



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLOGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

CARLOS ANTONIO DA COSTA JUNIOR

ANÁLISES MOLECULARES DA REGIÃO CONTROLE DO DNA
MITOCONDRIAL DE ASTROCITOMAS NA POPULAÇÃO PARAENSE

BELÉM

2012

CARLOS ANTONIO DA COSTA JUNIOR

**ANÁLISES MOLECULARES DA REGIÃO CONTROLE DO DNA
MITOCONDRIAL DE ASTROCITOMAS NA POPULAÇÃO PARAENSE**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Praia Anselmo

BELÉM

2012

CARLOS ANTONIO DA COSTA JUNIOR

**ANÁLISES MOLECULARES DA REGIÃO CONTROLE DO DNA
MITOCONDRIAL DE ASTROCITOMAS NA POPULAÇÃO PARAENSE**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Belém (PA), 06 de junho de 2012.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Nilson Praia Anselmo
(ICB – UFPA)
(Orientador)

Profa. Dra. Bárbara do Nascimento Borges
(UFRA)

Prof. Dr. Edivaldo Herculano C. de Oliveira
(IEC / UFPA)

BELÉM

2012

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca de Pós-Graduação do ICB-UFGA – Belém (PA)

Costa Junior, Carlos Antonio da

Análises moleculares na região controle do DNA mitocondrial de astrocitomas na população paraense / Carlos Antonio da Costa Junior; orientador, Nilson Praia Anselmo. – 2012.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2012.

1. Cérebro – Tumores. 2. Gliomas - Aspectos moleculares. 3. Astrocitomas – Aspectos moleculares. 4. Sistema nervoso central. 5. DNA mitocondrial. I. Título.

CDD – 22. ed. 616.99481

“De um certo ponto adiante não há mais retorno. Esse é o ponto que deve ser alcançado.”

Franz Kafka

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da Vida, pelo planeta fantástico por ele criado e pelas milhares de descobertas ainda à espera de mentes sedentas.

Ao meu orientador, Professor Dr. Nilson Praia Anselmo, que me acompanhou desde a iniciação científica, compartilhando seus conhecimentos e experiências durante todos esses anos, pela dedicação e paciência, muito obrigado.

À Professora Lúcia Harada por construir e tornar o Labiomol um ambiente acolhedor e incentivador da busca do conhecimento. Aos companheiros do Labiomol, Mariana, Elaine, Michko, Wendel, Sávio, Symara e aos que não estão mais por perto, Soelange, Laine, Leila, Henrique, Helder, Ailton e Carinne, que sempre contribuíram para o ambiente familiar do laboratório.

Ao meu amigo Wallax Augusto Ferreira, pela grande força e apoio, pois, sem sua ajuda, certamente esse trabalho não seria possível.

À minha, co-orientadora, professora, conselheira, estimuladora, guia, guru e amiga, Professora Dra Bárbara Borges (a eterna babita), que foi uma das melhores pessoas que conheci durante minha vida na UFPA e quem eu quero manter como amiga para o resto da vida.

À equipe de Neurocirurgia do Hospital Ophir Loyola, pela parceria que foi a base de nosso projeto.

À minha esposa Alethea Kinny, pela paciência e companheirismo e principalmente pelo apoio nas horas mais sacrificantes. À família, pelo suporte moral e emocional.

Aos professores, que não medem esforços na tarefa árdua do magistério. Em especial ao Professor Max Reis, que durante anos ajuda alunos a serem muito mais que alunos. Ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, pela oportunidade de e excelência.

E finalmente à UFPA, que a cada dia merece mais e mais meu respeito e admiração.

RESUMO

O câncer do sistema nervoso central representa 2% de todas as neoplasias malignas na população mundial e 23% dos casos de câncer infantil. No Brasil, estimam-se 4.820 casos deste câncer em homens e 4.450 em mulheres para o ano de 2012. Os gliomas são tumores do sistema nervoso central formados a partir de células da glia e somam mais de 70% do tumores cerebrais. A propriedade mais importante dos gliomas é sua capacidade de evasão imunológica. Idade, etnia, gênero e ocupação podem ser considerados fatores de risco para o surgimento de gliomas, e são duas vezes mais frequentes em afro-americanos. O astrocitoma é o tumor glial mais frequente, constituindo cerca de 75% dos casos de gliomas. Estes tumores são classificados em quatro graus, de acordo com a Organização Mundial de Saúde. O DNA mitocondrial está relacionado com o desenvolvimento e a progressão de vários tipos de tumores. A mitocôndria é responsável pelo balanço energético celular e está envolvida no disparo da apoptose em resposta ao estresse oxidativo. Mutações na *D-LOOP* podem alterar a taxa de replicação do DNA e aumentar o risco do desenvolvimento do câncer. Neste estudo foram analisadas 29 amostras de astrocitoma classificados de acordo com a OMS. Nossos dados sugerem que os astrocitomas de baixo grau podem estar relacionados à herança genética, tornando portadores de alguns polimorfismos ou mutações específicas, mais suscetíveis ao risco de desenvolver a doença, e os de alto grau podem estar relacionados à exposição prolongada aos agentes carcinógenos. Foram identificados polimorfismos e mutações onde alguns apresentaram relação com o risco do desenvolvimento de astrocitomas e com a progressão da doença. A inserção de dois ou mais nucleotídeos nas regiões de microssatélites pode causar sua instabilidade e contribuir com o surgimento do câncer. A deleção no sítio 16132 pode ser um marcador para astrocitoma de alto grau, assim como a inserção de duas ou mais citosinas no sítio 16190 pode ser um marcador específico para astrocitomas. As mutações heteroplásmicas podem ser determinantes para o surgimento e/ou progressão de astrocitomas de alto grau.

Palavras-chave: Astrocitoma; D-LOOP; mtDNA; SNC; Tumor Cerebral.

ABSTRACT

The central nervous system cancer represents 2% of all malignancies in the world population and 23% of cases of childhood cancer. In Brazil, an estimated 4,820 cases of cancer in men and women in 4450 to the year 2012. Gliomas are tumors of the central nervous system formed from glial cells, making up over 70% of brain tumors. The most important property of gliomas is the ability of immune evasion. Age, ethnicity, gender and occupation may be considered risk factors for the development of gliomas, and are twice as common in African-Americans. The astrocytoma is the most common glial tumor, constituting about 75% of cases of gliomas. These tumors are classified into four levels according to the World Health Organization. Mitochondrial DNA is related to the development and progression of various types of tumors. Mitochondrion is responsible for cellular energy balance and is involved in triggering apoptosis responding to oxidative stress. Mutations in D-LOOP can change DNA replication rates and increase the developing cancer risk. We analyzed 29 samples astrocytoma classified according to the WHO. Our data suggest that low-grade astrocytomas may be related to genetic inheritance, making some patients with specific mutations or polymorphisms more susceptible to the risk of developing the disease, and high grade may be related to prolonged exposure to carcinogenics. Polymorphisms and mutations have been identified which correlate with some risk of developing astrocytomas and disease progression. The insertion of two or more nucleotides at microsatellite regions may cause instability and contribute to the cancer onset. Deletion at the site 16132 may be a high-grade astrocytoma marker, as well as insertion of two or more cytosines to the site 16190 can be an astrocytoma specific marker. Heteroplasmy may be decisive for the emergence and / or progression of high-grade astrocytomas.

Keywords: Astrocytoma; D-LOOP; mtDNA; CNS; Brain Tumor.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. GLIOMAS	19
1.2. ASTROCITOMAS.....	23
1.3. ASPECTOS MOLECULARES DO CÂNCER DE SNC	26
1.4. O DNA MITOCONDRIAL.....	29
1.4.1. REGIÃO CONTROLE.....	32
2. OBJETIVOS.....	39
2.1. OBJETIVO GERAL.....	39
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1. AMOSTRAS	40
3.2. EXTRAÇÃO DE DNA	41
3.3. REAÇÃO DA CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	42
3.4. SEQUENCIAMENTO DO DNA	43
3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1. POLIMORFISMOS	51
4.2. MUTAÇÕES	54
4.2.1. MUTAÇÕES HETEROPLÁSMICAS.....	57
5. CONCLUSÃO	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Gráfico de evolução da mortalidade por câncer no Brasil entre os anos de 1990 e 2009. Fonte: MS/SVS/DASIS/CGIAE/Sistema de Informação sobre Mortalidade – SIM; MP/Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE; MS/INCA/Conprev/Divisão de Informação..... 16
- Figura 2:** Glioma angiocêntrico (grau I), caracterizado pelo acúmulo perivascular de células tumorais. Fonte: Frontal Cortex (2012) 19
- Figura 3:** Imunossupressão por gliomas. Células de glioma secretam um número de diferentes mediadores imunossupressores que inibem a imunidade antitumoral em seres humanos e roedores (MHC = complexo principal de histocompatibilidade, FasL = proteína transmembrana ligante da família dos fatores de necrose tumoral, IL = interleucina, G-TsF = fator de supressão de células T derivado de glioma, TGF- β = fator beta de crescimento de transformação, B7 = co-estimulador de linfócitos). Fonte: Fenstermaker e Ciesielski (2004).....21
- Figura 4:** (a) Astrocitoma Pilocítico (grau I); (b) astrocitoma difuso (grau II); (c) astrocitoma anaplásico (grau III) e (d) glioblastoma multiforme (grau IV). Fonte: adaptado de Ohgaki (2009)..... 24
- Figura 5:** Mitocôndria com setas apontando várias cópias de DNA mitocondrial. Fonte: adaptado de Genebase (2012).Mitocôndria com mtDNA..... 30
- Figura 6:** Representação esquemática do mtDNA de mamíferos. A molécula de cadeia dupla circular de ~16,5 kb contém uma única região não codificante, a região de *Displacement Loop* (D loop), alberga os promotores para a transcrição de ambas as fitas mitocondriais (HSP e LSP) e a origem de replicação *leading* (OH). A origem de replicação *lagging* (OL) é incorporada em um conjunto de genes de tRNA. Os genes para as duas rRNAs (12S e 16S rRNA), 13 (mRNAs ND1-6,ND4L, Cit b, COI-III, ATP6, e ATP8), e 22 tRNAs (F, V, L1, I, M, W, D, K, G, R, H, S1, L2, T, P, P, S2, Y, C, N, A, e Q) são indicados na legenda. Fonte: Park e Larsson, 2011.Esquema do mtDNA de mamíferos 29
- Figura 7:** Diagrama da região controle mostrando o flanqueamento dos genes tRNA_{pro} e tRNA_{phe} e a localização das regiões hipervariantes HVI e HVII. Fonte: adaptado de Pinheiro (2003)..... 32
- Figura 8:** Estímulos apoptóticos por via mitocondrial. Fonte: adaptado de Tait e Green (2010)..... 34
- Figura 9:** *Boxplot* utilizando o teste de Mann-Whitney ilustrando as medianas etárias e o desvio padrão entre os dois gêneros dos pacientes. Não houve diferença significativa entre as medianas ($p>0,05$) 46
- Figura 10:** *Boxplot* relacionando os graus de estadiamento tumoral e suas faixas etárias com as respectivas medianas, quartis e erro-padrão (graus I e III)..... 47

Figura 11: Gráfico ilustrando a análise de variância (ANOVA) entre os graus tumorais e as médias etárias dos pacientes. Todas as comparações de um grau com o seguinte imediato não foram significantes.....	48
Figura 12: <i>Boxplot</i> utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov, ilustrando a distância significativa ($p < 0,05$) das medianas etárias entre os tumores de baixo grau (I/II) e de alto grau (III/IV) de estadiamento.	49
Figura 13: Cromatograma da região do microssatélite 303-315 ilustrando a inserção de uma citosina (reverso-complementar) no sítio 310.....	51
Figura 14: Cromatogramas do sítio 073 ilustrando os alelos (a) selvagem e (b) mutante e o polimorfismo A/G deste sítio em destaque.	52
Figura 15: Cromatogramas do sítio 16190 ilustrando os alelos (a) selvagem e (b) mutante, após a deleção da timina e a inserção de duas citosinas no referido sítio.....	53
Figura 16: Cromatogramas do sítio 16519 ilustrando os alelos (a) selvagem e (b) mutante do polimorfismo T/C no referido sítio.....	53
Figura 17: Cromatogramas do sítio 16132 ilustrando os alelos (a) selvagem e (b) mutante após a deleção da timina.....	54
Figura 18: <i>Boxplot</i> com teste de Kolmogorov-Smirnov comparando as medianas etárias de tumores com e sem deleção no sítio 16132 do mtDNA de pacientes com astricitoma	55
Figura 19: Cromatogramas do sítio 16152 ilustrando a transversão de T (a) para G (b) ocorrida neste sítio do mtDNA.	55
Figura 20: Cromatogramas do sítio 16125 onde ilustra a transversão T:G do alelo (a) normal para o (b) mutante.	56
Figura 21: Cromatogramas do sítio 16276 ilustrando a transversão C:A (em destaque) do alelo (a) normal para o (b) mutante.	57
Figura 22: Cromatogramas ilustrando algumas das mutações heteroplásmicas relatadas neste trabalho, presentes nos sítios (a) 16125 (T/G), (b) 16129 (A/C) e (c) 16276 (G/C).....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativas do ônus global do câncer. Fonte: Adaptado de WCR (2008).....	17
Tabela 2: Classificação dos Astrocitomas e grau de malignidade (WHO, 2007)	20
Tabela 3: Classificação histológica dos Astrocitomas - estimativa de sobrevida. Fonte: Adaptado de WCR (2008)	24
Tabela 4: Caracterização das amostras utilizadas neste trabalho	41
Tabela 5: Iniciadores utilizados nas PCRs deste trabalho	43
Tabela 6: Iniciadores utilizados nas reações de sequenciamento	44
Tabela 7: Classificação das amostras utilizadas neste trabalho em relação ao grau de estadiamento dos tumores, gênero e mediana etária.....	47
Tabela 8: Alterações nucleotídicas encontradas durante o estudo e suas respectivas significâncias estatísticas	50
Tabela 9: Mutações heteroplásmicas observadas neste estudo.....	58
Anexo I: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	77
Anexo II: Estadiamento Tumoral TMN (WCR, 2008).....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
APAF1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i> (fator-1 de ativação protease-apoptótico)
APC	<i>Antigen-present cell</i> (Células apresentadoras de antígenos)
ATP	Adenosina trifosfato
B7	Co-estimulador de linfócitos
BHE	Barreira Hematoencefálica
CCND1	<i>Cyclin D1</i> (ciclina D1)
CDK4	Cyclin-Dependent Kinase 4 (Ciclina dependente de cinase 4)
CGIAE	Coordenação Geral de Informações e Análise Epidemiológica
Cit-b	Citocromo b
c-myc	Gene regulador que codifica fator de transcrição
CO	Citocromo oxidase (I a III)
DASIS	Departamento de Análise da Situação de Saúde
D-LOOP	<i>Displacement LOOP</i> (alça de deslocamento)
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (fator de crescimento epidermal)
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (receptor do fator de crescimento epidermal)
FasL	<i>Fas Ligand</i> (Proteína ligante da Fas)
GBM	Glioblastoma Multiforme
G-TsF	Fator de supressão da célula T-derivado de glioma
HBV	<i>Hepatitis B Virus</i> (vírus da hepatite B)
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (antígenos leucocitários humanos)
HPV	<i>Human Papiloma Virus</i> (vírus do papiloma humano)
HV I/II	Hipervariante I / II

IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agência Internacional de Pesquisa em Câncer)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KS	Kolmogorov-Smirnov
MDM2	<i>Murine Double Minute 2</i>
MET	<i>Metabolic Equivalent of Task</i> (Metabólico de tarefa equivalente)
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Principal de histocompatibilidade)
MS	Ministério da Saúde
mtDNA	DNA mitocondrial
MW	Mann-Whitney
MYCN	<i>V-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived</i>
NO	Óxido Nítrico
OH	<i>Origin Heavy</i> (Origem de replicação da cadeia pesada)
OL	<i>Origin Light</i> (Origem de replicação da cadeia leve)
OMS	Organização Mundial de Saúde
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (espécies reativas de oxigênio)
rRNA	RNA ribossomal
SIM	Sistema de Informação sobre Mortalidade
SNC	Sistema Nervoso Central
SVS	Sistema de Vigilância em Saúde
TCF	<i>Transcription Factor</i> (fator de transcrição da família TCF/LEF)
TGF- α	Fator α de crescimento e transformação

TGF- β	Fator β de crescimento e transformação
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (fator de necrose tumoral)
TP53	Tumor Protein 53 (Proteína tumoral 53)
tRNA	RNA transportador
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i> (União pelo Controle Internacional do Câncer)
WCR	<i>World Cancer Report</i> (Relatório Mundial de Câncer)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)

1. INTRODUÇÃO

Câncer é um grupo de doenças que se caracteriza pela perda do controle da divisão celular e pela capacidade de invadir outras estruturas orgânicas (INCA, 2012). É um termo genérico dado a um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo (WHO, 2012).

Pode ser causado tanto por fatores externos ao organismo, como substâncias químicas, irradiação, vírus, etc. quanto por fatores internos, como hormônios, condições imunológicas e mutações genéticas. Os fatores causais podem agir em conjunto ou em sequencia para iniciar e/ou promover o processo carcinogênico. Em geral, dez ou mais anos se passam entre exposições ou mutações e a detecção do câncer e, na maioria das vezes, o câncer não é hereditário (INCA, 2012). Existem apenas alguns raros casos que são herdados, tal como o retinoblastoma, um tipo de câncer de olho que ocorre em crianças. No entanto, existem alguns fatores genéticos que tornam determinadas pessoas mais sensíveis à ação dos carcinógenos ambientais, o que explica por que algumas delas desenvolvem câncer e outras não, quando expostas a um mesmo carcinógeno (INCA, 2012).

Uma característica definidora de câncer é a rápida proliferação de células anormais que crescem além de seus limites habituais, e que podem então invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos. Este processo é referido como metástase estas são a principal causa de morte por câncer (WHO, 2012).

Não se trata de uma doença moderna, claramente existe há muitos séculos. No entanto, é um fenômeno mais comum no homem hoje em dia do que anteriormente. Em grande parte, devido ao crescimento da população mundial e à idade relativamente avançada até a qual as pessoas atualmente vivem, já que é uma doença mais comum em idosos do que em jovens (WCR, 2008). Outros fatores que podem contribuir para o aumento das taxas de incidência são o surgimento e desenvolvimento de novas tecnologias de diagnóstico da doença.

O câncer afeta a todos – os jovens e velhos, os ricos e pobres, homens, mulheres e crianças – e representa um grande fardo para os doentes, famílias e

sociedades. É uma das principais causas de morte no mundo, particularmente nos países em desenvolvimento (WHO, 2012).

No entanto, muitas destas mortes poderiam ser evitadas. Mais de 30% dos casos pode ser evitado através do estilo de vida saudável ou por imunização contra infecções por carcinógenos (HBV, HPV). Outros podem ser detectados cedo, tratados e curados. Mesmo com câncer em estágio final, o sofrimento dos pacientes pode ser aliviado com cuidados paliativos (WHO, 2012).

Segundo o INCA, no Brasil, as estimativas para o ano de 2012 nas taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes é de 518.510 novos casos, sendo 21.700 destes, na região norte do país. O INCA ainda estima a incidência de neoplasias malignas para 2012 no Pará em 113,21 casos para 100 mil homens e 137,28 casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2012).

As taxas de mortalidade por câncer no Brasil, que subiam em média 0,22% ao ano na década de 90, passaram para um aumento anual de 0,3% entre 2000 e 2009 (INCA, 2012). Em 1990 tinha-se uma relação entre morbidade e mortalidade de aproximadamente 9,9%, vinte anos depois, essa relação progrediu consideravelmente para cerca de 15% (**Figura 1**) (INCA, 2012).

