



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

CARLOS ANTONIO DA COSTA JUNIOR

AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE GENÔMICA MITOCONDRIAL EM
GLIOMAS DE ALTO E BAIXO GRAU NA POPULAÇÃO PARAENSE

BELÉM
2016

CARLOS ANTONIO DA COSTA JUNIOR

**AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE GENÔMICA MITOCONDRIAL EM
GLIOMAS DE ALTO E BAIXO GRAU NA POPULAÇÃO PARAENSE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos para qualificação no Curso de Doutorado.

Orientadora: Profa. Dra. Bárbara do Nascimento Borges

**BELÉM
2016**

Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Costa Junior, Carlos Antonio da

Avaliação da integridade genômica mitocondrial em gliomas de alto e baixo grau na população paraense / Carlos Antonio da Costa Junior ; Orientadora, Bárbara do Nascimento Borges. - 2016.

121 f. : il.

Inclui bibliografia

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2016.

1. Gliomas – Pará. 2. DNA mitocondrial . 3. Sistema nervoso central - câncer. I. Borges, Bárbara do Nascimento, orientadora. II. Título.

CDD – 22 ed. 616.9948098115

CARLOS ANTONIO DA COSTA JUNIOR

**AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE GENOMICA MITÔCONDRIAL EM
GLIOMAS DE ALTO E BAIXO GRAU NA POPULAÇÃO PARAENSE**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos para qualificação no Curso de Doutorado.

Belém (PA), 14 de dezembro de 2016.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Bárbara do Nascimento Borges
(UFPA)
(Orientador)

Prof. Dr. Carlos Eduardo Matos C Bastos
(UFPA)

Profa. Dra. Danielle Queiroz Calcagno
(UFPA)

Prof. Dr. Rommel Rodriguez Burbano
(UFPA)

**BELÉM
2016**

DEDICATÓRIA

Ao meu pai-avô, Raimundo Ferreira da Veiga (*in memoriam*), que, através de seu jeito simples, humilde e coração enorme, nos ensinou o valor do amor ao próximo

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos deste trabalho não seguem uma ordem de importância, nem uma ordem cronológica, muito menos ordem de afinidade. Simplesmente, a gratidão se traduz na possibilidade da transformação de um sonho em realidade na qual estas pessoas, de modo direto ou indireto, me impuseram e felizmente me obrigaram (e acima de tudo, ajudaram) a realizar.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Bárbara Borges, presente de verdade desde os meus passos iniciais no laboratório, ensinando, guiando, ajudando e, principalmente, dando exemplo de dedicação e amor à ciência. Mas, acima de tudo, levarei uma amizade para o resto da vida! Nossa querida Babita!

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular, sempre nos ajudando, mesmo nos momentos de dificuldades técnicas (e financeiras), a união falou mais alto e soubemos funcionar como um grupo (nem sempre) unido e (verdadeiramente) solidário. Aos amigos Wallax, Danilo, Chico, Mariana, Thamirys, Raissa, Symara e Igor. Em especial à professora Maria Lúcia Harada, que iniciou nossos caminhos muito antes de decidirmos o que queríamos ser quando crescêssemos.

Ao meu mestre e amigo, professor Nilson Praia Anselmo (in memoriam), cuja (enorme) paciência e dedicação fizeram milagre por mim e por muitos alunos. Além de exemplo profissional, sempre o terei como exemplo de ser humano.

À minha esposa, Alethea Barreto, minha companheira de todas as horas (literalmente), me ensinando uma das lições mais importantes durante todos esses anos: sempre manter os pés no chão. Sendo minha fortaleza, minha família. Ao nosso filho Bruce, que, mesmo após aqueles dias extenuantes, é capaz de renovar nossas energias com sua alegria e amor.

À minha família, pelo amor, apoio e cobrança, necessários para todo ser humano. Aos meus amigos que, apesar da ausência, estão sempre do nosso lado. Em especial aos amigos Mariana e Allan. E ao meu amigo Igor Francês.

À UFPA, ao PNBC, ao CNPQ, pela estrutura e apoio para realização deste e de muitos outros trabalhos.

E por último, a Deus, que, mesmo diante das maiores dificuldades, nos momentos de desânimo e desesperança, sempre nos mostra uma luz e nos motiva a seguir adiante.

*There's a starman waiting in the sky
He'd like to come and meet us
But he thinks he'd blow our minds*

David Bowie

RESUMO

O câncer se caracteriza pela a rápida proliferação de células anormais que crescem além dos seus limites habituais, podendo invadir partes adjacentes ou à distância. O câncer do SNC representa 2% de todas as neoplasias no mundo, sendo ligeiramente mais alta em homens que em mulheres. As mitocôndrias, responsáveis pela produção da maior parte do ATP celular através da oxidação fosforilativa (OXPHOS), pode também atuar através da glicólise com a mesma finalidade, não necessitando exclusivamente de oxigênio. Esta opção é característica das células cancerosas, conhecida como efeito Warburg. Uma hipótese para explicar essa alteração metabólica pode estar relacionada aos defeitos no DNA mitocondrial (mtDNA) causados pela OXPHOS, onde essas mutações podem induzir as células cancerosas à glicólise. Foram analisadas oito regiões do mtDNA (*D-LOOP*, *ND1*, *ND3*, *CO I*, *CO II*, *CO III*, *ATPase 6* e *ATPase 8*) em tecidos neoplásicos de pacientes acometidos por câncer de células da glia na população paraense, relacionando os dados obtidos com as características clínicas e patológicas dos pacientes. Dentre as alterações encontradas, as do complexo I parecer ser determinantes para a progressão dos tumores de alto grau, assim como, as alterações *indel* parecem comprometer estruturas importantes para a OXPHOS. As deleções 4977 pb, quando associadas a outras alterações no *ND1/ND3* ou a heteroplasmias, sugerem mau prognóstico, porém, parecem ter uma redução no risco quando as alterações nos *ND1* e *ND3* são simultâneas.

Palavras-chave: glioma; mtDNA; deleção 4977 pb; *ND1*; *ND3*; GBM;

ABSTRACT

Cancer is characterized by fast abnormal cells proliferation which grow beyond their normal limits and may invade adjacent or distant tissue. Cancer CNS represents 2% of all cancers in the world, being slightly higher in men than in women. Mitochondria are responsible for producing most of the cellular ATP by oxidative phosphorylation (OXPHOS), may also act through glycolysis for same purpose, not requiring only oxygen. This option is a particular cancer cell property, also known as the Warburg effect. One hypothesis to explain this metabolic change may be related to mitochondrial DNA (mtDNA) defects caused by OXPHOS where these mutations can lead cancer cells to glycolysis. Eight mtDNA regions (D-LOOP, ND1, ND3, CO I, CO II CO III, ATPase 6 and ATPase 8) were analyzed in patients' neoplastic tissues with glial cell cancer in Pará population, relating the data with the pathological and clinical characteristics of the patients. Among the changes found, the complex I seem to be decisive for the progression of high-grade tumors, as well as changes indel seem compromising important structures for OXPHOS. Deletions 4977 bp, when combined with other changes in ND1 / ND3 or heteroplasmias suggest poor prognosis, however, seem to have a reduced risk when changes in ND1 and ND3 are simultaneous.

Keywords: glioma; mtDNA; 4977 pb deletions; *ND1*; *ND3*; GBM.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. CÂNCER DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	18
1.2. GLIOMAS	20
1.3. MITOCONDRIA: GENOMA E ATIVIDADE	28
1.3.1. REGIÃO CONTROLE.....	31
1.3.2. CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL	35
1.3.2a. COMPLEXO I MITOCONDRIAL.....	36
1.3.2b. COMPLEXO II MITOCONDRIAL.....	36
1.3.2c. COMPLEXO III MITOCONDRIAL.....	37
1.3.2d. COMPLEXO IV MITOCONDRIAL	37
1.3.2e. COMPLEXO V MITOCONDRIAL.....	38
1.4. O PAPEL DA MITOCÔNDRIA NA PATOGÊNESE TUMORAL.....	38
1.4.1. GRANDES DELEÇÕES DE 4977 PB.....	41
2. OBJETIVOS	44
2.1. OBJETIVO GERAL	44
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
3. MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1. AMOSTRAS	45
3.2. EXTRAÇÃO DE DNA	47
3.3. REAÇÃO DA CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	47
3.4. SEQUENCIAMENTO DO DNA	48
3.5. ANÁLISES DOS DADOS	50
3.5.1. ANÁLISES ESTRUTURAIS.....	50
3.5.2. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	50
4. RESULTADOS	52
4.1. <i>D-LOOP</i>	54
4.2. <i>ND1</i>	60
4.3. <i>ND3</i>	64
4.4. <i>ND5</i>	65
4.5. <i>CO I</i>	65
4.6. <i>CO II</i>	68
4.7. <i>CO III</i>	70
4.8. <i>ATP6</i>	71
4.9. <i>ATP8</i>	72

4.10. DELEÇÃO 4977 PB.....	72
4.11. ALTERAÇÕES NO TRNA-LISINA.....	75
5. DISCUSSÃO	77
5.1. D-LOOP.....	78
5.2. COMPLEXO MITOCONDRIAL I.....	82
5.3. COMPLEXO MITOCONDRIAL IV	89
5.4. COMPLEXO MITOCONDRIAL V	93
5.5. ALTERAÇÕES NO TRNA-LIS.....	94
5.6. DELEÇÃO 4977 PB + MUTAÇÃO ND1/ND3	95
6. CONCLUSÃO	98
7. REFERÊNCIAS.....	99

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Processo de carcinogênese. **Fonte:** Adaptado de Liu et al., (2015)..... 15
- Figura 2:** Estimativa de neoplasias malignas para 2016 no Estado do Pará. **Fonte:** INCA (2016). 16
- Figura 3:** Vias (hipotéticas) da gliomagênese com base nos dados do TCGA e a formação dos subtipos de GBM: mesenquimal, clássico, proneural e GBM-O (GBM com componente Oligodendroglioma). GBM, glioblastoma; IDH, isocitradodesidrogenase; TCGA, The Cancer Genome Atlas. **Fonte:** adaptado de Vigneswaran; Neill; Hadjipanayis (2015)..... 27
- Figura 4:** Ilustração da via glicolítica na célula normal e na célula cancerosa. **Fonte:** adaptado de Conley, (2014)..... 28
- Figura 3** Representação do mtDNA humano. A molécula de cadeia dupla circular de ~16,5 kb contém uma única região não codificante, a região da *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. **Fonte:** Adaptado de Yusoff (2015)..... 29
- Figura 6:** 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 Kelly e Scarpulla (2004) 32
- Figura 7:** Mecanismo mitocondrial de apoptose e seus indutores potenciais através das vias intrínseca e extrínseca. **Fonte:** adaptado de Favalaro et al (2012)..... 33
- Figura 8:** Cadeia respiratória mitocondrial comporta por 5 complexos. **Fonte:** adaptado de Morris (2013). 35
- Figura 9:** Cadeia respiratória mitocondrial com os 5 complexos, representando esquematicamente o processo de transporte de elétrons e as subunidades de cada complexo transcritas pelo mtDNA e nDNA. **Fonte:** adaptado de Schon; DiMauro; Hirano, 2012..... 40
- Figura 10:** Ilustração da deleção de 4977 pb e o processo de recombinação que ocorre pós deleção juntando os nucleotídeos flanqueadores mais próximos. **Fonte:** adaptado de Chen et al., 2011 42
- Figura 11:** *Bloxplot* ilustrando as faixas etárias das amostras utilizadas neste estudo, divididas por gênero 52
- Figura 12:** *Bloxplot* ilustrando o grau de estadiamento tumoral distribuído de acordo com o gênero dos pacientes. Mediana masculina de grau 3, equivalente ao quartil superior das amostras do gênero feminino. 53

