%) e não figurando entre os cinco primeiros para mulheres (INCA, 2017).

O grande número de casos desta patologia pode ser explicado pela sua origem, a partir de alterações em genes do controle do ciclo celular. A célula passa então a se proliferar desobedecendo aos mecanismos de controle, podendo adquirir a capacidade de invadir outros tecidos. Desta maneira,

portanto, o câncer possui um componente genético em sua origem, podendo afetar, teoricamente, qualquer tipo celular do nosso organismo (GILBERTSON, 2011).

Figura 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma*.

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: (INCA, 2017).

Tais alterações que podem desencadear a alteração maligna na célula podem ser genéticas, que irão alterar diretamente o cromossomo e o DNA, e/ou epigenéticas, que modificarão a expressão dos genes. Contudo, as modificações no DNA e na sua expressão não parecem explicar completamente a gênese dos cânceres. Diferentes tipos de cânceres possuem fatores externos que induzem ao seu surgimento. Por exemplo, o consumo excessivo de álcool, o fumo, o sedentarismo e a exposição às radiações ionizantes são alguns dos agentes externos associados direta ou indiretamente a muitos tipos de cânceres (CHAKRAVARTHI, NEPAL e VARAMBALLY, 2016). Outros fatores são considerados intrínsecos ao indivíduo, como os subprodutos metabólicos – produzidos pelo próprio organismo em seu metabolismo normal – capazes de afetar o DNA, tais como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, os produtos de peroxidação lipídica, os metabólitos de estrógeno e o colesterol, além dos radicais livres, entre outros (GABRIELLI, BROOKS e PAVEY, 2012). Desta maneira, a origem do câncer pode ser explicada sob uma ótica de interação de fatores externos e internos ao indivíduo que influenciam direta ou indiretamente, o comportamento e constituição do material genético das células afetadas.

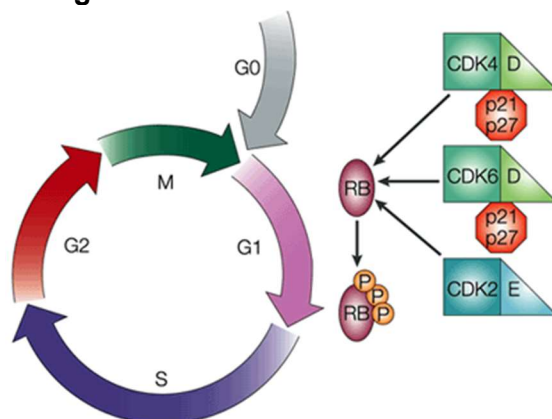
CAPÍTULO I.

BASES TEÓRICAS DOS PROCESSOS NEOPLÁSICOS

1. CICLO CELULAR E PROCESSO NEOPLÁSICO

As células vivas a todo momento recebem informações do meio em que vivem e precisam tomar decisões sobre quais respostas são as mais adequadas: crescer e dividir-se, diferenciar-se ou até mesmo encaminhar-se à apoptose são algumas das opções (TYSON e NOVAK, 2014). Ao se tratar de uma célula eucariótica – incluídas neste grupo, portanto, as células humanas – a decisão de proliferar-se é seguida de uma ordenada sequência de fases denominada ciclo celular. Neste ocorrem eventos de forma ordenada que, com o propósito de facilitar o entendimento, foram agrupados em fases, a saber: G1, S, G2 e M (Figura 2). Em cada uma destas ocorrem eventos específicos e necessários para a correta divisão da célula e seu material genético que resultará em duas células filhas idênticas entre si (BERTOLI, SKOTHEIM e DE BRUIN, 2013).

Figura 2: Ciclo celular e suas fases.



Fonte: (COLEMAN, MARSHALL e OLSON, 2004).

Organismos pluricelulares dependem de sinalização para avançar no ciclo celular, tanto de origem interna à célula quanto externa a ela. Quando está sinalização ocorre de maneira externa a ela, a atuação de fatores de crescimento

em células com receptores de membrana específicos permite que seja deflagrado o processo de divisão celular (YASUTIS e KOZMINSKI, 2013). Entretanto, ressalta-se que o avanço no ciclo celular e consequente multiplicação celular é controlada de maneira muito eficiente, a fim de se evitar seu descontrole (DIAZ-MORALLI, *et al.*, 2013). Os “checkpoints” ou pontos de checagem são o sistema de controle do ciclo celular que utiliza proteínas cinases dependentes de ciclinas (Cdks) ciclicamente ativadas (LIM e KALDIS, 2013). Como o próprio nome indica, as Cdks somente possuem efeito de cinase quando ligadas a uma ciclina, e o complexo ciclina-Cdks catalisa a fosforilação de membros da família de proteínas retinoblastomas (pRB, p107 e p130) proporcionando a progressão do ciclo. Em contrapartida, quando há um estímulo quiescente, são ativados a família de inibidores de Cdks (INK e CIP/KIP) (YASUTIS e KOZMINSKI, 2013) .

Caso seja detectado em algum ponto de checagem, um dano qualquer à célula, haverá o desencadeamento de um mecanismo molecular de reparo celular. Se o reparo desencadeado não obtiver sucesso – seja por excesso de danos no DNA ou por defeitos no próprio sistema de reparo – a célula deve ser encaminhada à senescência ou até mesmo à apoptose. Contudo, algumas células podem burlar esses mecanismos e ganhar uma sobrevida, acumulando mais mutações em outros genes e dando início ao processo neoplásico (GABRIELLI, BROOKS e PAVEY, 2012; BOROUGHTS e DEBERARDINIS, 2015).

Vários foram os mecanismos e estratégias de reparo celular selecionados ao longo da evolução de células eucarióticas. Dentre os mais estudados, podemos citar o reparo por excisão de bases (BER – “base excision repair”), reparo por excisão de nucleotídeos (NER – “nucleotide excision repair”) e reparo por emparelhamento errôneo de DNA (MMR – “mismatch repair”) (BAUER, CORBETT e DOETSCH, 2015). Dentre as diversas causas para erros no DNA, as alterações no DNA causadas por espécies reativas de oxigênio (ROS) estão entre as mais comuns. Portanto, a presença de efetivos mecanismos de reparo se torna crucial para a sobrevida das células eucarióticas que vivem na presença de oxigênio (CADET e DAVIES, 2017).

Quando há uma falha nos mecanismos de reparo supracitados, pode ser acionado os mecanismos de morte celular programada, entre elas a apoptose. Fisiologicamente, esta morte celular pode ocorrer na organogênese e hematopoiese normal, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos e na resposta inflamatória. Patologicamente, mecanismos que perturbem a homeostase celular e/ou tecidual podem desencadear a cascata apoptótica (GILBERTSON, 2011; CHAKRAVARTHI, NEPAL e VARAMBALLY, 2016) .

Morfologicamente, reconhece-se a apoptose por um encolhimento celular, com posterior fragmentação de seu conteúdo, inclusive o seu DNA, em vesículas denominadas de corpos apoptóticos. O fenômeno ocorre de maneira muito rápida e sem interferir com as células vizinhas. Os corpos apoptóticos são posteriormente fagocitados por células fagocíticas do sistema imune (CUTSEM, SAGAERT, *et al.*, 2016).

A classe de moléculas implicada por toda a cascata são as caspases. Estas moléculas pertencem à família de proteases que clivam proteínas alvo em resíduos específicos de aspartato, com múltiplas funções no processo apoptótico (MCARTHUR e KILE, 2018). Cerca de 18 caspases de mamíferos são descritas na literatura, algumas com funções bem descritas, outras ainda sem uma confirmação de quais funções exatamente desempenham nas células (ECKHART, BALLAUN, *et al.*, 2008; SHALINI, DORSTYN, *et al.*, 2015).

Os mecanismos moleculares da morte celular programada são bem descritos. Em mamíferos, incluindo os humanos, são identificadas duas vias apoptóticas: intrínseca (mediada por mitocôndria) e extrínseca (mediada por receptor de morte) (LI e YUAN, 2008).

A maior via apoptótica de mamíferos é a intrínseca, chamada ainda de via mitocondrial ou via clássica. Como os nomes sugerem, a via é centrada na mitocôndria, levando a esta organela a ter uma função na célula tão crucial quanto a produção energética. As proteínas da família Bcl-2 estão envolvidas no processo de desencadeamento das vias apoptóticas. Os primeiros são os membros pró-sobrevivência, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 e A1, que mantêm as células vivas, impedindo a ativação de Bak e Bax, os dois mediadores essenciais

pró-morte da via intrínseca. Quando há sinais pró apoptóticos, um terceiro grupo de proteínas Bcl-2 são ativadas, as BH-3, que suprimem as proteínas pró sobrevivência permitindo o acionamento de Bak e Bax. Esta ativação induz a membrana externa mitocondrial a se tornar mais permeável. Com isto, há um efluxo de citocromo C que forma um complexo com o fator apoptótico ativador da protease-1 (Apaf-1, uma proteína adaptadora) e o zimogênio inativo da caspase-9. Esta ativação desencadeia a cascata de ativação de caspases e ocorre ativação das chamadas caspases executores (caspases 3 e 7) (LI e YUAN, 2008; GOLDAR, KHANIANI, *et al.*, 2015).

A via extrínseca é desencadeada via ativação do receptor de morte na membrana celular. Ligantes pró-apoptóticos externos à célula, tais quais fator de necrose tumoral (TNF), ligante Fas (Fas-L) e ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF. Após ligação do ligante ao receptor, os receptores de morte ligam-se através do seu domínio de morte intracelular com um motivo proteico correspondente a proteínas adaptadoras, tais como domínio de morte associado a Fas (FADD) e domínio de morte associado a receptor de TNF. A partir daí, há ativação da pró-caspase-8, que irá desencadear o processo de cascata de caspases, ativando as caspases iniciadores (LOPEZ e TAIT, 2015).

O balanço adequado de ativações de apoptose e desencadeamento de processos mitóticos são essenciais para a homeostase. As vias apoptóticas podem ser alteradas pelas células cancerosas transcricionalmente, traducionalmente e pós-traducionalmente. Significativamente, esses mecanismos não são exclusivos e as células cancerosas podem usar diversas estratégias para escapar da apoptose (CHAKRAVARTHI, NEPAL e VARAMBALLY, 2016; GOLDAR, KHANIANI, *et al.*, 2015) .

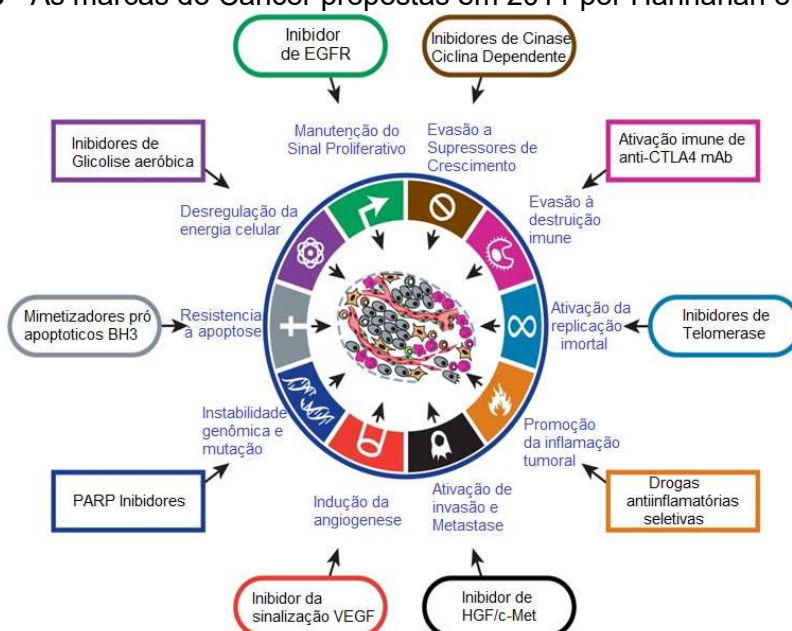
Desta maneira, sendo a via clássica uma das mais importantes, perturbações na integridade funcional e genética da mitocôndria podem levar à alterações na capacidade de ativação de cascatas apoptóticas, sendo esta evasão à apoptose uma das marcas do câncer descrito por Hannanan e Weinberg. Neste sentido, estudos acerca da integridade mitocondrial e de seu DNA podem levar à descoberta de novos possíveis alvos terapêuticos ou novos mecanismos de prognóstico e estadiamento tumoral (LOPEZ e TAIT, 2015;

GOLDAR, KHANIANI, *et al.*, 2015; CAO e TAIT, 2018; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

2. BIOLOGIA MOLECULAR DO CÂNCER

Todo o processo de carcinogênese é caracterizado por um conjunto de características (ou “marcas”), compartilhado por praticamente todos os tipos de cânceres. Em 2000, Hanahan e Weinberg definiram as seis primeiras “marcas”: a autossuficiência em relação aos sinais de crescimento, a resistência aos sinais antiproliferativos, a evasão a apoptose, o potencial proliferativo ilimitado, a angiogênese, a invasão a tecidos adjacentes e a metástase (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Com o avanço dos estudos sobre o câncer foram sendo sugeridas novas propriedades como: a evasão ao sistema imunológico, a instabilidade genômica, o estresse metabólico, mitótico e oxidativo e de danos ao DNA (NEGRINI, GORGOULIS e HALAZONETIS, 2010). Em 2011, Hanahan e Weinberg reformularam suas “marcas do câncer” (Figura 3), acrescentando às já existentes outras quatro: a evasão à destruição autoimune, a promoção de inflamação tumoral, a instabilidade genômica e mutação, e a desregulação da cinética celular (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Figura 3 - As marcas do Câncer propostas em 2011 por Hannahan e Weinberg



Fonte (traduzida): (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Todas estas “marcas” são desencadeadas por alterações em genes que devem conferir à célula portadora a capacidade de sobreviver e proliferar em condições as quais normalmente seriam deletérias (VOGELSTEIN, *et al.*, 2013). Como são muitos os genes envolvidos em todo o processo, estes podem ser divididos em duas classes: os oncogenes e os genes supressores tumorais. Os produtos desses genes fazem parte de uma rede de fatores que, juntos, trabalham no controle da proliferação celular, diferenciação e sobrevivência das células (MCCARTHY, 2016). Mutações envolvendo-os são cruciais para o desencadeamento do processo neoplásico (BAEISSA, *et al.*, 2016).

Os oncogenes são correlacionados com eventos genéticos de ganho de função e possuem efeito dominante. São responsáveis por codificar proteínas responsáveis pelo controle positivo da proliferação celular (VICENTE-DUEÑAS, *et al.*, 2013). São originários da ativação dos proto-oncogenes através de translocações, amplificações gênicas ou ainda por alterações intragênicas que alterem a regulação do gene. Tais mutações garantem a célula portadora uma vantagem proliferativa ou um aumento da sobrevivência da mesma (BAEISSA, *et al.*, 2016).

Os genes supressores tumorais por sua vez estão envolvidos em funções críticas e altamente conservadas dentro da célula. Eles são responsáveis pela regulação do ciclo celular e apoptose, diferenciação celular, vigilância da integridade genômica e reparo de erros no material genético, transdução do sinal e adesão celular (VOGELSTEIN, *et al.*, 2013). De acordo com sua função, os genes supressores tumorais podem ainda ser subdivididos em dois grupos, os “gatekeepers” ou genes protetores e os “caretakers” ou genes de manutenção (BUNZ, 2016).

Os *gatekeepers* reúnem genes que desempenham papel diretamente ligado a regulação do ciclo celular. Eles são responsáveis por promover a proliferação ou enviar a célula ao processo apoptótico. Mutações nesta subclasse de genes estão diretamente ligadas ao processo de carcinogênese e progressão tumoral de inúmeros tipos de câncer. Os *caretakers* por sua vez, são responsáveis por processos adjacentes ao ciclo celular como o reparo do DNA e a conservação da integridade genômica. Mutações nesta classe de gene não

levam a célula ao desenvolvimento do fenótipo mutante, mas favorecem o surgimento de mutações em genes classificados como *gatekeepers* (JEGGO, PEARL e CARR, 2016).

Entretanto, mutações na sequência de DNA por si só não são capazes de explicar toda a diversidade de fenótipos dentro de uma população de células cancerosas. Os fenômenos epigenéticos oferecem uma explicação adicional à essa diversidade. A epigenética é definida como modificações na expressão do DNA sem, no entanto, alterar a sua sequência (SHARMA, KELLY e JONES, 2010). Essas alterações são reversíveis e herdáveis. Em uma célula normal, fenômenos epigenéticos direcionam um desenvolvimento adequado e uma apropriada diferenciação celular (SCHÜBELER, 2015).

Dentre as modificações epigenéticas normais podem ser: as modificações de cromatina, alterações dos RNAs não codificadores, a metilação do DNA e o *imprinting* genômico, este último correlacionado à metilação do DNA (EASWARAN e BAYLIN, 2013). O mais bem estudado destes mecanismos é a metilação do DNA, que possui um importante papel no controle da atividade gênica (ESTELLER, 2008).

Tais eventos genômicos e epigenéticos descritos acima são relatados funcionando em conjunto para o desenvolvimento de tumores e metástases. O avanço dos estudos acerca destes temas tem proporcionado a possibilidade de um melhor entendimento dos processos de iniciação, progressão e sinalização do câncer, abrindo caminhos para um melhor direcionamento terapêutico (CHAKRAVARTHI, NEPAL e VARAMBALLY, 2016).

CAPÍTULO II.

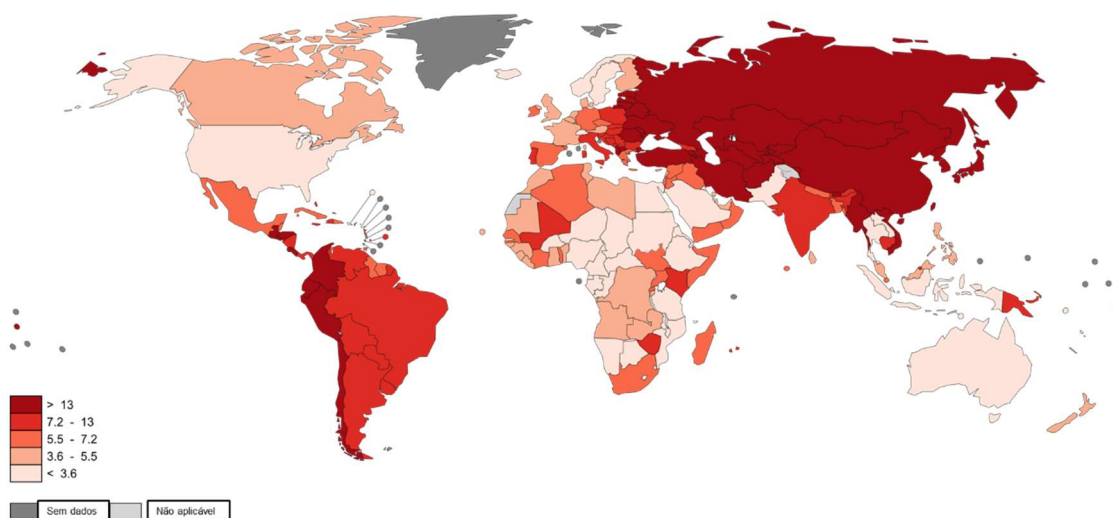
O CÂNCER GÁSTRICO

1. EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA.

O câncer gástrico é tido como o quinto tipo de neoplasia que mais leva a óbito no mundo e o quarto tipo mais diagnosticado (TORRE, *et al.*, 2015). Contudo, alguns pesquisadores associam a elevação dos números de novos casos de câncer gástrico com a melhoria no diagnóstico precoce, mudanças nos hábitos de conservação dos alimentos e maior consumo de frutas e verduras, o que pode acarretar também na diminuição no número de óbitos por esta neoplasia (ANG e FOCK, 2014).

A incidência deste tipo de câncer não é uniforme ao redor do mundo. América Central e do Sul, Ásia, Leste e Sul Europeu são áreas de elevada incidência do câncer gástrico. Já América do Norte, Austrália e Nova Zelândia apresentam as mais baixas taxas de incidência (TORRE, *et al.*, 2015; ANG e FOCK, 2014) (Figura 4).

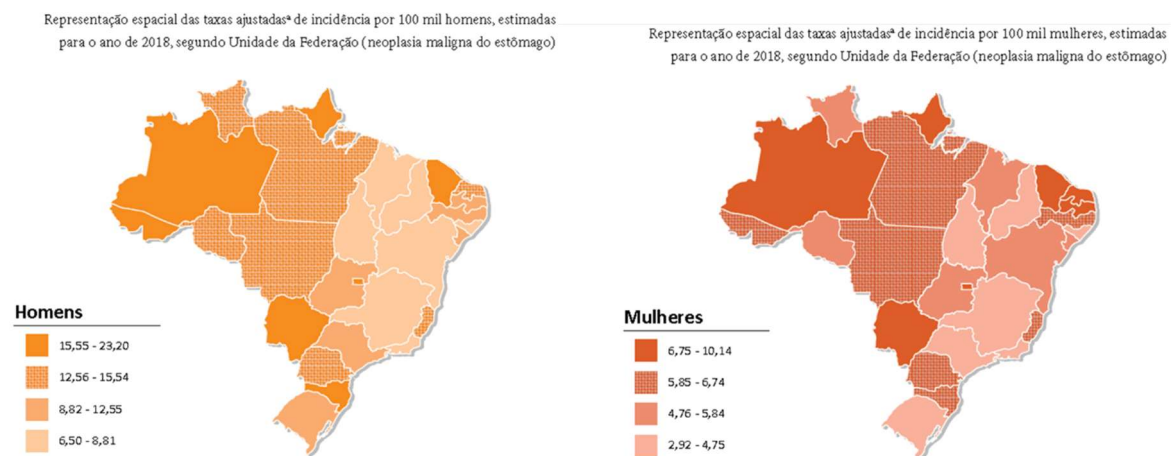
Figura 4 – Incidência do câncer gástrico ao redor do mundo.