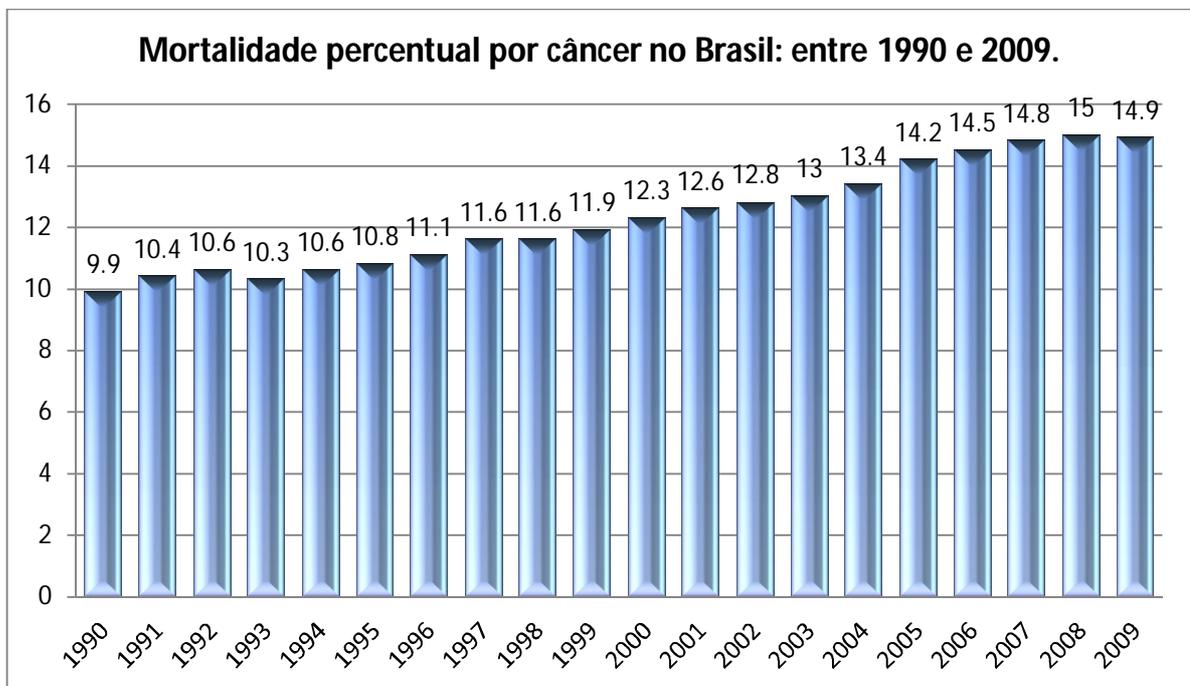


Figura 1: Gráfico sobre evolução da taxa de mortalidade por câncer no Brasil entre 1990 e 2009. **Fonte:** MS/SVS/DASIS/CGIAE/Sistema de Informação sobre Mortalidade – SIM; MP/Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE; MS/INCA/Conprev/Divisão de Informação.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), através da consolidação de dados de vários institutos de pesquisa publicados no *World Cancer Report* (2008), a estimativa para o ano de 2030, sem levar em consideração um aumento anual, é de 20 milhões de novos casos acompanhados de 12,9 milhões de óbitos. Considerando um aumento anual de 1% na incidência, esses valores saltam para 26,4 milhões de novos casos acompanhados de 17 milhões de óbitos (**Tabela 1**). Em ambos os casos, a relação de morbi-mortalidade alcança a impressionante taxa de aproximadamente 64% (WCR, 2008).

Tabela 1: Estimativas do ônus global do câncer.

Fonte	Ano Estimado	Óbitos (milhões)	Incidência (milhões)	Obs
American Cancer Society	2007	7.6	12.0	(a)
IARC	2008	7.6	12.4	
WHO	2005	7.6	-	(a)
U.I.C.C.	2002	6.7	10.9	
Globocan	2002	6.7	10.9	
Institute of Medicine	2001	7.0	-	
Mathers and Loncar	2030	11.5	-	
IARC	2030	12.9	20.0	(b)
IARC	2030	17.0	26.4	(c)

(a): estimativa baseada em Globocan; (b): assume ausência de mudança na taxa; (c): assume aumento de 1% ao ano na incidência. **Fonte:** Adaptado de WCR (2008).

O câncer do sistema nervoso central (SNC) representa, na população mundial, aproximadamente, 2% de todas as neoplasias malignas (INCA, 2012). A incidência de tumores cerebrais primários está estimada entre 7,2 a 12,5 por 100 milhões de pessoas ao ano, também representando em torno de 2% de todos os tumores primários em adultos e 23% dos casos de câncer infantil. As taxas de

incidência não apresentam grandes variações geográficas (MARIE e SHINJO, 2011).

No Brasil, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer do SNC em homens é o oitavo mais frequente na região Centro-Oeste (6/100 mil). Nas regiões Sul (7/100 mil) e Nordeste (3/100 mil), ocupa a nona posição, enquanto, nas regiões Sudeste (6/100 mil) e Norte (2/100 mil), a décima posição. Para as mulheres, é o oitavo mais frequente nas regiões Sul (6/100 mil) e Centro-Oeste (4/100 mil). O décimo mais frequente na região Norte (2/100 mil) e, nas regiões Sudeste (5/100 mil) e Nordeste (3/100 mil), é o 11º (INCA, 2012).

Para o ano de 2012, no país, estima-se a incidência de 4.820 casos de câncer do SNC em homens e 4.450 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco aproximado de 5 casos novos a cada 100 mil homens e 4 a cada 100 mil mulheres. E o Pará tem uma taxa estimada em 1,20 casos para cada 100 mil homens e 1,14 casos para cada 100 mil mulheres em relação a essas neoplasias malignas (INCA, 2012).

Os tumores cerebrais normalmente ficam limitados ao próprio cérebro e raramente se espalham para outras partes do corpo. Aproximadamente 50% de todos os tumores cerebrais primários são originados de células neurais especializadas, as glias, e são denominados gliomas (NIETO-SAMPEDRO *et al.*, 2011).

Os principais tumores primários que podem contribuir para o desenvolvimento de metástase cerebral são os cânceres de pulmão, de mama e melanomas. Este tipo de metástase frequentemente se manifesta em estágio avançado na progressão da doença e causa rápida deterioração na qualidade de vida do paciente, inclusive prejuízo neurocognitivo (ZHANG e YU, 2011).

A distribuição e o tipo histológico de tumores cerebrais diferem em crianças e adultos. Em crianças, os tumores cerebrais mais frequentes surgem a partir da fossa posterior do crânio, onde os tipos histológicos mais comuns são meduloblastomas, espingioblastomas (incluindo astrocitoma cerebelar e glioma do nervo óptico) e ependimomas. Já nos adultos, os tumores cerebrais mais comuns são meningiomas e gliomas (HODGENS, 2007).

1.1. GLIOMAS

Gliomas (**Figura 2**) são tumores do sistema nervoso que se desenvolvem a partir de células da glia. A glia é uma unidade formada por vários tipos celulares e tem como principal função dar suporte nutricional, sanguíneo, estrutural e de defesa aos neurônios. Essas células se encontram ao redor dos neurônios assim como em meio aos axônios neuronais. A maior parte das células gliais em termos quantitativos pode ser encontrada na substância branca encefálica (VERKHRATKY e BUTT, 2007).

Os gliomas pertencem a um grupo de tumores diversos que afetam o cérebro e a medula espinhal, conhecidos como neoplasmas do sistema nervoso central (NIETO-SAMPEDRO *et al.*, 2011).

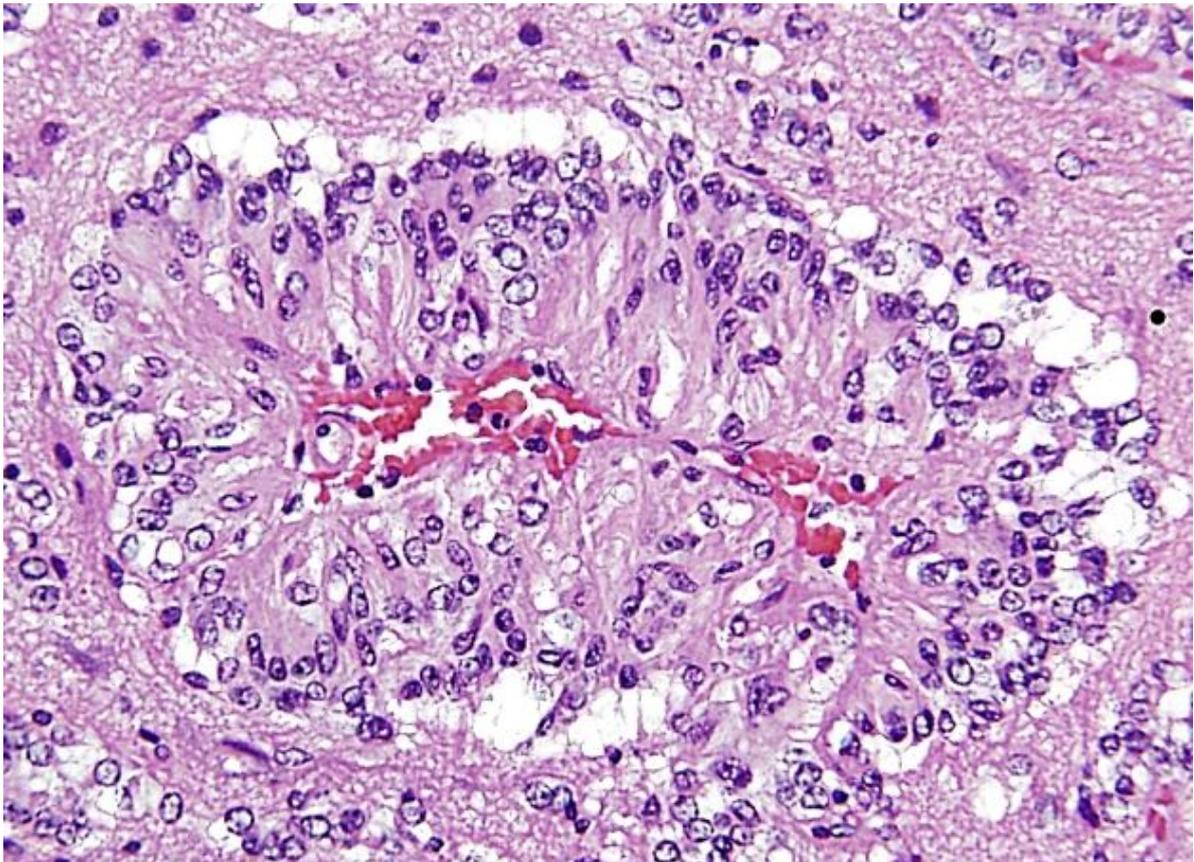


Figura 2: Glioma angiocêntrico (grau I), caracterizado por acúmulo perivascular de células tumorais.
Fonte: Frontal Cortex (2012)

A glia é formada principalmente por quatro linhagens celulares: astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e epêndima. São dessas células que as neoplasias se originam. Os astrócitos desempenham funções muito importantes como a sustentação e a nutrição dos neurônios. Os oligodendrócitos são responsáveis pela formação e manutenção da bainha de mielina nos axônios do SNC. A micróglia é a primeira linha de defesa contra patógenos invasores ou outro tipo de lesão ao tecido nervoso (RUBIO-PEREZ e MORILLAS-RUIZ, 2011). O epêndima tem a função de revestimento das cavidades ventriculares encefálicas e do canal medular, e participa da dinâmica do fluxo liquórico (MCHENRY, 1969).

Os gliomas somam mais de 70% dos tumores cerebrais humanos, e destes, o mais frequente é o tipo histopatológico maligno classificado, segundo a OMS, como Grau IV (**Tabela 2**). Existe uma tendência crescente na incidência de gliomas em cidades desenvolvidas e industrializadas, onde alguns relatos indicam uma taxa maior em caucasóides que em populações africanas ou asiáticas. Menos de 3% dos pacientes diagnosticados com glioblastoma têm sobrevivência de mais de cinco anos, sendo considerada a idade avançada um fator significativo e bastante consistente no prognóstico (OHGAKI, 2009). Os gliomas localizados nos gânglios basais (putâmen ou globo pálido) e tálamo são considerados de alto risco cirúrgico (NISHIHARA *et al.*, 2010)

Tabela 2: Classificação dos Astrocitomas e grau de malignidade (WHO, 2007)

Tumores Astrocíticos	Grau			
	I	II	III	IV
Astrocitoma subependimal de células gigantes	■			
Astrocitoma pilocítico	■			
Astrocitoma pilomixóide		■		
Astrocitoma difuso		■		
Xanthoastrocitoma pleomórfico		■		
Astrocitoma anaplásico			■	
Glioblastoma				■
Glioblastoma de células gigantes				■
Gliossarcoma				■

A propriedade mais importante e letal de gliomas é sua capacidade de evasão imunológica. Gliomas cerebrais malignos são capazes de evitar e suprimir o sistema imune. A evasão do sistema imunológico ocorre em diferentes níveis de reconhecimento do antígeno e ativação imunológica. Em primeiro lugar, pela limitação de sinalização eficaz entre o glioma e as células do sistema imunológico, as células de glioma evitam a sua detecção por este sistema. Um componente importante da eficiência da fuga imunológica é a complexidade do microambiente autossustentável dos gliomas. Estes geram vários mecanismos imunossupressores (**Figura 3**) que atuam, simultaneamente, criando *loops* de *feedback* positivo que aumentam os seus efeitos (NIETO-SAMPEDRO *et al.*, 2011).

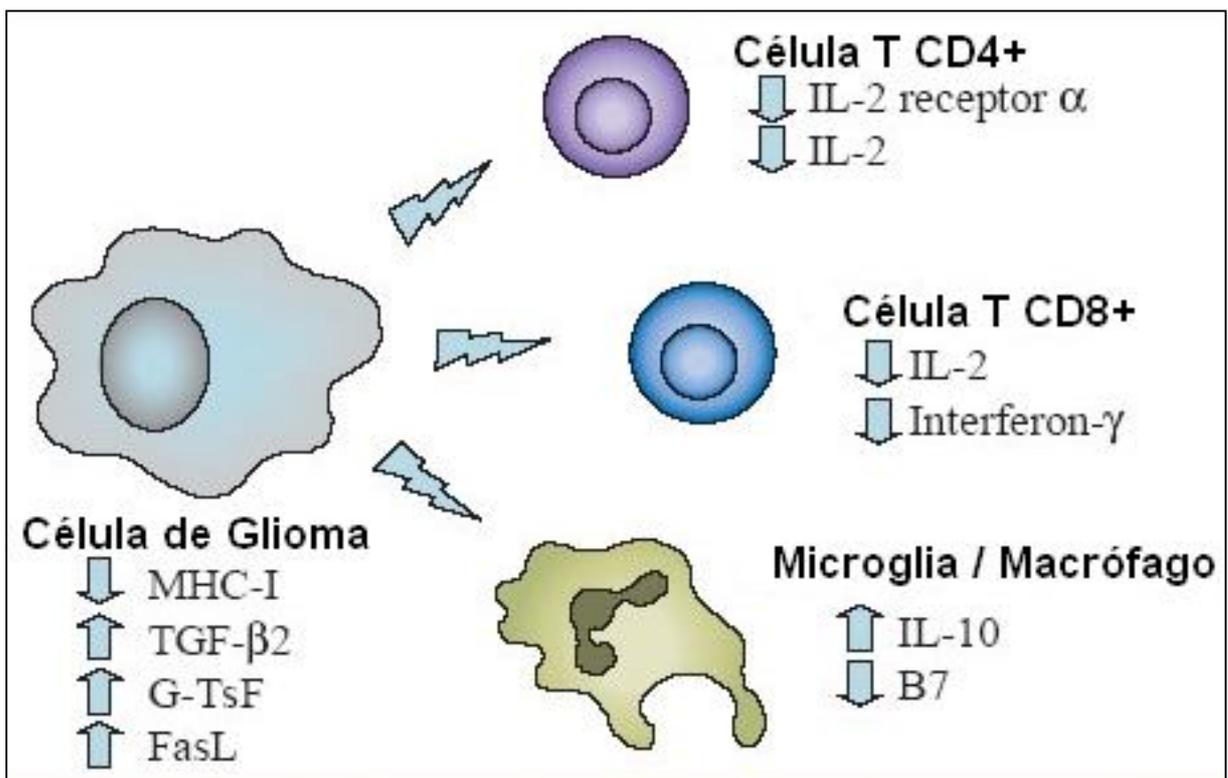


Figura 3: Imunossupressão por gliomas. Células de glioma secretam um número de diferentes mediadores imunossupressores que inibem a imunidade antitumoral em seres humanos e roedores (MHC = complexo principal de histocompatibilidade, FasL = proteína transmembrana ligante da família dos fatores de necrose tumoral, IL = interleucina, G-TsF = fator de supressão de células T derivado de glioma, TGF- β = fator beta de crescimento de transformação, B7 = co-estimulador de linfócitos). **Fonte:** Fenstermaker e Ciesielski (2004).

Além da idade, fatores como etnia, gênero (FAN e PEZESHKPOUR, 1992) e ocupação (WCR, 2008) podem ser considerados fatores de risco para o surgimento de gliomas. Gliomas são duas vezes mais frequentes em afro-americanos que em caucasoides e, de acordo com Ohgaki (2009), no leste europeu, América do Norte e Austrália surgem de 6 a 11 novos casos de tumores cerebrais a cada 100 mil pessoas todo ano em homens e de 4 a 11 em mulheres nos mesmos modos. No mesmo estudo o autor revela um alto risco de desenvolvimento de tumores cerebrais em certas ocupações, dentre as quais existe uma alta incidência de gliomas em anatomistas, patologistas e embalsamadores, o que sugere relação com o formaldeído. Zheng *et al.* (2001) apontam o risco de desenvolvimento de glioma relacionado ao uso de plásticos, látex e produtos de arsênio, mercúrio e petróleo. O INCA, em seu relatório anual denominado Vigilância do Câncer Relacionado ao Trabalho e ao Ambiente (2010), também relaciona a doença neoplásica ao risco ocupacional e lista fatores como exposição à radiação solar, benzeno, xileno, tolueno, amianto, sílica e radiação ionizante. Por outro lado, não há indicativos que o uso prolongado de telefone celular aumente o risco de desenvolver câncer do sistema nervoso (FREI *et al.*, 2011).

Outros estudos mostram que casos de síndrome familiar oncológica estão associados à ocorrência de gliomas, uma vez que, membros de famílias de pacientes com glioma podem ser mais suscetíveis ao desenvolvimento deste tipo tumoral do que a população em geral (LOUIS *et al.*, 2007). É relatado um alto risco de incidência familiar em astrocitomas, porém esse risco é nulo para outro tipo histológico de tumor cerebral (MALMER *et al.*, 1999). Outro estudo do mesmo grupo sugere que a incidência familiar ocorre em aproximadamente 5% dos casos de glioma e destes, 1% tem a probabilidade de herança autossômica dominante (MALMER *et al.*, 2001).

1.2. ASTROCITOMAS

Astrocitoma é um tumor cerebral originário de células gliais denominadas astrócitos, sendo o mais frequente tumor cerebral (MARIE e SHINJO, 2011), e constituindo aproximadamente 75% dos casos de gliomas (POJO e COSTA, 2011). O tumor astrocítico, em particular, causa um aumento anatômico característico nos hemisférios cerebrais dos pacientes, cuja média etária prevalente é de aproximadamente 37 anos (SANTOS *et al.*, 2001) e o glioblastoma multiforme (GBM), o astrocitoma de grau IV, é o mais maligno e frequente dentre eles (MARIE e SHINJO, 2011).

Os tumores astrocíticos são classificados seguindo seu estadiamento, avaliando o grau de malignidade a ser julgado conforme suas características histológicas e alterações genéticas, além de taxa de crescimento e a probabilidade de se infiltrar para o tecido cerebral próximo (LOUIS *et al.*, 2007). Foram distribuídos em quatro graus de malignidade descritos abaixo:

Grau I – Astrocitoma Pilocítico – é um astrocitoma de crescimento lento que normalmente não infiltra outras partes do sistema nervoso central. Os tumores de grau I são biologicamente benignos e sua cura pode ser obtida através de intervenção cirúrgica (**figura 4a**).

Grau II – Astrocitoma de Baixo Grau – também é relativamente de crescimento lento, mas cresce mais rápido que o astrocitoma pilocítico (grau I). Pode ou não invadir o tecido cerebral normal próximo e tende a reaparecer após o tratamento. São considerados neoplasias malignas de baixo grau que podem ocorrer após longo curso clínico (**figura 4b**).

Grau III – Astrocitoma Anaplásico- este astrocitoma maligno cresce mais rápido que os de grau II. Invade tecidos cerebrais normais e reaparece após o tratamento. Apresentam anaplasia e aumento proliferativo comparados aos tumores de grau II, sendo fatais e levando rapidamente ao óbito (**figura 4c**).

Grau IV – GBM – é o mais maligno e o de mais rápido crescimento dentre os astrocitomas. Muitos tipos celulares diferentes podem ser observados através de microscopia no local do tumor, inclusive astrócitos e oligodendrócitos. Áreas de necrose também podem ser observadas no centro do tumor (**figura 4d**). É capaz de

invadir rapidamente o tecido cerebral normal. Apresentam proliferação vascular e necrose e, pelo fato de poderem ser resistentes a rádio e a quimioterapia, os pacientes têm uma sobrevida de menos de 12 meses (FURNARI, 2009) (**Tabela 3**).