Figura 13: <i>Bloxplot</i> ilustrando o grau de estadiamento tumoral distribuído de acordo com o gênero dos pacientes	54
Figura 14: Cromatograma da região do microssatélite 303-315 ilustrando os alelos (a) selvagem, (b) D310 e (c) 5CT4C.....	55
Figura 15: Cromatogramas do sítio 16189 ilustrando os alelos (a) selvagem e (b) mutante, após evento de transição T→C e a inserção de duas citosinas no referido sítio.....	56
Figura 16: Cromatogramas do sítio 16519 ilustrando os alelos (a) selvagem e (b) mutante do polimorfismo T/C no referido sítio.....	57
Figura 17: <i>Bloxplot</i> ilustrando a diferença entre o grupo com a alteração T16519C e os alelos mutante (C) e selvagem (T) em comparação aos seus respectivos graus de estadiamento tumoral através do teste de MW	58
Figura 18: <i>Bloxplot</i> ilustrando a diferença entre o grupo com a alteração T16519C. Alelo mutante (C) e selvagem (T) comparando as idades entre os dois grupos através do teste de MW	58
Figura 19: Cromatograma ilustrando a transição A3547G e a transversão T3552A e os alelos (a) selvagem e (b) mutante	60
Figura 20: <i>Bloxplot</i> comparando a transição A3547G no alelo mutante (G) e o selvagem (A) em relação ao grau de estadiamento das amostras.....	61
Figura 21: Cromatogramas ilustrando a transição G3880A comparando os alelos (a) selvagem, (b) mutante; e a (c) inserção ins3883A em destaque.....	61
Figura 22: Estruturas 3D comparando o complexo I mitocondrial (a) normal e (b) após a ins3883A. Atenção para os tamanhos das duas proteínas, e seus respectivos índices de solvatação e torção. Fonte: obtida através do Swiss-Model (BIASINI et al., 2014)	62
Figura 23: Cromatogramas ilustrando amostra com alelo selvagem (a) e mutante (b) após as alterações G10398A e T10400C na mesma amostra	64
Figura 24: Cromatogramas comparando os alelos (a) mutante e (b) selvagem em relação à transição C13506T	65
Figura 25: (a) Imagem do <i>NCBI Blast Nucleotide</i> ilustrando o pareamento da sequência inserida no <i>Genbank</i> ; (b) cromatograma normal e (c) com seta apontando o início do segmento reverso duplicado no novo rearranjo encontrado no mtDNA...66	66
Figura 26: Cromatogramas ilustrando a alteração del7181C em relação aos alelos (a) selvagem e (b) mutante, com destaque para a citosina deletada (círculo)	64
Figura 27: <i>Bloxplot</i> comparando as medianas etárias em relação às amostras com a Deleção7181C e o alelo selvagem (MW p-u 0,0134 / p-b 0,0267)	64

- Figura 28:** Cromatogramas ilustrando amostra com alelo (a) selvagem e (b) mutante em relação à alteração del8244A, com destaque para a adenina no alelo selvagem que sofre a excisão69
- Figura 29:** Comparação entre a (a) região da deleção DEL8271-79; (b) cromatogramas ilustrando o alelo selvagem e (c) após a deleção DEL8271-79 (- / ACCCCC).....69
- Figura 30:** Cromatogramas comparando os alelos (a) selvagem, (b) mutante C e (c) mutante G em relação à alteração T9540C/G, com destaque para o nucleotídeo alterado (T) e os alelos resultantes de transição (C) e transversão (G)70
- Figura 31:** *Bloxplot* comparando as amostras alteradas 9540C/G e o alelo selvagem 9540T em relação ao grau tumoral de ambos os grupos (MW 0,05)71
- Figura 32:** Cromatograma ilustrando a heteroplasmia HP9043C/G no gene da ATPase 6 das amostras tumorais estudadas.....71
- Figura 33:** Gel de agarose a 2% comparando os fragmentos amplificados de *ND1*, *ND3* e o fragmento com a região em que ocorre a deleção 4977pb. Os fragmentos de *ND1* e *ND3* apresentam padrão homogêneo enquanto o da região da deleção 4977pb mostra-se heterogêneo, especialmente o poço 11, sem a deleção. (1) *ladder*; (2-5) *ND1*; (6-9) *ND3*; (10, 12 e 14) amostras com a deleção e (11) sem a deleção.....73
- Figura 34:** Ilustração obtida após inserir sequência no *NCBI Blast*. Detalhe para a área de deleção abrangendo vários genes mitocondriais e codificantes de RNA transportadores74
- Figura 35:** Cromatogramas ilustrando a sequência sem a deleção 4977pb e (b) com a deleção, onde ocorre a junção dos nucleotídeos 8482 com o 13460 (seta)74
- Figura 36:** *Bloxplot* comparando o grau de estadiamento tumoral entre os grupos com a deleção 4977 e selvagem, relacionando-os com o número de heteroplasmias ocorridas em ambos os grupos. O grupo de amostras heteroplásmicas com a deleção demonstrou predomínio de maior grau tumoral em relação ao grupo sem a deleção75
- Figura 37:** Esquema ilustrando a via pentose-fosfato (PPP), gerando NADPH e fosfatos. As hexoquinases mitocondriais (HK1 e HK2) fosforilam glicose em glicose-6-fosfato (G6P) utilizando preferencialmente ATP derivada da fosforilação oxidativa (OXPHOS) que ocorre na mitocôndria. Fonte: adaptado de Hay (2016)86
- Figura 38:** Rearranjo de 515pb no mtDNA após dupla deleção. **Fonte:** Adaptado de Dimberg et al. (2014).....91
- Figura 39:** Correlação entre a deleção 4977pb e as alterações encontradas nos genes *ND1* e *ND3* ilustrando as condições de coexistência e possível valor prognóstico...97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativas para o ano de 2016 de novos casos de câncer. Fonte: INCA (2016).....	18
Tabela 2: Tumores SNC e suas graduações de acordo com a OMS. Fonte: adaptado de Louis et al (2016).....	20
Tabela 3: Classificação dos astrocitomas e estimativa de sobrevida. Fonte: adaptado de WCR (2008)	22
Tabela 4: Amostras de CSN de origem glial utilizadas neste estudo.....	46
Tabela 5: Iniciadores utilizados nas PCRs deste trabalho.	48
Tabela 6: Iniciadores utilizados nas reações de sequenciamento.	49
Tabela 7: Distribuição etária das amostras de acordo com o grau tumoral	53
Tabela 8: Alterações nucleotídicas encontradas em cada amostra	55
Tabela 9: Mutações heteroplásmicas observadas na D-LOOP	59
Tabela 10: Frequência das alterações encontradas com base no tipo histológico ...	63
Tabela 11: Análise de Variância das alterações encontradas	76
Anexo I: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	120

1. INTRODUÇÃO

O interesse na doença neoplásica maligna tem crescido consideravelmente em razão do controle progressivo das doenças infecciosas, resultante de medidas sanitárias como vacinação e terapias antibióticas (IARC, 2016).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), câncer é o nome dado a um conjunto de doenças relacionadas, ou seja, que compartilham características típicas (NCI, 2016). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), são doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas (INCA, 2016).

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 (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Os fatores causais podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar e/ou promover o processo carcinogênico (HODGSON; FOULKES; MAHER, 2007). 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, 2016). 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, 2016).

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 tecido e se espalhar para outros órgãos. Este processo é referido como metástase, sendo estas a principal causa de morte por câncer (WHO, 2016).

Segundo o INCA (2016), o processo de carcinogênese, geralmente, ocorre de modo lento e progressivo, podendo levar de alguns meses a vários anos para que uma célula cancerosa prolifere e dê origem a um tumor visível. Esse processo (figura 1) passa por vários estágios antes de chegar ao tumor (Liu *et al.*, 2015). São eles:

- **Estágio de iniciação:** é o primeiro estágio da carcinogênese. Neste processo irreversível, as células sofrem o efeito dos agentes cancerígenos ou carcinógenos (agentes iniciadores) que provocam modificações em alguns de seus genes. Nesta fase as células se encontram, geneticamente alteradas, porém ainda não é possível se detectar um tumor clinicamente. Existe uma correlação linear entre a dose do agente iniciador e a quantidade de células tumorais formadas, ou seja, quanto maior a exposição, maior o risco de carcinogênese.

- **Estágio de promoção:** é o segundo estágio da carcinogênese. Nele, as células geneticamente alteradas, ou seja, "iniciadas", sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores, que são compostos que promovem a expansão clonal das células previamente iniciadas. A célula iniciada é transformada em maligna, de forma lenta e gradual devido a um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor. A suspensão do contato com agentes promotores muitas vezes interrompe o processo nesse estágio.

- **Estágio de progressão:** é o terceiro e último estágio e se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas, havendo uma série de transformações que levam um tumor benigno a formar um maligno. Este estágio é associado com alterações cariotípicas e com mudanças na taxa de crescimento celular, aumento no grau de invasão tumoral e metástase além de alterações na bioquímica e na morfologia celular.

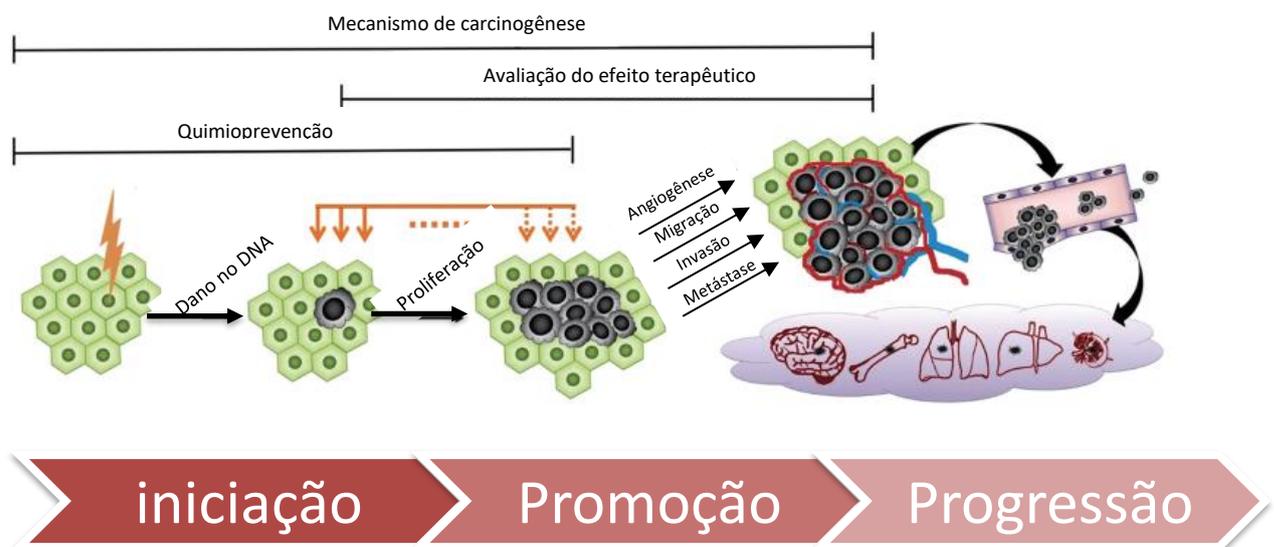


Figura 1: Processo de carcinogênese. **Fonte:** Adaptado de Liu et al., (2015).

Os fatores que promovem a iniciação ou progressão da carcinogênese são chamados agentes oncoaceleradores ou carcinógenos (WCR, 2008; SASTRE-PERONA; SANTISTEBAN, 2012).

Segundo o INCA, no Brasil, a estimativa de neoplasias malignas (exceto pele não melanoma) para o ano de 2016 é de 596.000 casos, sendo 295.200 homens e 300.870 mulheres. As taxas brutas por 100 mil habitantes são de 81,66 homens e 91,98 mulheres. No Pará, a estimativa é de 4.700 novos casos em homens, e 4.500 em mulheres, o que confere uma taxa bruta de 115,66 e 112,58 para cada 100 mil habitantes, respectivamente (Figura 2).