Fonte: Globocan 2012. IARC.

No Brasil, segundo o INCA, são aguardados para o ano de 2018 mais de 20 mil novos casos de câncer de estômago, sendo 13.540 para homens e 7.750 para mulheres. Na região Norte, entre os homens ocupam a segunda posição de incidência entre os tipos de cânceres excluindo-se os de pele não melanoma e o quinto entre as mulheres na mesma região. Para o estado do Pará, para o mesmo ano, especula-se que ocorram 740¹ novos casos e cerca de 35% (260¹ casos estimados) ocorram em sua capital, Belém (INCA, 2017) (Figura 5).

Figura 5 – Incidência de casos de câncer gástrico nos diferentes estados do Brasil, apresentando sua distribuição distinta entre homens e mulheres.



Fonte: INCA, 2017.

Desta maneira, inúmeras pesquisas buscam desvendar quais as causas que levam ao desenvolvimento desta neoplasia. Estudos epidemiológicos sugerem uma forte correlação entre fatores ambientais e genéticos/epigenéticos na gênese do câncer gástrico (VENERITO, *et al.*, 2016).

O fator ambiental mais fortemente correlacionado com o câncer gástrico é a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (MOSS, 2017). Esta bactéria coloniza especificamente o epitélio gástrico e é a mais comum infecção

¹ Número arredondado para múltiplo de 10 (INCA, 2017).

bacteriana no mundo (EUSEBI, ZAGARI e BAZ, 2014), tendo sido considerada carcinógeno tipo 1 (definitivo) pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC - *International Agency For Research on Cancer*) em 1994 (IARC, 1994).

Esta bactéria foi primeiramente isolada por Warren e Marshall em 1983 (MARSHALL e WARREN, 1984). Trata-se de uma bactéria gram negativa, espiralada, com presença de flagelos unipolares (MCCOLL, 2010). A infecção por este microrganismo ocorre nos anos iniciais da vida do indivíduo e persiste por toda a sua vida adulta (GRAHAM, 2015). Países com melhora em suas condições sanitárias observam uma diminuição nos casos de infecção por esta bactéria, e conseqüentemente, diminuição nos números de casos de câncer gástrico (MOSS, 2017).

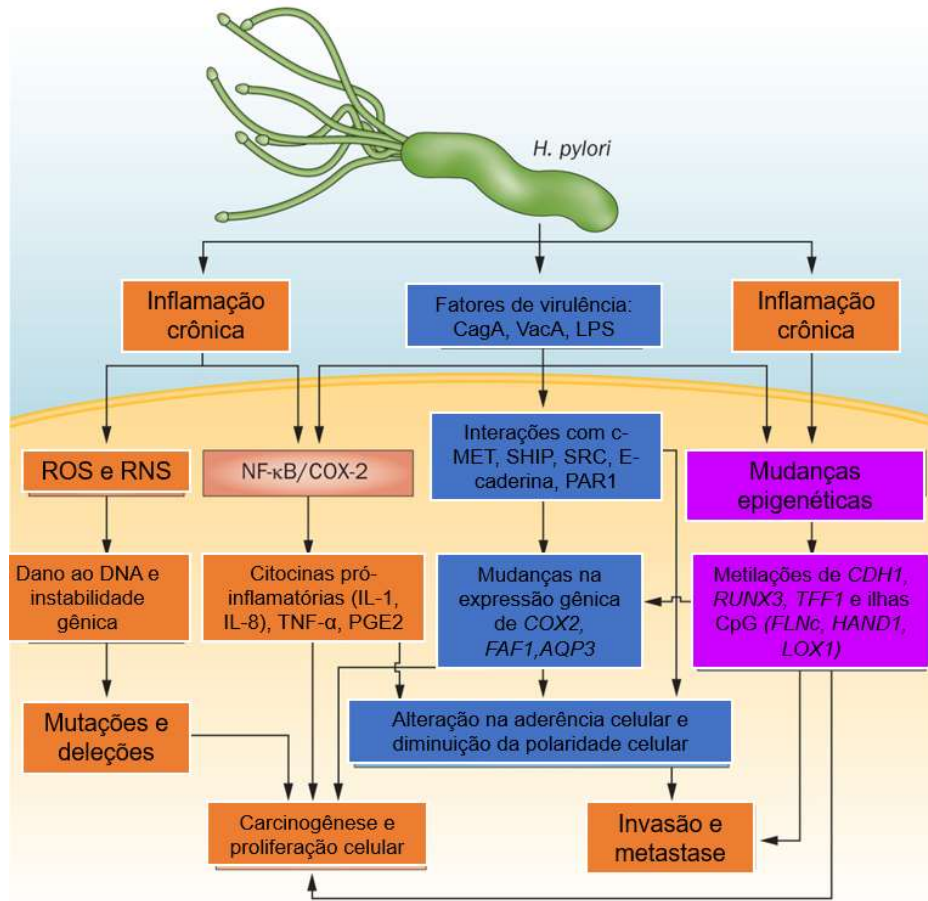
A presença desta bactéria no epitélio gástrico desencadeia uma inflamação persistente, crônica, desencadeando processos que, se não cessados, resultam no desenvolvimento do câncer gástrico (Figura 6) (WADHWA, *et al.*, 2013).

Entretanto, a infecção por esta bactéria não é o único fator ambiental envolvido na gênese deste tipo de neoplasia. Hábitos alimentares também estão associados. Há evidências de que elevado consumo de sal e compostos N-nitrosos e baixa ingestão de frutas e vegetais frescos aumentam o risco de câncer gástrico (VENERITO, *et al.*, 2016).

Estudos caso-controle associam positivamente a ingestão de sal e compostos N-nitrosos com o desenvolvimento de câncer de estômago, apesar de estudos prospectivos obterem resultados controversos (GUGGENHEIM e SHAH, 2013; ANG e FOCK, 2014). Ingestão de elevadas concentrações de sal destroem a mucosa gástrica, causando lesões e inflamações, propiciando a instalação da *H. pylori* e/ou levando ao desenvolvimento de uma gastrite, elevando o risco de desenvolvimento de câncer gástrico (GADDY, RADIN, *et al.*, 2013). Nitritos e nitratos – encontrados principalmente em alimentos defumados e em conserva – quando digeridos são convertidos em nitrosaminas (HOED e KUIPERS, 2016). Estas moléculas são capazes de provocar a desaminação de purinas e pirimidinas do DNA podendo levar a mutações de ponto, alterando

genes que possam estar envolvidos no processo de carcinogênese (SONG, WU e GUAN, 2015).

Figura 6 - Carcinogênese promovida por *H. pylori*.



Fonte: (WADHWA, *et al.*, 2013).

A ingestão de uma maior quantidade de frutas e vegetais frescos por sua vez, possui uma ação protetora com relação ao câncer de estômago (HOED e KUIPERS, 2016). Estes alimentos contêm substâncias antioxidantes e que garantem a integridade do DNA por evitarem a conversão de nitritos para nitrosaminas, além de possuírem uma grande quantidade de fibras. Estas últimas aparentemente funcionam neutralizando os nitritos presentes e reduzindo sua concentração intragástrica (ZHANG, *et al.*, 2013).

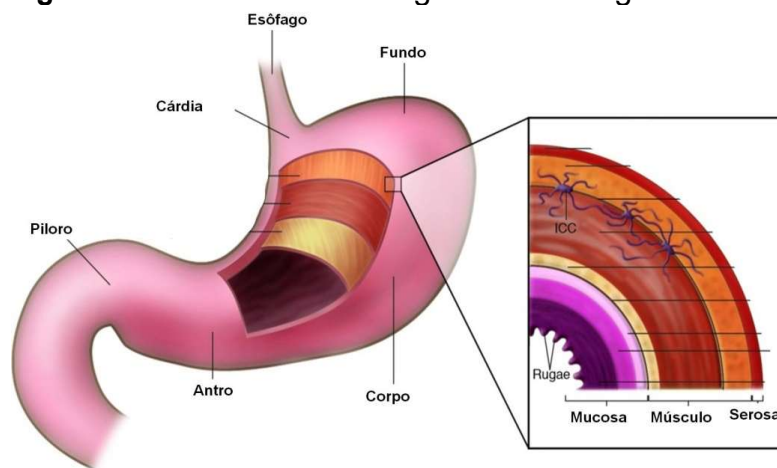
Por se tratar de uma patologia complexa, sua gênese não é explicada somente por fatores externos ao organismo. Da mesma maneira que os demais

tipos de tumores, alterações genéticas/epigenéticas possuem importante papel na carcinogênese gástrica. Por exemplo, mais de 50 mutações no gene *CDH1* estão relacionadas com o câncer gástrico difuso hereditário. Isto quer dizer que indivíduos com essas mutações ao associarem hábitos relacionados ao desenvolvimento dessa neoplasia, aumentam sua probabilidade de desenvolvê-la (HANSFORD, *et al.*, 2015).

2. Classificação histopatológica e Molecular do Câncer gástrico.

Anatomicamente, o estômago é dividido em três grandes áreas denominadas fundo, corpo e antro. Histologicamente, é constituído de cinco camadas sendo a mais interna a mucosa glandular, seguida pela submucosa, muscular, subserosa e mais externamente a serosa (Figura 7). O câncer gástrico pode se desenvolver em qualquer uma dessas áreas (COFFEY, *et al.*, 2007).

Figura 7 - Anatomia e histologia do estômago humano.



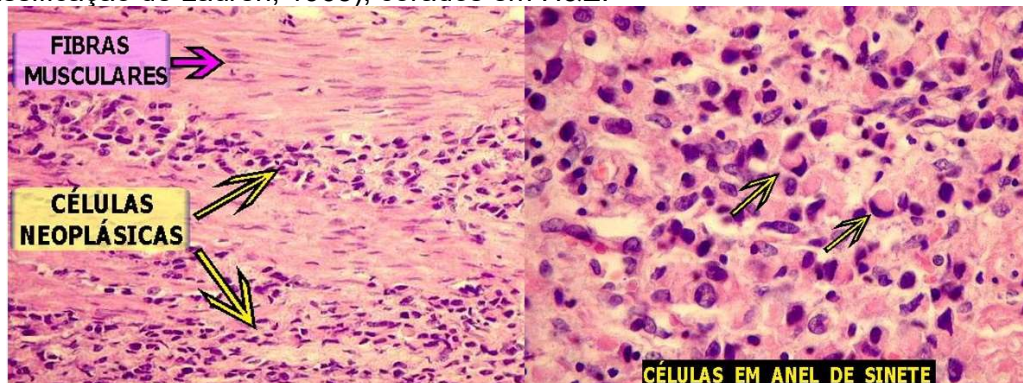
Fonte (traduzido e adaptado): (COFFEY, *et al.*, 2007).

Várias classificações histopatológicas para o adenocarcinoma gástrico foram propostas. Duas classificações são as mais aceitas e utilizadas: a proposta por Lauren e a da Organização Mundial da Saúde (OMS) (CUTSEM, *et al.*, 2016). A mais difundida, e a utilizada no presente trabalho, foi proposta por

Láuren em 1965. Nesta classificação, os tumores são divididos em dois grandes grupos: intestinal (ou bem diferenciado) e difuso (ou pobremente diferenciado); tendo ainda os indeterminados e os mistos (ANG e FOCK, 2014). Estes subtipos diferem tanto em suas características histológicas, quanto na epidemiologia, patogenicidade e perfil genético (CUTSEM, *et al.*, 2016).

O tipo difuso caracteriza-se por apresentar células pouco coesas, difusamente infiltradas no estroma gástrico, com pouca ou nenhuma formação glandular (Figura 8). Não há descrição de lesões pré-neoplásicas e não possui distribuição geográfica definida. Os pacientes acometidos por este tipo são em sua maioria jovens, do gênero feminino, com histórico familiar e apresentam o pior prognóstico em comparação ao tipo intestinal (KHATOON, RAI e PRASAD, 2016). Microscopicamente, a lesão não apresenta limites definidos, apresentando espalhamento extensivo na submucosa e metástases precoces. Possui um componente hereditário mais forte do que o tipo intestinal e possui correlação com fatores ambientais, como infecção por *H. pylori* (PIAZUELO e CORREA, 2013).

Figura 8 - Cortes histopatológicos de Adenocarcinoma gástrico do tipo difuso (segundo classificação de Lauren, 1965), corados em H&E.



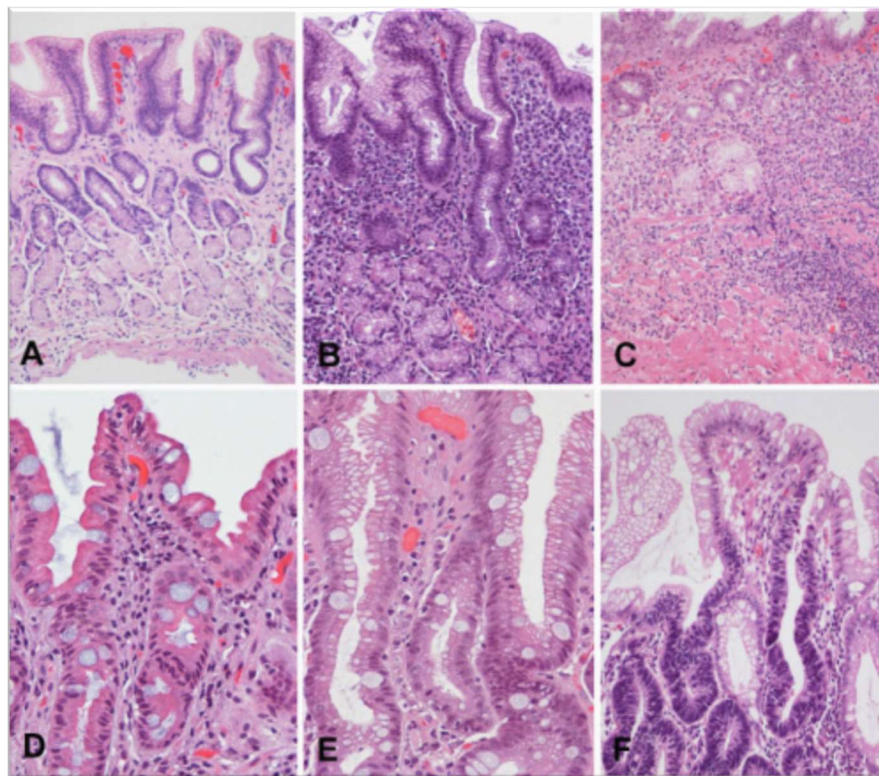
Fonte: Site AnatPat – Unicamp. <http://anatpat.unicamp.br/lamtgi3.html>

O tipo intestinal está associado com o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas prévias (Figura 9). Estas por sua vez podem ser classificadas na chamada cascata pré-neoplásica ou Cascata de Correa, possuindo etapas com características bem definidas: Gastrite não atrófica → gastrite atrófica multifocal sem metaplasia → metaplasia intestinal do tipo completo → metaplasia intestinal

do tipo incompleto → displasia. Esta cascata foi proposta em 1975, por Correa e colaboradores após observação de população colombiana com alto risco de câncer gástrico (CORREA, *et al.*, 1975; PIAZUELO e CORREA, 2013; MARTÍNEZ-GALINDO, *et al.*, 2015; CUTSEM, *et al.*, 2016)

Figura 9 – Cascata pré-cancerosa proposta por Correa, em 1975.

A, mucosa gástrica normal. B, Gastrite crônica não atrófica. Abundante infiltrado inflamatório na lâmina própria com glândulas bem preservadas observadas na metade mais profunda da mucosa. C, Gastrite atrófica multifocal sem metaplasia intestinal. Perda marcada de glândulas, com infiltrado inflamatório proeminente e proliferação de tecido fibroso na lâmina própria. D, Metaplasia intestinal, tipo completo. Células caliciformes alternando com enterócitos absorventes que apresentam borda de pincel bem desenvolvida. E, Metaplasia intestinal, tipo incompleto. Células caliciformes alternando com células colunares que contêm gotículas de mucina de tamanhos variáveis. F, Displasia. Epitélio com displasia de alto grau (metade inferior da fotografia) ocorrendo em um fundo de metaplasia incompleta (observada no epitélio superficial foveolar). (H & E. E, ampliação original: A-C x 100, D-F x 200).

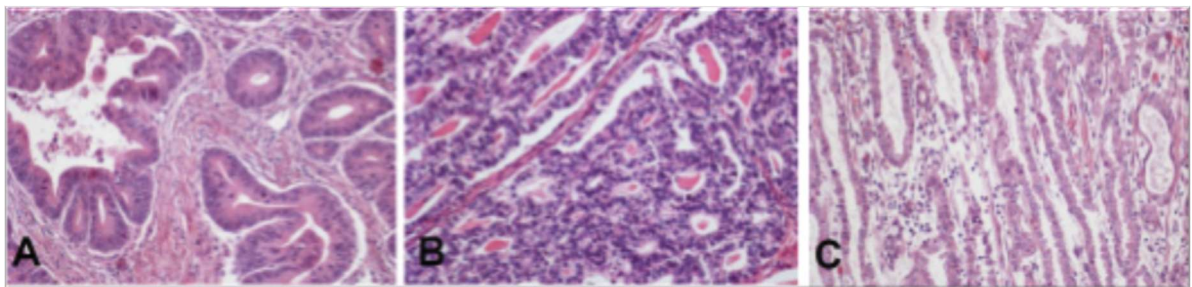


Fonte: (PIAZUELO e CORREA, 2013).

A cascata proposta por Correa culmina no tipo histológico intestinal proposto por Lauren (1965). É assim chamado por apresentar glândulas ou túbulos revestidos por epitélio semelhante a mucosa intestinal (Figura 10). É o

tipo histológico predominante em áreas de alto risco para câncer gástrico, entretanto, vem diminuindo a sua incidência nas últimas décadas, contribuindo fortemente para a queda da incidência global do câncer de estômago. Geralmente ocorre em indivíduos entre 55 e 80 anos de idade, e a proporção entre homens e mulheres é de 2:1. Histologicamente, caracteriza-se por células epiteliais malignas que apresentam coesão e diferenciação glandular infiltrando-se no estroma. As células tumorais podem apresentar diferentes graus de atipia nuclear e podem apresentar estruturas tubulares, trabeculares, papilares ou túbulo-papilares (PIAZUELO e CORREA, 2013; CORREA, 2013; MARTÍNEZ-GALINDO, *et al.*, 2015; CUTSEM, *et al.*, 2016).

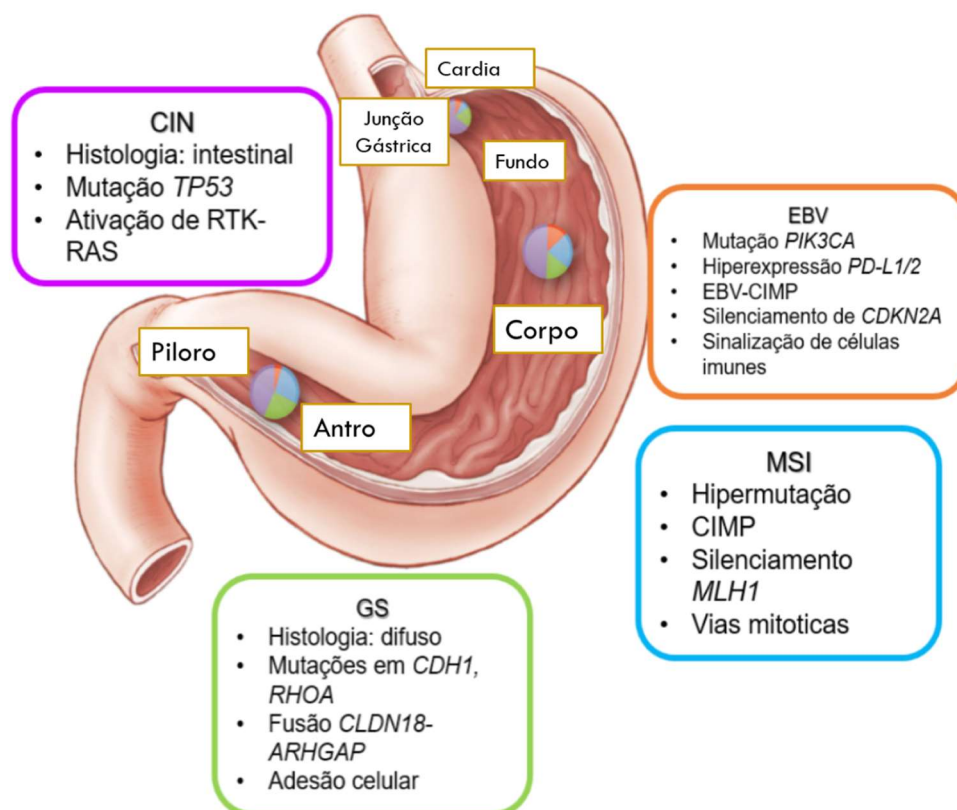
Figura 10 – Adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal. Três tipos tumorais são mostrados com formação irregular de glândulas, túbulos e papilas.



Fonte: (PIAZUELO e CORREA, 2013).

Uma pesquisa publicada, com os resultados do perfil genômico completo de 295 adenocarcinomas gástricos primários identificou quatro subgrupos tumorais: positivos para o vírus Epstein-Barr (9%), tumores com instabilidade de microsatélites (22%), tumores genomicamente estáveis (20%) e tumores cromossômicos instáveis (50%). A correlação com as características histológicas revelou enriquecimento do subtipo difuso no grupo genomicamente estável (73%) (Figura 11). A frequência de tumores cromossômicos instáveis foi aumentada nos adenocarcinomas da junção gastresofágica, e a maioria dos tumores positivos para o vírus Epstein-Barr estava localizada no fundo ou no corpo do estômago. Finalmente, os tumores positivos para este vírus foram encontrados principalmente em homens (81%), enquanto tumores com instabilidade de microsatélites apresentou-se ligeiramente associado ao gênero feminino (THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2014).