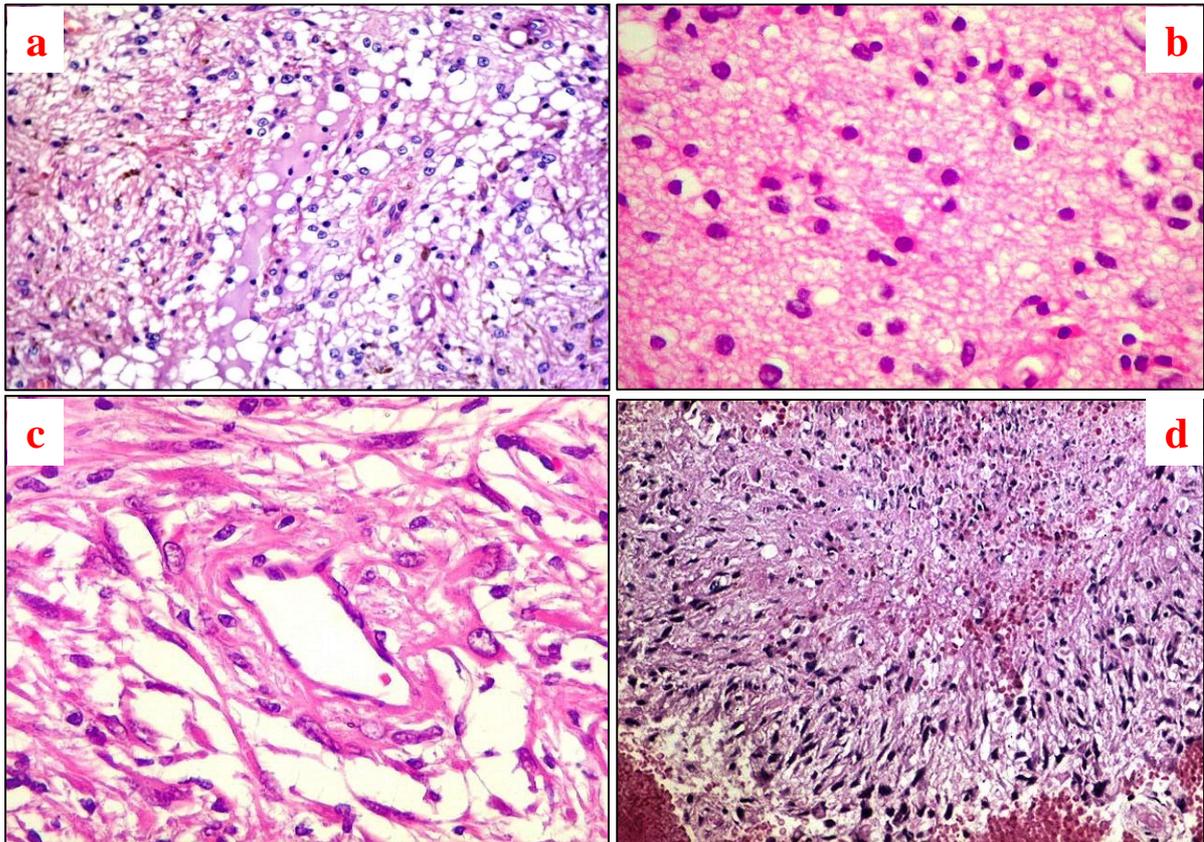


Figura 4: (a) Astrocitoma Pilocítico (grau I); (b) astrocitoma difuso (grau II); (c) astrocitoma anaplásico (grau III) e (d) glioblastoma multiforme (grau IV). **Fonte:** adaptado de Ohgaki (2009).

Tabela 3: Classificação histológica dos Astrocitomas e estimativa de sobrevida.

Crítérios (feições) histológicos	Nome	Gradação	Sobrevida
1 critério, geralmente atipias nucleares	Astrocitoma difuso de baixo grau	Grau II	> 5 anos
2 critérios, geralmente atipias nucleares e mitoses	Astrocitoma anaplásico	Grau III	2 a 5 anos
3 ou 4 critérios: atipias, mitoses, proliferação vascular e/ou necrose	Glioblastoma multiforme	Grau IV	< 1 ano

Fonte: Adaptado de WCR (2008).

Os GBM são altamente invasivos e os padrões de infiltração de células de gliomas correspondem à re aquisição do comportamento migratório primitivo das células neoplásicas durante o desenvolvimento do câncer de SNC. Estas células de glioma migram através do parênquima normal, aderem firmemente abaixo da margem pial, cercam neurônios e vasos (satelitose perineuronal e perivascular) e migram através de trilhos da substância branca (DIMOV *et al.*, 2011).

O sistema imunológico em pacientes com GBM se mostra altamente suprimido, dificultando respostas antitumorais. GBM são altamente recorrentes mesmo após cirurgias, quimioterapia, radioterapia e imunoterapia, recidivando ou desenvolvendo-se como GBM secundário. Os GBM secundários são histologicamente indistinguíveis dos primários sendo esta denominação utilizada de acordo com a origem do tumor. Os GBM secundários originam-se de um astrocitoma pré-existente de baixo grau enquanto que os primários já surgem como tal (também chamados de “de novo”), ou seja, como tumores de alta malignidade. Os glioblastomas secundários são tumores mais raros, porém mais comuns em pacientes jovens. Nas últimas décadas, as estratégias de tratamento para gliomas mudaram muito pouco em razão da compreensão limitada da biologia da doença (DIMOV *et al.*, 2011).

A maioria das pessoas que desenvolve um tumor cerebral primário não tem uma história familiar de tumores cerebrais, ou seja, mutações herdadas não parecem desempenhar um papel importante no desenvolvimento de câncer cerebral. Com a exceção da exposição à radiação ionizante durante a terapia de radiação para o tratamento de outros tipos de câncer, não existe uma associação clara entre a exposição a outros fatores de risco ambientais e o desenvolvimento exclusivo de tumores cerebrais. Parece que os tumores cerebrais primários se desenvolvem sem nenhuma razão aparente, e o papel de fatores ambientais, genéticos e certos tipos de vírus, no desenvolvimento destes tumores, continua a ser investigado (NIETO-SAMPEDRO *et al.*, 2011).

A maioria dos astrocitomas infiltrativos é anaplásica e os astrocitomas não-anaplásicos possuem um crescimento lento, no qual o tempo entre o início dos sintomas e o estabelecimento do diagnóstico pode se dar em média em até 3 anos (SANTOS *et al.*, 2001).

Em 50% dos pacientes, o início dos sintomas pode ser súbito. Podem ocorrer cefaléia, vômitos, astenia psicomotora, depressão da consciência, disfasia, perda somatossensorial e danos no campo visual (INCA, 2012).

Estudos já relataram alterações genéticas e citogenéticas em diversos tipos de tumores cerebrais inclusive gliomas, porém, em tumores astrocíticos, os poucos estudos realizados até o momento relatam ausência das mutações mais comuns nos demais tipos tumorais (HODGSON, 2007). Por outro lado, Fukushima *et al.* (2006) realizaram um estudo onde descrevem associação de alterações genéticas de oncogenes e genes supressores de tumor com a gênese tumoral dos astrocitomas.

1.3. ASPECTOS MOLECULARES DO CÂNCER DE SNC

Os tumores cerebrais são uma das principais causas de mortalidade por câncer e permanecem difíceis de curar, apesar dos avanços em cirurgia e terapias adjuvantes e estudos recentes estão focados na análise molecular e celular da massa tumoral. Os gliomas, sendo o tipo mais comum e mortal dos tumores cerebrais (KLEIHUES *et al.*, 2002), são tipicamente compostos por células morfológicamente diferentes que expressam uma grande variedade de marcadores de linhagem neurais. Alguns gliomas, apesar de compartilharem morfologia e fenótipo semelhantes, podem ter prognóstico e resposta ao tratamento muito diferentes. Alterações de múltiplos genes do ciclo celular e vias reguladoras desempenham um papel importante na tumorigênese e agem na formação de subtipos desse tumor (SINGH *et al.*, 2003).

Assim, desde 1992 vários esforços vêm sendo feitos na área das pesquisas em terapia gênica, pois até o momento não existe nenhuma eficaz, apesar dos tratamentos tradicionais, incluindo cirurgia, radioterapia e quimioterapia (CULVER *et al.*, 1992).

Sabe-se que alguns fatores ambientais podem contribuir para a etiologia do câncer, aceita-se também que as neoplasias são originadas através de um processo de múltiplos passos conduzidos por alterações de genes e seleção clonal da progênie variante, que vai adquirindo um comportamento progressivamente mais

agressivo. Estas mutações ocorrem principalmente em duas classes de genes celulares: os **oncogenes** e os **genes supressores de tumor**. A grande maioria das mutações em câncer é somática e presente apenas nas células tumorais. Uma quantidade relativamente pequena dessas mutações pode estar presente na linhagem germinativa dos indivíduos promovendo a predisposição a vários tipos de câncer (CHO e FEARON, 1996).

Os oncogenes são proto-oncogenes (genes celulares normais) ativados através de mutações funcionais associados com a progressão do câncer. Os oncogenes promovem o crescimento do tumor e mecanismos de desenvolvimento que afetam, tais como a proliferação celular, invasão, angiogênese e resistência à apoptose por proteínas produzidas estão associados com os tumores cerebrais. A síntese de proteína produto do oncogene, que pode aumentar ou provocar alterações funcionais, pode ser vista como um resultado de mutação nesta classe de genes (CENGIZ e CICEKCIBASI, 2011).

A ativação oncogênica associada a tumores do sistema nervoso está na forma do gene amplificado e aumenta o número de cópias nas células específicas. A alteração oncogênica, ou associada a oncogenes, mais comum é a amplificação do gene do receptor do fator de crescimento epidermal (*EGFR*) e as mutações do gene supressor de tumor *TP53* (EKSTRAND *et al*, 1991; LIBERMANN *et al*, 1985; WONG *et al*, 1987).

O gene *EGFR*, que é ativado por fatores de crescimento tais como EGF, TGF- α é uma tirosinaquinase transmembrana. A amplificação do gene é observada em 40% a 50% dos casos de GBM, mas é raro no astrocitoma anaplásico maligno (BRADY *et al*, 1992; EKSTRAND *et al*, 1991; HUMPHREY *et al*, 1990; WONG *et al*, 1987). Esta mudança é um preditivo para o grau de malignidade dos astrocitomas (NG e LAM, 1998). Em astrocitomas malignos, as amplificações de genes tais como o *MYCN*, *CDK4*, *MDM2*, *CCND1*, e *MET*, incluindo a família dos fatores de crescimento de tirosinaquinase como *EGFR* também foram determinadas (BIGNER *et al*, 1987; ELE *et al*, 1994; FISCHER *et al*, 1995; REIFENBERGER *et al*, 1994). Além disso, a amplificação mais comum foi *CDK4*, presente em 10% a 15% dos astrocitomas malignos e glioblastomas. Cada um destes genes tem sido associado com o grau de malignidade de tumores gliais. As alterações oncogênicas foram vistas em menos de 10% nos outros tumores do SNC. Em meduloblastomas, foram

relatadas as amplificações de *c-myc* e *MYCN*. Além disso, também foram detectadas β -catenina e mutações no gene *TCF* em casos raros (RAFFEL *et al*, 1990; WASSON *et al*, 1990; ZURAWEL *et al*, 1998).

Sob o aspecto imunológico, o cérebro era considerado anteriormente um órgão privilegiado, por possuir uma barreira hematológica (barreira hematoencefálica – BHE) distinta, carecendo somente de estruturas linfáticas discretas (YOFFEY e COURTICE, 1970). Apesar de estes fatores minimizarem a função imune do SNC, o sistema de vigilância presente é altamente adaptado e as respostas imunes podem ocorrer de modo bastante eficaz no SNC, através da função do sistema complemento (BERNHEIMER *et al*, 1988.) e do sistema antígeno-anticorpo, incluindo as células B funcionais (ALOISI *et al*, 1999; SANDBERG-WOLLHEIM *et al*, 1986) que também são encontrados no SNC.

Nas patologias do SNC, as células apresentadoras de antígenos (APC) iniciam o processo imunológico ativando as células da micróglia, as quais aumentam a expressão tanto do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) quanto de moléculas co-estimulatórias, contribuindo para respostas específicas de células T CD4 e CD8 (ALOISI *et al*, 1998; BRANNAN e ROBERTS, 2004; HICKEY e KIMURA, 1987; HICKEY *et al*, 1991; HICKEY, 2001; KRAKOWSKI e OWENS, 2000).

Na doença neoplásica, o glioma pode evadir-se do sistema imunológico em diferentes etapas de reconhecimento do antígeno e da ativação imune (PARNEY *et al.*, 2000). Muitas células de glioma expressam níveis baixos ou defeituosos de antígenos leucocitários humanos (HLA) e também foi relatada deficiência na via de ativação de células apresentadoras de antígeno, citotóxicas e linfócitos T-auxiliares ou *T-helper* (TH1) (FLÜGEL *et al.*, 1999). A inibição da apresentação de antígeno pela micróglia e por outros macrófagos no microambiente do tumor também confere aos tumores a capacidade de escapar da detecção imunológica (**Figura 3**).

Em gliomas, as células T, tanto no sangue periférico quanto no microambiente do tumor, têm sua função deprimida (ROSZMAN e BROOKS, 1985; ROSZMAN *et al*, 1985). Os linfócitos T (CD41 inatos), nestes tumores, revelam fracas respostas proliferativas e reduzem dramaticamente a síntese do TH1 e da citocina IL-2 (DAS *et al.*, 2008). A secreção por células de glioma de várias moléculas e citocinas inibidoras imunológicas também desempenha um papel importante na imunossupressão associada aos gliomas. Elevados níveis de

expressão de *TGF-β2*, IL-10 e prostaglandina E2 estão presentes em gliomas malignos (COULDWELL *et al.*, 1992; NITTA *et al.*, 1994). A estimulação de micróglias existentes em células tumorais reduz a secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF), no entanto, também aumenta a secreção da interleucina inibidora de citocina (IL) -10 (DIX *et al.*, 1999).

1.4. O DNA MITOCONDRIAL

O DNA mitocondrial (mtDNA) é um genoma com 16.569 pb, formado por uma dupla fita circular fechada, localizado na matriz das mitocôndrias, presente com um alto número de cópias (10^3 a 10^4) por célula (**Figuras 5 e 6**). Sua sequência foi primeiramente descrita em 1981 por Anderson *et al.* O genoma codifica 22tRNAs, 2 rRNAs e 13 proteínas envolvidas na cadeia de transferência de elétrons presentes na fase de fosforilação oxidativa mitocondrial e na produção de ATP (POLYAK *et al.*, 1998).

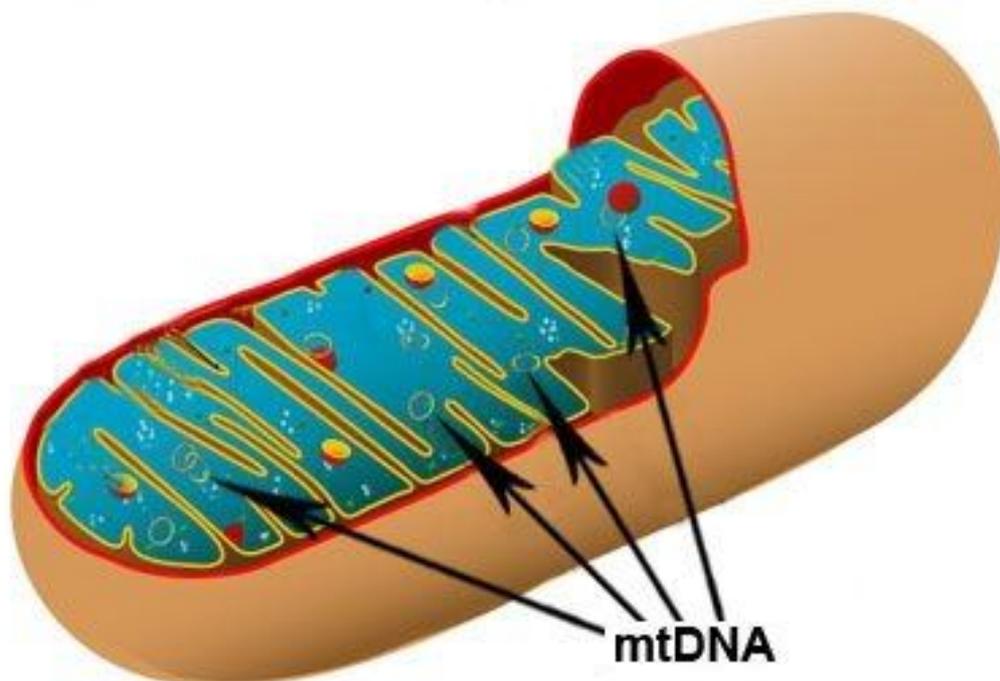


Figura 5: Mitocôndria com setas apontando várias cópias de DNA mitocondrial. **Fonte:** adaptado de Genebase (2012).

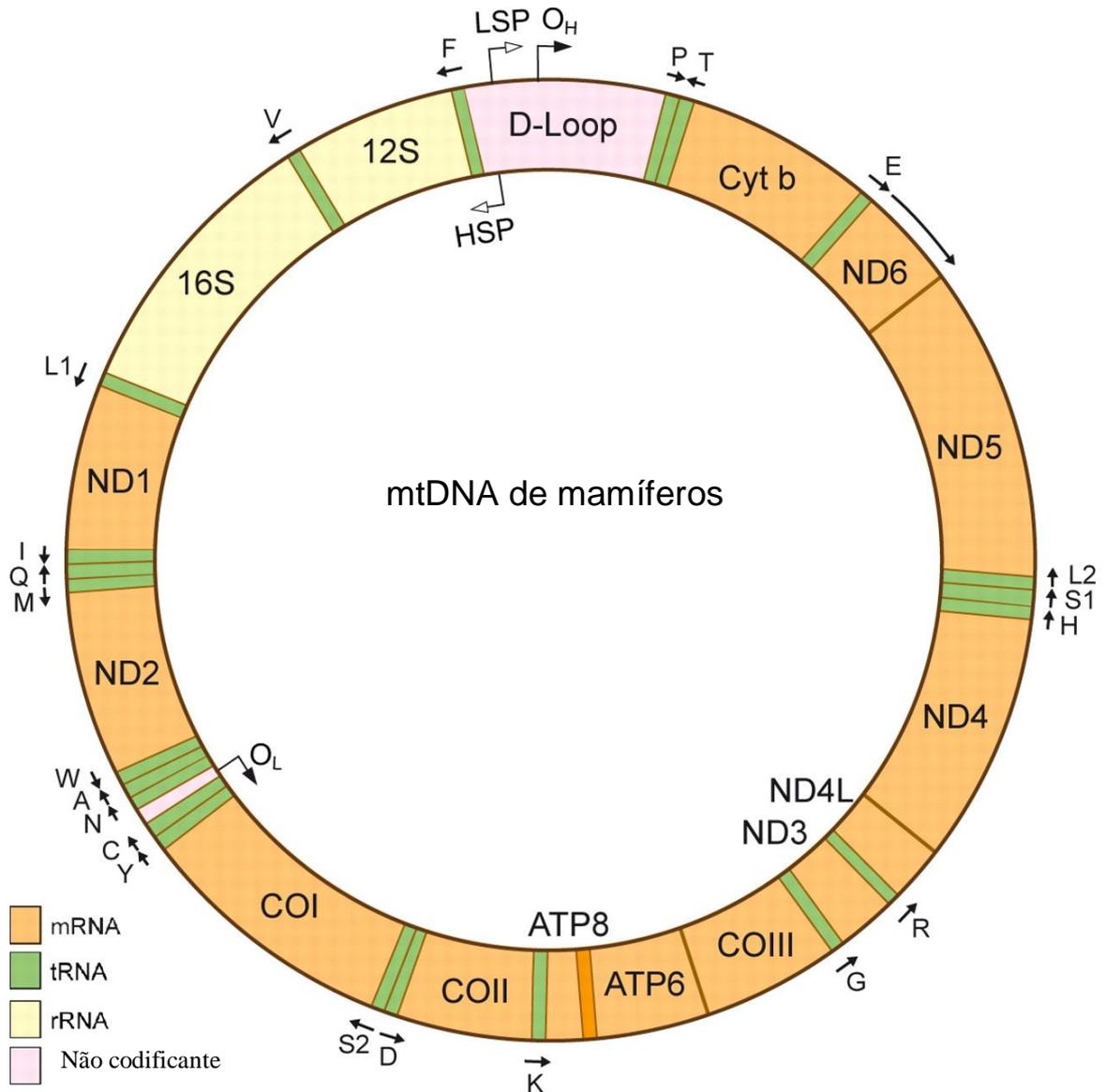


Figura 6: Representação esquemática do mtDNA de mamíferos. A molécula de cadeia dupla circular de ~16,5 kb contém uma única região não codificante, a região de *Displacement Loop* (D loop), alberga os promotores para a transcrição de ambas as fitas mitocondriais (HSP e LSP) e a origem de replicação *leading* (OH). A origem de replicação *lagging* (OL) é incorporada em um conjunto de genes de tRNA. Os genes para as duas rRNAs (12S e 16S rRNA), 13 (mRNAs ND1-6, ND4L, Cyt b, COI-III, ATP6, e ATP8), e 22 tRNAs (F, V, L1, I, M, W, D, K, G, R, H, S1, L2, T, P, P, S2, Y, C, N, A, e Q) são indicados na legenda. **Fonte:** Park e Larsson, 2011.

A formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) ocorre pela ação catalítica de enzimas, durante o processo de transferência de elétrons no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos (Sies, 1999).

O DNA mitocondrial está intimamente relacionado ao desenvolvimento e a progressão neoplásica e de metástases em vários tipos de tumores. Essa correlação

é explicada por este ser extremamente propenso a sofrer mutações. Sua taxa mutacional é de dez a cem vezes maior que a do DNA nuclear, devido uma série de causas, dentre elas, o fato em da organela gerar uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio, produzidas durante sua fase de fosforilação oxidativa (COPELAND *et al.*, 2002; FLISS *et al.*, 2000; JERONIMO *et al.*, 2001; JONES *et al.*, 2001; KIRCHES *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2001; MÁXIMO *et al.*, 2001; PARRELLA *et al.*, 2001; POLYAK *et al.*, 1998; ZHAO *et al.*, 2005).

A ausência de histonas no DNA mitocondrial é outro fator determinante para a ocorrência de mutações nestes nucleotídeos, uma vez que, essas proteínas exercem um papel fundamental de proteção no DNA nuclear (YAKES e VAN HOUTEN, 1997). Também, deve-se levar em consideração a baixa atividade corretora da enzima DNA polimerase mitocondrial quando comparada a enzima do DNA nuclear (KUNKEL e LOEB, 1981) e ainda, a reparação ineficiente do genoma dependente de excisão de nucleotídeos (CROTEAU *et al.*, 1999).