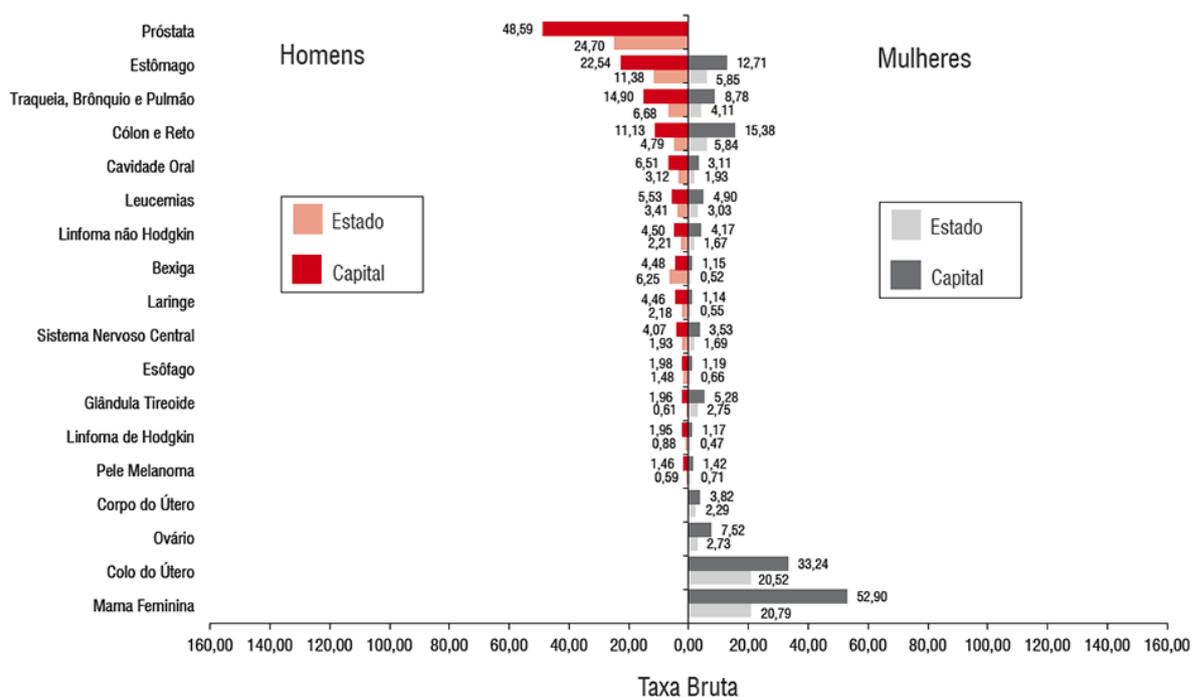


Figura 2: Estimativa de neoplasias malignas para 2016 no Estado do Pará. **Fonte:** INCA, 2016.

Um dos mecanismos envolvidos na carcinogênese que é extensivamente estudado é a metilação do 5º carbono do nucleotídeo citosina. Esse processo dá origem à 5-metilcitosina (5mc) através da adição de um grupo metil (CH₃) nesse átomo. O grupo metil da 5mc está localizado no sulco principal da dupla hélice e pode interferir na ligação dos fatores de transcrição impedindo, deste modo, a transcrição

do gene. Além disso, existe uma classe de proteínas ligantes de DNA metilado (MECP2) e a família de proteínas MBD que se ligam às citosinas metiladas e, também, reprimem a transcrição através do bloqueio dos fatores de transcrição (VIRANI et al., 2012). Trata-se de um mecanismo fisiológico que garante a “identidade funcional” de cada célula (BIRD, 2002). No câncer, a metilação está gravemente desregulada, com padrões aberrantes que pode ir desde a hipometilação de oncogenes até a hipermetilação de genes supressores de tumor (JOHNSTONE, 2002; OBERDOERFFER; SINCLAIR, 2007; VIRANI et al., 2012; ZHANG; COOPER; BROCKDORFF, 2016).

Apesar do genoma estar globalmente hipometilado no câncer, algumas regiões estão hipermetiladas. O mecanismo através do qual este fenômeno se dá pela superexpressão da família de enzimas da DNA-metiltransferase (DNMT), a qual age como doador de metil à citosina. Apesar de cinco membros da família da DNMT terem sido descritos, somente a *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b* parecem contribuir para os padrões de metilação de citosina (KULIS; ESTELLER, 2010). As histonas também desempenham um importante papel na regulação da transcrição remodelando a cromatina, visando expor ou ocultar as regiões promotoras dos genes. A metilação ocorre nos resíduos de arginina e lisina, precisamente nas caudas da proteínas H3 e H4. A proteína-chave envolvida no controle de células-tronco é a EZH2 (*enhancer of Zeste 2*), uma K-metiltransferase que catalisa a trimetilação da H3K27 resultando na H3K27me3. O “marcador” H3K27me3 está normalmente envolvido no silenciamento de genes relacionados ao desenvolvimento e diferenciação de células-tronco (ALDIRI; VETTER, 2012; SNOWDEN et al., 2002). Ao contrário de metilação, a acetilação da histona está fortemente associada com a ativação transcricional. Essas alterações dinâmicas no estado da cromatina são controladas pela histona acetiltransferase (HAT) e histona desacetilase (HDAC), onde a HAT catalisa a adição do grupo acetil na lisina da histona através da acetil coenzima A como cofator e induz uma abertura ou estado permissivo na cromatina. As HDAC, por sua vez, removem esse grupo acetil e induz a cromatina ao fechamento ou estado repressivo (ROTH et al., 2001; VIRANI et al., 2012; ZHANG; COOPER; BROCKDORFF, 2016).

1.1. CÂNCER DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O câncer do sistema nervoso central (SNC) representa, na população mundial, aproximadamente, 2% de todas as neoplasias malignas, sendo o 14º mais frequente nos homens, com risco estimado de 3,9/100 mil e o 15º entre as mulheres, com risco de 3/100 mil. As maiores taxas de incidência encontram-se nos países da Europa, apesar disso, as proporções não diferem de maneira significativa dos demais continentes (INCA, 2016).

No Brasil, a incidência de tumores cerebrais primários estimada para este ano é de 10.270 diagnósticos, sendo 420 destes na região Norte (Tabela 1). No Pará, a estimativa é de 1,93 por 100 mil homens e 1,69 por 100 mil mulheres. Mesmo representando cerca 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 (DAS; RAIZER; MURO, 2008; MARIE; SHINJO, 2011).

Tabela 1: Estimativas para o ano de 2016 de novos casos de câncer (fonte: INCA, 2016).

Localização Primária	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sul	Sudeste
Próstata	2.470	14.290	5.050	13.590	25.800
Mama Feminina	1.810	11.190	4.230	10.970	29.760
Colo do Útero	1.970	5.630	1.560	2.240	4.940
Traqueia, Brônquio e Pulmão	1.090	4.790	1.810	8.040	12.490
Cólon e Reto	920	4.470	2.330	6.610	19.950
Estômago	1.450	4.880	1.340	3.720	9.130
Cavidade Oral	450	3.070	890	2.750	8.330
Laringe	330	1.740	510	1.750	3.020
Bexiga	460	1.310	600	1.860	5.440
Esôfago	290	1.880	700	3.170	4.770
Ovário	250	1.420	530	990	2.960
Linfoma de Hodgkin	180	450	210	660	970
Linfoma não Hodgkin	400	1.770	660	2.060	5.350
Glândula Tireoide	350	2.270	400	1.100	2.840
Sistema Nervoso Central	420	2.210	700	2.730	4.210
Leucemias	560	2.280	600	2.200	4.430

Corpo do Útero	230	1.320	450	770	4.180
Pele Melanoma	160	940	360	1.950	2.260
Outras Localizações	3.400	16.800	5.150	31.170	43.170
Subtotal	17.190	82.710	28.080	98.330	194.000
Pele não Melanoma	4.300	24.470	16.350	33.550	97.090
TOTAL	21.490	107.180	44.430	131.880	291.090

A incidência dos tumores do SNC é ligeiramente mais alta em homens em comparação às mulheres e, quanto mais alto o nível socioeconômico, maiores as taxas de incidência deste tipo de tumor (INCA, 2014).

Os tumores cerebrais normalmente ficam limitados ao próprio cérebro e raramente se espalham para outras partes do corpo. Grande parte desses tumores origina-se no cérebro, nervos cranianos e meninges, sendo os gliomas, os tumores cerebrais primários são originados de células neurais especializadas, as glias, o tipo mais frequente, representando cerca de 40% a 60% de todos os tumores primários de SNC (GÓMEZ-NICOLA et al., 2011). Os meningiomas (20% a 35%) e os neurilemomas (5% a 10%) representam, somados, de 25% a 45% dos tumores de SNC. Os adenomas de hipófise, meduloblastomas, tumores de medula espinhal e neuroendócrinos, somados, não chegam a 3% de todos os tumores do SNC (INCA, 2016).

Em relação a distribuição e ao tipo histológico de tumores cerebrais, é sabido que estes 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, espongiblastomas (incluindo astrocitoma cerebelar e glioma do nervo óptico) e ependimomas. Já nos adultos, os tumores cerebrais mais comuns são meningiomas e gliomas (WCR, 2008).

1.2 GLIOMAS

Gliomas (Tabela 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 (KIRCHES et al., 2001; MONTANINI et al., 2005). 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; BUTT, 2007).

Tabela 2: Tumores do glias SNC e suas graduações de acordo com a OMS.

TUMORES DE ORIGEM GLIAL	
Tumores astrocíticos difusos e oligodendrogliais	Grau
Astrocitoma difuso, IDH-mutante	II
Astrocitoma anaplásico, IDH-mutante	III
Glioblastoma, IDH-selvagem	IV
Glioblastomas, IDH-mutante	IV
Glioma difuso de linha média, H3 K27M-mutante	IV
Oligodendroglioma, IDH-mutante e 1p/19q codeletados	II
Oligodendroglioma anaplásico, IDH-mutante e 1p/19q codeletados	III
Outros tumores astrocíticos	
Astrocitoma pilocítico	I
Astrocitoma subependimário de células gigantes	I
Xantoastrocitoma pleomórfico	II
Xantoastrocitoma pleomórfico anaplásico	III
Tumores ependimários	
Subependimoma	I
Ependimoma mixopapilar	I
Ependimoma	II
Ependimoma, RELA fusão-positiva	II ou III
Ependimoma anaplásico	III
Outros gliomas	
Glioma angiocêntrico	I
Glioma coroide do 3º ventrículo	II

Fonte: adaptado de Louis et al., 2016.

Além da idade, fatores como etnia, gênero (KIRCHES et al., 2001) e ocupação (WCR, 2008) podem ser considerados de risco para o surgimento de gliomas.

Gliomas são duas vezes mais frequentes em afro-americanos que em caucasoides e, de acordo com DAS (2008), no leste europeu, América do Norte e Austrália surgem de 6 a 11 novos casos de câncer do sistema nervoso (CSN) 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. Marie e Shinjo (2011) 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 (2016), também relaciona a doença neoplásica cerebral 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 (ICHIKAWA et al., 2016; VIGNESWARAN; NEILL; HADJIPANAYIS, 2015; YUSOFF et al., 2015).

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; YUSSOF et al., 2015). 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). Já outros trabalhos sugerem que a incidência familiar ocorre em aproximadamente 5% dos casos de glioma e destes, 1% tem a probabilidade de herança autossômica dominante (ICHIKAWA et al., 2016; ZHANG; YU, 2011).

Tabela 3: Classificação dos Astrocitomas e estimativa de sobrevida.

Nome	Gradação	Sobrevida
Astrocitoma difuso de baixo grau	Grau II	> 5 anos
Astrocitoma anaplásico	Grau III	2 a 5 anos
Glioblastoma multiforme	Grau IV	< 1 ano

Fonte: Adaptado de WCR (2008).

Em trabalho recente, Louis et al (2016) propuseram uma classificação de tumores do sistema nervoso humano baseada em entidades histológicas, variantes e padrões moleculares recentemente reconhecidos (figura 3), dos quais, os de origem glial estão descritos abaixo:

Glioma Difuso – Na nova classificação os gliomas difusos incluem os tumores astrocíticos grau II e III da OMS, os oligodendrogliomas de grau II e III, os glioblastomas de grau IV, assim como os já relatados gliomas difusos da infância. Sumariamente, astrocitomas difusos e oligodendrogliomas agora pertencem ao mesmo grupo por serem nosologicamente mais semelhantes entre si do que os primeiros com os astrocitomas pilocítico, como descrito na última classificação (LOUIS et al., 2016; PERRY; WESSELING, 2016).

Astrocitoma Difuso e Anaplásico – Atualmente, os astrocitomas difusos (grau II) e os anaplásicos (grau III) são segregados, cada um, como *IDH*-selvagem e *IDH*-mutante e em categorias não especificadas (*not otherwise specified/NOS designations*). O diagnóstico destes tipos tumorais utiliza ferramentas histológicas e moleculares e levanta também a possibilidade de resultados discordantes, mas somente quando baseada em apenas um desses dois aspectos (LOUIS et al., 2016; PERRY; WESSELING, 2016; YEUNG et al., 2014).

Astrocitoma é genericamente denominado como um tumor originário de células gliais, particularmente astrócitos, sendo o mais frequente tumor cerebral (MARIE; SHINJO, 2011), e constituindo aproximadamente 75% dos casos de gliomas (ZHANG; YU, 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 (DAS; RAIZER; MURO, 2008; ZHANG; YU, 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 (Tabela 3) (DAS; RAIZER; MURO, 2008; YUSSOF et al., 2015).