Figura 11 – Caracterização molecular dos subtipos de carcinomas gástricos. CIN= tumor com instabilidade cromossômica. EBV= tumores infectados por Epstein-Barr. CIMP= Fenótipo de ilhas CpG metiladas MSI = tumores com instabilidade de microsatélite.



Fonte: (THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2014).

3. Fatores Genéticos e epigenéticos associados à carcinogênese gástrica.

Várias são as causas de desregulação de genes em câncer gástrico e esta pode ocorrer em diferentes níveis: genômico, a nível de sinalização e a nível pós transcricional. Portanto, o desenvolvimento e progressão deste tipo de câncer envolve muitas alterações genéticas e epigenéticas tanto em genes supressores tumorais quanto em oncogenes (CUTSEM, *et al.*, 2016). Apesar da patogênese do câncer de estômago ser muito incerta – principalmente quando se trata do tipo difuso – muito tem se descoberto acerca da biologia molecular

do câncer como um todo, o qual tem proporcionado evidências de que a malignização de uma célula epitelial se dá através de um processo de múltiplas etapas, resultado de acúmulos de anomalias genéticas. A sequência de estágios pré-neoplásicos proposta por Correa 1975 é, então, acompanhada por sucessivas mudanças genéticas/epigenéticas (MCLEAN e EL-OMAR, 2014).

Com o advento da tecnologia do sequenciamento de nova geração, que tem se tornado mais acessível e mais eficiente, houve um significativo avanço sobre a descoberta de novas alterações genéticas e o esclarecimento das já correlacionadas com o câncer gástrico. Alterações nos genes CDH1 e TP53 continuam sendo as mutações de maior ocorrência dentre os tumores gástricos estudados. Contudo, outros genes têm ganhado atenção pelo seu envolvimento na carcinogênese gástrica (KATONA e RUSTGI, 2017).

As alterações genéticas mais comuns seriam a perda de heterozigosidade e mutações de pontos em genes supressores tumorais; e as epigenéticas seriam a inativação de genes supressores tumorais através de metilação de ilhas CpG's e silenciamento a nível transcricional. Mutações genéticas locais que alteram a expressão gênica incluem amplificação gênica, deleções e mutações em regiões codificadoras ou regulatórias. Outras alterações associadas ao câncer gástrico são a instabilidade de microssatélites (MSI) (CHOI, *et al.*, 2014), mutações em reguladores do ciclo celular, ativação da telomerase e polimorfismos genéticos (WU, LIN e TSAI, 2014). Na Figura 12 estão esquematizadas as principais alterações genéticas e epigenéticas associadas ao câncer gástrico.

Um mecanismo comum de inativação de genes em câncer gástrico é o silenciamento epigenético através da metilação do DNA e está normalmente associada a genes supressores tumorais (RÖCKEN, 2017). No câncer gástrico, inúmeros genes supressores tumorais já foram descritos como silenciados através deste mecanismo como o *hMLH1*, *APC*, *CHFR*, *COX2*, *DAP-kinase*, *DCC*, *E-cadherina (CDH1)*, *GSTP1*, *HRK*, *LOX*, *MGMT* (*O6-metilguanina metiltransferase*), *PTEN*, *RASSF1A*, *RUNX3*, *14-3-3 sigma*, *THBS1*, *TIMP-3*, e *TSLC1* (KATONA e RUSTGI, 2017). Também foi observado um aumento do número de genes metilados à medida que ocorre a progressão tumoral,

indicando uma correlação entre esta e a metilação do DNA (LIU e MELTZER, 2017).

Figura 12 – Alterações genéticas e epigenéticas associadas ao Câncer gástrico.

Mutação somática

- Instabilidade genômica (induzida por mutação em *TP53* e *BRCA2*)
- Modificação na adesão celular (Ex.: por mutação em *CDH1*, *CTNNA2*, *CTNNB2*, *FAT4*)
- Remodelamento aberrante de cromatina (ex.: por mutações em *ARID1A*, *MLL*, *MLL3*)
- Função aberrante de citoesqueleto e mobilidade celular (ex.: por mutações no *RHOA*)
- Desregulação de sinalização (ex.: genes da via *Wnt/APC*, *RNF43*, *CTNNB1*; da via do *TGF-β* *SMAD4* e *ELF3*; e da via do *RTK*, *ERBB3*, *ERBB4*, *ERBB2*, *PIK3CA*, *KRAS*)

Instabilidade cromossômica

- Deleção homozigótica ou heterozigótica (ex.: genes supressores tumorais *PTEN*, *SMAD4*, *PARK2*, *RB1*, *CDKN2A*, *ARID1A*)
- Amplificação (ex.: genes da via *RTK/RAS/MAPK* *EGFR*, *ERBB2*, *FGFR2*, *MET*, *VEGFA*, *KRAS*; e *PD-L1* e *PD-L2* no subgrupo EBV)
- Rearranjos (ex.: *AGTRAP-BRAF*, *CD44-SLC1A2*, *SLC34A2-ROS1*, *CLDN18-ARHGAP26*)
- Aneuploidia (ex.: ganho do cromossomo 8, perda de 18q)
- Perda de heteroziguidade (ex.: de 3p14.2 no início do câncer gástrico)

Instabilidade microssatélite

- Inativação mutacional ou silenciamento epigenético de genes de reparo de DNA (ex.: *MSH1*, *MSH2*, *MSH3*, *MLH1*)

Mecanismos epigenéticos

- Hipermetilação do DNA (ex.: *hMLH1*, *MGMT*, *p15*, *p16*, *CDH1*, *CDKN2A*, *APC* e *RUNX3*)
- Modificações de histonas (Ex.: *H3K27me* e *H3K9me3*)
- Desregulação de RNAs não codificante (ex.: de oncomiR: cluster *miR-106b-25*, *miR-27a*; de supressores tumorais miRNAs: *miR-29c*, *miR375*, *miR148a*, *miR125b*; oncogenes lncRNAs: *HOTAIR*, *H19*, *ANRIL*; de tumor supressor lncRNAs: *GAS5* e *MEG3*).

Fonte (modificado e adaptado): (LIU e MELTZER, 2017).

Os genes supressores tumorais também aparecem alterados em tumores de estômago. Algumas deleções intragênicas - ou até mesmo do gene inteiro - já foram descritas na literatura, envolvendo principalmente o gene *CDH1*. Outras mutações podem ocorrer neste gene. São descritos polimorfismos em seu promotor e alterações nos padrões de metilação das ilhas *CpG*'s que modificam a expressão do gene. Uma super-expressão de *CDH1* é encontrada em câncer gástrico e correlacionada com a aquisição de habilidades infiltrativas e de metástase. As mutações genéticas e os eventos epigenéticos neste gene também foram correlacionadas com alterações na linhagem germinativa que levam ao desenvolvimento de câncer gástrico do tipo difuso de origem familiar (HANSFORD, *et al.*, 2015). Outro gene supressor tumoral largamente estudado e envolvido na carcinogênese gástrica é o *TP53*. Este gene codifica uma proteína

responsável pelo controle do ciclo celular, reparo do DNA, diferenciação celular e apoptose. Sua função pode ser alterada através de perda de heterozigosidade, mutações e alterações nos padrões de metilação de seu promotor (CHIA e TAN, 2016). Mudanças nos padrões de expressão deste gene são uma das mais prevalentes alterações genéticas em cânceres humanos, incluído em tumores gástricos, onde aparece alterado em cerca de 40% dos casos. Observa-se ainda que em pacientes mais jovens, em comparação aos de idade avançada, há uma menor incidência de mutações no TP53 (CORREA, 2013).

Em tumores gástricos, muitos proto-oncogenes são ativados. Os mecanismos envolvidos podem ser desde uma amplificação gênica com consequente aumento de expressão do mesmo, quanto alterações epigenéticas (principalmente relacionada a perda de metilação de ilhas *CpG*'s). Dentre os oncogenes envolvidos na carcinogênese gástrica podemos citar o *C-MET*, *C-ERB2*, *K-RAS*, *C-MYC*, *C-KIT*, *K-SAM* E O *TNF-A* (RÖCKEN, 2017).

Outra característica genética marcante dos tumores gástricos é a presença de MSI. A instabilidade de microssatélite é a consequência de defeitos no processo de reparo do DNA que leva a instabilidade gênica (YODA, *et al.*, 2014). A principal causa desta alteração, é o silenciamento dos genes de reparo *hMLH1* e *hMSH2* através de hipermetilação de seus promotores (MARRELLI, *et al.*, 2015). Há então uma alteração espontânea em sequências repetitivas simples chamadas de microssatélites, com inserção ou deleção de uma ou mais repetições. Existem três níveis de MSI que podem ser identificados: alta instabilidade de microssatélite (MSI-H), baixa (MSI-L) e ausência de instabilidade (MSS) (CHOI, *et al.*, 2014; YODA, *et al.*, 2014).

A prevalência de MSI é variável no câncer gástrico, ficando entre 15% e 60% de acordo com a população estudada. A sua presença propicia um acúmulo de outras mutações que contribuem para a patogênese deste tipo de câncer. Tumores com MSI-H apresentam características diferentes quando correlacionadas aos que possuem MSI-L ou mesmo MSS, sendo relatado um melhor prognóstico e maior sobrevida (YODA, *et al.*, 2014).

A existência de polimorfismo genéticos também foi associada a gênese de tumores gástricos e estariam principalmente envolvidos na progressão dos

mesmos (MCLEAN e EL-OMAR, 2014). Polimorfismos são variações genéticas funcionais encontradas em cerca de 1% da população que ocasionam variabilidade genética. Trata-se de uma importante causa endógena do câncer (ZHOU, *et al.*, 2014). Alguns polimorfismos que comprovadamente modificam o risco ao câncer gástrico envolvem os genes *IL-1beta* (*IL1B*), o receptor antagonista *IL-1* (*IL1RN*) e o *N-acetiltransferase* (*NAT1*) (LIU e MELTZER, 2017). Outros ainda apresentam uma correlação fraca com a gênese do câncer gástrico, mas são associados a respostas diferenciadas aos tratamentos quimioterápicos. Como por exemplo os de genes são os envolvidos na via do folato, como o metileno tetrahydrofolato (*MTHFR*) e o timidilato sintase (*TS*) (GAO, *et al.*, 2013).

Mais recentemente os pesquisadores voltaram o foco para alterações no metabolismo energético da célula, revisitando o conceito do efeito Warburg e suas implicações. Alterações no DNA mitocondrial tem sido implicada tanto na gênese da neoplasia quanto como alvo terapêutico (SUN, *et al.*, 2016).

CAPÍTULO 3.

MODELOS EXPERIMENTAIS EM PESQUISAS ONCOLÓGICAS

Modelos animais têm se demonstrado valiosas ferramentas nos estudos acerca da carcinogênese. Nas últimas décadas, inúmeros esforços foram combinados para se obter o máximo de informações sobre a patogênese do câncer gástrico e quais são suas etapas pré neoplásicas, além de quais fatores influenciam diretamente em sua instalação e progressão. Alguns desses estudos foram feitos utilizando roedores como modelo experimental, mas o tamanho de seus órgãos impossibilita realizar alguns procedimentos como coleta de sangue e diagnóstico de imagem demonstrando o desenvolvimento da doença (TSUKAMOTO, MIZOSHITA e TATEMATSU, 2007). Vale ressaltar que o uso de roedores é muito útil para o teste em larga escala de potenciais carcinógenos, devido ao baixo custo de manutenção desses animais (USHIJIMA e SASAKO, 2004; TAKAYAMA, THORGEIRSSON e ADAMSON, 2008).

Os primatas não humanos por sua vez constituem excelentes modelos experimentais para os casos em que se quer avaliar a instalação e progressão dos tumores gástricos. Estes animais possuem proximidade evolutiva e filogenética aos seres humanos, possuindo similaridade anatômica, fisiológica e bioquímica muito maior do que os roedores. O tamanho de seus órgãos também confere uma vantagem para este tipo de experimento, pois permite a realização de procedimentos de coleta de sangue, biópsias e exames de endoscopia tantas vezes forem necessárias no mesmo animal em diferentes períodos. Comparados aos roedores, a incidência de tumores esporádicos é baixa, mas a longevidade desses animais permite que sejam expostos a carcinógenos por um longo período, comparável aos seres humanos. As desvantagens são óbvias: os custos de manutenção são elevados e o longo tempo para o surgimento dos primeiros resultados (TAKAYAMA, THORGEIRSSON e ADAMSON, 2008).

O primata não humano da espécie *Sapajus apella* é conhecido popularmente como macaco prego e pertence à subordem *Anthropoidea*,

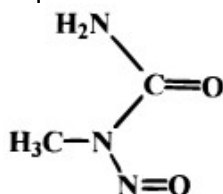
superfamília *Platyrrhini*, família *Cebidae* e gênero *Sapajus*. Essa espécie é encontrada na região leste e sul da Colômbia, sul da Venezuela, Guianas, leste do Equador, grande parte do Brasil, Bolívia e Paraguai (NAVES , *et al.*, 2006).

Os macacos do gênero *Sapajus* são indivíduos de tamanho médio, com tamanho corpóreo de até 60 centímetros, pesam entre 2,5 e 5,0 quilogramas, apresentam o corpo robusto e exibem dimorfismos sexuais, e possuem grande capacidade de adaptação a diferentes habitats (FERREIRA, 2009).

A utilização crescente dos primatas da espécie *Sapajus apella* em pesquisas científicas, dentre tantas outras espécies, tem ocorrido graças a sua homologia com o *Homo sapiens*, o que demonstra sua relevância na investigação de mecanismos patológicos e fisiológicos nas áreas de hematologia, imunologia, virologia e oncologia (VASCONCELOS, 2008; FERREIRA, 2009; FEIO, *et al.*, 2017)

Este tipo de modelo experimental – combinado ao uso de carcinógenos químicos para induzir ao câncer gástrico – estabelecido pelo *National Cancer Institute* (NIH) dos Estados Unidos e pelo *National Cancer Research Institute* do Japão (TAKAYAMA, THORGEIRSSON e ADAMSON, 2008). Dentre os carcinógenos químicos capazes de induzir tumores gástricos em modelos experimentais está o N-Metil-N-nitrosurea (MNU) (Figura 13). Este agente é capaz de provocar alterações genéticas e epigenéticas levando a alterações neoplásicas. É um conhecido carcinógeno que não necessita de ativação metabólica agindo diretamente sob o organismo (SWAN e MAGEE, 1968; BUDÁN, *et al.*, 2008).

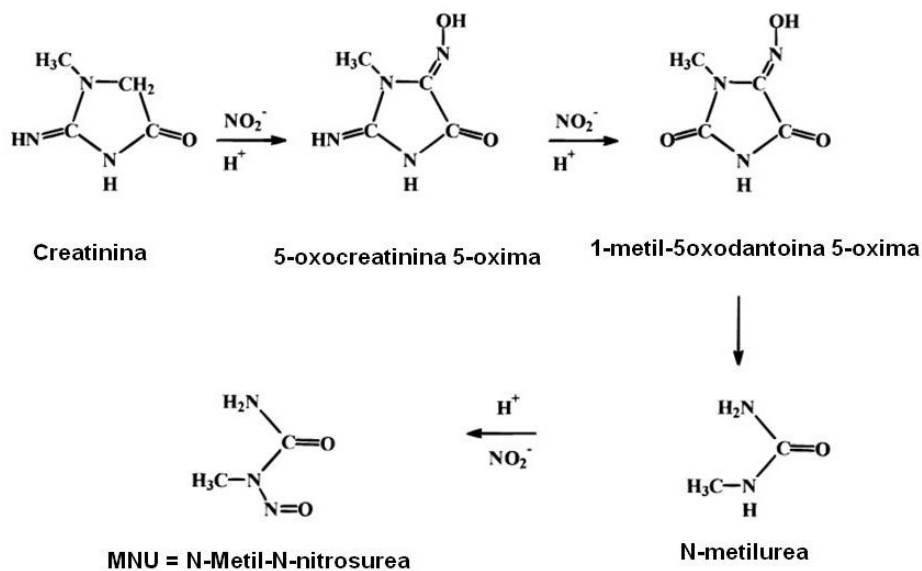
Figura 13 - Estrutura química do MNU (N-Metil-N-nitrosurea).



Fonte: (SEN, *et al.*, 2000).

O MNU pertence à classe de compostos conhecidos genericamente como N-nitrosamidas, que são instáveis em solução aquosa, especialmente em $\text{pH} > 5$. É improvável que sejam encontradas MNU ou outras nitrosamidas em concentrações apreciáveis em alimentos ou bebidas. Entretanto, é possível que estes compostos sejam formados no estômago *in vivo* de humanos a partir de precursores ingeridos (como amidas e nitritos). Experimentos demonstram que pode haver formação de nitrosamidas (como o MNU) a partir de precursores amidas correspondentes, sendo esta muito elevada em condições ácidas como as encontradas no estômago (FAUSTINO-ROCHA, *et al.*, 2015). O MNU pode ainda ser formado como produto do metabolismo da creatinina (Figura 14) (SEN, SEAMAN, *et al.*, 2000). Devido a probabilidade de formação de MNU a partir de amidas e nitritos, a ingestão de carnes curadas e alimentos salgados torna-se um fator ambiental predisponente ao câncer, principalmente o de estômago (BONEQUI, *et al.*, 2013; GADDY, *et al.*, 2013; FAUSTINO-ROCHA, *et al.*, 2015).

Figura 14 - Reação de formação de MNU a partir da Creatinina



Fonte: (SEN, *et al.*, 2000).

A nível molecular, o MNU reage com a guanina do DNA formando O⁶-metilguanina. A alquilação na posição O6 da guanina é associada à formação de mutação do DNA nos cânceres, como a transição de pares de guanina-citosina

e de adenina-timina na mutação no gene *K-RAS* ou no *TP53*, que ocorre porque guanina alquilados são reconhecidas como adeninas durante a replicação do DNA (BUDÁN, VARJAS, *et al.*, 2008). Devido às características supracitadas, o MNU tem sido utilizado como carcinógeno em modelos experimentais (LEE, *et al.*, 2016; ARAS, *et al.*, 2013; CAICEDO–GRANADOS, *et al.*, 2014)

Sendo assim, a indução pelo MNU de lesões pré-neoplásicas semelhantes às que ocorrem antes do desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal (TSUKAMOTO, MIZOSHITA e TATEMATSU, 2007) em primatas não humanos, permite que sejam coletadas amostras de tecido gástrico de cada estágio de desenvolvimento da doença e caracterizar quais as alterações genéticas e epigenéticas presentes.

CAPÍTULO IV.

ALTERAÇÕES NO mtDNA, CARCINOGENESE GÁSTRICA E DIAGNÓSTICO PRECOCE.

Alterations in mtDNA, gastric carcinogenesis and early diagnosis.

Symara Rodrigues Antunes, Barbara do Nascimento Borges.

Artigo publicado na Revista Mitochondrial DNA Part A, DOI:
10.1080/24701394.2018.1475478.



Mitochondrial DNA Part A

DNA Mapping, Sequencing, and Analysis

ISSN: 2470-1394 (Print) 2470-1408 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/imdn21>

Alterations in mtDNA, gastric carcinogenesis and early diagnosis

S. Rodrigues-Antunes & B. N. Borges

To cite this article: S. Rodrigues-Antunes & B. N. Borges (2018): Alterations in mtDNA, gastric carcinogenesis and early diagnosis, Mitochondrial DNA Part A, DOI: [10.1080/24701394.2018.1475478](https://doi.org/10.1080/24701394.2018.1475478)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/24701394.2018.1475478>



Published online: 26 May 2018.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

REVIEW ARTICLE



Alterations in mtDNA, gastric carcinogenesis and early diagnosis

S. Rodrigues-Antunes and B. N. Borges 

Laboratório de Biologia Molecular “Francisco Mauro Salzano”, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil

ABSTRACT

Gastric cancer remains one of the most prevalent cancers in the world. Due to this, efforts are being made to improve the diagnosis of this neoplasm and the search for molecular markers that may be involved in its genesis. Within this perspective, the mitochondrial DNA is considered as a potential candidate, since it has several well documented changes and is readily accessible. However, numerous alterations have been reported in mtDNA, not facilitating the visualization of which alterations and molecular markers are truly involved with gastric carcinogenesis. This review presents a compilation of the main known changes relating mtDNA to gastric cancer and their clinical significance.

ARTICLE HISTORY

Received 6 March 2018
Accepted 7 May 2018

KEYWORDS

Mitochondrial DNA; gastric cancer; molecular markers

Introduction

Gastric cancer remains the most common type of cancer worldwide, being responsible for high amounts of death (Cutsem et al. 2016). In the past years, a decrease in the prevalence of gastric cancer has been observed, however, its morbidity remains high as in most cases the diagnosis occurs in advanced stage (Karimi et al. 2014). It is known that predisposing factors such as behavioural habits – like high salt intake and smoking – and genetic alterations – like familial hereditary changes in CDH1 gene (especially for the diffuse type) (Hansford et al. 2015) – contribute to the genesis of gastric cancer (Guggenheim and Shah 2013). Despite several studies on the etiopathogenesis of gastric cancer, a unique molecular marker that provides an early and less invasive diagnosis, allowing a better prognosis for the patient, has not yet been found (Karimi et al. 2014). This is due, in part, to the complexity of nuclear DNA (nDNA) and the several changes reported to be involved in gastric carcinogenesis (Van der Post et al. 2015), such as those triggered by *Helicobacter pylori* infection (Amieva and Peek 2016).