Células cancerosas se adaptam a fim de maximizar suas habilidades em sintetizar substratos para membranas, ácidos nucleicos e proteínas para o aumento da taxa de proliferação, principal característica dessas células. Isto não pode ser concluído sem grandes quantidades de energia (ATP), o que é obtido pelo aumento exacerbado do uso de glicose e glutamina (MARIE e SHINJO, 2011). Essas células exibem um fenótipo metabólico denominado de glicólise aeróbica, ou efeito de Warburg, caracterizado por aumentar a glicólise através da geração de lactato, independente da disponibilidade de oxigênio (WARBURG, 1931 Apud VANDER HEIDEN *et al.*, 2009). A expressão da isoforma da piruvato-cinase do gene M tipo II (PKM2) é a responsável pela mediação deste fenótipo metabólico, e confere uma vantagem proliferativa a células tumorais *in vivo* (CHRISTOFK *et al.*, 2008). A PKM2 é expressa em células cancerosas, bem como em tecidos adultos, fetais e indiferenciados, e é alostericamente regulada pela frutose-1,6-bifosfato (FBP) e pode interagir com as proteínas de sinalização tirosina fosforiladas. A enzima Piruvato-cinase (PK) catalisa o passo final na glicólise, gerando piruvato e ATP a partir de fosfoenolpiruvato e ADP (DOMBRAUCKAS *et al.*, 2005).

1.4.1. REGIÃO CONTROLE

O genoma das mitocôndrias apresenta uma porção não codificante denominada região controle ou Alça-D (*D-LOOP*), com 1.122 pb e está compreendida entre as posições 16024 e 576 (*NCBI Reference Sequence: NC_012920.1*). Essa região (**Figura 5**) é o principal sítio de controle de replicação do mtDNA e dos principais promotores necessários para transcrição (*WHEELHOUSE et al., 2005*). Contém sequências importantes para funções mitocondriais fundamentais, como: (i) a origem de replicação da fita H; (ii) origem da transcrição das duas fitas, H e L; (iii) e os sítios de ligação dos fatores transcricionais. Além de o mtDNA apresentar uma taxa de substituição nucleotídica maior do que o genoma nuclear, a região *D-LOOP* possui duas regiões hipervariáveis desse segmento, denominadas HVI e HVII (**Figura 6**), consideradas *hotspots* para mutação (*ANDERSON et al., 1981; RUIZ-PESINI et al., 2007*).

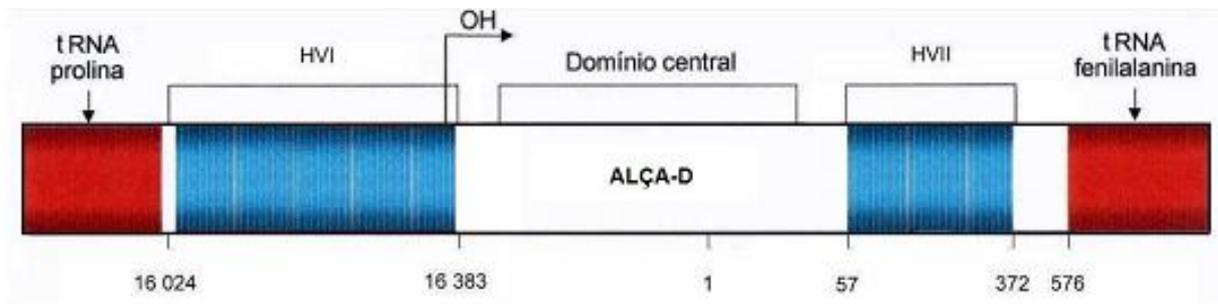


Figura 7: Diagrama da região controle mostrando o flanqueamento dos genes tRNA_{pro} e tRNA_{phe} e a localização das regiões hipervariáveis HVI e HVII. **Fonte:** adaptado de Pinheiro, 2003.

Acredita-se que algumas mutações somáticas ocorrentes na região *D-LOOP* estão relacionadas com a diminuição do número de cópias do DNA mitocondrial (*TAN et al., 2006*) e consequente diminuição do metabolismo celular (*BONIFÁCIO, 2011*). Observa-se também que, em pacientes alguns tipos de câncer, ocorre uma diminuição do número de cópias do mtDNA em células do plasma sanguíneo, contrastando com o aumento dessas cópias em células tumorais (*BONIFÁCIO, 2011*). Além disso, há um crescente número de evidências que correlacionam a presença de mutações no DNA mitocondrial com características clinicopatológicas malignas ou mau prognóstico da doença neoplásica

(MATSUYAMA *et al.*, 2003; LIÈVRE *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2005; TSENG *et al.*, 2006)

A mitocôndria é responsável pela manutenção do balanço energético celular e está envolvida no “disparo” da apoptose em resposta ao estresse oxidativo (ROTHFUSS *et al.*, 2009). A região *D-LOOP* é o principal sítio de controle de replicação do DNA mitocondrial, contendo a origem “*leading*” e os principais promotores necessários para a transcrição dos genes mitocondriais (WHEELHOUSE *et al.*, 2005). Mutações na *D-LOOP* podem alterar a taxa de replicação do DNA por modificar significativamente a afinidade de ligação de fatores trans-ativantes (MEIEHOFER *et al.*, 2006).

Estímulos apoptóticos induzem a translocação de **Bax** ou **Bak** (Bcl-2 associada à proteína X) do citosol para a mitocôndria, que induz a liberação de citocromo C (**Figura 7**). A Bax é ativada pela proteína BH3, através de estímulo intrínseco, enquanto que a Bak é ativada pela associação das caspases 8 após estímulo extrínseco via FasL (CHENG *et al.*, 2001). No citosol, após liberação da mitocôndria, o citocromo C ativa as caspases através da formação de um complexo (apoptossomo) com Apaf-1 (fator-1 de ativação protease-apoptótico), procaspase-9 e ATP (TAIT e GREEN, 2010). Estima-se que o complexo **Bcl-2/Bcl-xL** (Bcl-2 mutante) pode suprimir a apoptose por simples liberação de citocromo C e prevenir ou interferir na ativação das caspases com citocromo C e Apaf-1. A produção sustentada de óxido nítrico (NO) também pode causar a liberação de citocromo C mitocondrial para o citoplasma e contribuir assim para a ativação das caspases. No entanto, o óxido nítrico está envolvido em muitos aspectos da apoptose e pode atuar tanto como um promotor quanto um inibidor, dependendo das condições metabólicas celulares (WCR, 2008).

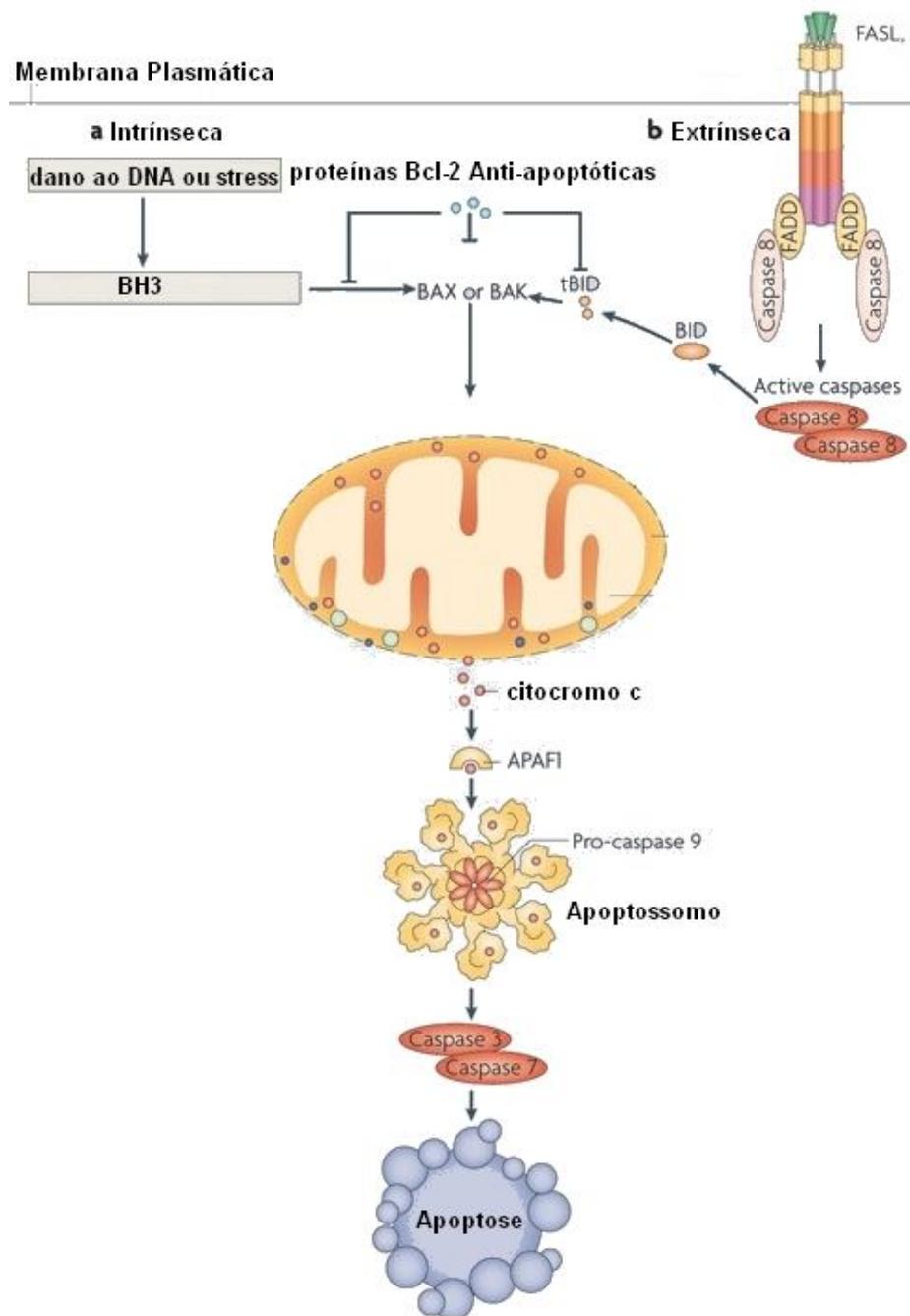


Figura 8: Estímulos apoptóticos por via mitocondrial. **Fonte:** adaptado de Tait e Green (2010).

Devido ao ambiente altamente reativo e, provavelmente, devido também a uma estrutura mitocondrial condensada semelhante à cromatina, porém em menor grau que a nuclear, o DNA mitocondrial é frequentemente exposto ao estresse oxidativo, levando-o a defeitos genômicos (ROTHFUSS *et al.*, 2009). As transições G:A e T:C já foram observadas na região *D-LOOP*, as quais são consistentes com o

espectro mutagênico de dano oxidativo (MEIEHOFER *et al.*, 2006.) Rothfuss *et al.* (2009) ainda associam os danos no DNA mitocondrial ao envelhecimento, a doenças como câncer e doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington e esclerose lateral amiotrófica. Outros estudos também relataram que mutações na *D-LOOP* estão significativamente associadas ao consumo de tabaco e ao hábito de mascar betel, ambos carcinogênicos (LIU *et al.*, 2011).

Tanto as mutações germinativas quanto as somáticas do DNA mitocondrial parecem modificar o risco de câncer ou estão diretamente envolvidas no mecanismo patogênico da tumorigênese (TAN *et al.*, 2006). As formas mais prevalentes de mutações no DNA mitocondrial são as mutações pontuais e as deleções ou inserções em grande escala, estas últimas culminam em disfunção mitocondrial e apoptose (ROTHFUSS *et al.*, 2009).

Uma pequena fração de mutações pode alterar a função mitocondrial e a fisiologia celular, porém são bastante inespecíficas, podendo ocorrer em qualquer tipo tumoral e ainda não têm causalidade conhecida (VEGA *et al.*, 2004). Além disso, Barekati *et al.* (2010) sugerem que danos no DNA mitocondrial podem ser causados pela p53 desregulada por fatores como silenciamento epigenético, o que levaria ao aumento do metabolismo celular com uma superprodução de espécies reativas de oxigênio e outros metabólitos capazes de alterar o mtDNA (GOCHHAIT *et al.*, 2008).

Segundo Liu *et al.* (2011), o acúmulo de mutações no mtDNA está relacionado com o aumento da taxa de proliferação celular e inibição da apoptose e essas mutações correlacionam-se positivamente com mutações na p53. A disfunção da proteína p53 pode ser comprometida por mutação do gene *TP53*, metilação aberrante de ilhas CpG (mais comum no câncer humano) ou ainda por alteração dos genes cruciais que regulam a via da proteína. A maioria das mutações no gene *TP53* ocorre no domínio de ligação do DNA (éxons 5-8) o qual tem um papel crítico na atividade biológica da p53 (BAREKATI *et al.*, 2010). Gochhait *et al.* (2008) sugerem que a presença concomitante de alteração somática no mtDNA e no sítio de ligação de DNA do gene *TP53* facilita a sobrevivência da célula e a tumorigênese.

Altilia *et al.* (2012) sugere uma relação entre o *TP53* e o mtDNA, onde o polimorfismo do códon 72 deste gene confere ao mesmo duas aptidões distintas em

que a isoforma p53P72 é mais propensa a assegurar a reparação do DNA nuclear e a p53R72, do genoma mitocondrial. Assim, parece que a capacidade para localizar a mitocôndria pode afetar não apenas a atividade da p53 como um indutor de apoptose, mas também como um cofator de reparação do mtDNA, portanto influenciar a estabilidade do mtDNA e eventualmente a eficácia metabólica mitocondrial.

Os dados dos estudos com mtDNA e os vários tipos de cânceres são bastante variáveis, talvez devido à natureza histológica ou embrionária do tumor. Liu *et al.* (2010) reporta a ausência de mutações homoplásmicas somáticas em regiões codificantes do mtDNA em estudo com meduloblastomas e Meiehofer *et al.* (2006) sugere que mutações somáticas nessas regiões em tumores são silenciosas ou os polimorfismos, em sua maioria, não são patogênicos.

Quanto à região *D-LOOP*, entre as mutações mais relatadas está a instabilidade de um microssatélite na posição 303-315, onde se localiza parte do sítio de ligação do iniciador de replicação (MONTANINI *et al.*, 2005; SHARMA *et al.*, 2005). Segundo Vega *et al.* (2004), estas mutações não oferecem vantagem seletiva, conseqüentemente, não sendo suscetíveis de contribuir para a tumorigênese. Tal sugestão se deve ao fato do estudo ter relatado uma distribuição semelhante de alterações somáticas entre gliomas de grau II, III e IV.

Já Kirches *et al.* (2001) relatam uma elevada taxa de mutações homoplásmicas em regiões hipervariantes da *D-LOOP* em glioblastomas (grau IV) com predominância de transições e sugerem um mecanismo comum gerador de polimorfismos do DNA mitocondrial, no qual, ao ocorrer uma mutação em determinado ponto, esta mesma alteração se repetirá por duas ou mais vezes em um mesmo tecido.

Os estudos de Lièvre *et al.* (2006) sugerem que as mutações no *D-LOOP* podem ser consideradas como um marcador para câncer assim como sua utilidade na detecção precoce do câncer de cabeça e pescoço. Essas mutações mostraram ser um acontecimento precoce na carcinogênese de cabeça e pescoço (Ha *et al.*, 2002), com frequência de 22% nas lesões pré-malignas de cabeça, aumentando de acordo com o grau de displasia, chegando a 50% nas lesões severas e 61% nos carcinomas *in situ*. Klemba *et al.* (2010) também enfatizam o estabelecimento de

biomarcadores utilizando *D-LOOP* para a identificação de indivíduos de alto risco para câncer vulvar.

Mutações homoplásmicas são aquelas que afetam todas as cópias do mtDNA de uma célula. Porém quando determinadas mutações afetam somente algumas mitocôndrias, o processo é conhecido como heteroplasmia (CHATTERJEE *et al.*, 2011).

As mutações homoplásmicas acumulam-se no genoma mitocondrial como consequência de segregação aleatória de moléculas mutantes durante o desenvolvimento do tumor (VEGA *et al.*, 2004). Kirches *et al.* (2001) descreve uma frequência elevada de mutações homoplásmicas mitocondriais encontradas em glioblastomas, onde também afirma que 89% das substituições de nucleotídeos ocorrem em sítios de polimorfismos e todos são transições. Ele afirma também que 95% de todos os polimorfismos herdados na *D-LOOP* são transições. Já Montanini *et al.* (2005) reporta que as alterações presentes nos tumores não são encontradas em células do plasma sanguíneo, sugerindo que as alterações ocorrem principalmente no tecido tumoral.

Em contrapartida, Liu *et al.* (2011) sugere que a presença de mutações somáticas na região *D-LOOP* está associada com um melhor prognóstico em pacientes com câncer oral. E a prevalência de deleção do mtDNA é significativamente mais baixa em tecidos de carcinoma hepatocelular (Wheelhouse *et al.*, 2005).

A baixa prevalência dos tumores do sistema nervoso central em comparação aos demais casos de neoplasias não descarta o forte impacto social desta doença (WCR, 2008). Sabe-se que os astrocitomas estão entre os mais devastadores tumores humanos, apresentando altas taxas de morbidade e mortalidade (WCR, 2008).

Alterações nucleotídicas são fundamentais para a formação e progressão maligna dos tumores, causando modificações na expressão ou função de determinados genes, desregulando vias de sinalização e crescimento (BREDEL *et al.*, 2009)

Estudos mostram que a população paraense apresenta peculiaridades genéticas únicas em relação a neoplasias do estômago (MOTTA, 2004), o que faz

desta população um bom objeto para se estudar outros tipos de neoplasias. Além disso, as informações geradas com estes estudos terão uma utilização muito valiosa, pois poderão gerar dados que serão empregados não só na melhora da classificação e diferenciação tumoral, mas também poderão ser úteis em questões de diagnóstico e prognóstico não só nesta população, mas na população humana como um todo.

Considerando a premissa de que marcadores moleculares podem ser utilizados no diagnóstico, prognóstico e na escolha adequada do tratamento a ser recebido pelo paciente, que a idade ao diagnóstico tem grande influência no prognóstico, e que o componente étnico influencia na incidência e patogênese molecular dos tumores, a identificação de marcadores envolvidos na progressão tumoral de tumores do SNC, especialmente astrocitomas, são de extrema importância para a saúde pública.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem por objetivo geral analisar fatores genéticos e moleculares da região de controle do DNA mitocondrial relacionados ao surgimento e desenvolvimento de câncer do sistema nervoso.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar as alterações nucleotídicas da região controladora do DNA mitocondrial em tecidos neoplásicos e amostras controle, ambos da população paraense;
- b) Verificar a associação dos padrões monomórficos/polimórficos e instabilidade de microssatélites nessa região com características tumorais, idade e gênero dos pacientes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho faz parte de um projeto maior intitulado “Estudos Citogenéticos e Moleculares em Tumores do Sistema Nervoso Humano na População Paraense”, aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (025/06 CEP-CCS/UFGPA), conforme anexo I. Os pacientes ou seus parentes mais próximos foram informados sobre o estudo a ser realizado e, em caso de concordância em participar do mesmo, solicitou-se a assinatura de um termo de livre consentimento (Anexo I).

3.1. AMOSTRAS

Amostras de tecido tumoral foram previamente coletadas durante o procedimento cirúrgico pela equipe de neurocirurgia do Hospital Ophir Loyola. O material foi colocado em meio de cultura RPMI, contendo antibióticos, para prevenção de possível contaminação. Imediatamente após sua coleta, o material foi encaminhado ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará, para processamento.

Foram utilizadas 29 amostras tumorais do sistema nervoso humano classificadas como astrocitomas de diversos graus (**Tabela 4**), com idades entre 2 e 71 anos; e 44 amostras de sangue de indivíduos, sem histórico de câncer e que concordaram em participar deste trabalho (assinando TCLE), que serão utilizadas como grupo controle. Os laudos histopatológicos desse hospital seguem os padrões de classificação de Tumores do Sistema Nervoso Central da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2007).

Tabela 4: Caracterização das amostras utilizadas neste trabalho.

Protocolo	Sexo	Idade	Exame Histopatológico
CSN001	M	23	Astrocitoma Subependimário de células gigantes
CSN010	F	12	Astrocitoma Fibrilar
CSN012	M	13	Astrocitoma Pilocítico grau I
CSN014	F	68	Glioblastoma multiforme
CSN017	F	64	Glioblastoma multiforme
CSN020	M	3	Astrocitoma Pilocítico
CSN021	M	65	Glioblastoma multiforme
CSN022	M	2	Glioma misto (oligoastrocitoma)
CSN031	F	55	Astrocitoma grau III
CSN035	F	22	Astrocitoma/Neurocitoma atípico (grau II)
CSN038	F	2	Astrocitoma difuso grau II
CSN044	M	60	Astrocitoma grau III
CSN058	M	37	Astrocitoma difuso grau II
CSN073	M	43	Glioblastoma multiforme
CSN082	F	52	Astrocitoma fibrilar (glioma grau II- OMS)
CSN101	M	79	Glioblastoma multiforme
CSN104	M	54	Astrocitoma Grau IV
CSN115	M	26	Glioma Maligno
CSN116	F	3	Astrocitoma pilocítico
CSN122	F	71	Astrocitoma Grau IV
CSN126	F	34	Astrocitoma difuso Grau II
CSN130	F	51	Astrocitoma Grau IV
CSN136	M	64	Astrocitoma difuso Grau II
CSN145	F	27	Astrocitoma pilocítico anaplásico
CSN146	F	31	Astrocitoma Anaplásico
CSN153	M	60	Glioblastoma multiforme
CSN154	M	43	Glioblastoma multiforme
CSN198	M	74	Glioblastoma multiforme
CSN199	M	48	Glioblastoma multiforme

3.2. EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração do DNA genômico (SAMBROOK *et al.*, 1989), foram utilizados aproximadamente 150µL de sangue (grupo controle) e 20mg de tecido não tumoral e tumoral (casos de neoplasia), foram transferidos para microtubos estéreis de 1,5mL, adicionados de 300µL de tampão de homogeneização, 300µL de tampão de lise, 20µL de Proteinase K (10mg/mL), misturados por inversão por 10 minutos e incubados em banho-maria por 30 minutos a 55°C, agitando-os delicadamente a cada 10 minutos e posteriormente deixados esfriar a temperatura ambiente.