Glioblastoma – 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. É capaz de invadir rapidamente o tecido cerebral normal. Apresentam proliferação vascular e necrose e, pelo fato de serem potencialmente resistentes à rádio e quimioterapia, os pacientes têm uma sobrevida de menos de 12 meses (LOUIS et al., 2016; MASUI; MISCHÉL; REIFENBERGER, 2016; PERRY; WESSELING, 2016; YEUNG et al., 2016; YUSSOF et al., 2015).

Os Glioblastomas Multiformes (GBM) são altamente invasivos e os padrões de infiltração celular correspondem à reativação do comportamento migratório primitivo das células neoplásicas durante o desenvolvimento do câncer de SNC. Estas células 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 (KIRCHES et al., 2001; LOUIS et al., 2016; MASUI; MISCHÉL; REIFENBERGER, 2016; MONTANINI et al., 2005; OLAR; ALDAPE, 2014; PERRY; WESSELING, 2016; YEUNG et al., 2016).

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 tumores mais raros 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 (CHENG; HOU; MATTSON, 2010; GOMEZ-NICOLA et al., 2011).

Os genes *IDH* (1 e 2) são responsáveis por codificar enzimas homodiméricas as quais são envolvidas em diversos processos celulares, incluindo

adaptação à hipóxia, desmetilação da histona e modificações no DNA (MEDEIROS et al., 2016). A proteína IDH2 é um componente crítico do Ciclo de Krebs (ou ciclo do ácido tricarboxílico – TCA). As duas proteínas, IDH1 e IDH2 são responsáveis por catalisar a descarboxilação do isocitrato em α -cetoglutarato (α -KG) para produzir a forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) a partir da NADP⁺ (MEDEIROS et al., 2016).

A partir dessa informação, e de acordo com a última classificação da OMS, os GBM são divididos como IDH-selvagem (90% dos casos), o qual corresponde mais frequentemente à definição primária ou “de novo” e predomina em pacientes acima dos 55 anos de idade; IDH-mutante (cerca de 10% dos casos), correspondendo aos GBM secundários, ou seja, os que evoluíram de gliomas difusos de grau inferior e acometem preferencialmente pacientes mais jovens. Uma nova variante provisória foi adicionada à essa classificação: glioblastoma epitelióide (GBM-Ep), juntando os glioblastomas de células gigantes e os gliossarcomas aos GBM IDH-selvagens. Os GBM-Ep são formados por grandes células epitelióides com citoplasma eosinofílico, cromatina vesicular, nucléolo proeminente e presença variável de células rabdóides. Têm maior prevalência em crianças e adultos jovens, e topograficamente presentes no córtex ou em massas do diencefalo (LOUIS et al., 2016; MASUI; MISCHÉL; REIFENBERGER, 2016; PERRY; WESSELING, 2016; YEUNG et al., 2016).

Oligodendroglioma – O diagnóstico deste tipo tumoral requer a presença de alteração em IDH combinada com a perda total do braço curto do cromossomo 1 e do braço longo do 19 (codeleção 1p/19q). Na ausência de técnicas de rotina capazes de identificar a mutação R132H no *IDH1*, recomenda-se o sequenciamento do códon 132 do *IDH1* e do códon 172 do *IDH2*. Já na ausência dessas duas possibilidades, o oligodendroglioma caracterizado histologicamente deve ser classificado como NOS (LOUIS et al., 2016).

Oligoastrocitoma – Tumor de fenótipo semelhante aos dois componentes presentes em sua nomenclatura, oligodendrócitos e astrócitos, e, por essa razão, tem um diagnóstico histológico desencorajador quando baseado apenas nessa técnica. Na ausência de ferramentas moleculares apropriadas, geralmente são classificados como NOS, indicando a dependência desses testes para correto diagnóstico (LOUIS et al., 2016).

Glioma Pediátrico Difuso – Anteriormente classificados de acordo com características de neoplasias cerebrais dos homólogos adultos, apesar das evidentes diferenças, este tipo tumoral possui um desenvolvimento totalmente distinto. Trata-se de um grupo que ocorre principalmente em crianças (e algumas vezes em adultos também) e é caracterizado pela mutação *K27M* na histona H3 do gene *H3F3A* ou, em menor frequência, no gene *HISTH3B*. Possui crescimento difuso e localização medial (tálamo, tronco cerebral e medula espinhal). Esta nova entidade é denominada como glioma difuso de linha medial (LOUIS et al., 2016).

Outros Astrocitomas – O Xantastrocitoma Anaplásico Difuso (WHO III) foi incluído na nova classificação de Tumores do Sistema Nervoso da OMS (LOUIS et al., 2016) como uma entidade distinta, contrariando a classificação anterior que o associava ao Xantastrocitoma pleomórfico com características anaplásicas. A caracterização deste tipo tumoral como anaplásico requer 5 ou mais mitoses por 10 campos, inclusive, com potencial presença de necrose. Pacientes com este tipo tumoral possuem uma sobrevida menor em comparação àqueles com Xantastrocitoma pleomórfico (WHO II) (LOUIS et al., 2016).

Outra classificação alterada foi a dos Astrocitomas Pilomixóides, que anteriormente eram descritos como grau II. Vários estudos genéticos e histológicos mostraram uma sobreposição extensiva entre Astrocitomas Pilomixóides e Pilocíticos, onde, este último, de caráter predominantemente benigno ou pouco agressivo dificultava a caracterização do Pilomixóide, de curso mais agressivo. Apesar disso, ainda não está claro se os Astrocitomas Pilomixóides podem ser classificados como grau II, sendo sugeridos mais estudos que esclareçam seu comportamento, até que se possa optar por um melhor estadiamento (ICHIKAWA et al., 2016; LOUIS et al., 2016).

Ependimoma – A classificação anterior dos ependimomas era difícil de se realizar e sua utilidade clínica era questionável. A dificuldade em assimilar um significado clínico ao estadiamento dos ependimomas ainda é discutida atualmente, principalmente, no que diz respeito ao Ependimoma e ao Ependimoma Anaplásico. Enquanto isso, um subtipo genético tem sido aceito: Ependimoma RELA fusão-positiva. Essa variante compreende a maioria dos tumores supratentoriais infantis e é caracterizada por apresentar a fusão de fragmentos cromossômicos (C11orf95) ao

RELA, o principal efetor de sinalização da NF- κ B (PARKER et al., 2014; LOUIS et al., 2016).

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 (CHENG; HOU; MATTSON, 2010; GOMEZ-NICOLA et al., 2011; KIM et al., 2015; LOUIS et al., 2016).

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 (CHENG; HOU; MATTSON, 2010; GOMEZ-NICOLA et al., 2011).

Em 50% dos pacientes, o início dos sintomas pode ser súbito, podendo ocorrer cefaleia, vômitos, astenia psicomotora, rebaixamento do nível de consciência, disfasia, perda somatossensorial e danos no campo visual (INCA, 2012).

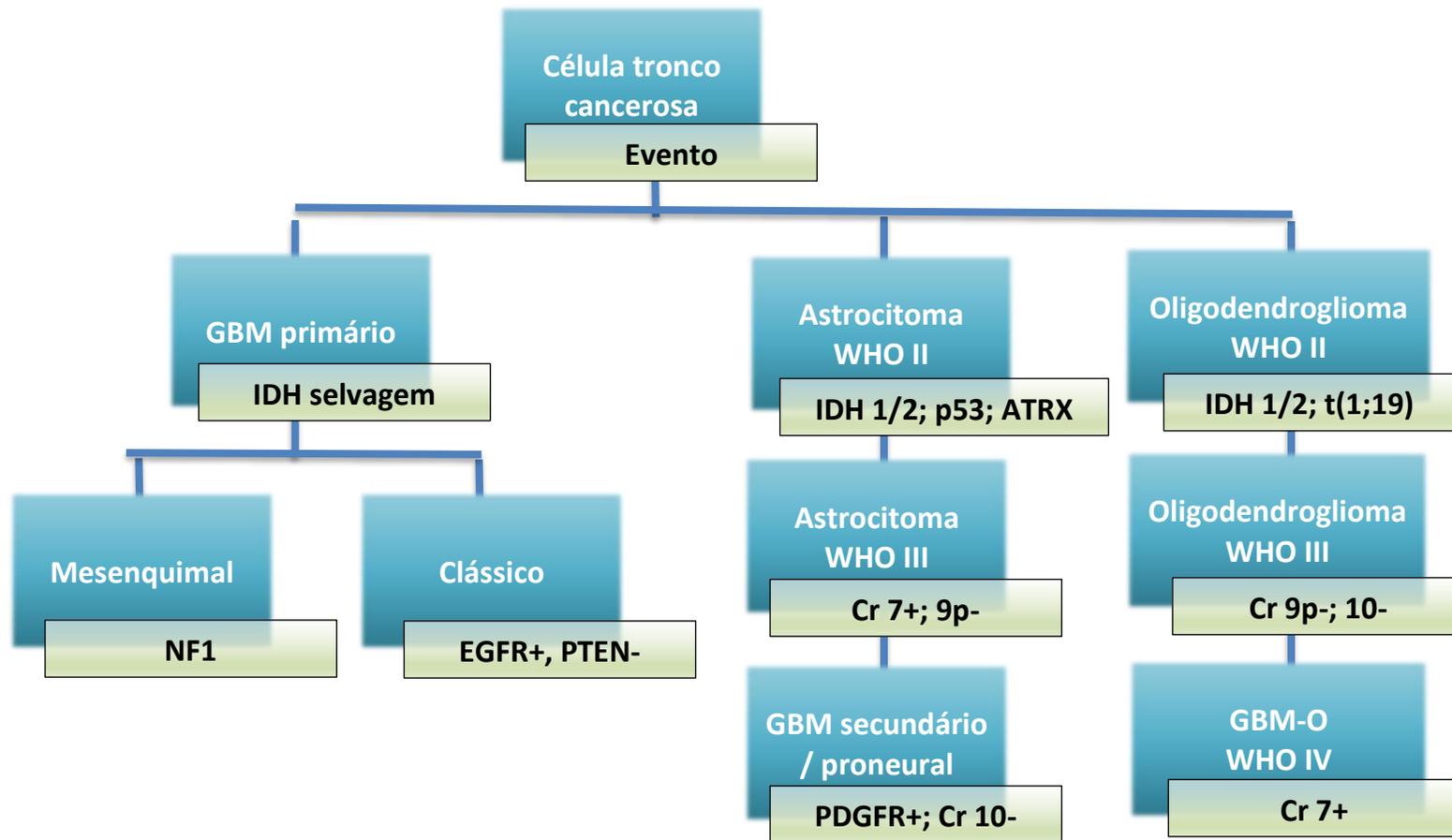


Figura 3: Vias (hipotéticas) da gliomagênese com base nos dados do TCGA e a formação dos subtipos de GBM: mesenquimal, clássico, proneural e GBM-O (GBM com componente Oligodendroglioma). GBM, glioblastoma; IDH, isocitradodesidrogenase; TCGA, The Cancer Genome Atlas.

Fonte: adaptado de Vigneswaran; Neill; Hadjipanayis (2015).

1.3. MITOCÔNDRIA: GENOMA E ATIVIDADE

As mitocôndrias são responsáveis pela produção da maior parte do ATP celular por fosforilação oxidativa (OXPHOS) em um processo totalmente dependente de oxigênio (WALLACE e MURDOCK, 1999; TAIT; GREEN, 2010). Além da OXPHOS, as células também podem produzir ATP através da glicólise, não necessitando obrigatoriamente de O_2 . Desde a descoberta de Otto Warburg (WARBURG, 1931; WARBURG, 1956), que mostrou que as células cancerosas têm preferência por metabolizar a glicose via glicólise anaeróbia, mesmo na presença de O_2 (figura 4), uma série de estudos têm demonstrado que este processo é uma “marca” do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011; MÁXIMO et al., 2012). A glicólise precisa, inicialmente, da conversão da glicose em piruvato e, em seguida, o piruvato é convertido em ácido láctico (NAKAMOTO; SCANLON; AL-SHAWI, 2008).