Despite the factors above, correlation between changes in mitochondrial DNA (mtDNA) and gastric cancer has recently been reported (Lee et al. 2014). Indeed, Warburg (1956) suggested that defects in mitochondria lead to changes in the behaviour of the entire cell, which can lead to a malignant transformation and tumour progression (Warburg 1956; Butcher et al. 2017). Recently, the involvement of mutations and copy number variations in mtDNA in a variety of cancers has been reported (Wallace 2013; Reznik et al. 2016), including gastric cancer (Fernandes et al. 2014). Therefore, the involvement of mitochondria in the carcinogenesis of some cancers has been reported (Hofmann et al. 2014; McMahon and LaFramboise 2014; Errichiello and Venesio 2017; Hardie et al. 2017; Strickertsson et al. 2017; Zhu et al. 2017).

On the other hand, with more and more cases of cancer being reported worldwide, the search for tumour markers that can help in the screening of patients, selection of better and more effective treatments and improvement in the early diagnosis of cancer becomes an important field of research. Due to the existence of hundreds of copies per cell which are, theoretically easy to access, a molecular tumour marker based on mtDNA is promising (Wallace 2012; Geurts-Giele et al. 2015; Kleist et al. 2016; Kirches 2017). However, this field has proved to be more difficult than it appeared, due to difficulties in establishing effective methodologies and to the need of improvement on the interpretations of the results. These difficulties often relate to properly isolating mtDNA from nDNA, in addition to the correct choice of the target gene or mitochondrial region correlated with gastric carcinogenesis (Vyas et al. 2016; Qian et al. 2017).

Nevertheless, many studies have shown promising results concerning these challenges for diagnosis/prognosis of gastric cancer (Maximo et al. 2001; Wu et al. 2005; Wang, Wang, Wang, et al. 2014). To provide a perspective of such advances, the present review intends to bring together the main mitochondrial targets that may be used as tumour molecular markers in gastric cancer diagnosis.

Mitochondrial genome and function

Mitochondria are eukaryotic cell organelles involved primarily in cell energy generation and cellular homeostasis, mainly by ATP production via respiratory chain that results in the production of reactive oxygen species (ROS) which may trigger apoptotic process (Wallace 2012; Sabharwal and Schumacker 2014; Panieri and Santoro 2016; Ježek et al. 2018). Moreover, mitochondria are special organelles in the cell: they have their own DNA, which is circular,

double-stranded and composed of 16,569 bp, with several copies per organelle. Traditionally, mtDNA strands are classified as heavy or light depending on the presence of a higher or smaller content of guanine (Lima and Prosdociimi 2017).

Human mtDNA encodes 13 polypeptides involved in respiration chain and oxidative phosphorylation of the cell, besides two rRNA and 22 tRNA essentials for the synthesis of proteins within the mitochondria. There is also one control region, called displacement loop (*D-LOOP*), whose function is to control the replication and transcription of the molecule (Osellame et al. 2012). Due to exclusive maternal inheritance of mitochondria, most cells in an organism have identical mtDNA – a condition called homoplasmy. If changes in the mtDNA occur and propagate, this condition is called heteroplasmy (DeBerardinis and Chandel 2016).

In general, because this organelle participates of important cellular physiological processes, mutations or changes on its genome copy number can lead to a deficiency in energy production and large disorders in the cell (Wallace 2013; Borriello and Ragine 2017). Indeed, mutations in mtDNA are linked to some human diseases, aging and degenerative or metabolic disorders caused by changes in DNA in a hereditary or somatic way (Grimm et al. 2016; Young and Copeland 2016; Zong et al. 2016; Kauppila et al. 2017). Association between mutations in mtDNA and cancer has become an interesting research field since Warburg described changes in cancer cell metabolism (Warburg 1956). After Warburg's discovery, which revealed that cancer cells prefer to metabolize glucose via glycolysis even in the presence of O₂, many studies have shown that aerobic glycolysis is a hallmark of cancer (Hanahan and Weinberg 2011; Ward and Thompson 2012; Cairns and Mak 2016; Lim et al. 2016; Pavlov and Thompson 2016; Trachootham et al. 2017). Glycolysis requires, initially, the conversion of glucose to pyruvate, and then pyruvate is subsequently forwarded to the mitochondria for the production of acetyl-CoA and following the Krebs cycle. Oxygen deprivation in mammalian cells leads to a lower production of ATP due to the production of lactic acid rather than pyruvate (Boroughts and DeBerardinis 2015; DeBerardinis and Chandel 2016; Martinez-Outschoorn et al. 2017). The so-called Warburg effect is therefore related to defects caused by oxidative phosphorylation in mtDNA genes, where such alterations induce cancer cells to anaerobic glycolysis (Ward and Thompson 2012; Maiuri and Kroemer 2014).

Just as nDNA, mtDNA is exposed to environmental agents, such as radiations and chemicals, which cause structural alterations (Houten et al. 2016; Lambertini and Byun 2016; Roubicek and Souza-Pinto 2017). However, mtDNA is most likely to mutate, due to its proximity to the production of some of these agents, especially ROS, and thus the rate of mutation in mtDNA is about 10- to 200-fold higher than in nDNA (Giannattasio et al. 2013).

Interestingly, the mtDNA has, as already mentioned above, numerous coding regions that could harbour several genetic mutations. However, mutation rates of mtDNA appear to be concentrated in the *D-LOOP* region (Bussard and Siracusa 2017). *D-LOOP* is an important region, with 1122 base pairs (bp), that controls the entire noncoding mtDNA. It contains

important sequences that are fundamental for the normal mitochondrial functions, such as the origin of replication of both mtDNA strands and the binding sites for transcription factors of several mitochondrial genes (Young and Copeland 2016; Sun and St. John 2017). Alterations in this area may impact the entire mitochondrial behaviour (Lee et al. 2014; Guo et al. 2016; Govatati et al. 2017). In addition, besides the higher nucleotide substitution rate, the *D-LOOP* region has two hypervariable regions, called hypervariant I (HVI) and hypervariant II (HVII) regions which have, as their name indicates, high rates of nucleotide variation (Wei et al. 2011). Although many studies do not show clinicopathological alterations when *D-LOOP* is mutated, this region appears to be a mutational hotspot associated with greater severity of the related disease (Mousavizadeh et al. 2015; Xu et al. 2015; Stocco et al. 2017).

Utility of mtDNA for screening patients with gastric cancer

The correlation between mtDNA and gastric cancer has been discussed for decades, receiving a greater interest in the last years (Table 1).

Deletions are a common reported alteration when analysing primary gastric cancer. A 50bp deletion had not been reported as being a normal polymorphism (Burgart et al. 1995). Another indel event (248delA) was reported in an analysis of 45 samples from patients with gastric cancer (Tamura et al. 1999). However, such studies made no inferences about the consequences and cellular behaviour of such alterations.

Two polymorphisms are commonly reported: D310[C6] and D514[CA5]; the former is more frequent in gastric cancer samples, although lacking significant correlation with patients' clinicopathological data, such as the occurrence of *H. pylori* (Hiyama et al. 2003). This polymorphism was observed more frequent in gastric cancer samples than in control samples. Another polymorphism (D16521) investigated demonstrated similar results (Wei et al. 2011). At this point, still clinicopathologically associated, however, it was demonstrated that this polymorphism could be used as molecular markers for gastric cancer. Indeed, instability in this mtDNA area reported in other types of cancer demonstrated a possible strong correlation with carcinogenesis (Tommasi et al. 2014; Geurts-Giele et al. 2015; Chen et al. 2016).

The statement that *D-LOOP* is a mutational hotspot is associated with the notion that increased production of ROS in mitochondria directly influences their DNA and that such region controls the transcription of the entire mtDNA. Consequently, mutations in the *D-LOOP* may alter all the encoded genes and the behaviour of the mitochondria and of the cell itself. In analyses with samples of patients with gastric cancer, it was identified that 18 mutations associated with a significant increase in ROS production, apoptosis and proliferation (Zhao et al. 2005). These data corroborate with the assumption that changes in mtDNA lead to an uncontrolled production of ROS and, thereafter, affect cellular proliferation rate and apoptosis. So, it is expected that mtDNA impairment increases as the stages of gastric cancer progress.

Table 1. Alterations observed in mtDNA in gastric cancer patients.

Region/gene	Variation	Author
–	Large deletion (Δ 4977 bp mtDNA)	Maximo et al. (2001) and Wu et al. (2005)
Non-coding nucleotides	Np5895 delC	Hung et al. (2010)
conserved sequence block 2 or CSB220	50 bp del	Burgart et al. (1995)
D310 (<i>D-LOOP/HVII</i>)	7C/7C	Wei et al. (2011)
	7C/8C	
	8C/8C	
	8C/9C	
	9C/9C	
	7C/8C + 8C/8C	
	7C	
	8C	
	8C/9C + 9C/9C	
	9C	
	1-bp del	Hiyama et al. (2003)
	2-bp del	
D16521 (<i>D-LOOP</i> /16320-67np)	T/T	Wei et al. (2011)
	C/T	
	C/C	
	C/T + C/C	
	T	
	C	
<i>D-LOOP</i>	260-bp tandem duplication/triplication in mtDNA <i>D-LOOP</i> Region	Hung et al. (2008)
	Np41 C→T	Zhao et al. (2005)
	Np72 T→C	
	Np73 A→G	
	Np73 G→A	Han et al. (2003)
	Np101 G→A	Wang, Wang, Wang, et al. (2014)
	Np143 G→A	Tamura et al. (1999)
	Np146 T→C	Han et al. (2003)
	Np150 C→T	Han et al. (2003)
	Np152 T→C	Tamura et al. (1999)
	Np167 C→G	Han et al. (2003)
	Np189 A→G	Zhao et al. (2005)
	Np204–207 TGTG→TG	Lee et al. (2005) and Wu et al. (2005)
	Np204 T→C	Tamura et al. (1999), Han et al. (2003), Lee et al. (2005) and Wu et al. (2005)
	Np204 T→T/C	
	Np205 G→A	
	Np235 A→G	Lee et al. (2005) and Wu et al. (2005)
		Han et al. (2003) and Wang, Wang, Wang, et al. (2014)
	Np248 A del	Tamura et al. (1999)
	Np255 G→A	Zhao et al. (2005)
	Np263 A→G	Han et al. (2003)
	Np303–309 (C) ₇ →(C) ₉	Tamura et al. (1999)
	Np303 (C) ₇ →(C) ₈	Lee et al. (2005), Wu et al. (2005), Zhao et al. (2005), Hung et al. (2008) and Wang, Wang, Wang, et al. (2014)
	Np303 (C) ₈ →(C) ₇	
	Np303 (C) ₈ →(C) ₉	
	Np303 (C) ₉ →(C) ₈	
	Np303 (C) ₈ →(C) ₁₀	
	Np310 T→CTCC	
	Np311/568 ins	Han et al. (2003)
		Lee et al. (2005), Wu et al. (2005) and Hung et al. (2008)
	Np311–315 (C) ₅ →(C) ₆	Tamura et al. (1999) and Han et al. (2003)
	Np312 T→TCCCCC	
	Np318(317) C→T	
	Np321(320) C→T	Han et al. (2003)
	Np324 C→G	
	Np392 T→C	Wang, Wang, Wang, et al. (2014)
	Np481 C→T	Zhao et al. (2005)
	Np483 C→A	Han et al. (2003)
	Np489 C→T	
	Np489 T→C	Tamura et al. (1999), Han et al. (2003) and Wang, Wang, Wang, et al. (2014)
	Np514–523 (CA) ₅ →(CA) ₄	Tamura et al. (1999), Maximo et al. (2001), Han et al. (2003) and Zhao et al. (2005)
	Np514 (CA) ₅ →(CA) ₈	
	Np514 (CA) ₅ →(CA) ₆	
	Np514 (CA) ₅ →(CA) ₄	
	Np523 AC→del	Han et al. (2003) and Wang, Wang, Wang, et al. (2014)
	Np527 C→T	Han et al. (2003)
	Np567 (C) ₆ →(C) ₇	Zhao et al. (2005) and Maximo et al. (2001)
	Np568 (CA) ₆ →(CA) ₉	
	Np611 G(ins)	
	Np641 A→T	Han et al. (2003)
	Np16122 T→C	Zhao et al. (2005)

(continued)

Table 1. Continued

Region/gene	Variation	Author
12S rRNA	Np16129 G→A	Tamura et al. (1999)
	Np16221 C→T	Zhao et al. (2005)
	Np16189 T→C	Tamura et al. (1999)
	Np16234 C→Del	Zhao et al. (2005)
	Np16260 C→T	Lee et al. (2005) and Wu et al. (2005)
	Np16325 T→C	Tamura et al. (1999)
	Np16362 T→C	Wang, Wang, Wang, et al. (2014)
	Np16366 T→C	Zhao et al. (2005)
	Np16399 A→C/A→A/G	Tamura et al. (1999), Lee et al. (2005) and Wu et al. (2005)
	Np16401 C→A	Lee et al. (2005)
	Np16438 G→A/G→G/A	Lee et al. (2005), Wu et al. (2005), Zhao et al. (2005)
	Np16465 A→G	Zhao et al. (2005)
	Np16492 A→Del	
	Np16494 C→T	
	Np16519 C→T	Lee et al. (2005), Wu et al. (2005) and Wang, Wang, et al. (2014)
	Np652 G(ins)	Han et al. (2003) and Han et al. (2005)
	Np663 A→G	Han et al. (2005)
	Np709 G→A	Han et al. (2003) and Han et al. (2005)
	Np716 T(del)	
tRNA ^{Leu} ND5	Np716 T→G	
	Np728 C→T	
	Np745 A→G	
	Np750 G→A	Han et al. (2005)
	Np757 A→T	Han et al. (2003) and Han et al. (2005)
	Np759 A→T	Han et al. (2005)
	Np760 A→T	Han et al. (2003)
	Np764 A→C	Han et al. (2005)
	Np772 A→T	Han et al. (2003) and Han et al. (2005)
	Np782 A→T	Han et al. (2005)
	Np794 T→C	
	Np799 A→C	
	Np960 insC	Jiang et al. (2015)
	Np1106 T→C	Han et al. (2003)
	Np1160 A→G	
	Np1226 C→T	
	Np3244 G→A	Habano et al. (2000)
	Np13015 T→C (Leu→Leu)	Hung et al. (2010)
	Np12405 C→T (Leu→Leu)	
COI	Np12418 InsA (frame shift)	
	TTC→TCC = Phe→Ser	Habano et al. (2000)
	ATA→TTA = Met→Leu	
	C ins = códon stop	
	Np12481 TTC→CTC = Phe49Leu	Maximo et al. (2001)
	Np12506 TCC→CCC = Ser77Pro	
	Np12529 AAC→AGC = Asn65Ser	
	Np12561 CAG→CAA = Gln75Gln	
	Np12536 CAC→CGC = His67Ar	
	Np6573 (GGA) ₃ →(GGA) ₄ = (Gln)3226(Gln) ₄	Maximo et al. (2001)
ATPase 6	Np7080 T→C	Jiang et al. (2015)
	AC del = stop codon	Habano et al. (2000)
	Np8572 G > A (p.G16S)	Bi et al. (2011)
ND1	Np8686 T→C	Jiang et al. (2015)
	Np3526 GCC→ACC = Ala74Thr	Maximo et al. (2001)
	Np3644 T→C	Jiang et al. (2015)
ND2	Np3447 CAA→CAG = Gln47Gln	Maximo et al. (2001)
	Np3697 G→A	Hung et al. (2010)
	Np3580 AAA→AAG = Lys58Lys	Maximo et al. (2001)
ATPase8 CytB	Np4632 G > A (p.A55T)	Bi et al. (2011)
	Np4996 G→A	Hung et al. (2010)
	Np8572 G > A (synonymous)	Bi et al. (2011)
RNR2	Np15777 G > A (p.S344N)	Bi et al. (2011)
	Np15597 T > C (p.V284A)	
	Np15767 C→G;	Jiang et al. (2015)
COIII	Np15497 G→A	Jiang et al. (2015)
	Np2148 2149dupAG	Bi et al. (2011)
	Np3200 T > C	
tRNA ^{pro} tRNA ^{ser(ucn)}	Np9770 T→C (synonymous)	Bi et al. (2011)
	Np9986 G→A (Gly→Gly)	Hung et al. (2010)
	Np15983 T→C	Jiang et al. (2015)
ND4	Np7472 InscC	Hung et al. (2010)
	Np11253 T→C	Jiang et al. (2015)

Np: nucleotide position; Del: deletion; Ins: insertion.

However, despite several point mutations in the *D-LOOP* region are reported, there is no observation in increase of mtDNA impairment in these cases in gastric cancer (Lee et al. 2005).

Nevertheless, several reports suggest that changes in mtDNA have a strong correlation with gastric carcinogenesis. Regardless of association between genetic alterations in mtDNA and Warburg's effect, mtDNA depletion, resistance to apoptosis and oxidative chain defects was reported. This association, even without clinicopathological changes associated, resulting in an accumulation of a greater amount of ROS and consequently major changes in the cell leads to installation of the malignant phenotype (Wu et al. 2005).

In another approach, analysis in *D-LOOP* region and other genes (*ND1/tRNA^{Leu}*, *ND4*, *ND5*, *COII*, *Cytb*, *ND2*, *ND3* and *ATPase 6*) suggested that microsatellite instability and frame-shift mutations which lead to truncated products of the *ATPase6* and *ND5* only in tumoural samples, corroborate the idea that mtDNA changes contribute to gastric carcinogenesis (Habano et al. 2000). Likewise, several alterations were found in *ND1*, *ND5* and *COI* genes, although most of the reported mutations were concentrated in the *D-LOOP* region. Those mutations were grouped in three types: large deletions ($\Delta 4977$ bp mtDNA), point mutations (transitions) and small indel events (Maximo et al. 2001). It is noteworthy to notice that such alterations were only found in tumour tissue samples. The discovery of the fact that both normal and tumour tissues have alterations in mtDNA suggests that most of the alterations were involved in gastric carcinogenesis. When results were analysed using the classification proposed by Lauren (Lauren 1965), a predominance of a large deletion in *D-LOOP* ($\Delta 4977$ bp mtDNA) in diffuse type gastric cancer was observed. Once again providing a way of differentiating between the histological types of Lauren.

On the other hand, a correlation between the alterations np652insG and np716T G of the *12S rRNA* and gastric carcinogenesis, especially of the intestinal type was reported (Han et al. 2005). This represents another distinction between Lauren histological types that can assist in a screening of patients.

However, we cannot put apart the importance of *H. pylori* infection in gastric carcinogenesis. In two studies that analysed the influence of *H. pylori* infection on mtDNA based on comparisons of cell cultures, animal models and human samples, a decrease in the expression of genes involved in base excision repair and mismatch repair (MMR) after infection by *H. pylori*, both *in vitro* and *in vivo* was demonstrated (Machado et al. 2009, 2013 – Table 1). These transformations lead both nuclear and mtDNA to accumulate errors which contribute to carcinogenesis. When mitochondrial genes were analysed (*ND1*, *D-LOOP*, *ATPase6* and *COI*) in this scenario, the mutation rate – especially transversions – was observed to be higher in infected cells than in uninfected cells. Analyses of patient samples focusing on the *D-LOOP* region and coding region (*ND1*, *ND3*, *ND4*, *ND5*, *COI* and *ATPase6* genes), demonstrate a 20% increase in the mutation rate. There was an association between mutations in the D310 *D-LOOP* region and changes in the mtDNA coding region of the *ND1* gene complex (Machado et al. 2009). These results may suggest that changes induced by

bacteria can modify mtDNA and consequently alter all functioning of the organelle by modification of gene products.

Based on previous studies showing that repair machine malfunction may induce mutations in mtDNA altered the expression of *APE-1* and *YB-1* to prove that they were involved in the mitochondrial base excision repair and MMR and were modified when there is an infection by *H. pylori* (Machado et al. 2013). The results agreed with the proposed hypothesis. To prove this, an mtDNA analysis involving the *D-LOOP* region, comprising D310 (C6) and D514 (CA5) repeats, as well as analyses of *ND1* gene was performed. The resulting data were similar to those published earlier (Machado et al. 2009), with higher mutation rates in *D-LOOP* and *ND1* gene in cells infected by the bacteria than in uninfected ones.

However, studies indicate that rather than alterations on the mtDNA copy number (Liao et al. 2011; Jiang et al. 2015), changes in the mtDNA (Wang, Wang, Zhao, et al. 2014) are more associated with a chance of developing gastric cancer. This was due to the observation that several alleles in *D-LOOP* region (73G/A, 235A/G, 309insC/C, 324C/G, 16,362T/C and 16,519C/T) were significantly associated with an increased risk of gastric cancer, while the 523–524delAC allele was associated with a minor risk to develop gastric cancer. These findings suggest these SNPs can be used in screening tests for patients at high risk of developing gastric cancer (Wang, Wang, Zhao, et al. 2014). The SNP site 489C/T, located at the hypervariable segment 3 (HV3) region of *D-LOOP*, is an independent prediction marker for gastric cancer outcome, whereas 523–524delAC is associated with overall survival in this type of cancer (Wang, Wang, Wang, et al. 2014).

Analysis of biopsy material from gastric cancer patients revealed changes in coding (*ND1*, *ND2*, *ND5*, *COIII* and *tRNA^{Ser (UCN)}*) and non-coding regions of mtDNA (Hung et al. 2010). Even though no correlation with clinicopathological characteristics of individuals was observed, the alterations were more frequent in samples from Lauren's intestinal type, a result similar to that of Han et al. (2005).

Two studies (Liao et al. 2011; Jiang et al. 2015) also indicate that changes in the number of copies of mtDNA, obtained from blood samples, may be associated with gastric cancer. Even though no correlation was found between changes reported in mtDNA and clinical aspects in patients, even in early stages (Jiang et al. 2015), the authors suggest that the results may be affected by the small sample size and by the fact that analysed Tibetan population reside in high altitude sites, forcing cells to adapt their mitochondrial phosphorylation pattern and possibly even alter the mtDNA. On the other hand, Liao et al. (2011) observed a decrease of mtDNA copy number about two years before gastric cancer development in the patients, but even so, no significant relationship between mtDNA copy number and gastric cancer in general was found.