Para a precipitação de proteínas, foram adicionados 700µL de fenol-clorofórmio (1:1), misturados por inversão por 10 minutos e posteriormente centrifugados por 15 minutos a 14.000 RPM. Após esta etapa, transferiu-se o sobrenadante para outro microtubo, onde se adicionou 700µL de clorofórmio-álcool

isoamílico (24:1) para desproteinização das amostras. A presença de clorofórmio desnatura as proteínas e o álcool isoamílico evita a formação de espuma e auxilia no separo e na manutenção da estabilidade das camadas do centrifugado. Mais uma vez, misturou-se por inversão por 10 minutos e centrifugou-se por 10 minutos a 14.000 RPM.

Ao sobrenadante, já transferido para outro microtubo, adicionou-se o mesmo volume de isopropanol e 1/10 do volume inicial de acetato de sódio (3M; pH 4.8) para a precipitação do DNA. Após suave homogeneização, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 14.000 RPM, descartou-se o álcool, adicionou-se 200µL de Etanol a 70% e centrifugou-se por 5 minutos a 14.000 RPM. Depois de descartado o álcool, as amostras foram levadas a estufa, a uma temperatura de 37°C, por 5 minutos, para secagem. Por fim, o DNA foi eluído em 20µL de tampão TE (pH 8.0) e visualizado em gel de agarose a 1,0% para quantificação.

3.3. REAÇÃO EM CADEIDA DA POLIMERASE (PCR)

Após a extração do DNA, foi realizada a amplificação da alça-D com o uso de iniciadores (primers), cujas seqüências encontram-se descritas na **Tabela 5**.

A PCR foi realizada nas seguintes condições: (1) Reação contendo 0,05 mM de dNTP; tampão de reação 1x (10x = KCL 500mM, 200mM Tris-HCL, pH 4.8); 1,5mM de MgCl₂, aproximadamente 100ng de DNA total, 10pM de cada iniciador e 1U de Taq DNA polimerase; (2) Amplificação com 40 ciclos, consistindo de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 50 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os iniciadores utilizados neste trabalho foram gentilmente cedidos pela Professora Dra Maria Lúcia Harada, específicos para a região *D-LOOP* do DNA mitocondrial (**Tabela 5**).

O fragmento-modelo utilizado como padrão para os estudados neste trabalho foi o **NC_012920.1**, obtidos no *Mega Blast* (NCBI, 2012).

Tabela 5: Iniciadores utilizados nas PCRs deste trabalho.

Iniciador	Seqüência	Sentido
DL218	CACCATTAGCACCCAAAGCT	Forward
DL2	AAGGGCTAGGACCAAACCT	Reverse

Para verificar a eficiência da amplificação, 3µL do produto da PCR acrescido de 3µL de corante de visualização (5 mL glicerol, 1 mL de azul de bromo fenol 0,1%, 1 mL de xileno-cianol 0,1%, 2 mL de EDTA 0,5M), foi submetido a eletroforese horizontal em gel de agarose high-melting a 1,0% corado com 1µl de brometo de etídio (0,2 mg/mL), usando um marcador de peso molecular de 1kb (12,5µg). A eletroforese foi realizada em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA), a uma corrente de 100 V, por aproximadamente 20 minutos, posteriormente visualizado através de luz ultravioleta.

3.4. SEQUENCIAMENTO DO DNA

O produto da PCR, purificado com kit “EZ-10, Spin Column PCR Products Purification Kit” de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante *BioBasic Inc.*, foi submetido a sequenciamento, empregando o método de terminação de cadeia, descrito por SANGER *et al.* (1977). A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o Kit *MegaBACE™ Long Read Matrix (GE Healthcare)* e os iniciadores apresentados na **Tabela 6**. As amostras foram submetidas a 25 ciclos nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 30 segundos. Após o término dos ciclos, a temperatura foi estabilizada em 18°C. Ao término da reação, as amostras foram precipitadas com isopropanol a 65%. Os precipitados foram sequenciados utilizando o aparelho *MegaBace 1000 (GE Healthcare)*.

As seqüências foram alinhadas e editadas com auxílio do *software* BioEdit, utilizando a seqüência padrão **NC_012920.1** como base e o MITOMAP (2012) como banco de dados de referência para as alterações encontradas. Os critérios de classificação de polimorfismo/mutação foram os mesmos do MITOMAP, exceto em relação às novas alterações, onde se considerou uma frequência maior que 1% para polimorfismo e menor que isso para mutação.

Tabela 6: Iniciadores utilizados nas reações de sequenciamento.

Iniciador	Seqüência	Sentido
DL218	CACCATTAGCACCCAAAGCT	Forward
DL2	AAGGGCTAGGACCAAACCT	Reverse
DLF16236	CGTACATAGCACATTACAGT	Forward
DLR16434	GAGTGCTACTCTCCTCGCT	Reverse

3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As variáveis preditoras definidas foram sexo (dicotômica), idade (contínua) e presença ou não de mutação (dicotômica) na região controladora do DNA mitocondrial relacionadas com o grau tumoral das amostras estudadas (categórica). Definidas as variáveis e delimitando que serão testadas duas a duas, sendo estas independentes entre si, foram escolhidos os testes estatísticos de *Mann-Whitney* (MW) e *Kolmogorov-Smirnov* (KS).

O teste de MW é direcionado a testar diferença entre medianas, assim como chances de obtenção de observações mais presentes em uma população contra outra, onde a significância é obtida através do valor de p ($p \leq 0,05$). A hipótese nula no teste de MW é que as duas amostras são provenientes de uma única população, e, portanto, que as distribuições à sua probabilidade são iguais. Neste teste é exigido que as amostras sejam independentes.

O teste de KS, semelhante ao de MW, compara duas amostras independentes, porém, estimando a distância mínima entre elas. É um teste não paramétrico de igualdade entre as distribuições de probabilidade bidimensional e, assim como no teste de MW, a significância é obtida através do valor de p ($p \leq 0,05$), sendo este unilateral, para igualdade dentro do grupo, e bilateral para igualdade/distância entre dois grupos. O teste de KS em duas amostras é um dos métodos (não paramétricos) mais úteis para comparação de duas amostras, uma

vez que é sensível às diferenças em ambas, localização e forma das funções de distribuição cumulativa empírica das duas amostras.

Também foi realizada uma análise de variância entre os graus tumorais e as suas respectivas médias etárias utilizando o teste ANOVA e cálculo de *Odds Ratio*, para avaliar os riscos, no programa BioEstat 5.0 (AYRES, 2008). Para tanto foi realizado teste unilateral, e valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com nossos dados amostrais, analisados com auxílio dos softwares BioEstat 5.0® e Microsoft Office Excel 2010®, a mediana etária entre pacientes do gênero masculino foi de 45,5 anos e do gênero feminino a mediana de 34 anos. Embora esses valores estejam aparentemente distantes, não foi encontrada diferença significativa entre as medianas nos dois gêneros e com desvio padrão também semelhante nos mesmos (Figura 9). As amostras tumorais estavam distribuídas de acordo com seu grau de estadiamento (Tabela 7) onde foi possível estabelecer as medianas dos mesmos, assim como os desvios de cada um e os erro-padrão nos graus I e III como critério de exclusão nos testes de *Mann-Whitney* e *Kolmogorov-Smirnov* (Figura 10).

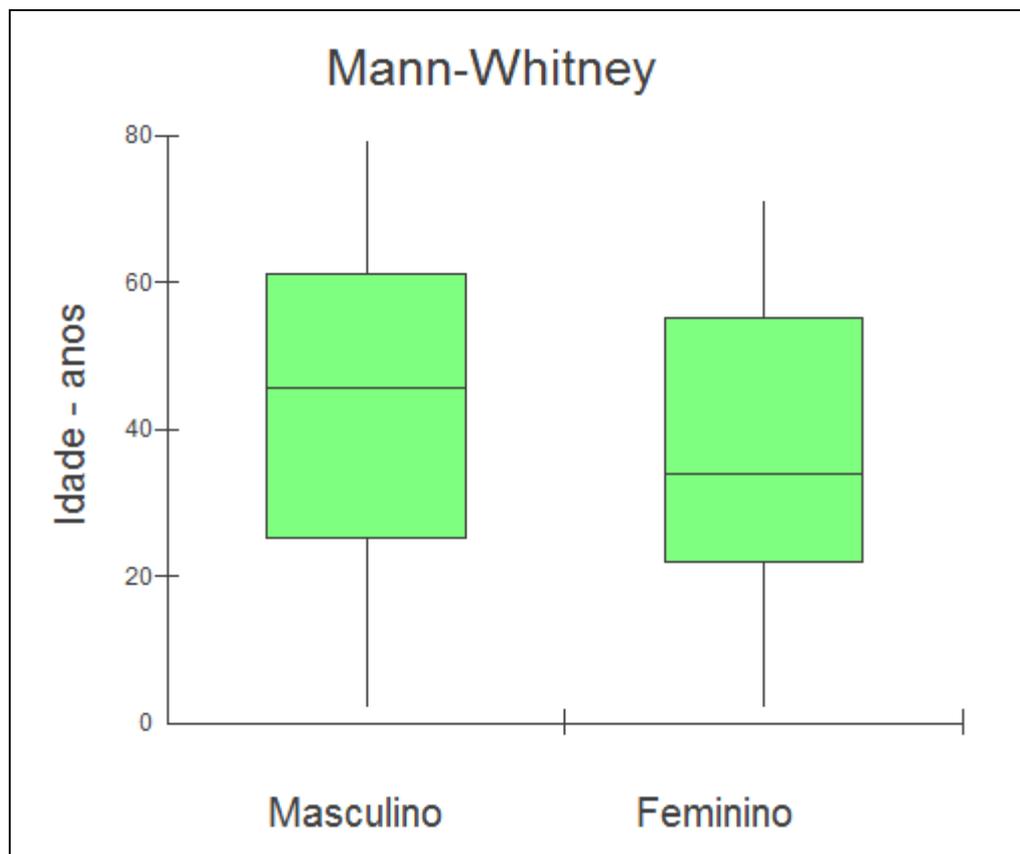


Figura 9: *Boxplot* utilizando o teste de *Mann-Whitney* ilustrando as medianas etárias e o desvio padrão entre os dois gêneros dos pacientes. Não houve diferença significativa entre as medianas ($p > 0,05$).

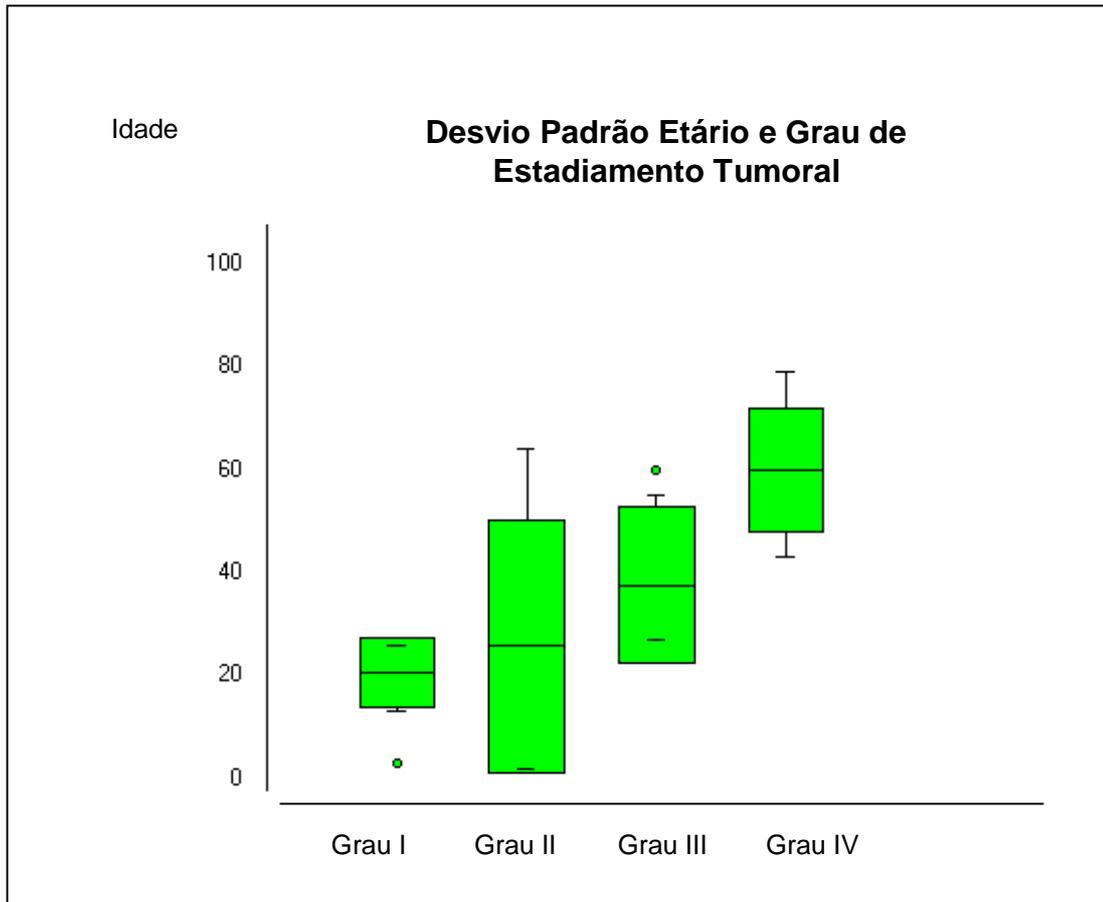


Figura 10: *Boxplot* relacionando os graus de estadiamento tumoral e suas faixas etárias com as respectivas medianas, quartis e erro-padrão (graus I e III). Para detalhes sobre as amostras, vide **Tabela 4**.

Tabela 7: Classificação das amostras utilizadas neste trabalho em relação ao grau de estadiamento dos tumores, gênero e mediana etária.

Grau de Estadiamento	Indivíduos	Gêneros	Mediana Etária
Grau I	04	03 – masculino	18 anos
		01 – feminino	
Grau II	08	04 – masculino	23 anos
		04 – feminino	
Grau III	04	01 – masculino	43 anos
		03 – feminino	
Grau IV	12	08 – masculino	62 anos
		04 – feminino	

Essas características dos dados amostrais dos pacientes, por não revelarem diferença significativa entre as medianas etárias quando separados por gênero, difere dos dados descritos nos estudos de Pojo e Costa (2011), que sugerem diferença na distribuição de astrocitomas entre os gêneros. Essa discrepância ocorra, talvez, em função de peculiaridades étnicas da população brasileira, em particular a paraense, o que confere um perfil genético bastante diferenciado das populações da Europa e dos EUA, onde foram realizados os estudos epidemiológicos citados e onde foram feitos os levantamentos da Organização Mundial de Saúde (Ohgaki, 2009).

Em relação aos graus de agressividade, a análise de variância (ANOVA) não demonstrou diferença significativa entre as médias de graus subsequentes, o que sugere inexistência de relação entre a idade do paciente e a progressão da doença neoplásica especificamente em astrocitomas. Por outro lado, quando comparados com intervalo superior a um grau (ex: 1-3; 1-4; 2-4), todos tiveram valor significativo pelo mesmo método de análise, sugerindo diferença etária entre os tumores de baixo e de alto grau (**Figura 11**).

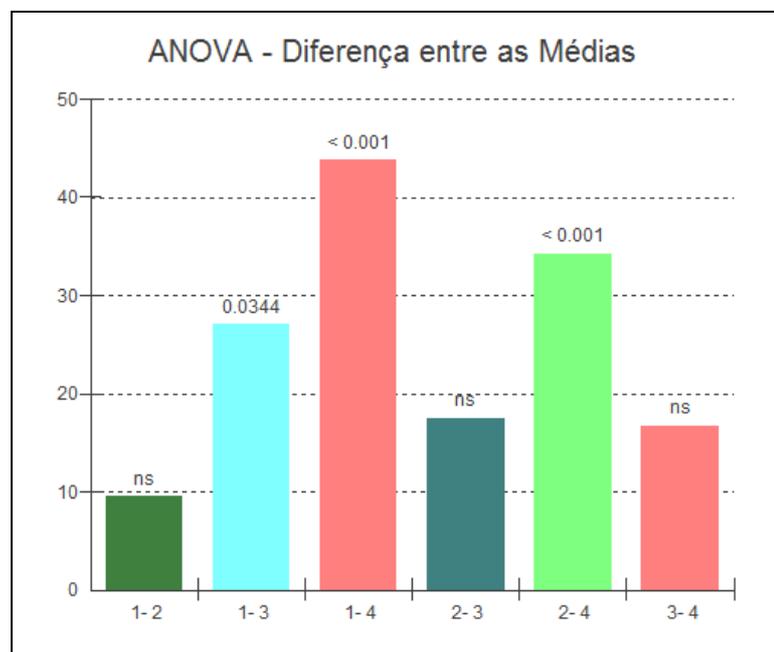


Figura 11: Gráfico ilustrando a análise de variância (ANOVA) entre os graus tumorais e as médias etárias dos pacientes. Todas as comparações de um grau com o seguinte imediato não foram significantes.

Estes testes sugerem que os tumores astrocíticos de baixo grau de estadiamento, especialmente o de grau I – Astrocitomas Pilocíticos, apesar de terem distribuição semelhante em homens e mulheres, são mais comuns em pacientes juvenis, principalmente nas faixas etárias abaixo de 19 anos (CBTRUS, 2010). Essa prevalência em crianças e adolescentes faz com que esse tipo tumoral de baixo grau seja conhecido como “Astrocitoma Pilocítico Juvenil”. Estes resultados são semelhantes aos achados por Cengiz e Cicekcibasi (2011), que também sugerem uma maior prevalência de tumores de baixo grau em indivíduos mais jovens.

Para fins de continuidade das análises estatísticas, foi proposto um agrupamento dos graus tumorais em duas classes, tendo sido as mesmas denominadas de baixo grau (I e II) e de alto grau (III e IV), com exclusão dos indivíduos classificados como erro-padrão (**Figura 10**).

Foi observada distância significativa entre os tumores de baixo grau e os de alto grau (**Figura 12**). A mediana etária dos pacientes acometidos por astrocitomas de baixo grau foi de 18 anos, enquanto que a mediana dos pacientes com tumor de alto grau foi de 57,5 anos. A distância significativa entre as classes propostas e suas respectivas medianas etárias reforça a ideia de que grande parte dos tumores astrocíticos de baixo grau tenha origem hereditária e sugere que os de alto grau possam surgir em decorrência de longa exposição a agentes carcinogênicos (WCR, 2008).

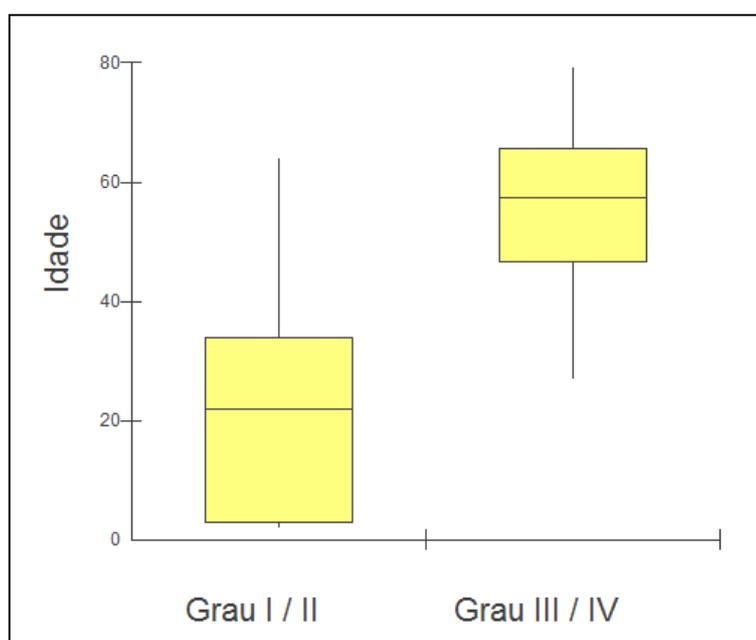


Figura 12: *Boxplot* utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov, ilustrando a distância significativa ($p < 0,05$) das medianas etárias

entre os tumores de baixo grau (I/II) e de alto grau (III/IV) de estadiamento.

Após o sequenciamento das amostras, foram identificadas várias alterações nucleotídicas (**Tabela 8**) em comparação ao fragmento padrão **NC_012920.1**. Todas as amostras apresentaram mais de uma alteração nucleotídica tanto em pontos isolados quanto em pontos de maior frequência, considerados *hotspots*.

Tabela 8: Alterações nucleotídicas encontradas durante o estudo e suas respectivas significâncias estatísticas.