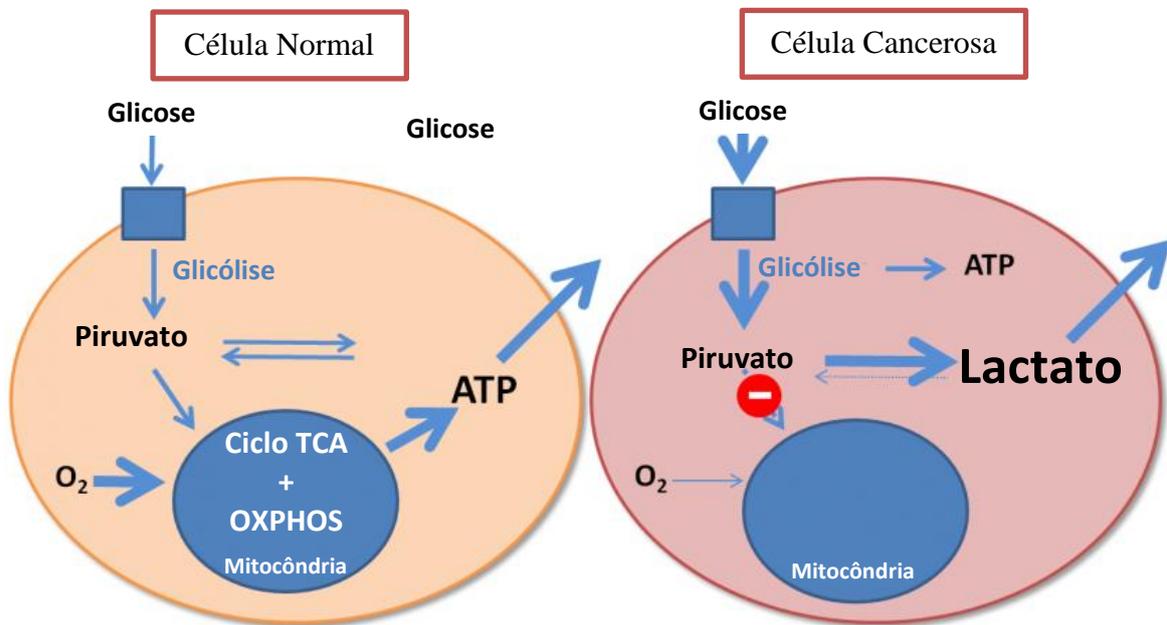


Figura 4: Ilustração da via glicolítica na célula normal e na célula cancerosa. **Fonte:** Adaptado de Conley (2014).

Nas células dos mamíferos, a fermentação é inibida na presença de oxigênio, e isto permite a oxidação do piruvato pela mitocôndria, resultando, além da produção de ATP, em CO_2 e H_2O (CHANDRA; SINGH, 2011). Tal inibição foi batizada de “efeito Pasteur” (RACKER, 1974). Tal versatilidade no metabolismo celular é fundamental para que ocorra uma produção sustentada de energia mesmo na variação da concentração de oxigênio (GATENBY; GILLIES, 2004).

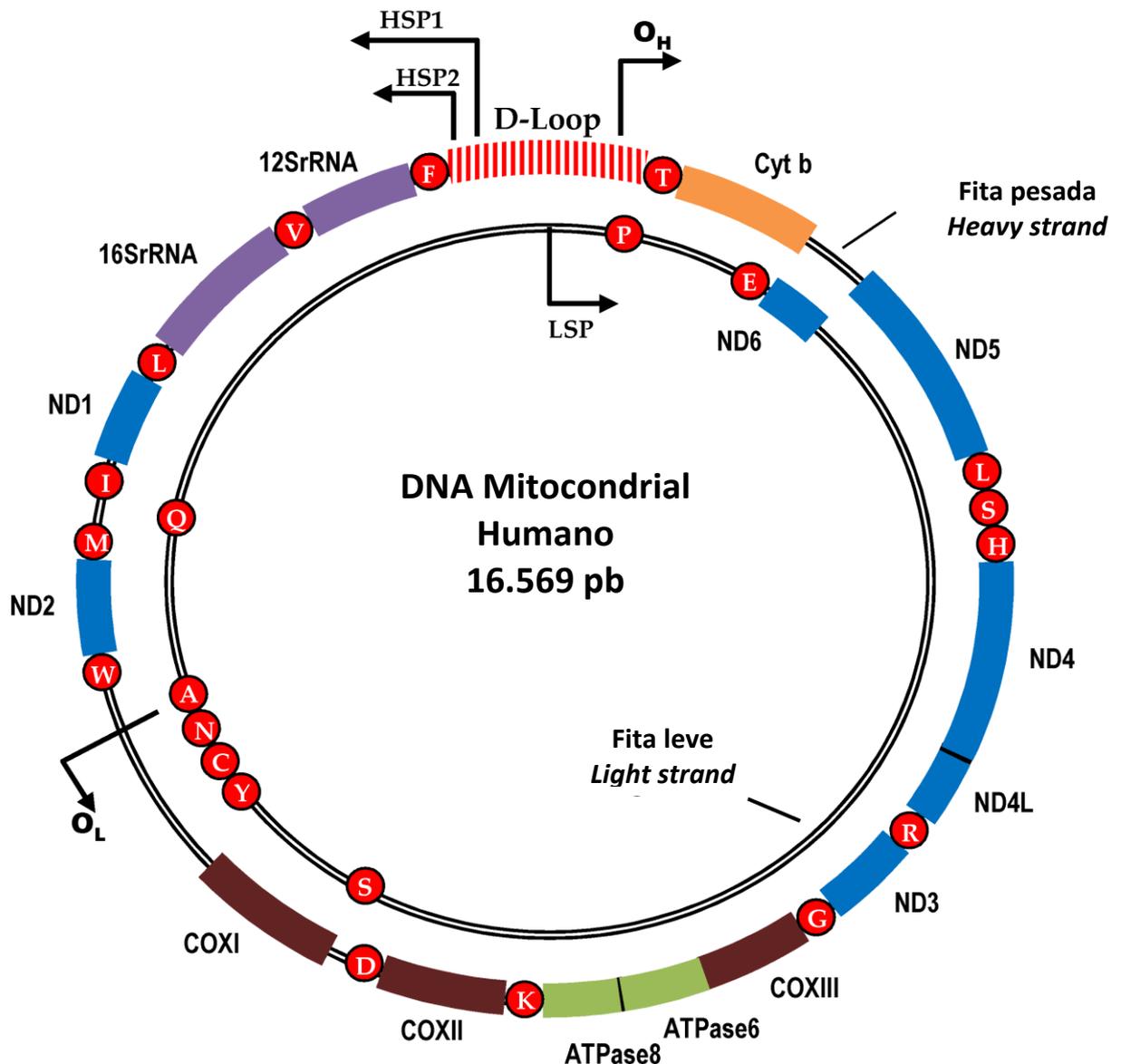


Figura 5: Representação do mtDNA humano. A molécula de cadeia dupla circular de ~16,5 kb contém uma única região não codificante, a região da *D-LOOP*, alberga os promotores para a transcrição das fitas pesada (HSP1 e HSP2) e leve (LSP) e a origem de replicação *leading* (OH). A origem de replicação *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. **Fonte:** Adaptado de Yusoff (2015).

Uma hipótese para explicar essa mudança metabólica, denominada Efeito Warburg, está relacionada aos defeitos causados pela OXPHOS nos genes do DNA mitocondrial (mtDNA), onde tais mutações induzem as células cancerosas à glicólise (BRANDON et al., 2006; CHANDRA; SINGH, 2011; CZARNECKA et al., 2010; LU et al., 2009; MÁXIMO et al., 2009).

O mtDNA, que se faz presente com um alto número de cópias (10^3 a 10^4) por célula, é um genoma formado por uma dupla fita circular fechada, localizada na matriz das mitocôndrias, com 16.569 pares de base (pb) (Figura 5). Essa dupla fita é composta por uma fita chamada pesada (*Heavy strand - H*), rica em guanina; e outra leve (*Light strand - L*), rica em citosina. Na fita H, estão contidos 12 dos 13 genes codificantes de proteínas, 11 dos 12 genes que codificam RNA transportadores (tRNA) e a maioria dos genes de RNA ribossomal (rRNA). A ausência de íntrons é outra característica específica do mtDNA, possibilitando que os genes estejam em sequência contínua (ANDERSON et al., 1981).

Especificamente, os 13 genes codificantes de proteínas do mtDNA estão envolvidos na cadeia de transferência de elétrons presentes na fase de fosforilação oxidativa da mitocôndria, na produção de ATP (POLYAK et al., 1998; SCHMIDT et al., 2011).

Alterações no genoma mitocondrial podem representar um papel importante no desenvolvimento do câncer humano (TONG et al., 2003). Outras evidências afirmam que essas mutações no mtDNA, incluindo grandes deleções, mutações com mudança de aminoácido (*missense*), e pequenas deleções/inserções com mudança na matriz de leitura (*frameshift*) estão associadas a vários outros tipos de câncer (POLYAK et al., 1998; FLISS et al., 2000; ARAL et al., 2010).

Estudos prévios demonstram que o DNA mitocondrial está intimamente relacionado ao desenvolvimento e a progressão de tumores primários e metástases em vários tipos histológicos. Tal correlação é explicada pelo fato deste genoma ser extrema e continuamente exposto a condições que podem provocar mutações. A taxa de mutação do mtDNA é de dez a cem vezes maior que a do DNA nuclear (nDNA), devido uma série de causas, dentre elas, o fato da organela produzir uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS), decorrentes da 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., 2011; MÁXIMO et al., 2005; PARRELLA et al., 2001; POLYAK et al., 1998; ZHAO et al., 2005).

A ausência de histonas no mtDNA é outro fator predisponente e, até mesmo, determinante à ocorrência de mutações, uma vez que, essas proteínas exercem um papel fundamental de proteção do DNA nuclear (nDNA) (YAKES; VAN-HOUTEN, 1997). Também, deve-se levar em consideração a baixa atividade corretora da enzima DNA polimerase mitocondrial quando comparada à enzima do DNA nuclear (KUNKEL; LOEB, 1981) e, ainda, à reparação ineficiente do genoma dependente de excisão de nucleotídeos (CROTEAU; STIERUM; BOHR, 1999; ARAUJO, 2013).

Barekati et al. (2010) sugerem que danos no DNA mitocondrial podem ser causados pela proteína p53 desregulada, 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). Altilia et al. (2012) sugerem uma relação entre o *TP53* e o mtDNA, onde o polimorfismo do códon 72 deste gene confere a ele duas aptidões distintas em que a isoforma p53P72 é mais propensa a assegurar a reparação do DNA nuclear enquanto que a p53R72, a do genoma mitocondrial. Assim, parece que o potencial de atividade mitocondrial pode afetar não apenas a atividade da proteína p53, como um indutor de apoptose, mas também como um cofator de reparação do mtDNA e, portanto, influenciar a estabilidade deste e eventualmente a eficácia metabólica mitocondrial (YACOUBI-LOUESLATI et al., 2009; BAREKATI et al., 2010; ALTILIA et al., 2012).

1.3.1. REGIÃO CONTROLE

O genoma mitocondrial apresenta uma porção não codificante denominada região controle ou Alça-D (*D-LOOP*), com 1.122 pb, situada entre os nucleotídeos 16024 e 576, e flanqueada pelos tRNA de prolina (5') e fenilalanina (3') (*NCBI Reference Sequence: NC_012920.1*). Essa região (Figura 6) é o principal sítio de controle de replicação do mtDNA e dos promotores necessários para transcrição (WHEELHOUSE et al, 2005; DING et al., 2010). 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 do mtDNA apresentar uma taxa de substituição nucleotídica maior que a do genoma nuclear, a região *D-LOOP* possui duas regiões hipervariáveis desse segmento, denominadas regiões Hipervariante I (HVI) e Hipervariante II (HVII), consideradas *hotspots* para mutações (ANDERSON et al., 1981; RUIZ-PESINI et al., 2007).

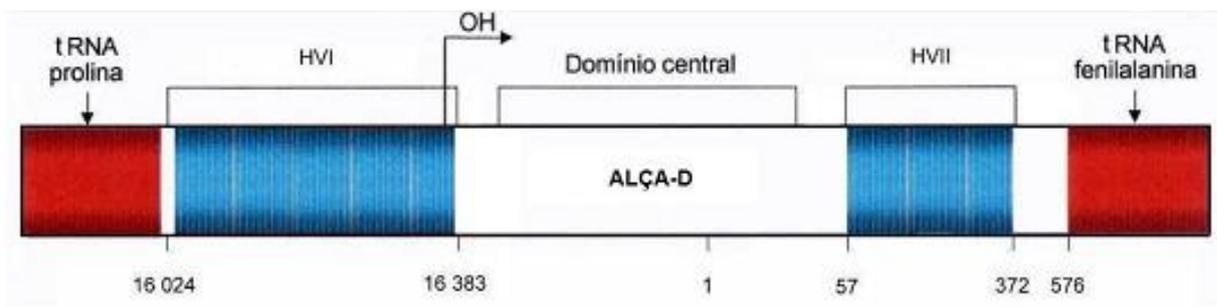


Figura 6: Diagrama da região controle mostrando o flanqueamento dos genes tRNA_{pro} e tRNA_{phe} e a localização das regiões hipervariáveis HVI e HVII. **Fonte:** adaptado de Kelly e Scarpulla (2004).