Bi et al. (2011) presented a new approach to the analysis of all mtDNAs. Through phylogenetic analysis, mtDNA sequences of cancer cells were compared to their normal paired tissues (normal adjacent tissue or peripheral blood). Unfortunately, due to the sample size the authors could not associate the mutations found in mtDNA to the genesis of

gastric cancer. However, this type of methodological approach can be used for future studies, with a relevant sampling, to determine which mutations in mtDNA are indeed correlated with gastric carcinogenesis.

Conclusions and perspectives

Mutations in genes like *TP53* and *CDH1* are still mainly associated with gastric cancer (Van der Post et al. 2015). However, they do not totally explain the differences in the clinical presentations of this type of cancer or imply different treatments. Therefore, the search for new molecular markers that can be used in treatment and prognosis for patients with gastric cancer has been incessant. Alterations in mtDNA have been shown to be unrelated to clinicopathological aspects, but apparently associated with differentiated prognostics of tumour evolution and involved in gastric carcinogenesis.

Despite some studies showed that alterations in mtDNA could be used to screen patients for gastric cancer, more studies are needed to find a common marker easy to identify. In view of the fact that mitochondria are one of the therapeutic targets used by anti-cancer chemotherapeutic drugs, it has been shown that mtDNA changes are an important field of study (Borriello and Ragione 2017; Martinez-Outschoorn et al. 2017).

Even with the *D-LOOP* region being considered as the mtDNA area more prone to alterations and thus a mutational hotspot with the potential to alter the behaviour of mtDNA and the organelle itself, alterations in coding genes also seem to have an influence on gastric carcinogenesis – especially those on *ND1* gene, referred by some authors as involved in the development of gastric cancer (Maximo et al. 2001; Jiang et al. 2015).

The classification of solid tumours regarding mtDNA status will lead to changes in patient screening and treatment management, as well as improvement in the establishment of more accurate prognostics. We can therefore consider that the use of mtDNA as a tumour marker for gastric cancer, especially polymorphisms in the D-loop region, is promising, leading to uses both in the diagnosis of the patient and in the management of the treatment.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

S. Rodrigues-Antunes was awarded with a doctoral fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

ORCID

B. N. Borges  <http://orcid.org/0000-0002-5989-8287>

References

Amieva M, Peek RM. Jr. 2016. Pathobiology of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer. *Gastroenterology*. 150:64–78.

- Bi R, Li WL, Chen MQ, Zhu Z, Yao YG. 2011. Rapid identification of mtDNA somatic mutations in gastric cancer tissues based on the mtDNA phylogeny. *Mutat Res*. 709–710:15–20.
- Borroughs LK, DeBerardinis RJ. 2015. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat Cell Biol*. 17:351–359.
- Borriello A, Ragione FD. 2017. The new anticancer era: tumor metabolism targeting. *Cell Cycle*. 16:310–311.
- Burgart LJ, Zheng J, Shu Q, Strickler JG, Shibata D. 1995. Somatic mitochondrial mutation in gastric cancer. *Am J Pathol*. 147:1105–1111.
- Bussard KM, Siracusa LD. 2017. Understanding mitochondrial polymorphisms in cancer. *Cancer Res*. 77:6051–6059.
- Butcher LD, Den Hartog G, Ernst PB, Crowe SE. 2017. Oxidative stress resulting from *Helicobacter pylori* infection contributes to gastric carcinogenesis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 3:316–322.
- Cairns RA, Mak TW. 2016. The current state of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer*. 16:613–614.
- Chen X, Fang Y, Shi Y, Cui J, Li L, Xu Y, Ling B. 2016. Mitochondrial D310 instability in Chinese lung cancer patients. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*. 27:1177–1180.
- Cutsem EV, Sagaert X, Topal B, Haustermans K, Prenem H. 2016. Gastric cancer. *Lancet*. 388:2654–2664.
- DeBerardinis RJ, Chandel NS. 2016. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*. 2:e1600200.
- Errichiello E, Venesio TJ. 2017. Mitochondrial DNA variants in colorectal carcinogenesis: drivers or passengers? *J Cancer Res Clin Oncol*. 143:1905–1914.
- Fernandes J, Michel V, Camorlinga-Ponce M, Gomez A, Maldonado C, De Reuse H, Torres J, Touati E. 2014. Circulating mitochondrial DNA level, a noninvasive biomarker for the early detection of gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 23:2430–2438.
- Geurts-Giele WRR, Gathier GHGK, Atmodimedjo PN, Dubbink HJ, Dinjens WNM. 2015. Mitochondrial D310 mutation as clonal marker for solid tumors. *Virchows Arch*. 467:595–602.
- Giannattasio S, Guaragnella N, Arbini AA, Moro L. 2013. Stress-related mitochondrial components and mitochondrial genome as targets of anticancer therapy. *Chem Biol Drug Des*. 81:102–112.
- Govatati S, Saradamma B, Malempati S, Dasi D, Thupurani MK, Nagesh N, Shivaji S, Bhanoori M, Tamanam RR, Nallanchakravarthula V, et al. 2017. Association of mitochondrial displacement loop polymorphisms with risk of colorectal cancer in south Indian population. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*. 28:632–637.
- Grimm A, Friedland K, Eckert A. 2016. Mitochondrial dysfunction: the missing link between aging and sporadic Alzheimer's disease. *Biogerontology*. 17:281–296.
- Guggenheim DE, Shah MA. 2013. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Surg Oncol*. 107:230–236.
- Guo Z, Zhao S, Fan H, Du Y, Zhao Y, Wang G. 2016. Identification of sequence polymorphisms in the D-Loop region of mitochondrial DNA as a risk factor for colon cancer. *Mitochondr A*. 27:1–2.
- Habano W, Sugai T, Nakamura SI, Uesugi N, Yoshida T, Sasou S. 2000. Microsatellite instability and mutation of mitochondrial and nuclear DNA in gastric carcinoma. *Gastroenterology*. 118:835–841.
- Han CB, Li F, Zhao YJ, Ma JM, Wu DY, Zhang YK, Xin Y. 2003. Variations of mitochondrial D-loop region plus downstream gene 12S rRNA-tRNA^{Phe} and gastric carcinomas. *World J Gastroenterol*. 9:1925–1929.
- Han CB, Ma JM, Xin Y, Mao XY, Zhao YJ, Wu DY, Zhang SM, Zhang YK. 2005. Mutations of mitochondrial 12S rRNA in gastric carcinoma and their significance. *World J Gastroenterol*. 11:31–35.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144:646–674.
- Hansford S, Kaurah P, Li-Chang H, Woo M, Senz J, Pinheiro H, Schrader KA, Schaeffer DF, Shumansky K, Zogopoulos G, et al. 2015. Hereditary diffuse gastric cancer syndrome CDH1 mutations and beyond. *JAMA Oncol*. 1:23–32.
- Hardie R, van Dam E, Cowley M, Han T, Balaban S, Pajic M, Pinese M, Ionomou M, Shearer RF, McKenna J, et al. 2017. Mitochondrial mutations and metabolic adaptation in pancreatic cancer. *Cancer Metabol*. 5:2.
- Hiyama T, Tanaka S, Shima H, Kose K, Kitadai Y, Ito M, Sumii M, Yoshihara M, Shimamoto F, Haruma K, et al. 2003. Somatic mutation of

- mitochondrial DNA in *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis in patients with and without gastric cancer. *Int J Mol Med*. 12:169–174.
- Hofmann JN, Hosgood HD, Liu C, Chow W, Shuch B, Cheng W, Lin T, Moore LE, Lan Q, Rothman N, et al. 2014. A nested case-control study of leukocyte mitochondrial DNA copy number and renal cell carcinoma in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial. *Carcinogenesis*. 35:1028–1031.
- Houten BV, Hunter SE, Meyer JN. 2016. Mitochondrial DNA damage induced autophagy, cell death, and disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 21:42–54.
- Hung WY, Lin JC, Lee LM, Wu CW, Tseng LM, Yin PH, Chi CW, Lee HC. 2008. Tandem duplication/triplication correlated with poly-cytosine stretch variation in human mitochondrial DNA D-loop region. *Mutagenesis*. 23:137–142.
- Hung WY, Wu CW, Yin PH, Chang CJ, Li AFY, Chi CW, Wei YH, Lee HC. 2010. Somatic mutations in mitochondrial genome and their potential roles in the progression of human gastric cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1800:264–270.
- Ježek J, Cooper KF, Strich R. 2018. Reactive oxygen species and mitochondrial dynamics: the Yin and Yang of mitochondrial dysfunction and cancer progression. *Antioxidants*. 7:13.
- Jiang J, Zhao JH, Wang XL, Di J, Liu ZB, Li GY, Wang MZ, Li Y, Chen R, Ge RL. 2015. Analysis of mitochondrial DNA in Tibetan gastric cancer patients at high altitude. *Mol Clin Oncol*. 3:875–879.
- Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman ND, Kamangar F. 2014. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 23:700–713.
- Kaupilla TES, Kaupilla JHK, Larsson N. 2017. Mammalian mitochondria and aging: an update. *Cell Metabol*. 25:57–71.
- Kirches E. 2017. MtDNA as a cancer marker: a finally closed chapter? *Curr Genom*. 18:255–267.
- Kleist B, Meurer T, Poetsch M. 2016. Mitochondrial DNA alteration in primary and metastatic colorectal cancer: different frequency and association with selected clinicopathological and molecular markers. *Tumor Biol*. 39:1010428317692246.
- Lambertini L, Byun H. 2016. Mitochondrial epigenetics and environmental exposure. *Curr Environ Health Rep*. 3:214–224.
- Lauren P. 1965. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histological classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 64:31–49.
- Lee H, Geng C, Cheng M, Lee Z, Guo Z. 2014. Single nucleotide polymorphisms in the mitochondrial displacement loop and age-at-onset of familial breast cancer. *Mitochondr A*. 27:3082–3085.
- Lee HC, Huang KH, Yeh TS, Chi CW. 2014. Somatic alterations in mitochondrial DNA and mitochondrial dysfunction in gastric cancer progression. *World J Gastroenterol*. 20:3950–3959.
- Lee HC, Yin PH, Lin JC, Wu CC, Chen CY, Wu CW, Chi CW, Tam TN, Wei YH. 2005. Mitochondrial genome instability and mtDNA depletion in human cancers. *Ann NY Acad Sci*. 1042:109–122.
- Liao LM, Baccarelli A, Shu XO, Gao YT, Ji BT, Yang G, Li HL, Hoxha M, Dioni L, Rothman N, et al. 2011. Mitochondrial DNA copy number and risk of gastric cancer: a report from the Shanghai women's health study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 20:1944–1949.
- Lim S, Li C, Xia W, Lee H, Chang S, Shen J, Hsu JL, Raftery D, Djukovic D, Gu H, et al. 2016. EGFR signaling enhances aerobic glycolysis in triple-negative breast cancer cells to promote tumor growth and immune escape. *Cancer Res*. 76:1284–1296.
- Lima NCB, Prosdociimi F. 2017. The heavy strand dilemma of vertebrate mitochondria on genome sequencing age: number of encoded genes or G1T content? *Mitochondr DNA A*. 29:300–302.
- Machado AMD, Desler C, Bøggild S, Strickertsson JAB, Friis-Hansen L, Figueiredo C, Seruca R, Rasmussen LJ. 2013. *Helicobacter pylori* infection affects mitochondrial function and DNA repair, thus, mediating genetic instability in gastric cells. *Mech Age Dev*. 134:460–466.
- Machado AMD, Figueiredo C, Touati E, Maximo V, Sousa S, Michel V, Carneiro F, Nielsen FC, Seruca R, Rasmussen LJ. 2009. *Helicobacter pylori* infection induces genetic instability of nuclear and mitochondrial DNA in gastric cells. *Clin Cancer Res*. 15:2995–3002.
- Maiuri MC, Kroemer G. 2014. Essential role for oxidative phosphorylation in cancer progression. *Cell Metabol*. 21:11–12.
- Martinez-Outschoorn UE, Peiris-Pagés M, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. 2017. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol*. 14:11–31.
- Maximo V, Soares P, Seruca R, Rocha AS, Castro P, Sobrinho-Simões M. 2001. Microsatellite instability, mitochondrial DNA large deletions, and mitochondrial DNA mutations in gastric carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 32:136–143.
- McMahon S, LaFramboise T. 2014. Mutational patterns in the breast cancer mitochondrial genome, with clinical correlates. *Carcinogenesis*. 35:1046–1054.
- Mousavizadeh K, Rajabi P, Alaei M, Dadgar R, Houshmand M. 2015. Usage of mitochondrial D-loop variation to predict risk for Huntington disease. *Mitochondr DNA*. 26:579–582.
- Osellame LD, Blacker TS, Duchon MR. 2012. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 26:711–723.
- Panieri E, Santoro MM. 2016. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liaison in cancer cells. *Cell Death Dis*. 7:e2253.
- Pavlov NN, Thompson CB. 2016. The emerging Hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metabol*. 23:27–47.
- Qian M, Spada C, Wang X. 2017. Approach, application, and bioethics of mtDNA sequencing in cancer. In: Sun H, Wang X, editors. *Mitochondrial DNA and diseases*. Advances in experimental medicine and biology, vol. 1038. Singapore: Springer.
- Reznik E, Miller ML, Senbabaoglu Y, Riaz N, Sarungbam J, Tickoo SK, Al-Ahmadie HA, Lee W, Seshan VE, Hakimi AA, et al. 2016. Mitochondrial DNA copy number variation across human cancers. *eLife*. 5:e10769.
- Roubicek DA, Souza-Pinto NC. 2017. Mitochondria and mitochondrial DNA as relevant targets for environmental contaminants. *Toxicology*. 391:100–108.
- Sabharwal SS, Schumacker PT. 2014. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat Rev Cancer*. 14:709–721.
- Stoccoro A, Siciliano G, Migliore L, Coppede F. 2017. Decreased methylation of the mitochondrial D-loop region in late-onset Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 59:559–564.
- Strickertsson JAB, Desler C, Rasmussen LJ. 2017. Bacterial infection increases risk of carcinogenesis by targeting mitochondria. *Semin Cancer Biol*. 47:95–100.
- Sun X, St. John JC. 2017. The role of the mtDNA set point in differentiation, development and tumorigenesis. *Biochem J*. 473:2955–2971.
- Tamura G, Nishizuka S, Maesawa C, Suzuki Y, Iwaya T, Sakata K, Endoh Y, Motoyama T. 1999. Mutations in mitochondrial control region DNA in gastric tumours of Japanese patients. *Eur J Cancer*. 35:316–319.
- Tommasi S, Favia P, Weigl S, Bianco A, Pilato B, Russo L, Paradiso A, Petruzzella V. 2014. Mitochondrial DNA variants and risk of familial breast cancer: an exploratory study. *Int J Oncol*. 44:1691–1698.
- Trachootham D, Chingsuwanrote P, Yoosadiang P, Mekkiangkrai D, Ratchawong T, Buraphacheep N, Kijanakul S, Saekhow S, Pongpichayadej O, Vongvachvasin K, et al. 2017. Partial substitution of glucose with xylitol suppressed the glycolysis and selectively inhibited the proliferation of oral cancer cells. *Nutr Cancer*. 69:1–11.
- Van der Post RS, Vogelaa IP, Carneiro F, Guilford P, Huntsman D, Hoogerbrugge N, Caldas C, Schreiber KEC, Hardwick RH, Ausems MGEM, et al. 2015. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. *J Med Genet*. 52:361–374.
- Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. 2016. Mitochondria and cancer. *Cell*. 166:555–566.
- Wallace DC. 2012. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer*. 12:685–698.
- Wallace DC. 2013. A mitochondrial bioenergetic etiology of disease. *J Clin Invest*. 123:1405–1412.
- Wang C, Wang Y, Wang H, Zhang R, Guo Z. 2014. Mitochondrial DNA haplogroup N is associated good outcome of gastric cancer. *Tumour Biol*. 35:12555–12559.
- Wang H, Wang Y, Zhao Q, Guo Z, Zhang F, Zhao Y, Zhang R. 2014. Identification of sequence polymorphisms in the D-Loop region of mitochondrial DNA as a risk factor for gastric cancer. *Mitochondr DNA*. 27:1045–1047.
- Warburg O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science*. 123:309–314.

- Ward PS, Thompson CB. 2012. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even Warburg did not anticipate. *Cancer Cell*. 21:297–308.
- Wei L, Zhao Y, Guo TK, Li PQ, Wu H, Xie HB, Ma KJ, Gao F, Xie XD. 2011. Association of mtDNA D-Loop polymorphisms with risk of gastric cancer in Chinese population. *Pathol Oncol Res*. 17:735–742.
- Wu CW, Yin PH, Hung WY, Li AFY, Li SH, Chi CW, Wei YH, Lee HC. 2005. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in gastric cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 44:19–28.
- Xu J, Guo Z, Bai Y, Zhang J, Cui L, Zhang H, Zhang S, Ai X. 2015. Single nucleotide polymorphisms in the D-loop region of mitochondrial DNA is associated with the kidney survival time in chronic kidney disease patients. *Renal Fail*. 37:108–112.
- Young MJ, Copeland WC. 2016. Human mitochondrial DNA replication machinery and disease. *Curr Opin Genet Dev*. 38:52–62.
- Zhao YB, Yang HY, Zhang XW, Chen GY. 2005. Mutation in D-loop region of mitochondrial DNA in gastric cancer and its significance. *World J Gastroenterol*. 11:3304–3306.
- Zhu X, Mao Y, Huang T, Yan C, Yu F, Du J, Dai J, Ma H, Jin G. 2017. High mitochondrial DNA copy number was associated with an increased gastric cancer risk in a Chinese population. *Mol Carcinogen*. 56:2593–2600.
- Zong W, Rabinowitz JD, White E. 2016. Mitochondria and cancer. *Mol Cell*. 61:667–676.

JUSTIFICATIVA

O câncer gástrico ainda configura como uma importante causa de morte no mundo e, não diferente, no Brasil. Tendo o Pará, especialmente Belém, já sido classificado como uma das cidades com maior taxa de incidência dessa neoplasia no mundo, pesquisas que esclareçam a complexidade de fatores envolvidos na carcinogênese desta neoplasia se fazem necessários. O prognóstico deste tipo de neoplasia é considerado ruim, pois em geral as descobertas ocorrem em níveis avançados de desenvolvimento, restando a cirurgia como principal tratamento com potencial curativo. Dada esta limitada opção de tratamento eficaz (uma vez que a radioterapia e a quimioterapia têm demonstrado resultados pouco satisfatórios), se torna urgente o melhor entendimento da carcinogênese gástrica para que se possa desenvolver melhores terapias e condutas de prevenção.

O conhecimento adquirido sobre a gênese deste tipo de câncer vem crescendo nas últimas décadas, com expressivo conhecimento dos genes alterados no tumor. Entretanto o conhecimento sobre as modificações que desencadeiam a gênese dos tumores gástricos e todas as alterações genéticas/epigenéticas no processo pré-neoplásico até a instalação da neoplasia ainda é muito limitado.

Por outro lado, alterações no mtDNA tem se demonstrado associadas na instalação e desenvolvimento de diversas neoplasias, incluindo a gástrica, contudo necessitando de mais estudos que comprovem esta associação. Fato inegável é que a mitocôndria é um importante alvo terapêutico, tendo em vista a sua importância em diferentes processos celulares, inclusive nas células com alterações malignas.

O uso de modelos animais para estudos deste porte demonstra ser a chave nesse processo de construção deste conhecimento. Como já mencionado, animais de pequeno porte como os roedores são essenciais para testes em larga escala, mas impossibilitam estudos relacionando o estadiamento tumoral com análises moleculares. Já o uso de primatas não humanos, propicia este tipo de

estudo, possibilitando o acompanhamento da evolução tumoral com exames de imagens e bioquímicos, além de permitir biópsias de cada estágio pré-neoplásico e sua consequente caracterização molecular. Além deste fato, a proximidade filogenética dos primatas com humanos permite extrapolações mais confiáveis dos resultados.

Como o surgimento espontâneo de tumores em primatas é baixo, faz-se necessária a escolha de drogas de estímulo a esta neoplasia, que desencadeiem o processo tumoral similar ao que ocorre de forma espontânea em humanos. O desafio é alcançar uma dose que não cause a morte desses primatas por intoxicação, mas que leve ao desenvolvimento tumoral o mais rápido possível a fim de se minimizar os custos e o tempo gasto. De fato, o MNU cumpre esse papel, desencadeando lesões similares a tumores do tipo intestinal.

Diante desses fatos, estudos como este, que associam processo carcinogênico em modelo animal tão próximo ao humano, possuem um valor inestimável para elucidar mecanismos como os supracitados, auxiliando na busca de pontos de reversão do processo neoplásico que envolvam a mitocôndria e/ou elucidando quais alterações mitocondriais são importantes neste processo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O presente estudo busca analisar as alterações genéticas envolvendo o mtDNA no desenvolvimento e evolução do câncer gástrico, possibilitando a identificação de marcadores para o diagnóstico, bem como de valor prognóstico, com potencial para desenvolvimento de alvos terapêuticos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar alterações nos genes *COI*, *COIII*, *ND1*, *ND3*, e *ATPASE8* que possam ter correlação com o câncer gástrico.
- Avaliar alterações nucleotídicas dos genes do complexo I (*ND1* e *ND3*), complexo IV (*COI*) e complexo V (*ATPASE8*) do DNA mitocondrial em linhagens de câncer gástrico humano implantadas em primatas da espécie *Sapajus apella*;
- relacionar as alterações mitocondriais encontradas com as lesões provocadas por MNU, uma vez que o agente MNU é responsável por causar alterações semelhantes às lesões que ocorrem no câncer gástrico pela exposição à fatores ambientais.

MATERIAIS E MÉTODOS

AMOSTRAS E DESENHO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com animais de experimentação da Universidade Federal do Pará (Parecer MED002-10 – em anexo). Foi executado a partir de linhagens tumorais em modelos xenobióticos de macacos *Sapajus apella*.