Sítio	Alteração	Nº Amostras	Porcentagem	p-valor
073	A>G	6	20,68%	>0,05
310	T>C	9	31,03%	>0,05
	Ins CC / CCC	4	13,79%	0,01
16125	T>G	3	10,34%	>0,05
16132	Del T	8	27,58%	<0,01
	T>G	2	6,89%	
16152	T>G	2	6,89%	>0,05
16190	T>C	7	24,14%	<0,01
	Ins CC	1	3,45%	
16276	A>C	1	3,45%	>0,05
	A>T	1	3,45%	
19519	T>C	16	55,17%	0,08

Os locais com maior índice de alteração nucleotídica foram o microssatélite já descrito **303-315** (SHARMA *et al.*, 2005; MONTANINI *et al.*, 2005) e os polimorfismos **073**, **16190** e **16519**. Foram também encontradas mutações nos sítios **16132** e **16152**.

Dois novos sítios alterados foram encontradas neste trabalho, sendo estes na posição **16125** e **16276**. No sítio 16125 foram encontradas três amostras com transversões T:G e duas com mutações heteroplásmicas T/G. E no sítio 16276 foram encontradas duas amostras com alterações A:T e A:C e uma terceira com mutação heteroplásmica A/C. Ainda não havia sido descrita nenhuma alteração nestes sítios até o momento (MITOMAP, 2012).

4.1. POLIMORFISMOS

Das 29 amostras estudadas, 10 (34,48%) apresentaram alterações nucleotídicas na região 303-315 (**Figura 13**). Esta região, classificada como microssatélite (YACOUBI-LOUESLATI *et al.*, 2009), apresenta uma alta taxa de mutação e está localizada dentro da região hipervariante HVII. A transição T:C (D310) foi observada em 09 amostras e é o tipo mais comum de mutação nessa região, porém, não teve valor estatístico significante para o risco relacionado a ocorrência de astrocitomas, semelhante aos dados de outros tipos tumorais, onde não há relato de associação direta com o risco de câncer (MONTAINI *et al.*, 2005; SHARMA *et al.*, 2005; PANG *et al.*, 2008).

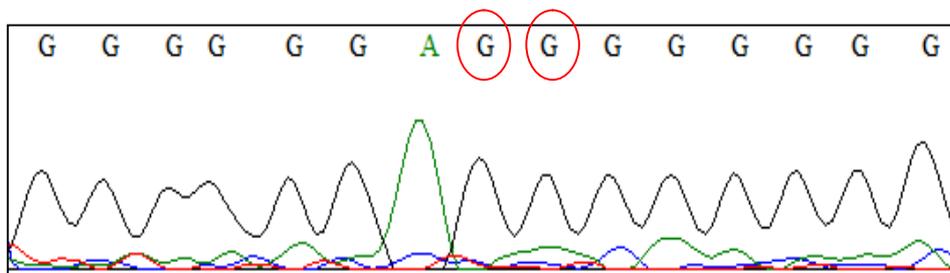


Figura 13: Cromatograma da região do microssatélite 303-315 ilustrando a inserção de duas citosinas (reverso-complementar) no sítio 310.

No entanto, foi observado um pequeno, mas significativo número de inserções de duas e três citosinas em duas amostras, onde o teste de Odds Ratio apontou um risco de ocorrência da doença neoplásica de 42,53%, com $(p)=0,01$ em comparação com o grupo controle. Segundo Sharma *et al.* (2005), a ocorrência de inserções ou deleções de vários nucleotídeos leva à instabilidade desse microsatélite mitocondrial e podem derivar de replicação errada, normalmente atribuída ao surgimento do câncer. Pang *et al.* (2008) e Bragoszewski *et al.* (2008) sugerem que a ocorrência de mutações em larga escala nas regiões HVII podem afetar a transcrição e tradução, contribuindo para o surgimento do câncer.

Foram encontradas seis transições A:G no sítio 73 (**Figura 14**), porém, não foi encontrado risco (*Odds Ratio*) ou associação significativa deste polimorfismo com o câncer. A transição 73A:G é uma variação comum em populações caucasóides europeias e pode desempenhar um papel na distinção entre os cinco maiores grupos europeus de mtDNA (PANG *et al.*, 2008) e reforçam o conceito que este haplótipo pode representar um tipo de sequência comum no mtDNA do ser humano.

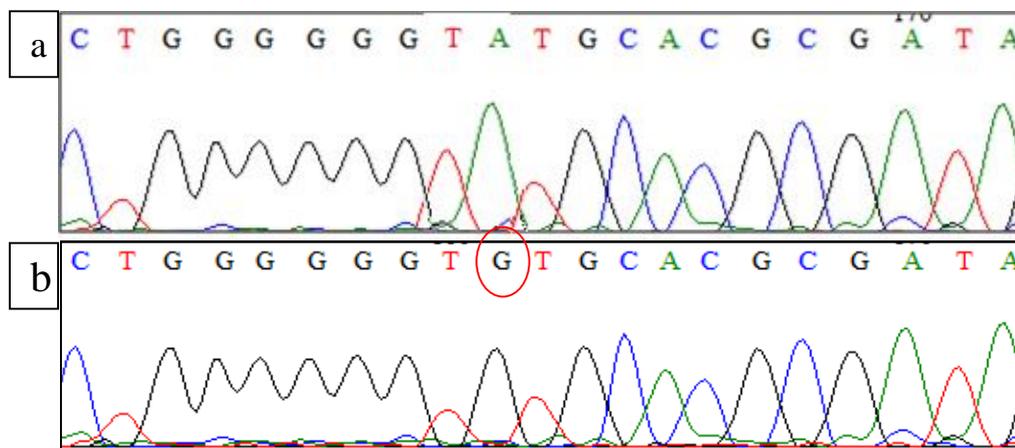


Figura 14: Cromatogramas do sítio 073 ilustrando os alelos (a) selvagem e (b) mutante e o polimorfismo A/G deste sítio em destaque.

Quanto ao polimorfismo do sítio 16190, foram encontradas oito alterações, sendo sete transições T:C e uma inserção de duas citosinas (**Figura 15**). Este sítio está localizado na região HVI e a transição é relacionada à herança africana (CATELLI *et al.*, 2011), sem significativa com câncer. Por outro lado, o teste *Odds Ratio* mostrou um risco de 31,50% ($p=0,01$) relacionando a alteração onde ocorreu a inserção de duas citosinas. Portanto, como não há um relato prévio que

associe esta alteração neste sítio a qualquer tipo de câncer, o que pode ser um importante marcador para astrocitomas.

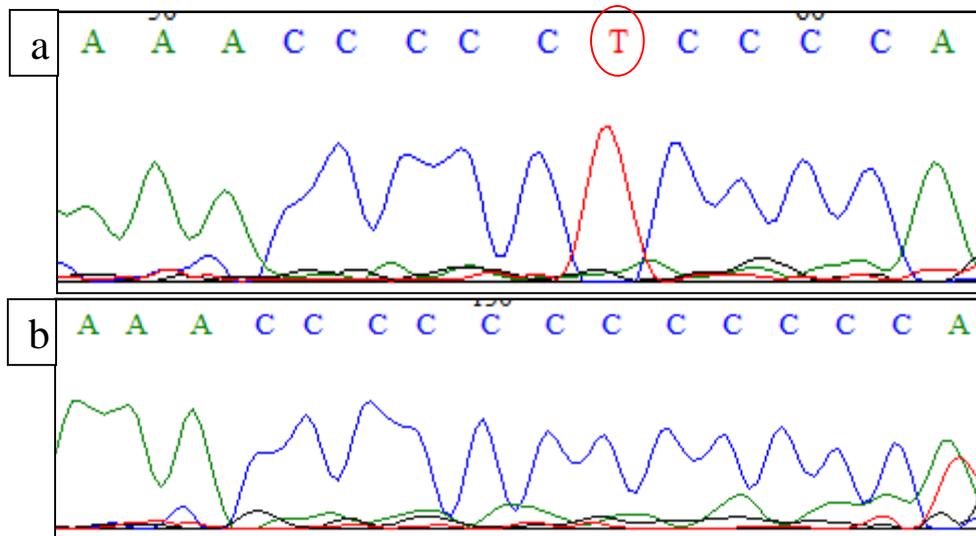


Figura 15: Cromatogramas do sítio 16190 ilustrando os alelos (a) selvagem e (b) mutante, após a deleção da timina e a inserção de duas citosinas no referido sítio.

A transição 16519T:C, encontrada em 16 amostras (55,17%) do presente trabalho (**Figura 16**), também é uma variante mitocondrial comum nas duas formas e não foi associada ao câncer até o momento, além disso, os testes estatísticos não mostraram risco significativo relacionando esta transição à doença neoplásica, semelhante aos achados no câncer de ovário (BRAGOSZEWSKI *et al.*, 2008).

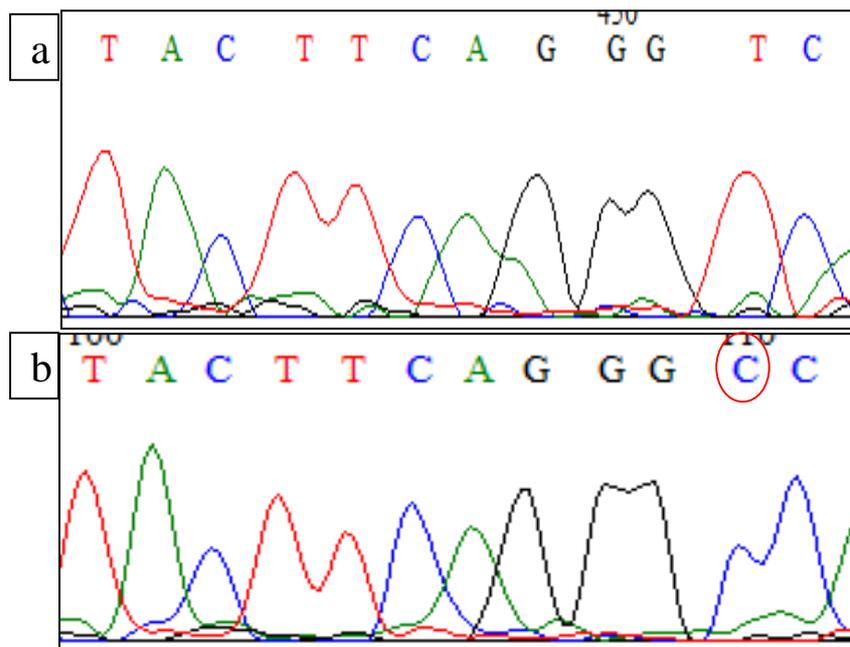


Figura 16: Cromatogramas do sítio 16519 ilustrando os alelos (a) selvagem e (b) mutante do polimorfismo T/C no referido sítio.

4.2. MUTAÇÕES

No sítio 16132 foram observadas oito (27,58%) deleções e duas (6,89%) transversões 16132T:G (**Figura 17**). As alterações, em comparação com a sequência padrão, demonstraram diferença significativa com o teste de KS ($p < 0,01$). As amostras tumorais com deleções apresentaram uma mediana etária acima daquelas sem qualquer alteração no sítio, o que sugere uma relação das alterações neste sítio com a idade do paciente (**Figura 18**). Além disso, as deleções no mtDNA estão diretamente relacionadas ao envelhecimento (ROTHFUSS *et al.*, 2009) e ao surgimento de glioblastomas (BRANDON *et al.*, 2006; KIRCHES *et al.*, 2001). Portanto, pode-se sugerir que essas deleções de um único nucleotídeo, embora ainda não tenham sido relatadas (MITOMAP, 2102), podem estar associadas ao surgimento de astrocitomas de alto grau.

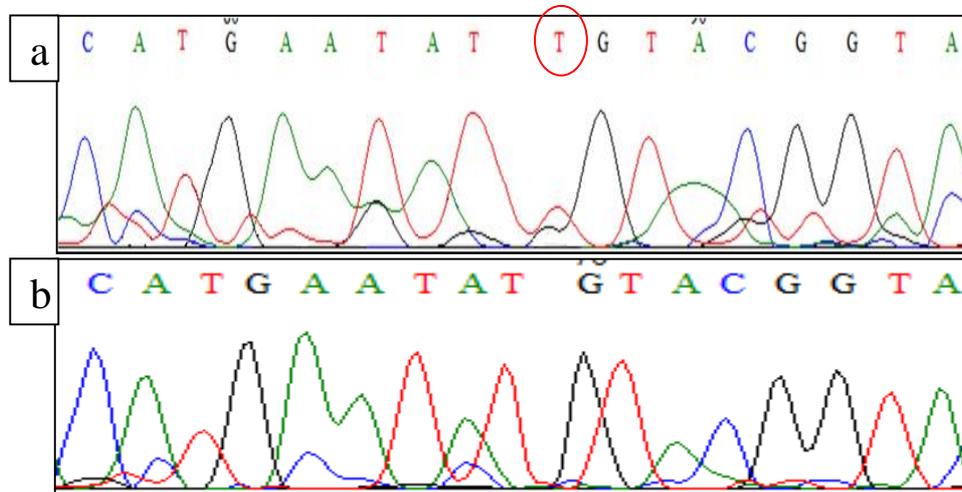


Figura 17: Cromatogramas do sítio 16132 ilustrando os alelos (a) selvagem e (b) mutante após a deleção da timina.

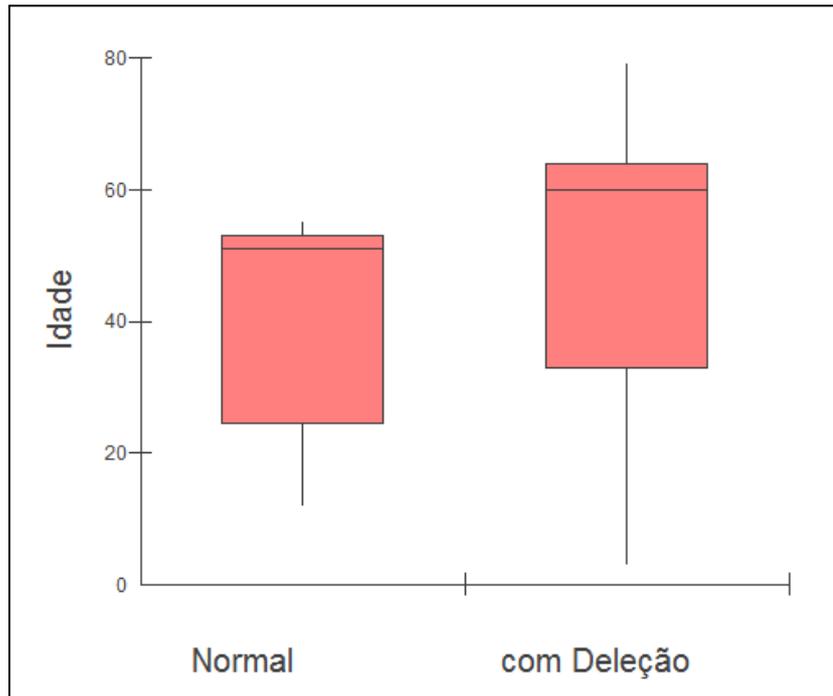


Figura 18: *Bloxplot* com teste de Kolmogorov-Smirnov comparando as medianas etárias de tumores com e sem deleção no sítio 16132 do mtDNA de pacientes com astricitoma.

Outra mutação encontrada em duas (6,89%) amostras de astrocitomas foi a transversão 16152T:G (**Figura 19**), também presente na região HVI e sem valor estatístico significativo, embora tal alteração encontrada ainda não tenha sido relatada, a transição reportada por Baldelt e Parson (2008) no mesmo sítio não parece desempenhar nenhum papel patogênico, sendo utilizado em estudos de variação populacional (KONG *et al.*, 2006).

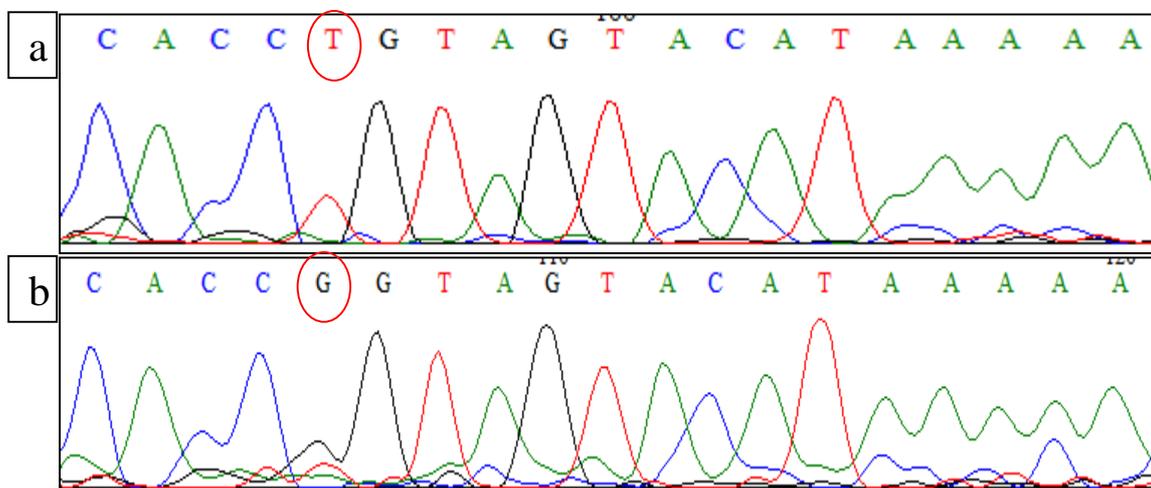


Figura 19: Cromatogramas do sítio 16152 ilustrando a transversão de T (a) para G (b) ocorrida neste sítio do mtDNA.

Dois novos sítios de mutações foram encontradas (MITOMAP, 2012) nas amostras tumorais, sendo o **16125** com três transversões T:G e duas mutações heteroplásmicas T/G (**Figura 20**); e o **16276**, com duas transversões A:C e A:T e duas mutações heteroplásmicas A/C (**Figura 21**). Em ambos os sítios os testes estatísticos não foram capazes de demonstrar significância relativa, embora Jones *et al.* (2001) tenha relatado que as transversões T:G no mtDNA possam conferir às células cancerígenas uma grande vantagem seletiva e que as mutações heteroplásmicas herdadas poderiam ser uma nova base de suscetibilidade genética ao câncer. A inexistência de significância estatística pode ser devido ao pequeno número amostral ou mesmo à características genéticas populacionais, visto que os dois sítios estão localizados dentro da região HVI, um marcador de variações populacionais.

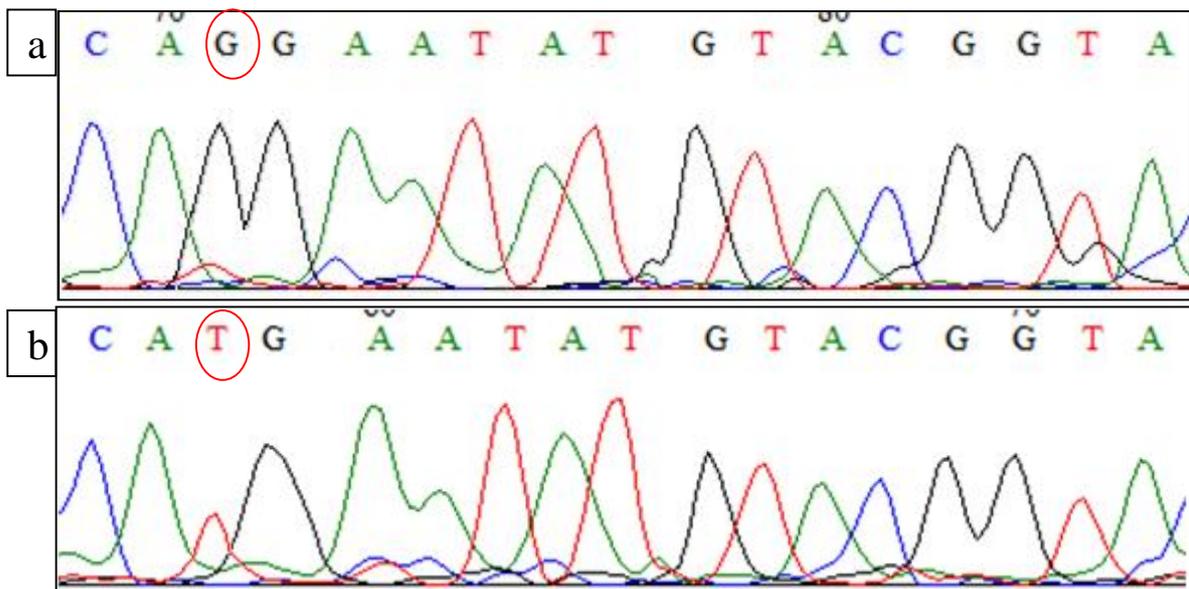


Figura 20: Cromatogramas do sítio 16125 onde ilustra a transversão T:G do alelo (a) normal para o (b) mutante.