Acredita-se que algumas mutações somáticas recorrentes da região *D-LOOP* podem estar relacionadas com a redução do número de cópias do DNA mitocondrial (TAN et al., 2006) e consequente diminuição do metabolismo celular (BONIFÁCIO, 2011). Observa-se também que, em 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 número crescente de evidências que correlacionam a presença de mutações no mtDNA com características clínico patológicas malignas e um mau prognóstico da doença neoplásica (MATSUYAMA et al., 2003; LIÈVRE et al., 2006; KONG et al., 2006; TSENG et al., 2006; CZARNECKA & BARTNIK, 2010; YUSOFF et al., 2015).

O acúmulo tóxico de ROS intracelular, decorrente de um grande desbalanço metabólico pode ativar uma via apoptótica intrínseca iniciada pela mitocôndria (TAIT e GREEN, 2010). Esta via (Figura 6), após os estímulos necessários, inicia-se pela liberação do citocromo-C da mitocôndria para o citosol, onde este irá formar juntamente com outras proteínas, um complexo denominado

Fator de ativação protease-apoptossômico-1 (Apaf-1). Após sua formação, o Apaf-1 ativa a pro-caspase 9 em caspase 9, formando um complexo apoptossomo composto pela Apaf-1, caspase 9 e citocromo-c. Esse complexo ativa as pro-caspases 3/7 em caspases 3/7, iniciando, assim, a cascata de caspases que culminam com a morte celular e granulação do citoplasma (FALAVORO et al., 2012; HOLCIK; SONENBERG, 2005; TAIT e GREEN, 2010).

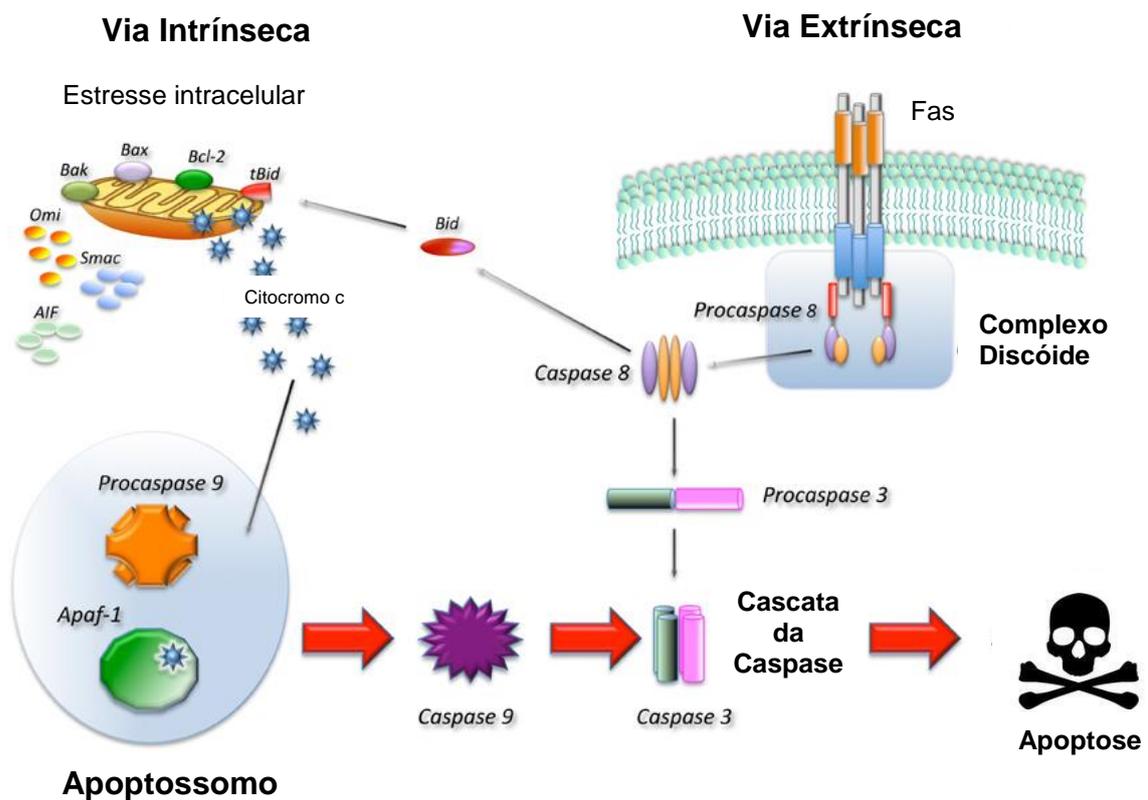


Figura 7: Mecanismo mitocondrial de apoptose e seus indutores potenciais através da via intrínseca e extrínseca. **Fonte:** adaptado de Favaloro et al. (2012).

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., 2010).

Entre as mutações mais relatadas na *D-LOOP*, 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 em geral. Tal sugestão se deve ao fato do estudo ter relatado uma distribuição semelhante de alterações somáticas entre gliomas de grau II, III e IV (LUETH et al., 2010; MAXIMO et al., 2012). 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).

Os dados dos estudos com mtDNA em vários tipos de cânceres são bastante variáveis, talvez devido à natureza histológica ou embrionária do tumor. Liu e Kohane (2009) reportam a ausência de mutações homoplásmicas somáticas em regiões codificantes do mtDNA em estudo com meduloblastomas, enquanto Meiehofer et al., (2006) sugerem que mutações somáticas nessas regiões em tumores são silenciosas ou os polimorfismos, em sua maioria, não são patogênicos.

Por outro lado, os estudos de Lièvre et al. (2006) sugerem que algumas mutações em *D-LOOP* podem ser consideradas como marcadores para risco do câncer em geral, assim como, ressalta a sua utilidade na detecção precoce do câncer de cabeça e pescoço já estabelecido. Essas mutações mostraram ser um acontecimento precoce na carcinogênese de cabeça e pescoço (WANG et al, 2012), com frequência de 22% nas lesões pré-malignas de cabeça e aumentando 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.

Em contrapartida, Liu et al. (2011) sugerem que a presença de mutações somáticas em *D-LOOP* está associada com um melhor prognóstico em pacientes com câncer oral. Por outro lado, a prevalência de deleções pontuais do mtDNA é significativamente mais baixa em tecidos de carcinoma hepatocelular (WHEELHOUSE et al., 2005).

1.3.2. CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

Os componentes da cadeia respiratória mitocondrial situam-se na membrana interna da mitocôndria, abrangendo cinco subunidades complexas constituídas principalmente por proteínas e lipídios (KIM et al., 2015). Tais complexos (Figura 6) são compostos por: complexo I (NADH); complexo II (succinato-ubiquinona oxireductase); complexo III (citocromo-c oxireductase); complexo IV (citocromo-c oxidase) e complexo V (ATP sintase). Estes constituintes formam o sistema de fosforilação oxidativa (OXPHOS), que fornece o ATP demandado pela célula (KAUFHOLD; GARBAN; BONAVIDA, 2016; RAK et al., 2016; TOKARZ; BLASIAK, 2014)

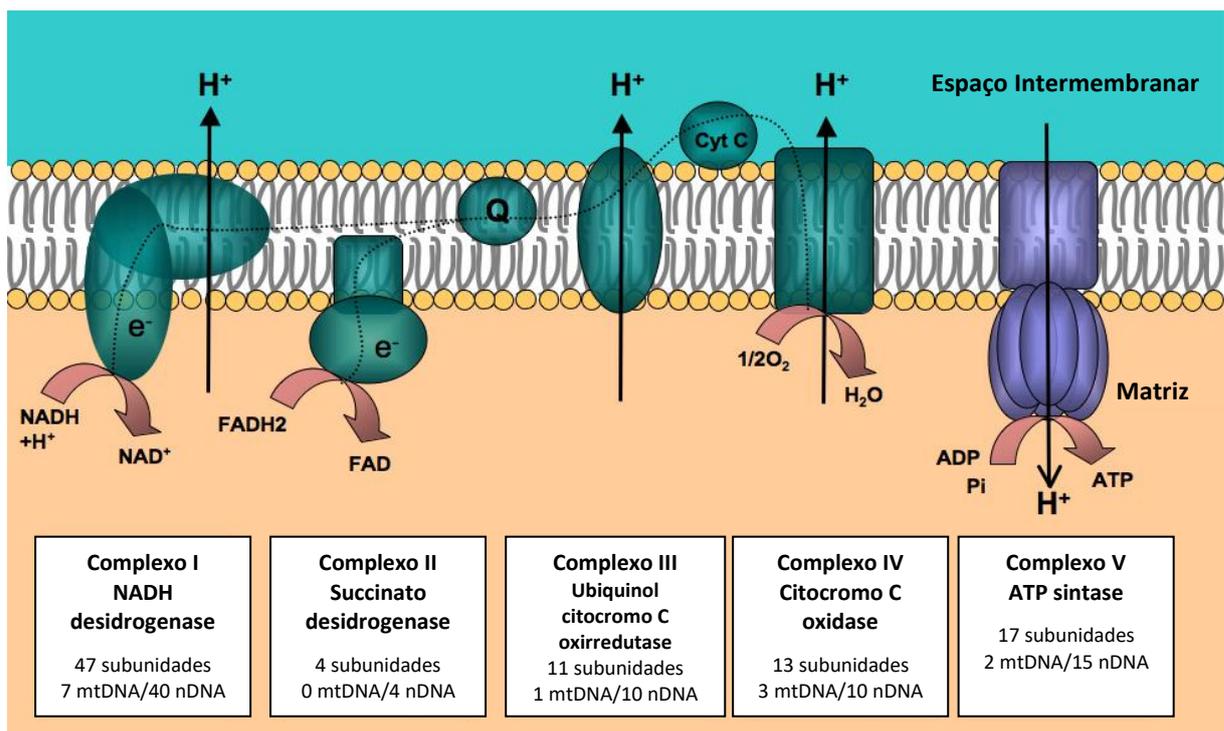


Figura 8: Cadeia respiratória mitocondrial composta por 5 complexos. Legenda: Cyt C (citocromo c).

Fonte: adaptado de MORRIS (2013).

1.3.2.1. COMPLEXO I MITOCONDRIAL

O complexo I mitocondrial é o guardião da cadeia respiratória por dar o primeiro passo da oxidação pela NADH desidrogenase. É uma enzima formada por 47 subunidades, sendo 7 mitocondriais (*ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND4L*, *ND5* e *ND6*) e 40 nucleares (MORRIS et al., 2013). Localizada na membrana interna mitocondrial, é responsável por catalisar a transferência de elétrons da NADH para a coenzima Q. A elevação de NAD⁺/NADH promove a translocação de prótons através da membrana mitocondrial interna, o que, após a finalização do percurso da cadeia, culminará com a produção de energia (CHANDRA; SINGH, 2011; SANTIDRIAN et al., 2015; JAROSZ et al., 2016). Células tumorais também geram altos níveis das formas reduzidas de NAD⁺ (NADH e NADPH) como importantes cofatores e componentes de redução oxidativa. Essa atividade metabólica alterada pode estar ligada a uma disfunção mitocondrial a qual inibe a OXPHOS, aumenta os níveis de ROS, promove um crescimento descontrolado e causa danos no DNA, o que sustentará fenótipos metastáticos (CHALLEN et al., 2011).

Segundo Santidrian et al. (2015), o balanço celular de NAD⁺/NADH é regulado pelo complexo I mitocondrial, tanto em células normais quanto nas de tumores malignos de mama, e que a progressão tumoral e, até mesmo, o processo metastático deste tipo histológico é controlada pela expressão do gene mitocondrial *ND1*.