Após a obtenção das amostras de biópsia e da análise histopatológica, as amostras foram encaminhadas ao laboratório de biologia molecular para que fosse realizada a extração do DNA. Todo o DNA (tanto das amostras de linhagem quanto das de biópsia) foi extraído através da utilização do QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Mainz, Rheinland-Pfalz, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, foi realizada a quantificação no NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 (Thermo Scientific).

Grupo de amostras: linhagens tumorais em modelos xenobióticos.

Linhagens tumorais foram inoculadas em 13 espécimes de primatas *Sapajus apella* com ou sem MNU. Os animais foram avaliados por veterinários e apresentavam bom estado de saúde. Todos os animais eram identificados com microchips e seguiam uma dieta balanceada sem adição de sódio. Os indivíduos tinham entre sete e seis anos, pesando entre 2,7 e 3,6 kg. As amostras estão descritas na Tabela 1.

As linhagens utilizadas foram a AGP01, ACP03, ACP02, P-100 e CS256. AGP01 é uma linhagem originária de células tumorais obtidas de um aspirado de líquido ascítico e classificada como do tipo intestinal. As linhagens ACP03 e ACP02 foram isoladas de adenocarcinomas gástricos primários, sendo o primeiro classificado como do tipo intestinal e o último como difuso. As três linhagens foram retiradas de pacientes do norte do Brasil e estabelecidas pela equipe do laboratório de Citogenética Humana do Instituto de Ciências

Biológicas da Universidade Federal do Pará. Elas apresentam cariótipo com alterações cromossômicas, sendo a mais comum a trissomia dos cromossomos 7, 8 e deleção do braço pequeno do cromossomo 17. Adicionalmente, foi detectada também a trissomia do cromossomo 17 em ACP03 e AGP01 (LEAL, *et al.*, 2011; LEAL, *et al.*, 2009).

Tabela 1 - Descrição das amostras de linhagens inoculadas em *Sapajus apella*.

Amostra	Linhagem	Tempo*	MNU
AGP01-7	AGP01	7 dias	--
AGP01-14		14 dias	--
AGP01-MNU		7 dias	16 mg/Kg
ACP02-7	ACP02	7 dias	--
ACP02-14		14 dias	--
ACP02-MNU		7 dias	16 mg/Kg
ACP03-7	ACP03	7 dias	--
ACP03-14		14 dias	--
ACP03-MNU		7 dias	16 mg/Kg
PG100-7	PG100	7 dias	--
PG100-MNU		7 dias	16 mg/Kg
CS256-7	Carcinossarcoma	7 dias	--
CS256-14	256 de Walker	14 dias	--

*tempo desde a inoculação das linhagens nos animais até a retirada cirúrgica dos tumores.

Na linhagem PG100, a inoculação com resgate do tumor em 14 dias não foi possível pois o animal foi a óbito. Esta linhagem foi obtida do Banco de células do Rio de Janeiro, sendo um adenocarcinoma gástrico primário que compartilha das principais alterações genéticas encontradas em câncer gástricos, como a trissomia do cromossomo 8 e deleção do braço curto do cromossomo 17 (RIBEIRO, *et al.*, 2010).

Alguns animais receberam, concomitantemente com as linhagens, MNU (16mg/kg) por via oral. Após 72 horas, as linhagens causaram crescimento tumoral e após uma semana ou quatorze dias os tumores foram recuperados por meio de cirurgia. Em dois animais foram implantadas células do carcinossarcoma 256 de Walker, uma linhagem de câncer de mama de rato albino (Wistar rats) que se prolifera em uma grande variedade de animais e órgãos, com objetivo de

ser o controle positivo (MCEUEN e THOMSON, 1933; LEWIS, *et al.*, 2013; SHENOY, *et al.*, 2016) .

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

As sequências genômicas utilizadas para os iniciadores desse estudo, se encontram descritas na Tabela 2. As reações de cadeia de polimerase foram feitas com o volume final de 25 µl, sendo 50 ng de DNA, 50mM MgCl₂, 10xPCR buffer, 0,20mM de dNTP, 10pM de cada um dos indicadores específicos e 0,5 U de Taq DNA polimerase (ThermoFisher Scientific). Os tempos, temperaturas e número de ciclos utilizados na ciclagem estão especificados na tabela 2.

Tabela 2 - Iniciadores utilizados para amplificação das amostras com as respectivas referencias de origem das sequencias.

REGIÃO	INICIADOR	SEQUÊNCIA 5'→3'	TAMANHO FRAGMENTO	REFERÊNCIA
CO I	COI – F	GTTGTAGCCCACTTCCAC	222	(LEE, <i>et al.</i> , 2005)
	COI – R	CATCGGGGTAGTCCGAGTAA		
ATPase 8	ATPase 8 – F	CCCACCATAATTACCCCAT	102	
	ATPase 8 – R	TTTTATGGGCTTTGGTGAGG		
ND1	ND1F	GACGCCATAAACTCTTCAC	390	(MAXIMO, PAULA, <i>et al.</i> , 2001)
	ND1R	GGTTGGTCTCTGCTAGTGTG		
ND3	ND3F	CCTGCCACTAATAGTTATGTC	210	
	ND3R	GATATGAGGTGTGAGCGATA		

Para visualização das amplificações, foram utilizados 3µl do produto da PCR, 2 µl GelRedTM (Biotium) e 2µl de corante de visualização (5 mL glicerol, 1 mL de azul de bromofenol 0,1%, 1 mL de xileno-cianol 0,1%, 2 mL de EDTA 0,5M) em gel de agarose a 2%, eletroforese horizontal e tampão (Tris-Borato-EDTA 1x), com corrente de 100V por aproximadamente 15 minutos. Por fim, as

confirmações das bandas positivas foram feitas em transiluminador com luz ultravioleta.

Após a PCR, os fragmentos amplificados foram sequenciados utilizando o sequenciador ABI3130 (ThermoFisher Scientific), a reação de sequenciamento foi realizada utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific).

As sequências foram alinhadas e analisadas utilizando o programa BioEdit 7.2.6.1 (HALL, 2013), com uma sequência de referência do DNA mitocondrial humano, retirada do banco de dados NCBI (NCBI Reference Sequence: NC_012920.1).

MODELO DE ALTERAÇÃO DA PROTEÍNA

Quando identificada uma alteração que resultasse em mudança de aminoácido, a estrutura da proteína resultante foi analisada através de modelagem 3D com o auxílio do software SWISS-MODEL (BIASINI, *et al.*, 2014).

ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

Os dados obtidos após o processo de sequenciamento das amostras, os produtos de sequência foram analisados com o auxílio do programa Bioedit 7.2.5 (HALL, 2013) e as alterações tabuladas em planilhas para análises estatísticas.

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de primatas não humanos em trabalhos experimentais se mostra promissor devido à complexidade fisiológica e a homologia genética desses animais com a espécie humana, o que habilita a produção de estudos sem ser necessária restrição do sistema imune dos animais para o sucesso de estudos xenográficos. As amostras analisadas estão listadas na Tabela 3, com os respectivos genes e alterações encontradas.

Tabela 3 – Amostras com os seus respectivos genes analisados e resultados obtidos por gene. Np=posição de nucleotídeo

AMOSTRAS	COI	ND1	ND3	ATPASE8
AGP01-7	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
AGP01-14	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
AGP01-MNU	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
ACP02-7	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
ACP02-14	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
ACP02-MNU	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
ACP03-7	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
ACP03-14	Sem alterações	NP3594 C→T NP3693 G→A	NP10398 A→G	Sem alterações
ACP03-MNU	Sem alterações	NP3594 C→T NP3693 G→A	NP10398 A→G	Sem alterações
PG100-7	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
PG100-MNU	Sem alterações	Sem alterações	NP10398 A→G	Sem alterações
CS256-7	Sem alterações	NP3594 C→T NP3693 G→A	NP10398 A→G	Sem alterações
CS256-14	Sem alterações	NP3594 C→T NP3693 G→A	NP10398 A→G	Sem alterações

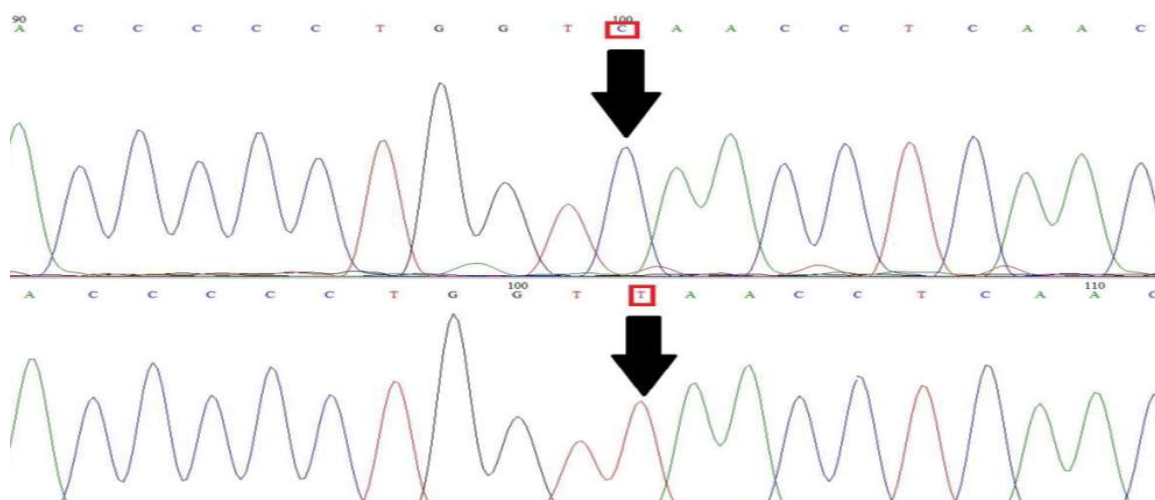
Neste trabalho não foram encontradas alterações nos genes *COI* e *ATPase8* nas amostras de linhagens tumorais, o que corrobora os resultados de Luo *et al.* (2010) em tumores gástricos (LUO, *et al.*, 2010). A Citocromo oxidase I é uma das subunidades codificadas pelo mtDNA que formam o complexo IV da cadeia respiratória, e alterações neste gene foram encontradas em diferentes tipos de câncer, como câncer de mama (GHATAK, *et al.*, 2014) e próstata (RAY, *et al.*, 2009; SCOTT, ARNOLD e PETROS, 2012). Nos trabalhos que utilizaram amostras de câncer gástrico, as análises do gene *COI* não encontraram correlação com as neoplasias (MAXIMO, *et al.*, 2001; JIANG, *et al.*, 2015). Já o gene *ATPase8* é uma das subunidades da ATP sintase, e mutações nesse gene já foram relacionadas ao câncer de mama (GRZYBOWSKA-SZATKOWSKA, *et al.*, 2014). A correlação com o câncer gástrico de alterações neste gene ainda não foi estabelecida, havendo poucos relatos de alterações (RODRIGUES-ANTUNES e BORGES, 2018; BI, *et al.*, 2011). Desta forma, nossos resultados corroboram o que já foi descrito na literatura, de uma não associação provável de alterações desses genes ao câncer gástrico.

Em seu estudo sobre carcinomas colorretais, Araújo e colaboradores (2015) identificaram uma alta taxa de mutações nos genes mitocondriais do complexo I neste tipo tumoral (ARAUJO, *et al.*, 2015). No presente estudo, no gene *ND1* foram observadas duas alterações. A primeira foi uma transição C→T na posição 3594 do DNA mitocondrial, localizada na posição 3 do códon 96 do gene *ND1* (Figura 15; Tabela 4). Em câncer gástrico são relatadas poucas alterações no gene *ND1* (RODRIGUES-ANTUNES e BORGES, 2018) entretanto, nenhuma similar às encontradas no presente estudo (HUNG, *et al.*, 2010; MAXIMO, *et al.*, 2001; JIANG, *et al.*, 2015). Nosso estudo descreve pela primeira vez, no nosso conhecimento, as alterações observadas.

Tabela 4 – Relação de amostras de linhagens associadas com as alterações em genes mitocondriais encontradas. Está indicado a alteração de aminoácidos relacionado a alterações de uma única base identificadas nas amostras.

Gene	Troca de nucleotídeo	Posição da alteração	Aminoácido	Amostras alteradas
ND1	C→T	3594	Val→Val	ACP03-14, ACP03-MNU, CS256-7, CS256-14
ND1	G→A	3693	Leu→Leu	ACP03-14, ACP03-MNU, CS256-7, CS256-14
ND3	A→G	10398	Thr→Ala	ACP03-14, ACP03-MNU, PG100-MNU, CS256-7, CS256-14

Figura 15 – Cromatograma do gene ND1 evidenciando a mudança de uma citosina para timina, correspondente à posição 3594 do mtDNA. No cromatograma superior é apresentada a amostra PG100-7, sem a alteração, e no inferior a amostra ACP03-14, com alteração.



Essa mudança não altera a transcrição do aminoácido (mutação sinônima), que continua sendo uma valina (Val). Algo semelhante ocorre na transição encontrada na posição 3693 (G→A), que não acarreta uma mudança de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *ND1* (Leu→Leu), sendo, portanto, sinônima (Tabela 4; Figura 18) (MACA-MEYER, *et al.*, 2001; HERRNSTADT, *et al.*, 2002; BRANDON, BALDI e WALLACE, 2006). Essas alterações não parecem apresentar relação com o desenvolvimento do câncer

gástrico. A posição 3594T é associada ao perfil do haplogrupo mitocondrial L1/L2 (WALLACE, 2007; MITOMAP, 2006), relacionado a descendência africana.

Apesar de ser relacionada à ancestralidade genética, a presença desses marcadores nas amostras analisadas parece ser resultado do acaso, uma vez que não temos como confirmar a ascendência do paciente que originou essas amostras.

Na região responsável pela transcrição da unidade ND3 do Complexo I, foi detectada a transição de uma adenina para guanina na posição 10398 do DNA mitocondrial (Tabela 4; Figura 17), já descrita na literatura como altamente polimórfica (CZARNECKA, *et al.*, 2010; MAO, *et al.*, 2013; YU, *et al.*, 2015). Essa alteração do DNA mitocondrial acarreta na mudança de treonina (Thr) para alanina (Ala), na posição 114 localizada na extremidade carboxi-terminal da subunidade ND3 do complexo I da cadeia respiratória (FANG, *et al.*, 2010).

Outro estudo desenvolvido por Canter e colaboradores (2005) detectou uma associação inversa do polimorfismo 10398G e o câncer de mama invasivo em uma população afro-americana, sendo o alelo 10398A ligado a esse tipo de tumor. Apesar disso, essa relação ainda não é bem compreendida, ocorrendo discordâncias na literatura (SETIAWAN, *et al.*, 2008; MOSQUERA-MIGUEL, *et al.*, 2008). Esse mesmo padrão também foi observado em um estudo de câncer de mama na Índia (DARVISHI, *et al.*, 2007). Os alelos A e G parecem ter diferentes correlações dependendo do grupo étnico ao qual ele é relacionado, sendo que em populações afro-americanas o polimorfismo 10398A estaria relacionado ao câncer de mama e próstata (CANTER, *et al.*, 2005; MIMS, *et al.*, 2006), enquanto que em populações europeias a alteração 10398G foi correlacionada ao câncer de mama (BAI, *et al.*, 2007; CZARNECKA, *et al.*, 2010). Apesar de ser mais estudado em câncer de mama, o polimorfismo na posição 10398 também já foi identificado em doenças neurodegenerativas (CHU, *et al.*, 2015), desordens psiquiátricas (HWANG, *et al.*, 2017) e outros tipos de câncer, como o de tireoide (YEH, *et al.*, 2000) e próstata (ARNOLD, *et al.*, 2015).

Figura 16 – Cromatograma evidenciando alterações no gene ND1 levando à mudança de uma guanina para adenosina na posição 3693 do mtDNA. Na parte superior da figura observamos o cromatograma da amostra PG100-7, sem a alteração, e na parte inferior da amostra ACP03-14, alterada.

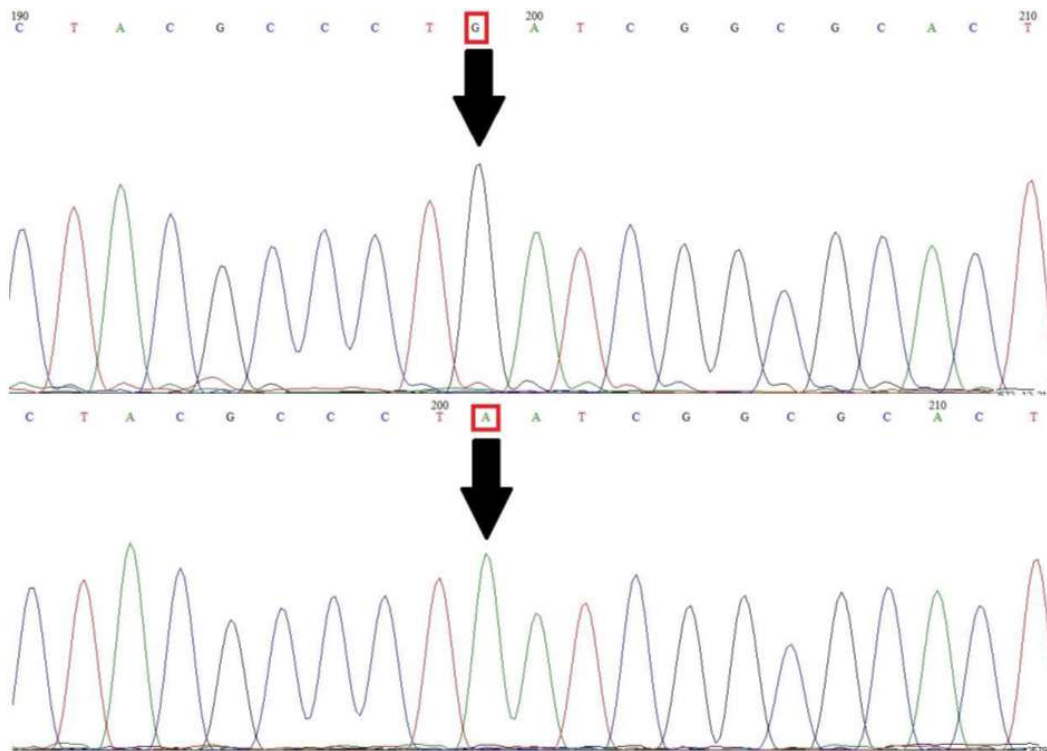
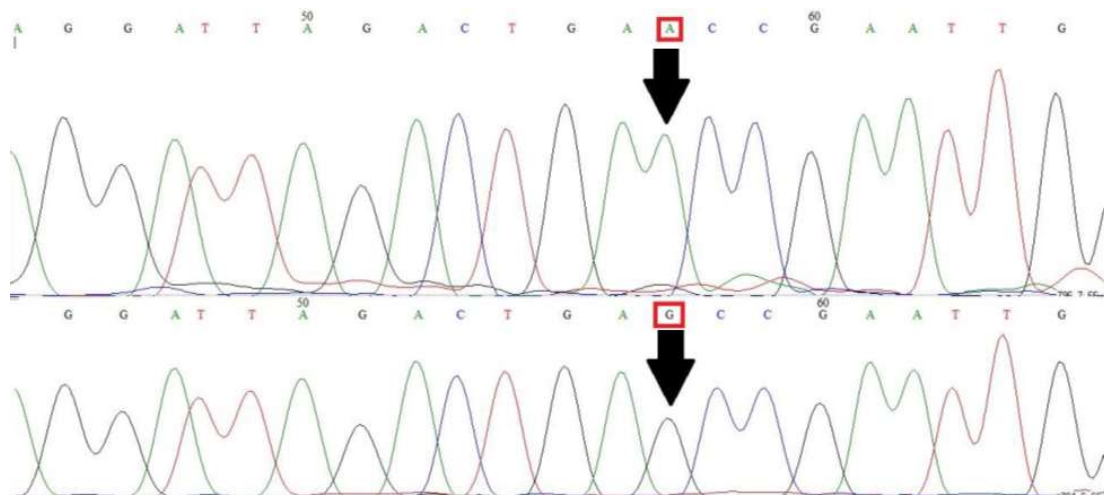


Figura 17 – Cromatograma evidenciando alteração no gene ND3 de guanina para adenosina, na posição 10398 do mtDNA. Na porção superior, cromatograma da amostra PG100-7, sem a alteração, e na parte inferior a amostra ACP03-14, alterada.



Sabe-se que o metabolismo tumoral é prioritariamente glicolítico visto que parte de suas células carregam mitocôndrias disfuncionais. Dessa forma, a troca de aminoácido A114T já foi objeto de diversos estudos *in vitro* sobre sua função. No entanto, não há ainda consenso na literatura sobre a funcionalidade desta alteração. Um estudo associou um maior pH da matriz mitocondrial nas células com polimorfismo 10398G em comparação com células portadoras do polimorfismo 10398A. Com isso, foi levantada a hipótese de que o pH mitocondrial teria papel na produção de ATP, apoptose e na mudança na permeabilidade de poros na membrana da mitocôndria. Quando a atividade do complexo I foi avaliada, observou-se, também, que células com o alelo A tiveram menor atividade deste complexo em comparação com as com o alelo G, suportando a hipótese de que o pH influenciaria nas funções da mitocôndria. Além disso, no alelo A também foi constatado o aumento da concentração de cálcio no interior da mitocôndria e a resposta à histamina (KAZUNO, *et al.*, 2006; STAFFORD e QUIN-CHEN, 2010).