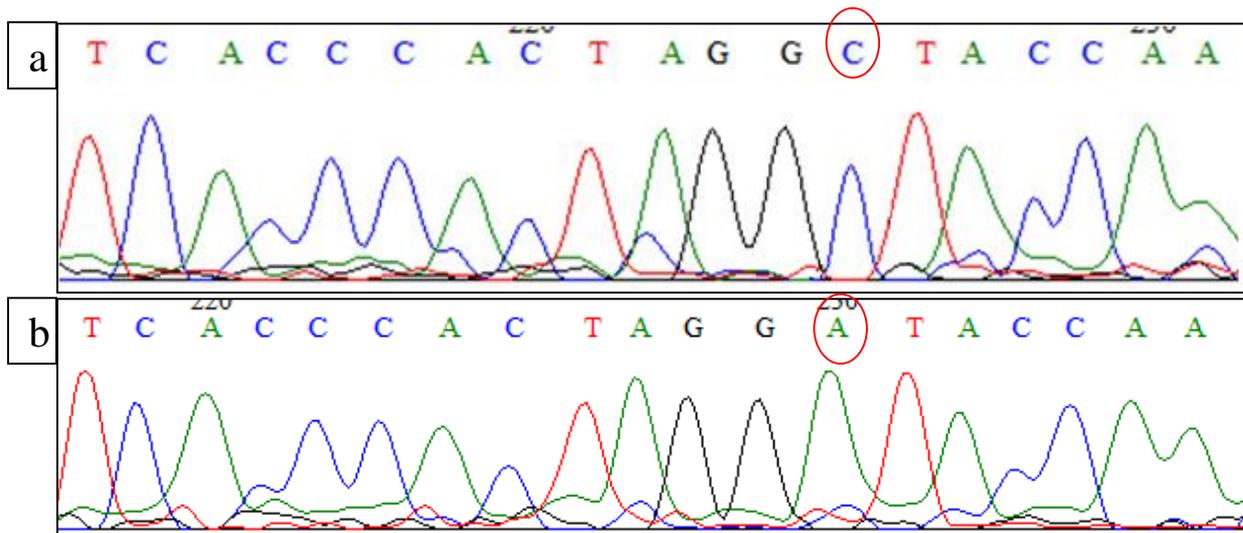


Figura 21: Cromatogramas do sítio 16276 ilustrando a transversão C:A (em destaque) do alelo (a) normal para o (b) mutante.

4.2.1. MUTAÇÕES HETEROPLÁSMICAS

Foram identificadas 21 (72,41%) amostras com mutações heteroplásmicas em 17 sítios diferentes (**Tabela 9** e **Figura 22**). O teste de KS demonstrou uma diferença significativa ($p < 0,01$ bilateral e $p < 0,0001$ unilateral) entre as amostras homoplásmicas e as heteroplásmicas quando relacionadas às idades dos pacientes dos respectivos grupos, o que sugere que mutações heteroplásmicas estejam associadas ao aumento do risco da ocorrência de astrocitomas em relação às homoplásmicas, semelhante aos dados de Zhao *et al.* (2010) em estudos com câncer de mama. Ainda pôde-se observar uma diferença estatística entre as heteroplasmias e o grau de estadiamento tumoral, sugerindo que a presença dessas mutações pode ser determinante para a progressão ou mesmo para o surgimento de astrocitomas com alto grau de malignidade.

Tabela 9: Mutações heteroplásmicas observadas neste estudo.

Heteroplasmia	Sítio	Quantidade	Porcentagem	KS
A/G	235	1	3,45%	Unilateral p<0,0001 Bilateral p<0,01
A/T	16545	1	3,45%	
	16630	1	3,45%	
C/A	37	1	3,45%	
	16088	1	3,45%	
	16125	1	3,45%	
	16156	1	3,45%	
	16231	1	3,45%	
	16276	2	6,89%	
	16319	1	3,45%	
	16372	1	3,45%	
	16432	1	3,45%	
	16440	1	3,45%	
16525	1	3,45%		
T/G	16118	2	6,89%	
	16196	1	3,45%	
	16470	1	3,45%	

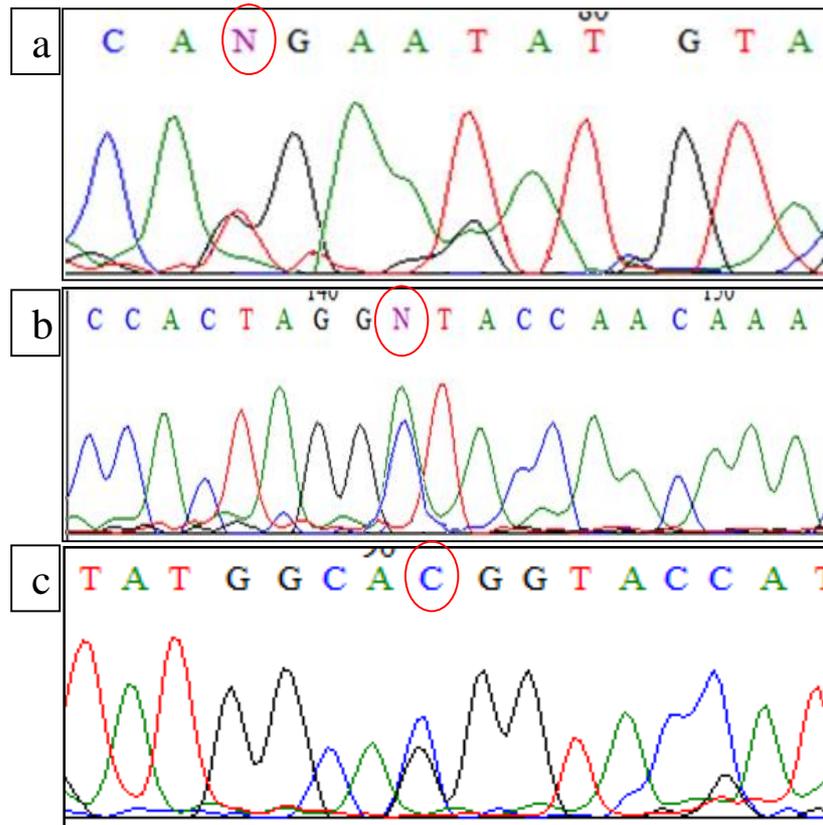


Figura 22: Cromatogramas ilustrando algumas das mutações heteroplásmicas relacionadas neste trabalho, presentes nos sítios (a) 16118 (T/G), (b) 16125 (A/C) e (c) 16276 (G/C).

5. CONCLUSÃO

- No presente estudo, não foi observada diferença significativa entre os gêneros e as idades dos pacientes com astrocitoma.
- Grande parte dos astrocitomas de baixo grau (principalmente o de grau I) parece estar relacionada com a herança genética, assim como os de alto grau parecem estar relacionados à exposição prolongada a agentes carcinogênicos.
- O polimorfismo da região 303-315 não mostrou relação significativa com o desenvolvimento de tumores astrocíticos. No entanto, a inserção de dois ou mais nucleotídeos nesta região pode provocar a instabilidade deste microssatélite mitocondrial, contribuindo para o surgimento do câncer.
- Os polimorfismos dos sítios 73, 16190 e 16519; e as mutações 16152T:G, 16125T:G, 16276A:C e 16276A:T não demonstraram relação significativa com o risco de desenvolvimento de astrocitomas.
- As mutações no sítio 16132 demonstraram diferença significativa em comparação com o alelo selvagem. As deleções neste sítio pode ser um importante marcador para astrocitomas de alto grau.
- A inserção de duas ou mais citosinas no sítio 16190 parece ser um marcador específico para astrocitomas.
- As mutações heteroplásmicas também apresentaram relação com o risco do desenvolvimento de astrocitomas, o que pode ser determinante para o surgimento e/ou progressão de astrocitomas de alto grau de malignidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALOISI F, RIA F, COLUMBA-CABEZAS S, HESS H, PENNA G e ADORINI L. Relative Efficiency of Microglia, Astrocytes, Dendritic Cells and B Cells in Naive CD4+ T Cell Priming and Th1/Th2 Cell Restimulation. **European Journal of Immunology**. 29(9). 2705-2714. 1999.

ALTILIA S, SANTORO A, MALAGOLI D, LANZARINI C, ALVAREZ JAB, GALAZZO G, PORTER DC, CROCCO P, ROSE G, PASSARINO G, RONINSON IB, FRANCESCHI C e SALVIOLI S. TP53 codon 72 polymorphism affects accumulation of mtDNA damage in human cells. **Aging**. 4(1). 28-39. 2012.

ANDERSON S, BANKIER AT, BARREL BG, DE BRUIJN MH, COULSON AR, EPERON IC, NIERLICH DP, ROE BA, SANGER F, SCHREIER PH, SMITH AJ, STADEN R e YOUNG IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**. 290(5806). 457-465. 1981.

ARAL C, AKKIPRIK M, KAYA H, ATAIZI-ÇELIKEL Ç, ÇAGLAYAN S, ÖZISIK G, BALOGLU H e ÖZER A. Mitochondrial DNA common deletion is not associated with thyroid, breast and colorectal tumours in Turkish patients. **Genetics and Molecular Biology**. 33(1). 1-4. 2010.

AYRES M, AYRES MJR, AYRES DL e DOS SANTOS AS. **Biostat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém-PA: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília, 2008. 290 pp.

BAI RK, CHANG J, YEH KT, LOU MA, LU JF, TAN DJ, LIU H e WONG LJC. Mitochondrial DNA Content Varies with Pathological Characteristics of Breast Cancer. **Journal of Oncology**. 2011. Art ID: 496189. 2011.

BANDELT HJ E PARSON W. Consistent treatment of length variants in the human mtDNA control region: a reappraisal International. **Journal of Legal Medicine**. 122(1). 11-21. 2008.

BAREKATI Z, RADPOUR R, KOHLER C, ZHANG B, TONIOLO P, LENNER P, LV Q, ZHENG H e ZHONG XY. Methylation profile of TP53 regulatory pathway and mtDNA

alterations in breast cancer patients lacking tp53 mutations. **Human Molecular Genetics**. 19(15). 2936-2946. 2010.

BERNHEIMER H, LASSMANN H e SUCHANEK G. Dynamics of IgG1, IgA1, and IgM1 Plasma Cells in the Central Nervous System of Guinea Pigs with Chronic Relapsing Experimental Allergic Encephalomyelitis. **Neuropathology and Applied Neurobiology**. 14(2). 157-167. 1988.

BIOEDIT: Biological Sequence alignment for Windows. Disponível em: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>. Acesso em 11 ago 2011.

BODMER S, STROMMER K, FREI K, SIEPL C, DE TRIBOLET N, HEID I e FONTANA A. Immunosuppression and Transforming Growth Factor-Beta in Glioblastoma. Preferential Production of Transforming Growth Factor-Beta 2. **Journal of Immunology**. 143(10). 3222-3229. 1989.

BONIFÁCIO ACS. **Avaliação do número de cópias do DNA mitocondrial como biomarcador no cancro de pulmão**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Portugal. 2011.

BRADY LW, MIYAMOTO C, WOO DV, RACKOVER M, EMRICH J, BENDER H, DADPARVAR S, STEPLEWSKI Z, KOPROWSKI H, BLACK P, LAZZARO B, NAIR S, MCCORMACK T, NIEVES J, MORABITO M e ESHLEMAN J. Malignant Astrocytomas Treated with Iodine-125 Labeled Monoclonal Antibody 425 Against Epidermal Growth Factor Receptor: A Phase II Trial. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**. 22(1). 225-230. 1992.

BRAGOSZEWSKI P, KUPRYJANCZYK J, BARTNIK E, RACHINGER A e OSTROWSKI J. Limited clinical relevance of mitochondrial DNA mutation and gene expression analyses in ovarian cancer. **BMC Cancer** . 8. 292. 2008.

BRANDON M, BALDI P e WALLACE DC. Mitochondrial mutations in cancer. **Oncogene**. 25(34). 4647-4662. 2006.

BRANNAN CA e ROBERTS MR. Resident Microglia from Adult Mice are Refractory to Nitric Oxide-inducing Stimuli due to Impaired NOS2 Gene Expression. **Glia**. 48(2). 120-131. 2004.

BREDEL M. Translating biological insights into clinical endpoints in neuro-oncology. **The Lancet Oncology**. 10(10). 928-929. 2009.

CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2006. **Central Brain Tumor Registry of the United States**. Hinsdale, IL. USA. 2010.

CENGIZ SL e CICEKCIBASI AE In: GARAMI M. **Molecular Targets of CNS Tumors**. InTech. Rijeka, Croatia. 2011. Cap 01, p. 03-18.

CHALLEN C, BROWN H, CAI C, BETTS G, PATERSON I, SLOAN P, WEST C, BIRCH-MACHIN M e ROBINSON M. Mitochondrial DNA mutations in head and neck cancer are infrequent and lack prognostic utility. **British Journal of Cancer**. 104(8). 1319-1324. 2011.

CHANDRA D e SINGH KK. Genetics insights into OXPHOS defect and its role in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1807(6). 620-625. 2011.

CHATTERJEE A, DASGUPTA S e SIDRANSKY D. Mitochondrial Subversion in Cancer. **Cancer Prevention and Research**. 4(5). 638-654. 2011.

CHENG A, HOU Y e MATTSON MP. Mitochondria and neuroplasticity. **ASN Neuro**. 2(5) 243-256. 2010.

CHENG EH, WEI MC, WEILER S, FLAVELL RA, MAK TW, LINDSTEN T, KORSMEYER SJ. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. **Molecular Cell**. 8(3). 705-711. 2001.

CHIN, L. E MEYERSON, M. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**, **455**: 1061-1068. 2008.

CHO KR e FEARON ER. DCC: linking tumor suppressor genes and altered cell surface interactions in cancer. **European Journal of Cancer**. 31(A). 1055-1060. 1995.

COOK WD E MCCAWE BJ. Accommodating haploinsufficient tumor suppressor genes in Knudson's model. **Oncogene**. 19(30). 3434-3438. 2000.

COPELAND WC, WACHSMAN JT, JOHNSON FM e PENTA JS. Mitochondrial DNA alterations in cancer. **Cancer Investigations**. 20. 557-569. 2002.

COULDWELL WT, YONG VW, DORE-DUFFY P, FREEDMAN MS e ANTEL JP. Production of Soluble Autocrine Inhibitory Factors by Human Glioma Cell Lines. **Journal of the Neurological Sciences**. 110(1-2). 178-185. 1992.

CROTEAU DL, STIERUM RH E BOHR VA. Mitochondrial repair pathways. **Mutations Research**. 434. 137-148. 1999.

CULVER KW, RAM Z, WALLBRIDGE S, ISHII H, OLDFIELD EH E BLAESE RM. In Vivo Gene Transfer with Retroviral Vector-Producer Cells for Treatment of Experimental Brain Tumors. **Science**. 256(5063).1550-1552. 1992.

CUSTODIO G, TAQUES, GR, FIGUEIREDO BC, GUGELMIN ES, FIGUEIREDO MMO, WATANABE F, PANTAROLO R, LALLI E e TORRES LFB. Increased incidence of choroid plexus carcinoma due to the germline TP53 R337H mutation in southern Brazil. **Plos One**. 6(3). 1-7. 2011.

CZARNECKA AM, KUKWA W, KRAWCZYK T, SCINSKA A, KUKWA A e CAPELLO F. Mitochondrial DNA mutations in cancer- from bench to bedside. **Frontiers in Bioscience**. 15. 437-460. 2010.

DAS S, RAIZER JJ e MURO K. Immunotherapeutic Treatment Strategies for Primary Brain Tumors. **Current Treatment Options in Oncology**. 9(1). 32-40. 2008.

DIMOV I, TASIC-DIMOV D, CONIC I e STEFANOVIC V. Glioblastoma Multiforme Stem Cells. **The Scientific World Journal**. 11. 930-958. 2011.

DING Z, JI J, CHEN G, FANG H, YAN S, SHEN L, WEI J, YANG K, LU J e BAI Y. Analysis of mitochondrial DNA mutations in D-LOOP region in thyroid lesions. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1800(3). 271-274. 2010.

DOMBRAUCKAS JD, SANTARSIERO BD e MESECAR AD. Structural basis for tumor pyruvate kinase M2 allosteric regulation and catalysis. **Biochemistry**. 44(27). 9417-29. 2005.

EKSTRAND AJ, JAMES CD, CAVENEE WK, SELIGER B, PETTERSSON RF e COLLINS VP. Genes for Epidermal Growth Factor Receptor, Transforming Growth Factor Alpha, and Epidermal Growth Factor and Their Expression in Human Gliomas In Vivo. **Cancer Research**. 51(8). 2164-2172. 1991.

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. Disponível em: <http://anatpat.unicamp.br/taneugliomas> Acesso em: 21 mar 2012.

FAN KJ e PEZESHKPOUR GH. Ethnic distribution of primary central nervous system tumors in Washington, DC, 1971 to 1985. **Journal of National Medicine Association**, **84**: 858-863. 1992.

FENSTERMAKER RA e CIESIELSKI MJ. Immunotherapeutic Strategies for Malignant Glioma. **Cancer Control**. 11(3). 181-191. 2004.

FISCHER U, MÜLLER HW, SATTLER HP, FEIDEN K, ZANG KD e MEESE E. Amplification of the MET Gene in Glioma. **Genes Chromosomes e Cancer**. 12(1). 63-65. 1995.

FLISS MS, USADEL H, CABALLERO OL, WU L, BUTA MR, ELEFF SM, JEN J e SIDRANSKY D. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. **Science**. 287. 2017-2019. 2000.

FLÜGEL A, LABEUR MS, GRASBON-FRODL EM, KREUTZBERG GW e GRAEBER, M.B. Microglia only Weakly Present Glioma Antigen to Cytotoxic T Cells. International. **Journal of Developmental Neuroscience**. 17(5-6). 547-556. 1999.

FREI P, POULSEN AH, JOHANSEN C, OLSEN JH, STEDING-JESSEN M e SCHÜZ J. Use of mobile phones and risk of brain tumours: update of Danish cohort study. **BMJ**. 343. 1-9. 2011.

FRONTAL CORTEX, Inc. Disponível em: <http://frontalcortex.com> Acesso em 19 mar 2012.

FUKUSHIMA T, FAVEREAUX A, HUANG H, SHIMIZU T, YONEKAWA Y, NAKAZATO Y e OHAGKI H. Genetic alterations in primary glioblastomas in Japan. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, **65**(1): 12-18. 2006.

FURNARI FB, FENTON T e BACHOO RM. Malignant Astrocytic Glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes & Development**, **21**: 2683-2710. 2009.

GENEBASE. mtDNA and its role in ancestry. *Genebase Tutorials*. Disponível em: <http://www.genebase.com/learning/article/17> Acesso em 19 abr 2012.

GOCHHAIT S, BHATT A, SHARMA S, SINGH YP, GUPTA P, BAMEZAI RN. Concomitant presence of mutations in mitochondrial genome and p53 in cancer development - a study in north Indian sporadic breast and esophageal cancer patients. **International Journal of Cancer**. 123(11). 2580-2586. 2008.

HANAHAN D e WEINBERG RA. The hallmarks of cancer, **Cell**, **100**(1): 57-70. 2000.

HICKEY WF e KIMURA H. Graft-vs.-Host Disease Elicits Expression of Class I and Class II Histocompatibility Antigens and the Presence of Scattered T Lymphocytes in Rat Central Nervous System. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 84(7). 2082-2086. 1987.

HICKEY WF, HSU BL e KIMURA H. T-lymphocyte Entry into the Central Nervous System. **Journal of Neuroscience Research**. 28(2). 254-260. 1991.

HICKEY WF. Basic Principles of Immunological Surveillance of the Normal Central Nervous System. **Glia**. 36(2). 118-124. 2001.

HODGSON S, FOULKES W, ENG C e MAHER E. **A Practical Guide to Human Cancer Genetics**. Cambridge, UK. Cambridge University Press, 2007. 411pp.

HODGSON SV e MAHER ER. Molecular genetics of cancer: A practical guide to human cancer genetics. **Cambridge University Press**. 14-21. 1998.

HUMPHREY PA, WONG AJ, VOGELSTEIN B, ZALUTSKY MR, FULLER GN, ARCHER GE, FRIEDMAN HS, KWATRA MM, BIGNER SH e BIGNER DD. Anti-Synthetic Peptide Antibody Reacting at the Fusion Junction of Deletion-Mutant Epidermal Growth Factor Receptors in Human Glioblastoma. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America. 87(11). 4207-4211. 1990.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <http://www.iarc.fr/> Acesso em 21 abr 2012.

INCA. Estimativa | 2012 – Incidência de Câncer no Brasil. BVS/MS. Rio de Janeiro-RJ. 2011.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br> Acesso em: 12 mar 2012.

JERONIMO C, NOMOTO S, CABALLERO OL, USADEL H, HENRIQUE R, VARZIM G, OLIVEIRA J, LOPES C, FLISS MS e SIDRANSKY D. Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids. **Oncogene.** 20. 5195-5198. 2001.

JONES JB, SONG JJ, HEMPEN PM, PARMIGIANI G, HRUBAN RH e KERN SE. Detection of mitochondrial DNA mutations in pancreatic cancer offers a "mass"-ive advantage over detection of nuclear DNA mutations. **Cancer Research.** 61(4). 1299-1304. 2001.

JORISSEN R. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling. **Experimental Cell Research.** 284. 31-53. 2003.

KASSEM AM, EL-GUENDY N, TANTAWY M, ABDELHADY H, EL-GHOR A E WAHAB AHA. Mutational Hotspots in the Mitochondrial D-Loop Region of Cancerous and Precancerous Colorectal Lesions in Egyptian Patients. **DNA Cell Biology.** 30(11). 899-906. 2011.