1.3.2.2. COMPLEXO II MITOCONDRIAL

O complexo II da cadeia de transporte de elétrons (Figuras 6 e 7) é o segundo ponto de entrada nesta cadeia. Também denominada de succinato-Q-oxidoredutase, é a única enzima que participa tanto no ciclo dos ácidos tricarboxílicos como na própria cadeia de transporte de elétrons. Consiste de 4 subunidades proteicas (todas nucleares) e um cofator dinucleotídico de flavina-adenina (FAD), centros de ferro-enxofre e um grupo heme que não participa na transferência de elétrons para a coenzima Q, mas aparenta ser necessário para diminuir a produção de ROS. Este complexo tem por função oxidar o succinato em fumarato e reduzir a ubiquinona. Esta fase da reação libera menos energia que a oxidação do NADH e o

complexo II não transporta prótons através da membrana mitocondrial, não contribuindo, desta forma, para o gradiente eletroquímico da organela (MORRIS et al., 2013; KLUKCOVA et al., 2013; ALAM; FITZGERALD; ZHANG, 2016).

1.3.2.3. COMPLEXO III MITOCONDRIAL

A Ubiquinona oxidorredutase (Figuras 8 e 9) é também conhecida como flavoproteína de transporte de elétrons ou citocromo-C oxidorredutase. É o terceiro ponto de entrada na cadeia de transporte de elétrons. Esta via metabólica é relevante na beta-oxidação de ácidos graxos e no catabolismo (aminoácidos e colina), ao receber elétrons de diversas acetil-Coenzima A desidrogenases (JAROSZ et al., 2016).

Em seres humanos, esta enzima é um dímero em que cada subunidade é composta por 11 proteínas, sendo 1 mitocondrial e 10 nucleares. O complexo III catalisa a oxidação de uma molécula ubiquinol e a redução de duas moléculas de citocromo-C (KIM, 2015; JAROSZ et al., 2016).

1.3.2.4. COMPLEXO IV MITOCONDRIAL

O complexo IV mitocondrial (Figuras 8 e 9) é um complexo enzimático de múltiplas subunidades contendo um grupo de citocromos A, citocromo A3, dois átomos de cobre e 13 subunidades proteicas diferentes, sendo 3 subunidades transcritas pelo mtDNA: *mt-CO1*, *mt-CO3* e *mt-CO3*. É o complexo oxidase terminal da cadeia respiratória que coleta os elétrons que serão transferidos do grupo do Citocromo-C, reduzidos e doados ao oxigênio molecular, que, por sua vez, será reduzido à água. Tanto a passagem de prótons através da membrana como o consumo de prótons na matriz mitocondrial contribuem para o gradiente iônico na organela (BETANCOURT et al., 2014; ALAM et al., 2016).

1.3.2.5. COMPLEXO V MITOCONDRIAL

ATP sintase ou sintetase ou mesmo Complexo V mitocondrial (Figuras 8 e 9) é o nome genérico dado ao conjunto formado por 16 proteínas, sendo 14 codificadas pelo por genes do nDNA e 2 pelo mtDNA (*ATP6* e *ATP8*). Este conjunto forma o complexo enzimático que fornece energia para o funcionamento das células através da síntese de ATP, a partir do ADP e do fosfato inorgânico (GHAFARPOUR et al., 2014; RAK et al., 2016).

A ATP sintase é a enzima final na via da OXPHOS e encontra-se presente em todos os organismos vivos, funcionando de forma idêntica em procariontes e eucariontes. Esta enzima utiliza energia armazenada no gradiente de prótons existente através da membrana para realizar a síntese de ATP. A reação de síntese de ATP é designada como mecanismo de mudança de ligação (*binding change mechanis*) e consiste na modificação cíclica do centro ativo do complexo (GRZYBOWSKA-SZATKOWSKA et al, 2014; GHAFARPOUR et al., 2014; YOU et al., 2013).

Esse complexo divide-se em duas partes denominadas como F1 e F0. A parte estrutural F1 está imersa na matriz mitocondrial, presa à membrana da organela pela estrutura F0 que, por sua vez, é uma espécie de canal ou passagem inserido na membrana da mitocôndria que serve de passagem para os prótons. Estas duas estruturas são compostas por genes do nDNA (NAKAMOTO; SCANLON; AL-SHAWI, 2008). Já as subunidades codificadas pelo mtDNA (*ATP6* e *ATP8*) não participam diretamente do mecanismo catalítico de rotação, mas desempenham importante papel no funcionamento do complexo, atuando como um catalisador movido pelo gradiente de prótons e que impulsiona a síntese de ATP (GRZYBOWSKA-SZATKOWSKA et al, 2014; NAKAMOTO; SCANLON; AL-SHAWI, 2008).

1.4. O PAPEL DA MITOCÔNDRIA NA PATOGÊNESE TUMORAL

Especialmente em relação à OXPHOS, a mitocôndria está atrelada ao processo de apoptose, assim como a produção de ROS e ATP (GRZYBOWSKA-

SZATKOWSKA et al, 2014). A ATP sintase é uma enzima essencial para a manutenção da função desta organela, apesar disso, Ghaffarpour et al., (2014) relatam uma alta taxa de alterações nucleotídicas nos genes das *ATPase6* e *ATPase8* em câncer de mama e sugerem que essas variações podem desempenhar um papel importante na tumorigênese, alterando o metabolismo energético nas células cancerosas (VANDER-HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009; RUBIO-PEREZ; MORILLA-RUIZ, 2012).

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, 2009). Devido ao ambiente altamente reativo e, provavelmente, devido também a uma estrutura mitocondrial menos condensada que a nuclear, o mtDNA está frequentemente exposto ao estresse oxidativo, levando-o a defeitos genômicos (ROTHFUSS *et al.*, 2010; OLAR; ALDAPE, 2014).

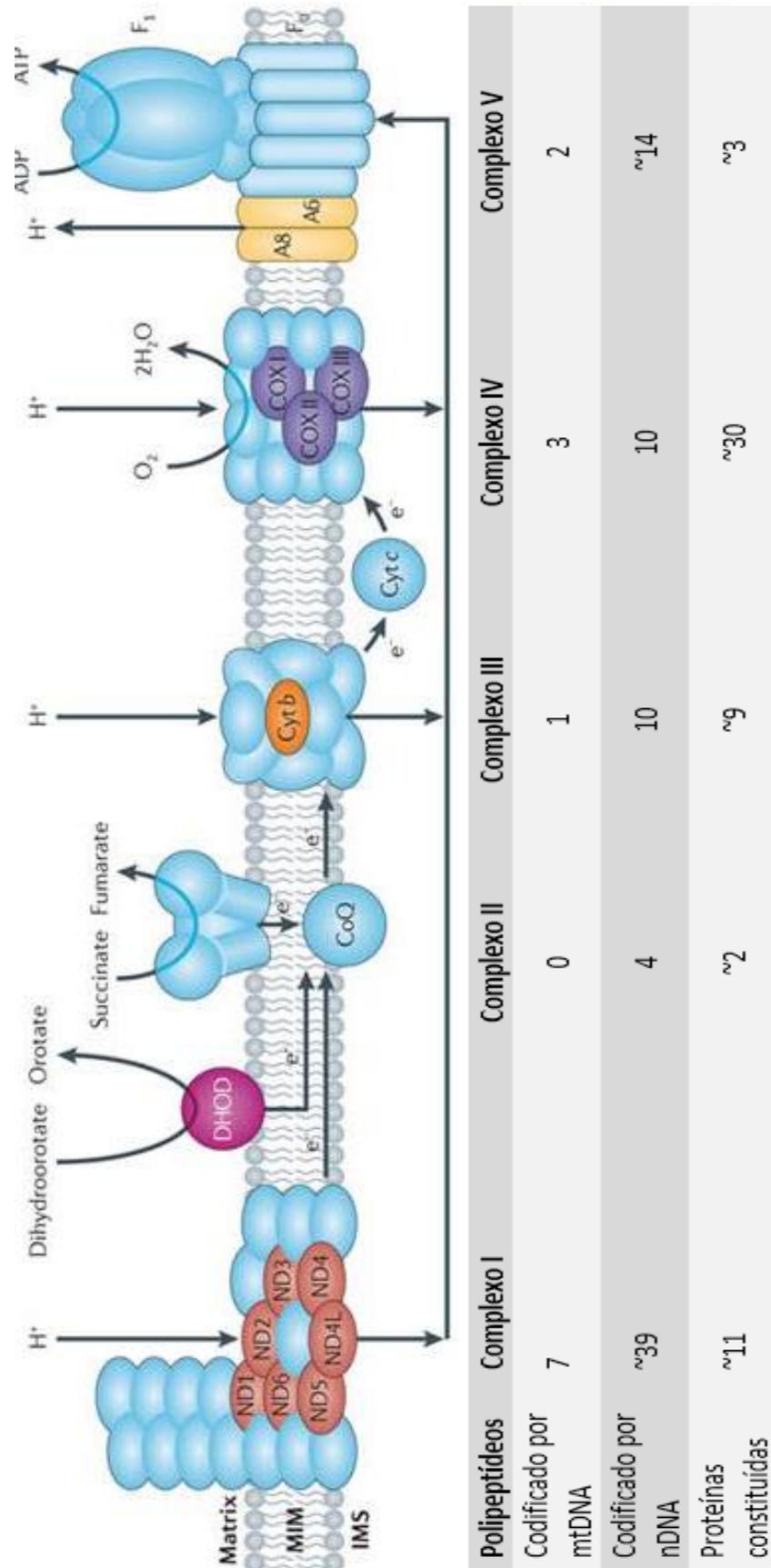


Figura 9: Cadeia respiratória mitocondrial com os 5 complexos, representando esquematicamente o processo de transporte de elétrons e as subunidades de cada complexo transcritas pelo mtDNA e nDNA. **Fonte:** adaptado de Schon; DiMauro; Hirano (2012).

1.4.1. GRANDES DELEÇÕES DE 4977PB

Uma deleção de cerca de 4977 pares de bases, conhecida como “deleção comum”, que geralmente ocorre entre os nucleotídeos 8469 e 13447 do genoma mitocondrial (figura 10) é responsável por remover do genoma mitocondrial os genes do complexo I: *ND3*, *ND4*, *ND4L* e parte do *ND5*; o gene *mt-CO3* do complexo IV; o gene *ATP6* e parte do *ATP8*, ambos do complexo V; e os RNA transportadores (tRNA) de glicina arginina, histidina, serina e leucina. Após a excisão de parte deste genoma, ocorre uma recombinação ligando diretamente os nucleotídeos flanqueadores desta parte. O mecanismo responsável por essa deleção ainda é desconhecido (LEE et al., 2015). Além disso, esta deleção possui uma zona flanqueadora (5') de repetição direta de 13 pb, cujo início do fragmento deletado pode variar entre as posições 8470 a 8482; e o final, entre 13447 e 13459 (DIMBERG et al., 2015).

A frequência desta deleção, segundo Ashutosh et al (2016), aumenta proporcionalmente com o estresse oxidativo e se acumula no tecido com o avanço da idade, podendo servir como um biomarcador de dano no mtDNA (MEISSNER et al., 2008).

Embora esta deleção tenha sido encontrada em diversos tecidos humanos, diversos estudos relacionam sua presença com algum tipo de toxicidade, como estado urêmico, algumas patologias relacionadas ao envelhecimento e, mais recentemente às neoplasias (ARAL et al., 2010; MA et al., 2012; DIMBERG et al., 2014; DIMBERG et al., 2015).