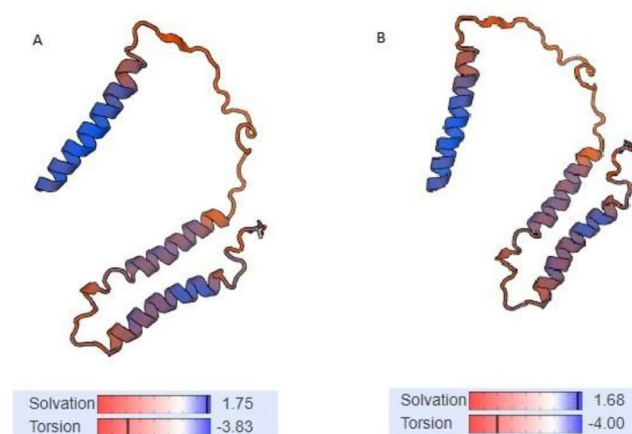
Ainda em relação ao metabolismo celular, um estudo comparativo com os dois alelos em linhagens de câncer de mama isoladas de pacientes afro-americanas, demonstrou que o alelo A apresentava um atraso no ciclo celular em comparação com o alelo G, devido a uma maior atividade do complexo I, um dos maiores produtores de ROS da cadeia respiratória. Essas linhagens também apresentaram maior resistência a apoptose mediada por etopósido e maior capacidade de metástase, em comparação com a linhagem do alelo G (KULAWIEC, OWENS e SINGH, 2009). Além do aumento da produção de ROS, também foram observadas em linhagens com a alteração 10398G a diminuição da atividade da enzima glicolítica Piruvato Cinase M2, o aumento da captação de glicose e da produção de lactato (SINGH, *et al.*, 2014).

Outro estudo feito em uma população malaia, também sugeriu não só que o alelo G, mais frequente em pacientes com câncer de mama, seria um marcador para essa doença, mas também que esse polimorfismo aumentaria a produção de ROS, alterando a função do complexo I e inibindo a apoptose através do alto nível de expressão do gene anti-apoptótico *BCL-2* (NADIAH,

HASNAN e ZAFARINA, 2012). Além disso, foi também sugerido que células portadoras deste polimorfismo sensibilizariam as células normais ao seu redor, induzindo a apoptose dessas, enquanto as células tumorais com alterações no Complexo I da Cadeia de Transporte de Elétrons, estariam protegidas da indução da morte celular, tornando-se as dominantes sobreviventes da massa tumoral (BAHARUDIN, JAAFAR e ZAINUDDIN, 2012). Desta maneira, podemos inferir que alterações no gene ND3 podem desencadear processos apoptóticos importantes a nível tecidual, podendo até mesmo ser um importante marcador para prognóstico do paciente.

A análise da molécula proteica nos permitiu identificar as diferenças entre a ND3 selvagem e ND3 com a alteração do penúltimo aminoácido (Figura 20), resultante da alteração A10398G. Foi possível identificar um menor índice de solvatação (1,68) e maior índice de torção (-4,0) da proteína resultante da alteração em comparação com a normal (respectivamente 1,75 e -3,63). Neste trabalho foi concluído que isso possa ter sido causado pela troca de um aminoácido polar (Thr) por um apolar (Ala). Apesar disso, as consequências do aumento na torção na função proteica ainda não estão bem esclarecidas. Neste estudo o aumento da torsão pode estar corroborando com o estudo de Kazuno et al. (2006) e Canto et al. (2016), que sugerem que células com o alelo G tem seu Complexo I com atividade mais aumentada do que células com o alelo A. (KAZUNO, *et al.*, 2006; CANTO, *et al.*, 2016).

Figura 18 – Representação gráfica das proteínas codificadas pelo gene ND3. A) Proteína normal, sem a alteração; B) Proteína alterada, com a alteração no penúltimo aminoácido (114Ala).



Apesar de não se ter muitas informações sobre o tumor de onde a linhagem PG100 foi isolada, sabe-se que a linhagem ACP03 foi isolada de um tumor gástrico do tipo intestinal em estágio mais avançado (T4N1M0) do que o observado nas linhagens AGP01 (T3N2M1) e ACP02 (T3N2M0) (LEAL, *et al.*, 2009; LEAL, *et al.*, 2011). A alteração 10398G foi observada também na linhagem controle de Carcinossarcoma 256 de Walker, conhecida por ter um comportamento extremamente agressivo, crescimento muito rápido e pequeno período de latência (MORAES, *et al.*, 2000). Essa mesma alteração só foi observada em ACP03 após 14 dias de implantação no modelo xenográfico, o que pode indicar o aumento da agressividade da mesma com o passar do tempo, devido as alterações no Complexo I. Da mesma forma, o MNU parece atuar aumentando a agressividade das linhagens, visto que ACP03-MNU e PG100-MNU também apresentaram esta alteração. O DNA mitocondrial existe em abundância nas células, uma vez que cada mitocôndria possui mais de cinco cópias de DNA. Isso abre uma maior possibilidade para que ocorra mutações nessas moléculas, resultando em uma heterogeneidade. Quando uma posição do mtDNA apresenta dois “alelos” diferentes, pode-se dizer que a população de mitocôndrias daquela célula não é exatamente idêntica, e que o mtDNA selvagem e o alterado coexistem em um estado chamado de heteroplasmia (HE, *et al.*, 2010). Neste estudo foram identificados dois sítios heteroplasmicos em apenas uma amostra (PG100-MNU), nas posições 3594 e 3693 (Tabela 5; Figuras 20 e 21), mesmo com um tempo menor de implantação (7 dias). Diante dos resultados, podemos inferir que a associação da presença do alelo 10398G associado ao MNU leva a um fenótipo mais agressivo. Quando pensamos no padrão alimentar da população paraense, por exemplo, devemos lembrar que possui muitos alimentos que, em contato com o ambiente ácido do estômago, levam à formação de composto nitrosos semelhantes ao MNU. Desta forma, caso a pessoa já possua o alelo 10398G ou haja alteração para este alelo no tecido gástrico, seu prognóstico tenderá a ser pior.

O DNA mitocondrial existe em abundância nas células, uma vez que cada mitocôndria possui mais de cinco cópias de DNA. Isso abre uma maior possibilidade para que mutações ocorram nessas moléculas, resultando em uma

heterogeneidade. Quando alguma posição do mtDNA apresenta dois “alelos” diferentes, pode-se dizer que a população de mitocôndrias daquela célula não é exatamente idêntica, e que o mtDNA selvagem e o alterado coexistem em um estado chamado de heteroplasmia (HE, *et al.*, 2010). Neste estudo foram identificados dois sítios heteroplásmicos em apenas uma amostra (PG100-MNU), nas posições 3594 e 3693 (Tabela 5; Figura 20 e 21).

Figura 19 – Cromatograma evidenciando a alteração no gene ND3 de guanina para adenosina, na posição 10398 do mtDNA. Porção superior da figura corresponde à amostra PG100-7, sem a alteração e na parte inferior a amostra PG100-MNU.

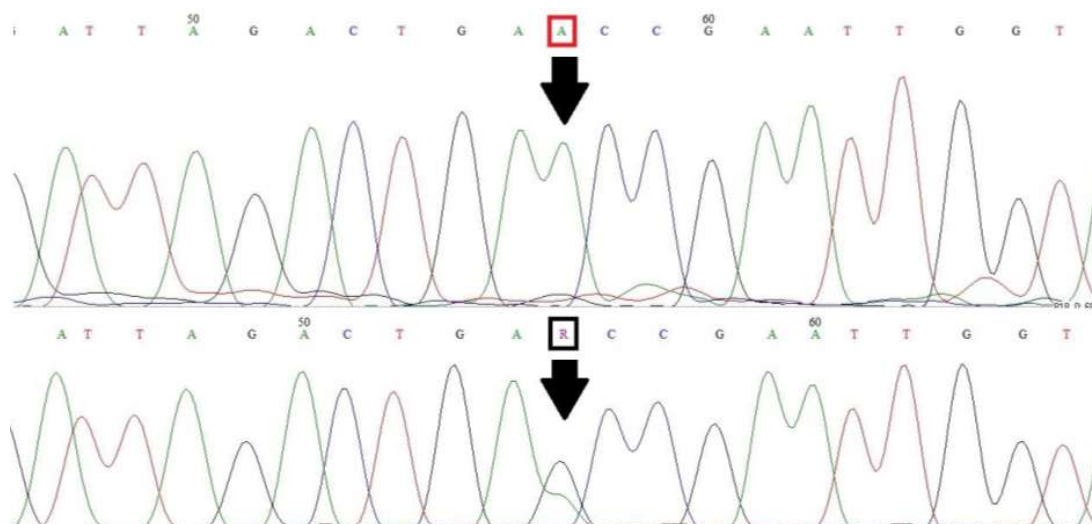


Tabela 5 – Heteroplasmias identificadas na amostra PG100-MNU de adenocarcinoma gástrico

Amostra	Nucleotídeo	Posição alteração	Gene
PG100-MNU	C/T	3594	ND1
PG100-MNU	A/G	3693	ND1

Figura 20 – Cromatograma evidenciando a heteroplasmia no gene *ND1* na posição 3594 do mtDNA. Cromatograma superior da amostra PG100-7, sem a alteração e na parte inferior a amostra PG100-MNU.

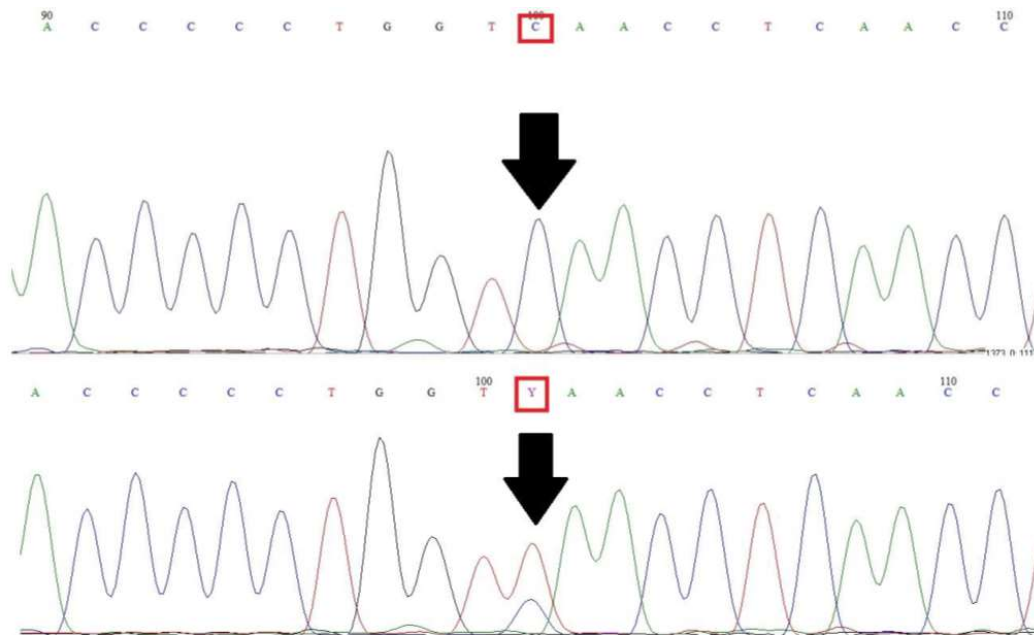
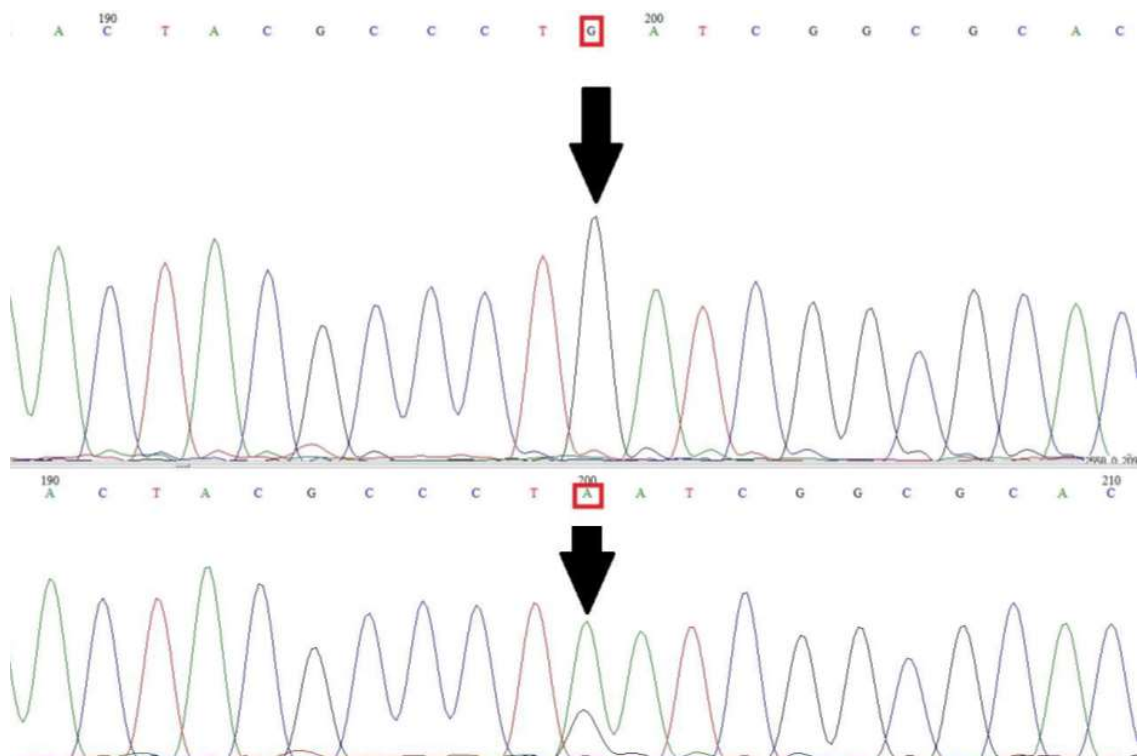


Figura 21 – Cromatograma evidenciando a heteroplasmia na posição 3698. Cromatograma superior da amostra PG100-7, sem alteração e na parte inferior da amostra PG100-MNU.



A heteroplasma pode não causar nenhuma alteração grave, mas podendo levar à patogenicidade (ELLIOTT, *et al.*, 2008). Esse estado pode ser decorrente da simples divisão celular, por exemplo no caso da segregação vegetativa, onde uma célula com mitocôndrias em estado de heteroplasma se divide em duas, resultando em uma célula filha com o mtDNA selvagem e outra com o alterado, com a seleção ocorrendo em nível celular (STEWART e CHINNERY, 2015). Estudos recentes têm relacionado o valor de heteroplasma para prognósticos em diferentes doenças (QI, *et al.*, 2016; SEQUEIRA, *et al.*, 2015). Um estudo de câncer de pulmão, demonstrou que tumores induzidos por MNU apresentam maior número de mutações de apenas um nucleotídeo em comparação com outro modelo de camundongos com o proto-oncogene *KRAS* geneticamente ativado (WESTCOTT, *et al.*, 2015). Kurowska e colaboradores (2012) demonstraram mutações induzidas em plantas por MNU se apresentaram em sua maioria como transições. Isso também foi visto tanto nos casos de troca de nucleotídeo e heteroplasma ocorridas na amostra PG100-MNU. Esse tipo de alteração, observado apenas nessa linhagem, pode ser indicativo de um melhor funcionamento do O6-metilguanina DNA metil transferase (MGMT), principal gene que faz o reparo de O6-metilguanina para uma guanina novamente, nas outras linhagens em comparação com a PG100 (SHIRAISHI, SAKUMI e SEKIGUCHI, 2000; FAHRER e KAINA, 2013).

O uso do MNU como agente indutor da carcinogênese não deve, entretanto, ser visto apenas do ponto de vista experimental. Temos exposição às substâncias que, na presença do ambiente ácido do estômago, são convertidas em compostos nitrosos que podem desencadear processos carcinogênicos similares aos induzidos pelo MNU. Este quadro se agrava mais ainda com a ausência de fatores ambientais protetores, como ingestão de frutas e verduras. Na população paraense este quadro se torna mais preocupante. A farinha de mandioca ainda constitui uma das bases alimentares da maioria da população. Neste alimento é muito comum encontrarmos a anilina, um composto que é fonte de radicais amina e dióxido de nitrogênio, os quais são substratos para a formação de nitrosaminas que podem posteriormente ser convertidas em nitritos que irão agredir a mucosa gástrica (OLIVEIRA, *et al.*, 2014). Somando-se a esse fato a provável alta incidência de *H. pylori* na população, - tendo em

vista a falta de saneamento básico de boa parcela da mesma, entre outros fatores -, temos a justificativa plausível para as altas incidências de câncer gástrico na região. Tendo em vista ainda que o processo carcinogênico gástrico ainda não está totalmente elucidado, apesar de associação de vários genes terem sido feitas ao longo dos anos, ainda não sabemos quais outros fatores podem estar intimamente associados a esta. Desta maneira, alterações dos genes do mtDNA podem ser um fator de prognóstico decisivo para o melhor manejo da população afetada pela neoplasia, devendo receber atenção sobre quais tipos de polimorfismos são presentes na população e assim melhorar o prognóstico e/ou modificar o tratamento que será ofertado a ele.

CONCLUSÕES

Após a realização das análises das amostras do presente trabalho chegamos a algumas conclusões:

- Amostras com maior grau de agressividade (CS256-7 e CS256-14) apresentaram mudança de aminoácido (A10398G, p. T114A) relacionada com alterações na função do gene ND3. Esta mesma alteração só foi observada em amostras tratadas com MNU (ACP03-MNU e PG100-MNU) e em uma amostra retirada de um tumor invasivo (ACP03-14) com tempo maior de implantação, o que pode ser sugestivo de um aumento da agressividade destas linhagens;
- O MNU agiu como indutor de heteroplasmias apenas na linhagem PG100, o que pode sugerir uma diferença no sistema de reparo do DNA nesta linhagem em comparação com as demais;
- Se faz necessário a avaliação dos polimorfismos e alterações presentes no mtDNA da população com câncer gástrico para que seja feita um melhor prognóstico dos pacientes, tendo em vista a influência destas no fenótipo celular.

BIBLIOGRAFIA

ANG, T. L.; FOCK, K. M. Clinical epidemiology of gastric cancer. **Singapore Med J**, v. 55, n. 12, p. 621-628, 2014.

ARAS, et al. Chemopreventive and anti-angiogenic effects of dietary phenethyl isothiocyanate in an N-methyl nitrosourea-induced breast cancer animal model. **BIOPHARMACEUTICS & DRUG DISPOSITION**, v. 34, p. 98–106, 2013.

ARAUJO, L. F. et al. Mitochondrial genome instability in colorectal adenoma and adenocarcinoma. **Tumour Biology**, v. 36, n. 11, p. 8869-8879, 2015.

ARNOLD, R. S. et al. Bone metastasis in prostate cancer: Recurring mitochondrial DNA mutation reveals selective pressure exerted by the bone microenvironment. **Bone**, v. 78, p. 81-86, 2015.

BAEISSA, H. M. et al. Mutational patterns in oncogenes and tumour suppressors. **Biochemical Society Transactions**, v. 44, n. part 3, 2016.

BAHARUDIN, N. T.; JAAFAR, H.; ZAINUDDIN, Z. Association of mitochondrial DNA 10398 polymorphism in invasive breast cancer in malay population of peninsular Malaysia. **The Malaysian journal of medical sciences: MJMS**, v. 19, n. 1, p. 36-38, 2012.

BAI, R. K. et al. Mitochondrial genetic background modifies breast cancer risk. **Cancer research**, v. 67, n. 10, p. 4687-4694, 2007.

BAUER, N. C.; CORBETT, A. H.; DOETSCH, P. W. The current state of eukaryotic DNA base damage and repair. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 21, p. 10083–10101, 2015.

BERTOLI, ; SKOTHEIM, J. M.; DE BRUIN, R. A. M. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. **NATURE REVIEWS | MOLECULAR CELL BIOLOGY**, v. 14, August 2013.

BI, R. et al. Rapid identification of mtDNA somatic mutations in gastric cancer tissues based on the mtDNA phylogeny. **Mutation Research**, v. 709-710, p. 15-20, 2011.

BIASINI, M. et al. SWISS-MODEL: modeling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 1, p. 252-258, 2014.

BONEQUI, et al. Risk factors for gastric cancer in Latin America: a meta-analysis. **Cancer Causes Control**, v. 24, p. 217–231, 2013.

BOROUGHTS, L.; DEBERARDINIS, R. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. **Nature Cell Biology**, v. 17, p. 351–359, 2015.

BRANDON, M.; BALDI, P.; WALLACE, D. C. Mitochondrial mutations in cancer. **Oncogene**, v. 25, p. 4647-4662, 2006.

BUDÁN, F. et al. Early Modification of c-myc, Ha-ras and p53 Expressions by N-Methyl-N-nitrosourea. **In vivo**, v. 22, p. 793-798, 2008.

BUNZ,. Oncogenes. In: BUNZ, F. **Principles of Cancer Genetics**. 2^a. ed. [S.I.]: Springer Netherlands, 2016. Cap. Chapter 2, p. 47-74.

BUNZ,. Tumor Suppressor Genes. In: BUNZ, F. **Principles of Cancer Genetics**. 2^a. ed. [S.I.]: Springer Netherlands, 2016. Cap. Chapter 3, p. 75-134.

CADET, J.; DAVIES, K. J. A. Oxidative DNA Damage & Repair: An Introduction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 106, p. 100, 2017.

CAICEDO–GRANADOS, et al. N-methylnitrosourea–induced carcinoma as a model for laryngeal carcinogenesis. **HEAD & NECK**, 2014.

CANTER, J. et al. Mitochondrial DNA G10398A polymorphism and invasive breast cancer in African- American women. **Cancer Research**, v. 65, n. 17, p. 8028-8033, 2005.

CANTO, P. et al. Genetic variants in ATP6 and ND3 mitochondrial genes are not associated with aggressive prostate cancer in Mexican–Mestizo men with overweight or obesity. **Aging Male**, v. 19, n. 3, p. 187-191, 2016.