KIRCHES E, KRAUSE G, WARICH-KIRCHES M, WEIS S, SCHNEIDER T, MEYER-PUTTLITZ B, MAWRIN C e DIETZMANN K. High frequency of mitochondrial DNA mutations in glioblastoma multiforme identified by direct sequence comparison to blood samples. **International Journal of Cancer.** 93. 534-538. 2001.

KLEIHUES P, LOUIS DN, SCHEITHAUER BW, RORKE LB, REIFENBERGER G, BURGER PC, CAVENEE WK. The WHO classification of tumors of the nervous

system. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**. 61(3). 215-225. 2002.

KLEMBA A, KOWALEWSKA M, KUKWA W, TONSKA K, SZYBINSKA A, MOSSAKOWSKA M, SCINSKA A, GOLIK P, RADZISZEWSKI J, KUKWA A, CZARNECKA AM e BARTNIK E. Mitochondrial genotype in vulvar carcinoma – cuckoo in the nest. **Journal of Biomedical Science**. 73(17). 1-15. 2010.

KNUDSON AGJR. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences. USA**. 68(4). 820-823. 1971.

KONG QP, BANDELT HJ, SUN C, YAO YG, SALAS A, ACHILLI A, WANG CY, ZHONG L, ZHU CL, WU SF, TORRONI A, ZHANG YP. Updating the East Asian mtDNA phylogeny: a prerequisite for the identification of pathogenic mutations. **Human Molecular Genetics**. 15(13). 2076-2086. 2006.

KRAKOWSKI ML e OWENS T. Naive T Lymphocytes Traffic to Inflamed Central Nervous System, but Require Antigen Recognition for Activation. **European Journal of Immunology**. 60(4). 5731-5739. 2000.

KUNKEL TA e LOEB LA. Fidelity of mammalian DNA polymerasis. **Science**. 213. 765-767. 1981.

LIBERMANN TA, NUSBAUM HR, RAZON N, KRIS R, LAX I, SOREQ H, WHITTLE N, WATERFIELD MD, ULLRICH A e SCHLESSINGER J. Amplification, Enhanced Expression and Possible Rearrangement of EGF Receptor Gene in Primary Human Brain Tumours of Glial Origin. **Nature**. 313(5998). 144-147, 1985.

LIÈVRE A, BLONS H, HOULLIER AM, LACCOURREYE O, BRASNU D, BEAUNE P e LAURENT-PUIG P. Clinicopathological significance of mitochondrial D-Loop mutations in head and neck carcinoma. **British Journal of Cancer**. 94. 692-697. 2006

LIU H e KOHANE IS. Tissue and process specific microRNA-mRNA co-expression in mammalian development and malignancy. **PLoS One**. 4(5). e5436. 2009.

LIU SA, JIANG RS, CHEN FJ, WANG WY e LIN JC. Somatic mutations in the D-loop of mitochondrial DNA in oral squamous cell carcinoma. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**. 2011.

LIU VW, YANG HJ, WANG Y, TSANG PC, CHEUNG AN, CHIU PM, NG TY, WONG LC, NAGLEY P e NGAN HY. High frequency of mitochondrial genome instability in human endometrial carcinomas. **British Journal of Cancer**. 89(4):697-701. 2003.

LOUIS DN, OHGAKI H, WIESTLER OD, CAVENEE WK, BURGER PC, JOUVET A, SCHEITHAUER BW e KLEIHUES P. The WHO Classification of tumours of the Central Nervous System. **Acta Neuropathology**, 114. 97-109. 2007.

LOWE SW, CERPERO E e EVAN G. Intrinsic tumor suppression. **Nature**, **432**: 307-315. 2004.

LU J, SHARMA LK e BAI Y. Implications of mitochondrial DNA mutations and mitochondrial dysfunction in tumorigenesis. **Cell Research**. 19(7). 802-815. 2009.

LUETH M, DEIMLING A, PIETSCH T, WONG LJ, KURTZ A, HENZE G e DRIEVER PH. Medulloblastoma harbor somatic mitochondrial DNA mutations in the D-loop region. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**. 32(2). 156-159. 2010.

MALMER B, GRONBERG H, BERGENHEIM AT, LENNER P e HENRIKSSON R. Familial aggregation of astrocytoma in northern Sweden: an epidemiological cohort study. **International Journal of Cancer**, **81**: 366-370. 1999.

MALMER B, ISELIUS L, HOLMBERG E, COLLINS A, HENRIKSSON R e GRONBERG H. Genetic epidemiology of glioma. **British Journal of Cancer**, **84**: 429-434. 2001.

MALUMBRES M e CARNERO A. Cell cycle desregulation: a common motif in câncer. **Progress in Cell Cycle Research**. 5. 5-18. 2003.

MARIE SKN e SHINJO SMO. Metabolism and brain cancer. **Clinics**. 66(1). 33-43. 2011.

MATSUYAMA W, NAKAGAWA M, WAKIMOTO J, HIROTSU Y, KAWABATA M e OSAME M. Mitochondrial DNA mutation correlates with stage progression and prognosis and non-small cell lung cancer. **Human Mutation**. 21(4). 441-443. 2003.

MAXIMO V, LIMA J, PRAZERES H, SOARES P, e SOBRINHO-SIMOES M. The biology and the genetics of Hürthle cells tumors of the thyroid. **Endocrine-related Cancer**. 354(11). 1-41. 2012.

MAXIMO V, LIMA J, SOARES P e SOBRINHO-SIMOES M. Mitochondria and cancer. **Virchows Archives**. 454(5). 481-495. 2009.

MAXIMO V, LIMA J, SOARES P, BOTELHO T, GOMES L, SOBRINHO-SIMOES M. Mitochondrial D-LOOP instability in thyroid tumours is not a marker of malignancy. **Mitochondrion**. 5. 333-340. 2005.

MÁXIMO V, SOARES P, LIMA P, CAMESELLE-TEIJEIRO J e SIMOES MS. Mitochondrial DNA somatic mutations (point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variantes in human thyroid pathology. **American Journal of Pathology**. 160(5). 1857-1865. 2002.

MÁXIMO V, SOARES P, SERUCA R, ROCHA AS, CASTRO P e SOBRINHO-SIMOES M. Microsatellite instability, mitochondrial DNA large deletions, and mitochondrial DNA mutations in gastric carcinoma. **Genes Chromosomes Cancer**. 32. 136-146. 2001.

MCHENRY LC. **Garrison's History of Neurology**. Springfield: Charles C. Thomas. 1969.

MEIEHOFER D, MAYR JA, FINK K, SCHMELLER N, KOFLER B e SPERL W. Mitochondrial DNA mutations in renal cell carcinomas revealed no generic impact on energy metabolism. **British Journal of Cancer**. 94. 268-274. 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância do Câncer Relacionado do Trabalho e ao Ambiente. INCA. 2ª Edição. 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância do Câncer Relacionado do Trabalho e ao Ambiente. INCA. 1ª Edição. 2006.

MONTANINI L, REGNA-GLADIN C, EOLI M, ALBAROSA R, CARRARA F, ZEVIANI M, BRUZZONE MG, BROGGI G, BOIARDI A e FINOCCHIARO G. Instability of mitochondrial DNA and MRI and clinical correlations in malignant gliomas. **Journal of Neuro-Oncology**. 74. 87-89. 2005.

MOTTA FJN, RODRIGUES PW, ASSUMPCAO PP e HARADA ML. Instabilidade de microssatélites em tumores gástricos na população paraense. In: **Anais do XVI Congresso Brasileiro de Genética**. SBG. Belém. 2004.

MUSHOLT TJ, HANACK J, BREHM C, WASIELEWSKI R, MUSHOLT PB. Searching for non-RET molecular alterations in medullary thyroid carcinoma: expression by mRNA differential display. **World Journal of Surgery**. 29. 472-482. 2005.

NCBI. NCBI Map Viewer. 2011. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>
Acesso em 11 out 2011.

NIETO-SAMPEDRO M, VALLE-ARGOS B, GÓMEZ-NICOLA D, FERNÁNDEZ-MAYORALAS A e NIETO-DÍAZ M. Inhibitors of Glioma that Reveal the Tumor to the Immune System. **Clinical Medicine Insights: Oncology**. 5. 265-314. 2011.

NISHIHARA M, SASAYAMA T, KUDO H e KOHMURA E. Morbidity of stereotactic biopsy for intracranial lesions. **Kobe Journal of Medical Sciences**. 56(4). 148-153. 2010.

NITTA T, HISHII M, SATO K e OKUMURA K. Selective Expression of Interleukin-10 Gene within Glioblastoma Multiforme. **Brain Research**. 649(1-2). 122-128. 1994.

OHGAKI H. Epidemiology of Brain Tumors. **Methods of Molecular Biology, Câncer Epidemiology**. 472: 323-342. 2009.

PANG LJ, SHAO JY, LIANG XM, XIA YF, ZENG YX. Mitochondrial DNA somatic mutations are frequent in nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Biology & Therapy**. 7(2). 198-207. 2008.

PARK CB e LARSSON NG. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. **The Journal of Cell Biology**. 193(5). 809-818. 2011.

PARRELLA P, XIAO Y, FLISS M, SANCHEZ-CESPEDES M, MAZZARELLI P, RINALDI M, NICOL T, GABRIELSON E, CUOMO C, COHEN D, PANDIT S, SPENCER M, RABITTI C, FAZIO VM e SIDRANSKY D. Detection of mitochondrial DNA mutations in primary breast cancer and fine-needle aspirates. **Cancer Research**. 61. 7623–7626. 2001.

PEDERSINI R, VATTEMI E e CLAUDIO PP. (2010). Adenoviral Gene Therapy in High-grade Malignant Glioma. **Drug News & Perspectives**. 23(6). 368-379. 2010.

PINTO LFR e FELZENSWALB I. Genética do câncer in: **Mutagênese Ambiental**. Universidade Luterana do Brasil. 29-48. 2003.

POJO M e COSTA BM. Molecular Hallmarks of Gliomas In: GARAMI M. **Molecular Targets of CNS Tumors**. InTech. Rijeka, Croatia. 2011. Cap 09, p. 177-200.

POLYAK K, LI Y, ZHU H, LENGAUER C, WILLSON JK, MARKOWITZ SD, TRUSH MA, KINZLER KW e VOGELSTEIN B. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. **Nature Genetics**. 20. 291-293. 1998.

PRIMER3PLUS. Primer 3 plus. 2009. Disponível em: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi> Acesso em 14 mar 2010.

RAFFEL C, GILLES FE e WEINBERG KI. Reduction to Homozygosity and Gene Amplification in Central Nervous System Primitive Neuroectodermal Tumors of Childhood. **Cancer Research**. 50(3). 587-591.1990.

REIFENBERGER G, REIFENBERGER J, ICHIMURA K, MELTZER PS e COLLINS VP. Amplification of Multiple Genes from Chromosomal Region 12q13-14 in Human Malignant Gliomas: Preliminary Mapping of the Amplicons Shows Preferential Involvement of CDK4, SAS, and MDM2. **Cancer Research**. 54(16). 4299-4303, 1994.

ROSZMAN TL, BROOKS WH, STEELE C e ELLIOTT LH. Pokeweed Mitogen-Induced Immunoglobulin Secretion by Peripheral Blood Lymphocytes from Patients with Primary Intracranial Tumors. Characterization of T Helper and B Cell Function. **Journal of Immunology**. 134(3). 1545-1550. 1985.

ROTHFUSS O, GASSER T e PATENGE N. Analysis of differential DNA damage in the mitochondrial genome employing a semi-long run real-time PCR approach. **Nucleic Acids Research**. 38(4). 1-10. 2010.

RUBIO-PEREZ JM e MORILLA-RUIZ M. A Review: Inflammatory process in Alzheimer's Disease, role of cytokines. **The Scientific World Journal**. Article ID: 756357. 2012.

RUIZ-PESINI E, DIEZ-SANCHEZ C, LOPEZ-PEREZ MJ e ENRIQUEZ JA. The role of the mitochondrion in sperm function; is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? **Current Topics in Developmental Biology**. 77. 3-19. 2007.

SAMBROOK J, FRITCSH EF e MANIATIS T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2. ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 3v. 3104p.

SANDBERG-WOLLHEIM M, ZWEIMAN B, LEVINSON AI e LISAK RP. Humoral Immune Responses within the Human Central Nervous System Following Systemic Immunization. **Journal of Neuroimmunology**. 11(3). 205-214. 1986.

SANGER F, NICKLEN S e COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, **Biotechnology**. 24: 104-108. 1992.

SANGER F, NICKLEN S e COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, **Biotechnology**. 24: 104-108. 1977.

SANGER F. The Sanger Institute. 2009. Disponível em: <http://www.sanger.ac.uk/>
Acesso em: 20 out 2010.

SANTOS R, FRIGERI L, ORDOVÁS C, FRIGERI M, BERTUOL I, GUIMARÃES CVA e MENDONÇA CMF. Epidemiologia dos tumores do sistema nervoso central. **Revista Científica AMECS**, 10: 24-32. 2001.

SASTRE-PERONA A e SANTISTEBAN P. Role of the wnt pathway in thyroid cancer. **Frontiers in Endocrinology**. 3(31). 1-10. 2012.

SCHMIDT M, GRUENFELDER, P, ROLLER J e HAGEN R. Suicide Gene Therapy in Head and Neck Carcinoma Cells: An in Vitro Study. **International Journal of Molecular Medicine**. 27(4). 591-597. 2011.

SHARMA H, SINGH A, SHARMA C, JAIN SK e SINGH N. Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region are frequent in cervical cancer. **Cancer Cell International**. 34(5). 1-6. 2005.

SIES H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology & Medicine**. 9. 916-921. 1999.

SINGH SK, CLARKE ID, TERASAKI, M, BONN VE, HAWKINS C, SQUIRE, J E DIRKS PB. Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. **Cancer Research**. 63(18). 5821-5828, 2003.

SMITH CUM. **Elements of Molecular Neurobiology**. Wiley. England. 2002.

TAIT SWG e GREEN DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 11. 621-632. 2010.

TAMURA G. Genetic and epigenetic alterations of tumor suppressor and tumor related genes in gastric cancer. **Histology and Histopathology**. 17. 323-329. 2002.

TAN DJ, CHANG J, LIU LL, BAI RK, WANG YF, YEH KT e WONG LJC. Significance of somatic mutations and content alteration of mitochondrial DNA in esophageal cancer. **BioMed Central Cancer**. 93(6). 1-11. 2006.

TONG BT, HA PK, DHIR K, XING M, WESTRA W, SIDRANSKY D e CALIFANO JA. Mitochondrial DNA alterations in thyroid cancer. **Journal of Surgical Oncology**. 82. 170-173. 2003.

TSENG LM, YIN PH, CHI CW, HSU CY, WU CH, LEE LM, WEI YH e LEE HC. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in breast cancer. **Genes, Chromosomes & Cancer**. 45(7). 629-638. 2006.

UNIVERSITY OF MARYLAND, Baltimore. 2009. Disponível em: www.umaryland.edu
Acesso em: 20 jun 2011.

VANDER HEIDEN MG, CANTLEY LC e THOMPSON CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**. 324(5930). 1029-1033. 2009.

VEGA A, SALAS A, GAMBORINO E, SOBRIDO MJ, MACAULAY V e CARRACEDO A. mtDNA mutations in tumors of the central nervous system reflect the neutral evolution of mtDNA in populations. **Oncogene**. 23. 1314-1320. 2004.

VERKHRATSKY A e BUTT A. **Glial Neurobiology: a text book**. Wiley. Cap. 10, p. 167-194. England. 2007.

WALLACE DC e MURDOCK DG. Mitochondria and dystonia: The movement disorder connection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. 96(5). 1817-1819. 1999.

WANG CY, LI H, HAO X, LIU J, WANG JX, WANG WZ, KONG QP e ZHANG YP. Uncovering the profile of somatic mtDNA mutations in Chinese colorectal cancer patients. **PLoS One**. 6(6). e21613. 2011.

WANG Z, CHATTERJEE D, JEON HY, AKERMAN M, VANDER HEIDEN MG, CANTLEY LC, KRAINER AR. Exon-centric regulation of pyruvate kinase M alternative splicing via mutually exclusive exons. **Journal of Cellular and Molecular Biology**. 4(2). 79-87. 2012.

WARBURG O. On the origin of cancer cells. **Science**. 123(3191). 309-314. 1956.

WARBURG O. **The Metabolism of Tumors**. R.R. Smith. New York. 1931.

WCR: World Cancer Report 2008. International Agency for Research on Cancer. **World Health Organization**. Lyon. 260p 2008.

WHEELHOUSE NM, LAI PBS, WIGMORE SJ, ROSS JA e HARRISON DJ. Mitochondrial D-loop mutations and deletion profiles of cancerous and noncancerous liver tissue in hepatitis B virus-infected liver. **British Journal of Cancer**. 92. 1268-1272. 2005.

WONG AJ, BIGNER SH, BIGNER DD, KINZLER KW, HAMILTON SR E VOGELSTEIN B. Increased Expression of the Epidermal Growth Factor Receptor

Gene in Malignant Gliomas is Invariably Associated with Gene Amplification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 84(19). 6899-6903. 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. USA. 2009. Disponível em: <http://www.who.int/en/> Acesso em: 13 abr 2012.

XIAOCHONG W, NORTHCOTT PA, CROUL S e TAYLOR MD. Mouse models of medulloblastoma. **Chinese Journal of Cancer**. 30(7). 442-449. 2011.

YACOUBI-LOUESLATI B, TROUDI W, BACCAR A, CHERNI L, RHOMDHANE KB, ELGAAIED AB. Polymorphism of the mitochondrial microsatellite 303-315 in breast cancer in Tunisia. **Bulletin du Cancer**. 96(3). 337-342. 2009.

YAKES MF e VAN-HOUTEN B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA. 94. 514-519. 1997.

YOFFEY JM e COURTICE FC. **Lymphatics, Lymph and the Lymphomyeloid Complex**. London, New York: Academic Press, 1970.

ZHANG C e YU D. Microenvironment determinantes of brain metastasis. **Cell & Bioscience**. 1-8. 2011.

ZHAO YB, YANG HY, ZHANG XW e CHEN GY. Mutation in D-loop region of mitochondrial DNA in gastric cancer and its significance. **Genes Chromosomes & Cancer**. 44. 19-28. 2005.

ZHENG T, CANTOR KF, ZHANG Y, KEIM S e LYNCH CF. Occupational risk factors for brain câncer: a population-based case-control study in Iowa. **Journal of Occupational and Environment Medicine**, 43: 317-324. 2001.

ZHOU S, KACCHAP S, e SINGH KK. Mitochondrial impairment in p53-deficient human cancer cells. **Mutagenesis**. 18(3). 287-292. 2003.

ZURAWEL RH, CHIAPPA SA, ALLEN C e RAFFEL C. Sporadic Medulloblastomas Contain Oncogenic Beta-Catenin Mutations. **Cancer Research**. 58(5). 896-899. 1998.

ANEXO I



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA UFPA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A Universidade Federal do Pará, em colaboração com o Hospital Ofir Loyola, está desenvolvendo uma pesquisa que permitirá conhecer melhor os mecanismos que ocasionam o desenvolvimento de tumores do sistema nervoso, através da identificação das alterações genéticas associadas ao quadro clínico do paciente e exame histopatológico. Estes estudos são realizados em pequenos fragmentos de tecido neoplásico removido por cirurgia e trará novas informações sobre aspectos genéticos relacionados a este quadro clínico.

Você está sendo admitido (a) neste Hospital, para estabelecimento de diagnóstico e/ou tratamento de algum tumor de sistema nervoso e há a necessidade da remoção de material biológico relacionado à esta enfermidade. Parte do material retirado será encaminhada para exames laboratoriais, necessários para o diagnóstico definitivo. O restante do material não utilizado é armazenado para novos exames, se necessário.

A obtenção do fragmento de tecido tumoral para pesquisa não implicará em riscos adicionais no seu tratamento ou na sua cirurgia, nem em aumento no tempo do exame ou cirurgia. O fragmento de material biológico será identificado no laboratório por um código formado por números e letras, preservando sua privacidade e identidade. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a garantir o anonimato do paciente.

É necessário esclarecê-lo (a) que não existem benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no seu atendimento ou tratamento.

Caso você tenha alguma dúvida sobre este documento ou em relação a pesquisa, por gentileza, entre em contato com o **Prof. Dr. Nilson Praia Anselmo** ou com o **Prof. Dr. Edivaldo H.C. de Oliveira**, através do telefone 3201-1585.

Uma cópia deste documento será arquivada em seu prontuário e, se desejar, uma cópia lhe será fornecida.

Declaro estar ciente das informações prestadas, tendo lido atentamente e concordado com o teor, e autorizo a utilização de amostras de tecido retiradas de meu organismo.

Belém, de de

Assinatura do Paciente ou Responsável

Nome:

RG:

ANEXO II

Estadiamento Tumoral TMN. **Fonte:** WCR, (2008).

T = tumor primário

Tx	Tumor primário, não pode ser avaliado
T0	Sem evidencia de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor invade submucosa
T2	Tumor invade a muscular própria
T3	Tumor invade através da muscular própria até a subserosa ou até tecidos pericólicos não-peritonializados ou perirretais
T4	Tumor penetra diretamente outros órgãos ou estruturas e/ou perfura peritônio visceral

N = linfonodos regionais

Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Sem metástases para linfonodos regionais
N1	Metástase em 1 a 3 linfonodos regionais
N2	Metástase em 4 ou mais linfonodos regionais

M = metástases distantes

Mx	Metástases distantes não puderam ser avaliadas
M0	Sem metástases distantes
M1	Metástases distantes