CAO, K.; TAIT, S. W. G. Chapter Five - Apoptosis and Cancer: Force Awakens, Phantom Menace, or Both? **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 337, p. 135-152, 2018.

CHAKRAVARTHI, B. V. S. K.; NEPAL, ; VARAMBALLY,. REVIEW - Genomic and Epigenomic Alterations in Cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 186, n. 7, 2016. CHIA , N.-Y.; TAN,. Molecular classification of gastric cancer. **Annals of Oncology**, v. 27, p. 763-769, 2016.

CHOI, Y. Y. et al. Is Microsatellite Instability a Prognostic Marker in Gastric Cancer?: A Systematic Review With Meta-Analysis. **Journal of Surgical Oncology**, v. 110, p. 129-135, 2014.

CHU, Q. et al. Female genetic distribution bias in mitochondrial genome observed in Parkinson's Disease patients in northern China. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

COFFEY, R. J. et al. Ménétrier disease and gastrointestinal stromal tumors: hyperproliferative disorders of the stomach. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, 2007.

COLEMAN, M. L.; MARSHALL , J.; OLSON, M. F. RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. **Nature Reviews - Molecular Biology**, v. 5, p. 355-366, 2004.

CORREA, P. Gastric Cancer: Overview. **Gastroenterol Clin N Am**, v. 42, p. 211-217, 2013.

CORREA, P. et al. A model for gastric cancer epidemiology. **Lancet**, v. 2, p. 58-60, 1975.

CUTSEM, E. V. et al. Gastric Cancer. **The Lancet**, 2016. ISSN [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30354-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30354-3).

CZARNECKA, A. M. et al. Mitochondrial NADH-dehydrogenase subunit 3 (ND3) polymorphism (A10398G) and sporadic breast cancer in Poland. **Breast cancer research and treatment**, v. 121, n. 2, p. 511-518, 2010.

DARVISHI, K. et al. Mitochondrial DNA G10398A polymorphism imparts maternal Haplogroup N a risk for breast and esophageal cancer. **Cancer letters**, v. 249, n. 2, p. 249-255, 2007.

DIAZ-MORALLI, S. et al. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, p. 255-271, 2013.

EASWARAN, ; BAYLIN,. Epigenetic Abnormalities in Cancer Find a “Home on the Range”. **Cancer Cell** , v. 23, January 14 2013.

ECKHART, L. et al. Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. **Mol Biol Evo**, v. 25, p. 831-841, 2008.

ELLIOTT, H. R. et al. Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. **The American journal of human genetics**, v. 83, n. 3, p. 254-260, 2008.

ESTELLER, M. Molecular Origins of Cancer - Epigenetics in Cancer. **The new england Journal of Medicine**, 13 March 2008. 1148-1159.

EUSEBI, L. H.; ZAGARI, R. M.; BAZ,. Epidemiology of Helicobacter pylori Infection. **Helicobacter**, 2014.

FAHRER, J.; KAINA, B. 6-methylguanine-DNA methyltransferase in the defense against N-nitroso compounds and colorectal cancer. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 11, p. 2435-2442, 2013.

FANG, H. et al. Cancer type-specific modulation of mitochondrial haplogroups in breast, colorectal and thyroid cancer. **BMC Cancer**, v. 10, 2010.

FAUSTINO-ROCHA, A. I. et al. N-Methyl-N-nitrosourea as a mammary carcinogenic agent. **Tumor Biol.**, 2015.

FEIO, D. C. A. et al. Organic effects of associating paclitaxel with a lipid-based nanoparticle system on a nonhuman primate, Cebus apella. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 3827–3837., 2017.

FERLAY , J. et al. GLOBOCAN 2012 v1.0. **Cancer Incidence and Mortality Worldwide**, 2013. Disponivel em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 11 mar. 2018.

FERREIRA, A. F. **Perfis hematológicos e bioquímicos de macaco prego (Cebus spp., Erxleben, 1777) mantidos em cativeiro no estado do Paraíba**. Recife: Tese de doutorado - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009. 177 p.

GABRIELLI, ; BROOKS, K.; PAVEY, S. Defective cell cycle checkpoints as targets for anti-cancer therapies. **Frontiers in Pharmacology | Pharmacology of Anti-CancerDrugs**, v. 3, February 2012.

GADDY, J. A. et al. High Dietary Salt Intake Exacerbates Helicobacter pylori-Induced Gastric Carcinogenesis. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 6, p. 2258–2267, 2013.

GAO, et al. Diet Folate, DNA Methylation and Polymorphisms in Methylenetetrahydrofolate Reductase in Association with the Susceptibility to Gastric Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, 2013.

GHATAK, S. et al. Mitochondrial D-loop and Cytochrome Oxidase C subunit I polymorphisms among the breast cancer patients of Mizoram, Northeast India. **Curr Genet**, v. 60, p. 201-212, 2014.

GILBERTSON, R. J. Mapping Cancer Origins. **Cell**, v. 145, p. 25 - 29, April 2011.

GOLDAR, S. et al. Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, n. 6, p. 2129-2144, 2015.

GRAHAM, D. Y. Helicobacter pylori Update: Gastric Cancer, Reliable Therapy, and Possible Benefits. **Gastroenterology**, 148, 2015. 719–731.

GRZYBOWSKA-SZATKOWSKA, L. et al. Novel mitochondrial mutations in the ATP6 and ATP8 genes in patients with breast câncer. **Molecular Medicine Reports**, v. 10, p. 1772-1778, 2014.

GUGGENHEIM, D. E.; SHAH , M. A. Gastric Cancer Epidemiology and Risk Factors. **Journal of Surgical Oncology**, 107, 2013. 230-236.

HALL, T. Bioedit. Biological sequence alignment editor for win95/98/NT/2K/XP/7/8/9/10. **Tom Hall Ibis Bioscience**, v. Current Version 7.2.5, 2013.

HANAHAN, ; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, March 4 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, January 7 2000.

HANSFORD, et al. Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome - CDH1 Mutations and Beyond. **JAMA Oncology**, v. 1, n. 1, 2015.

HE, Y. et al. Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumor cells. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 610-613, 2010.

HERRNSTADT, C. et al. Reduced-Median-Network Analysis of Complete Mitochondrial DNA Coding-Region Sequences for the Major African, Asian, and European Haplogroups. **Am J Hum Genet**, v. 70, p. 1152-1171, 2002.

HOED , C. M. D.; KUIPERS, E. J. Gastric Cancer: How Can We Reduce the Incidence of this Disease? **Curr Gastroenterol Rep**, v. 18, n. 34, 2016.

HOWLADER , N. et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, 2017. Disponivel em: <https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/>. Acesso em: 11 mar. 2018.

HUNG, W. et al. Somatic mutations in mitochondrial genome and their potential roles in the progression of human gastric cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1800, p. 264–270., 2010.

HWANG, I. W. et al. Association of mitochondrial DNA 10398 A/G polymorphism with attention deficit and hyperactivity disorder in Korean children. **Gene**, 2017.

IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum**: Schistosomes, Liver Flukes and Helicobacter pylori. Lyon: [s.n.], v. 61, 1994. 1-241 p.

INCA. **Estimativa 2018**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro - RJ: [s.n.], 2017.

JEGGO, P. A.; PEARL, L. H.; CARR, A. M. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, p. 35–42, 2016.

JIANG, J. et al. Analysis of mitochondrial DNA in Tibetan gastric cancer patients at high altitude. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 3, p. 875-879, 2015.

KATONA, B. W.; RUSTGI, A. K. Gastric Cancer Genomics: Advances and Future Directions. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, n. 2, 2017.

KAZUNO, A. A. et al. Identification of mitochondrial DNA polymorphisms that alter mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics. **PLoS genetics**, v. 2, n. 8, p. E128, 2006.

KHATOON, ; RAI, R. P.; PRASAD, K. N. Role of Helicobacter pylori in gastric cancer: Updates. **World J Gastrointest Oncol**, v. 8, n. 2, p. 147-158, 2016.

KULAWIEC, M.; OWENS, K. M.; SINGH, K. K. mtDNA G10398A variant in African-American women with breast cancer provides resistance to apoptosis and promotes metastasis in mice. **Journal of human genetics**, v. 54, n. 11, p. 647-654, 2009.

KUROWSKA, M. et al. Molecular analysis of point mutations in a barley genome exposed to MNU and gamma rays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 738, p. 52-70, 2012.

LAUREN, P. The two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and so-called Intestinal-type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v. 64, p. 31-49., 1965.

LEAL, M. F. et al. Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 195, p. 85-91, 2009.

LEAL, M. F. et al. MYC, TP53, and chromosome 17 copy-number alterations in multiple gastric cancer cell lines and in their parental primary tumors. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-8, 2011.

LEE, H.-C. et al. Mitochondrial Genome Instability and mtDNA Depletion in Human Cancers. **ANNALS NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES**, 2005.

LEE, J. Y. et al. Effect of N-Methyl-N-Nitrosourea on Helicobacter-induced Gastric Carcinogenesis in C57BL/6 Mice. **JOURNAL OF CANCER PREVENTION**, v. 21, n. 3, 2016.

LEWIS, K. M. et al. Characterisation of Walker 256 breast carcinoma cells from two tumour cell banks as assessed using two models of secondary brain tumours. **Cancer Cell International**, v. 13, p. 1-12, 2013.

LI, J.; YUAN, J. Caspases in apoptosis and beyond. **Oncogene**, v. 28, p. 6194–6206, 2008.

LIM, S.; KALDIS,. Cdk, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. **Development**, v. 140, n. 15, p. 3079-3093, 2013.

LIU, X.; MELTZER, S. J. Gastric Cancer in the Era of Precision Medicine. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, n. 2, 2017.

LOPEZ, J.; TAIT, S. W. G. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. **British Journal of Cancer**, v. 112, p. 957–962, 2015.

LUO , R. et al. Mitochondrial DNA mutations in gastric endothelial cells induced by extract of helicobacter pylori in vitro. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.**, v. 27, n. 4, p. 381-6, 2010.

MACA-MEYER, N. et al. Major genomic mitochondrial lineages delineate early human expansions. **BMC Genetics**, v. 2, p. 1-13, 2001.

MAO, Y. et al. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 32, n. 1-2, p. 303-315, 2013.

MARRELLI, et al. Strong Prognostic Value of Microsatellite Instability in Intestinal Type Non-cardia Gastric Cancer. **Ann Surg Oncol**, 2015.

MARSHALL , B. J.; WARREN, J. R. Unidentified Curved Bacilli in the Stomach of patients with Gastritis and Peptic Ulceration. **The Lancet**, 1984.

MARTÍNEZ-GALINDO, et al. Histopathologic characteristics of gastric adenocarcinoma in Mexican patients: A 10-year experience at the Hospital Juárez de México. **Revista de Gastroenterología de México**, v. 80, p. 21-26, 2015.

MAXIMO, et al. Microsatellite Instability, Mitochondrial DNA Large Deletions, and Mitochondrial DNA Mutations in Gastric Carcinoma. **GENES, CHROMOSOMES & CANCER**, v. 32, p. 136-143, 2001.

MCARTHUR, K.; KILE, B. T. Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? **Trends in Cell Biology**, p. 1-19, 2018.

MCCARTHY, J. TUMOUR SUPPRESSORS - Turning a negative into a positive. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, p. 272–273, 2016.

MCCOLL, K. E. L. Helicobacter pylori Infection. **The new england journal of medicine**, 362, n. 17, 2010.

MCEUEN, C.; THOMSON, D. The effect of hypophysectomy on the growth of the Walker rat tumour. **The British Journal of Experimental Pathology**, v. 14, n. 6, 1933.

MCLEAN, M. H.; EL-OMAR, E. M. Genetics of gastric cancer. **Nature Reviews - Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, November 2014.

MIMS, M. et al. Mitochondrial DNA G10398A polymorphism and invasive breast cancer in African-American women. **Cancer Research**, v. 66, n. 3, p. 1880-1881, 2006.

MITOMAP. www.mitomap.org. **MITOMAP**: A human mitochondrial genome database, 2006. Acesso em: 11 Junho 2017.

MORAES, S. et al. Modelo experimental de tumor de Walker. **Acta Cir Bras**, v. 15, n. 4, 2000.

MOSQUERA-MIGUEL, A. et al. Is mitochondrial DNA variation associated with sporadic breast cancer risk? **Cancer research**, v. 68, n. 2, p. 623-625, 2008.

MOSS, S. F. The Clinical Evidence Linking Helicobacter pylori to Gastric Cancer. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**, v. 3, p. 183–191, March 2017.

NADIAH, T. B.; HASNAN, J.; ZAFARINA, Z. Association of Mitochondrial DNA 10398 Polymorphism in Invasive Breast Cancer in Malay Population of Peninsular Malaysia. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 19, n. 1, p. 36-42, 2012.

NAVES, E. et al. Valores Hematológicos de macaco prego (Cebus apella - Linnaeus, 1758) em cativeiro. **Bioscience journal**, Uberlândia, v. 22, n. 2, p. 125-131, 2006.

NEGRINI, ; GORGOULIS, ; HALAZONETIS,. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. **NATuRe ReVleWS | Molecular cell Biology**, v. 11, March 2010.

OLIVEIRA, V. A. D. et al. Relação entre consumo alimentar da população nordestina e o alto índice de câncer gástrico nesta região. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 3, p. 06-24, 2014.

PIAZUELO, M. B.; CORREA,. Gastric cancer: Overview. **Colombia Médica**, v. 44, n. 3, 2013.

QI, Y. et al. Heteroplasmy of mutant mitochondrial DNA A10398G and analysis of its prognostic value in non-small cell lung cancer. **Oncology letters**, v. 12, n. 5, p. 3081-3088, 2016.

RAY, A. M. et al. Sequence Variation in the Mitochondrial Gene Cytochrome c Oxidase Subunit I and Prostate Cancer in African American Men. **Prostate**, v. 69, n. 9, p. 956-960, 2009.

RIBEIRO, H. F. et al. Cytogenetic characterization and evaluation of c-MYC gene amplification in PG100, a new Brazilian gastric cancer cell line. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 8, p. 698-811, 2010.

RÖCKEN, C. Molecular classification of gastric cancer. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, 2017.

RODRIGUES-ANTUNES, S.; BORGES, B. N. Alterations in mtDNA, gastric carcinogenesis and early diagnosis. **Mitochondrial DNA Part A**, p. 1-8, 2018. ISSN DOI: 10.1080/24701394.2018.1475478.

SCHÜBELER, D. Function and information content of DNA methylation. **Nature**, v. 517, p. 321-326, January 15 2015.

SCOTT, T. A.; ARNOLD, R. S.; PETROS, J. A. Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit 1 Sequence Variation in Prostate Cancer. **Scientifica**, v. 2012, p. 701810, 2012.

SEN, N. P. et al. Investigation on the Possible Formation of N-Nitroso-N-methylurea by Nitrosation of Creatinine in Model Systems and in Cured Meats at Gastric pH. **J. Agric. Food Chem**, v. 48, p. 5088–5096, 2000.

SEQUEIRA, A. et al. Mitochondrial mutations in subjects with psychiatric disorder. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0127280, 2015.

SETIAWAN, V. W. et al. Mitochondrial DNA G10398A variant is not associated with breast cancer in African-American women. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 181, n. 1, p. 16-19, 2008.

SHALINI, S. et al. Old, new and emerging functions of caspases. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, p. 526-539, 2015.

SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 01, p. 27–36, 2010.

SHENOY, P. A. et al. The Walker 256 Breast Cancer Cell-Induced Bone Pain Model in Rats. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 1-7, 2016.

SHIRAISHI, A.; SAKUMI, K.; SEKIGUCHI, M. Increased susceptibility to chemotherapeutic alkylating agents of mice deficient in DNA repair methyltransferase. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 10, p. 1879-1883, 2000.

SINGH, R. K. et al. mtDNA germ line variation mediated ROS generates retrograde signaling and induces pro-cancerous metabolic features. **Scientific Reports**, v. 4, p. 6571-6573, 2014.

SONG, ; WU, L.; GUAN, W. Dietary Nitrates, Nitrites, and Nitrosamines Intake and the Risk of Gastric Cancer: A Meta-Analysis. **Nutrients**, v. 7, p. 9872–9895, 2015.

STAFFORD, P.; QUIN-CHEN, E. B. The pattern of natural selection in somatic cancer mutations of human mtDNA. **Journal of Human Genetics**, v. 55, p. 605-612, 2010.

STEWART, J. B.; CHINNERY, P. F. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. **Nature reviews: Genetics**, v. 16, n. 9, p. 530-540, 2015.

SUN, et al. Energy metabolic dysfunction as a carcinogenic factor in cancer cells. **Clinical and Translational Medicine**, v. 5, n. 16, 2016.

SWAN, P. F.; MAGEE, P. N. Nitrosamine-Induced Carcinogenesis. The alkylation of nucleic acids of the rat by N-methyl-N-nitrosourea, dimethylniltrosamine, dimethyl sulphate and methyl methanesulphonate. **Biochem. J.**, v. 110, p. 39-47, 1968.

TAKAYAMA, S.; THORGEIRSSON, U. P.; ADAMSON, R. H. Chemical carcinogenesis studies in nonhuman primates. **Proc. Jpn. Acad**, v. 84, n. 6, p. 176-187, 2008.

TAMURA, G. et al. Mutations in Mitochondrial Control Region DNA in Gastric Tumours of Japanese Patients. **European Journal of Cancer**, v. 35, n. 2, p. 316-319, 1999.

THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. **Nature**, v. 513, n. 11 September, 2014.

TORRE, L. A. et al. Global Cancer Statistics, 2012. **CA CANCER J CLIN**, p. 00-00, 2015.

TRACHOOTHAM, D. et al. Partial Substitution of Glucose with Xylitol Suppressed the Glycolysis and Selectively Inhibited the Proliferation of Oral Cancer Cells. **Nutrition and Cancer**, v. 69, n. 6, p. 1-11, 2017.

TSUKAMOTO, T.; MIZOSHITA, T.; TATEMATSU, M. Animal Models of Stomach Carcinogenesis. **Toxicologic Pathology**, v. 35, p. 636–648, 2007.

TYSON, J.; NOVAK, B. Control of cell growth, division and death: information processing in living cells. **Interface Focus**, v. 4, n. 20130070, 2014.

USHIJIMA, T.; SASAKO, M. Focus on gastric cancer. **Cancer Cell**, v. 5, p. 121-125, 2004.

VICENTE-DUEÑAS, et al. Function of oncogenes in cancer development: a changing paradigm. **The EMBO Journal**, v. 32, p. 1502-1513, 2013.

VOGELSTEIN, et al. Cancer Genome Landscapes. **SCIENCE**, v. 339, MARCH 2013.

WADHWA, R. et al. Gastric cancer—molecular and clinical dimensions. **Nature Reviews - Clinical Oncology**, 2013.

WALLACE, D. C. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. **The Annual Reviews of Biochemistry**, v. 76, p. 781-821, 2007.

WANG, et al. Mitochondrial DNA haplogroup N is associated good outcome of gastric cancer. **Tumor Biol**, v. 35, p. 12555–12559, 2014.

WANG, H. et al. Identification of sequence polymorphisms in the D-Loop region of mitochondrial DNA as a risk factor for gastric cancer. **Mitochondrial DNA**, p. 1-3, 2014.

WANG, Z. et al. Cyclin B1/Cdk1 Coordinates Mitochondrial Respiration for Cell-Cycle G2/M Progression. **Developmental Cell**, v. 29, p. 217–232, April 28 2014.

WARBURG, O. Origin of cancer cells. **Science**, v. 123, p. 309–314, 1956.

WARD, P.; THOMPSON, C. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. **Cancer Cell**, v. 21, p. 297-308, 2012.

WESTCOTT, P. M. et al. The mutational landscapes of genetic and chemical models of Kras-driven lung cancer. **Nature**, v. 517, n. 7535, p. 489-495, 2015.

WU, H.-H.; LIN, W.-C.; TSAI, K.-W. Advances in molecular biomarkers for gastric cancer: miRNAs as emerging novel cancer markers. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 16, n. e1, 2014.

YASUTIS, K. ; KOZMINSKI, K. G. Review: Cell cycle checkpoint regulators reach a zillion. **Cell Cycle**, v. 12, n. 10, p. 1501–1509, May 15 2013.

YEH, J. J. et al. Somatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in papillary thyroid carcinomas and differential mtDNA sequence variants in cases with thyroid tumours. **Oncogene**, v. 19, n. 16, p. 2060-2063, 2000.

YODA, Y. et al. Integrated analysis of cancer-related pathways affected by genetic and epigenetic alterations in gastric cancer. **Gastric Cancer**, 2014.

YOU, ; JONES,. Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin? **Cancer Cell**, v. 22, p. 9-20, July 10 2012.

YU, Y. et al. Mitochondrial ND3 G10398A mutation: a biomarker for breast cancer. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 4, p. 17426-31, 2015.

ZHANG, et al. Dietary Fiber Intake Reduces Risk for Gastric Cancer: A Meta-analysis. **Gastroenterology**, v. 145, n. 1, p. 113–120.e3, 2013.

ZHOU, et al. Genetic polymorphisms of DNA repair pathways influence the response to chemotherapy and overall survival of gastric cancer. **Tumor Biol**, 2014.

ANEXO: APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA - PARECER MED002-10



PARECER MED002-10

Projeto: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO BIOPRODUTO *MÉTODO CANOVA* EM MODELO EXPERIMENTAL DE CÂNCER GÁSTRICO EM PRIMATAS NÃO HUMANOS.

Coordenador: Prof. Dr. Rommel Rodrigues Burbano

Área Temática: Medicina

Vigência: 01/2010 a 01/2012

Nº no CEPAE-UFPA: MED-02-10

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação é de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE-UFPA, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 1568/2005 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR E PRORROGAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido.

As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 01 de janeiro de 2010


Presidente do Comitê de Ética Em Pesquisa
Com Animais de Experimentação da Universidade
Federal do Pará