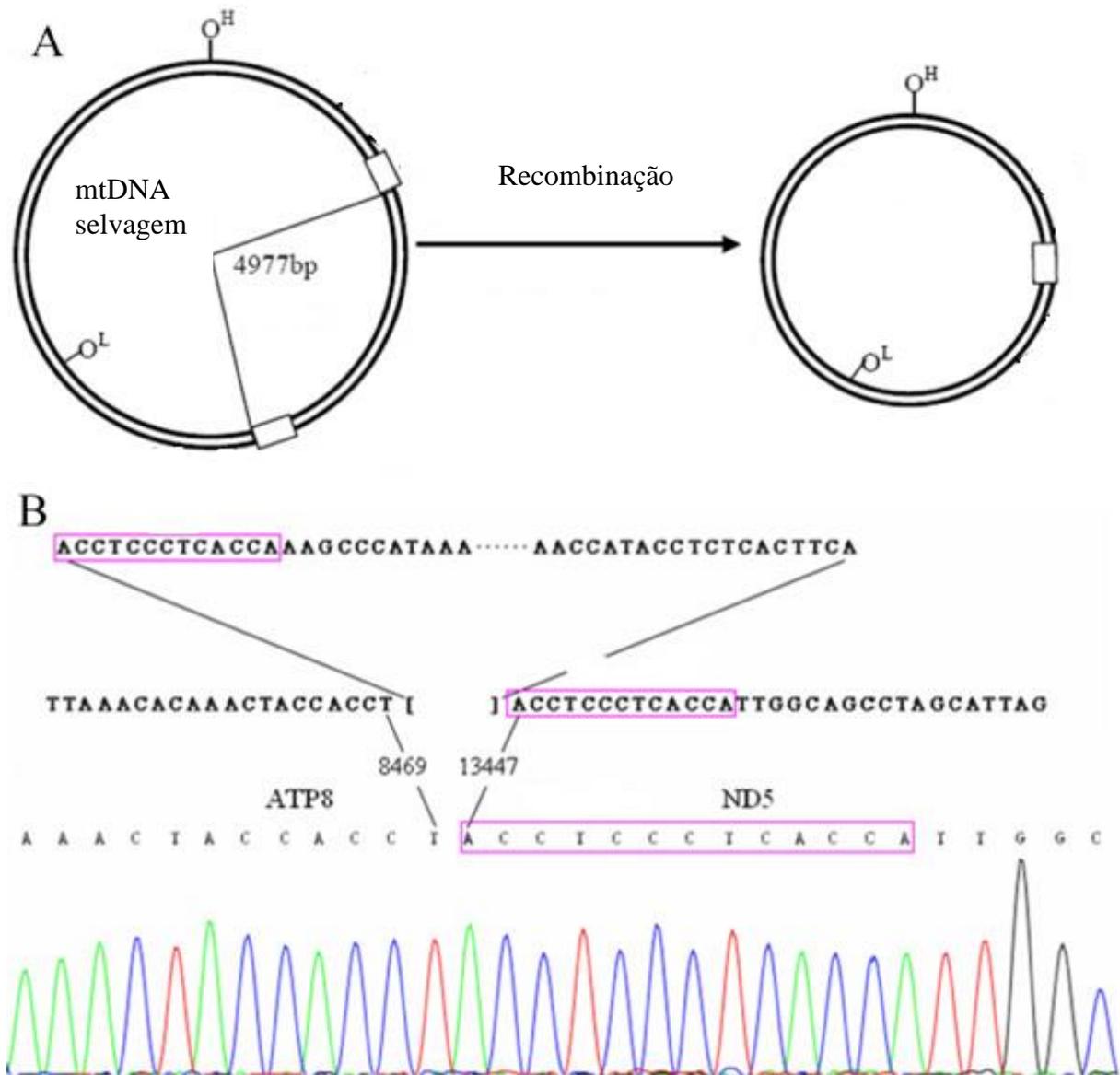


Figura 10: Ilustração da deleção de 4977 pb e o processo de recombinação que ocorre pós deleção juntando os nucleotídeos flancueadores mais próximos. **Fonte:** adaptado de Chen et al., 2011

De modo geral, o acúmulo de mutações no DNA mitocondrial está relacionado ao aumento da taxa de proliferação celular e inibição da apoptose, sendo que essas mutações correlacionam-se positivamente com mutações no *TP53* (LIU et al., 2011). Estudos também indicam que a proteína p53 está intimamente envolvida na biogênese e função mitocondrial adequada (POLYAK *et al*, 1997), e também na regulação mitocondrial do citocromo-c oxidase II (*mt-CO2*). A atividade das citocromo-c oxidase já foram relatadas como diminuídas em adenocarcinomas de cólon e carcinoma hepatocelular (WHEELHOUSE et al., 2005; WANG et al., 2011). A

deficiência de qualquer uma das citocromo oxidase (*mt-CO1*, *mt-CO2* ou *mt-CO3*) é uma das causas mais frequentes de defeitos da cadeia respiratória em humanos, por serem proteínas da cadeia transportadora de elétrons, essenciais para produção de ATP (ZHOU; KACCHAP; SINGH, 2003; BAI et al., 2011).

1.4.2. HETEROPLASMIAS

As heteroplasmias mitocondriais podem ser definidas como existências simultâneas de dois genótipos mitocondriais, sendo um herdado (selvagem) e outro mutante, em taxas variáveis no mesmo indivíduo, em uma ou várias células e, até mesmo, em uma mesma mitocôndria (STEFANO; KREAM, 2016).

Apesar dos avanços nos estudos moleculares relacionados ao CSN, existe necessidade da investigação do genoma mitocondrial em células de gliomas, que possam ajudar a esclarecer ou mesmo descartar o papel das diversas alterações desse genoma à grande variedade do fenótipo tumoral, assim como ao grau de estadiamento do mesmo, não deixando de levar em consideração, ainda, uma possível contribuição para a determinação do prognóstico e planejamento terapêutico em relação à doença.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem por objetivo geral avaliar a integridade mitocondrial em gliomas na população paraense, baseada na investigação de possíveis alterações nesse genoma.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar as alterações nucleotídicas nas regiões *D-LOOP*, *ND1*, *ND2*, *mt-CO1*, *mt-CO2*, *mt-CO3*, *ATPase 6* e *ATPase 8* específicas do DNA mitocondrial em tecidos neoplásicos de pacientes acometidos por câncer de células da glia na população paraense;
- b) Avaliar estruturalmente, através de modelagem proteica computacional as alterações presentes nos genes mitocondriais
- c) Relacionar os dados moleculares obtidos com os tipos tumorais de origem glial, comparando com os dados já relatados na literatura e em banco de dados mitocondriais (GenBank e Mitomap).
- d) Comparar dados moleculares das amostras tumorais associando-os ao fenótipo tumoral e ao seu grau de estadiamento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho é parte integrante do projeto de pesquisa intitulado “Identificação de Alterações Genéticas e Epigenéticas em Gliomas de Alto e Baixo Graus na População Paraense”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP-ICS/UFGPA). Os pacientes ou seus parentes mais próximos foram informados sobre o estudo a ser realizado e, em caso de concordância em participar do mesmo, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I).

3.1. AMOSTRAS

Foram utilizadas 29 amostras de tecido tumoral dos pacientes diagnosticados com câncer de sistema nervoso central, com CID C71 (neoplasia maligna do encéfalo) e classificadas através de exame anatomopatológico como neoplasias primárias de células de origem glial (Tabela 4). Estas amostras foram coletadas durante procedimento cirúrgico pela equipe de neurocirurgia 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.

As amostras utilizadas neste estudo foram classificadas e separadas de acordo com seus laudos histopatológicos os quais seguiram os padrões de classificação de tumores do SNC da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009).

Tabela 4: Amostras de CSN de origem glial utilizadas neste estudo

Laudo Histopatológico	Amostra	Gênero	Idade	Grau
Astrocitoma desmoplásico infantil	CSN192	F	1	I
Glioma angiocêntrico	CSN194	M	30	I
Ependimoma	CSN077	F	1	II
Ependimoma	CSN038	F	2	II
Oligoastrocitoma	CSN022	M	2	II
Ependimoma	CSN138	F	8	II
Astrocitoma fibrilar	CSN010	F	12	II
Astrocitoma difuso	CSN167	M	14	II
Oligodendroglioma	CSN095	M	19	II
Oligodendroglioma	CSN184	F	23	II
Astrocitoma difuso	CSN126	F	34	II
Oligodendroglioma	CSN096	F	43	II
Astrocitoma difuso	CSN136	M	64	II
Astrocitoma anaplásico	CSN146	F	31	III
Ependimoma anaplásico	CSN102	F	54	III
Astrocitoma anaplásico	CSN031	F	55	III
Astrocitoma anaplásico	CSN190	M	59	III
Astrocitoma Anaplásico	CSN044	M	60	III
Ependimoma anaplásico	CSN141	M	62	III
Oligoastrocitoma anaplásico	CSN088	F	63	III
Gliossarcoma	CSN047	M	64	III
Glioblastoma	CSN073	M	43	IV
Glioblastoma	CSN168	M	46	IV
Glioblastoma	CSN199	M	48	IV
Glioblastoma	CSN169	F	49	IV
Glioblastoma	CSN193	M	56	IV
Glioblastoma	CSN153	M	60	IV
Glioblastoma	CSN200	M	66	IV
Glioblastoma	CSN198	M	74	IV

3.2. EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração do DNA mitocondrial das amostras tumorais foram utilizados 20mg de tecido. O processo de extração foi realizado em microtubos estéreis de 1,5mL com auxílio do *Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit* (Promega), conforme manual do fabricante.

3.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Após a extração do DNA, foram realizadas amplificações de genes mitocondriais com utilização dos iniciadores, cujas sequências encontram-se descritas na Tabela 5.

As PCR foram realizadas 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 ciclos, consistindo de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento e número de ciclos conforme descrito na Tabela 5, 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 (tabelas 5 e 6), específicos para a região *D-LOOP* do DNA mitocondrial foram obtidos a partir dos estudos de Kocher e Wilson (1991); os específicos para as regiões *CO I*, *CO II*, *CO III*, *ATPase 6* e *ATPase 8* foram descritos por Li *et al.* (2002), e os utilizados para as demais regiões, *ND1*, *ND3* e deleções 4977pb, foram descritos por Maximo *et al.* (2001).

Os fragmentos-modelo utilizados como padrão para o desenvolvimento dos estudos neste trabalho foram obtidos a partir do banco de dados online *Mega Blast* (NCBI, 2016), identificado como mtDNA humano NC_012920.1.

Tabela 5: Iniciadores utilizados nas PCR deste trabalho.

Região	Iniciador	Seqüência (5' – 3')	Anelamento	Ciclos	Tam pb
<i>D-LOOP</i>	DL218 – F	CACCATTAGCACCCAAAGCT	52 °C/50 seg	40	1.122
	DL2 – R	AAGGGCTAGGACCAAACCT			
<i>CO I</i>	COI – F	GTTGTAGCCCACTTCCAC	56 °C/30 seg	35	222
	COI – R	CATCGGGGTAGTCCGAGTAA			
<i>CO II</i>	CO II – F	TTCATGATCACGCCCTCATA	56 °C/30 seg	35	187
	CO II – R	TAAAGGATGCGTAGGGATGG			
<i>CO III</i>	CO III – F	AAAGCACATACCAAGGCCAC	56 °C/30 seg	35	195
	CO III – R	CTTCTAGGGGATTTAGCGGG			
<i>ATPase 6</i>	ATPase 6 – F	GCCCTAGCCCACTTCTTACC	56 °C/30 seg	35	256
	ATPase 6 – R	TTAAGGCGACAGCGATTCT			
<i>ATPase 8</i>	ATPase 8 – F	CCCACCATAATTACCCCAT	56 °C/30 seg	35	102
	ATPase 8 – R	TTTTATGGGCTTTGGTGAGG			
<i>ND1</i>	ND1F	GACGCCATAAACTCTTCAC	57 °C/30 seg	35	390
	ND1R	GGTTGGTCTCTGCTAGTGTG			
4977pb	GD1F	TCAATGCTCTGAAATCTGTGG	54 °C/30 seg	35	-
	GD1R	GTTGACCTGTTAGGGTGAGAAG			
4977pb <i>Nested</i>	GD2F	ACAGTTTCATGCCCATCGTC	52 °C/30 seg	35	350
	GD2R	GCGTTTGTGTATGATATGTTTGC			
<i>ND3</i>	ND3F	CCTGCCACTAATAGTTATGTC	57 °C/30 seg	35	210
	ND3R	GATATGAGGTGTGAGCGATA			

Para verificar a eficiência da amplificação, foram utilizados 2 µL dos produtos de PCR acrescidos de 1 µL 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) e 1 µL de GelRed™ (Biotium), então submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 2,0%, usando um marcador de peso molecular de 1 kb. 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, após ser purificado com kit “*Purelink PCR Purification Kit*” de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante (*ThermoFisher*) foi submetido ao sequenciamento, empregando o método de terminação de cadeia, descrito por SANGER *et al.* (1977). A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o *Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (*ThermoFisher*) 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 em aparelho *ABI 3130*.

Tabela 6: Iniciadores utilizados nas reações de sequenciamento.

Iniciador	Sequencia (5' – 3')	Obs
DL218	CACCATTAGCACCCAAAGCT	Externos
DL2	AAGGGCTAGGACCAAACCT	
DLF16236	CGTACATAGCACATTACAGT	Internos
DLR16434	GAGTGCTACTCTCCTCGCT	
COI – F	GTTGTAGCCCACTTCCAC	-
COI – R	CATCGGGGTAGTCCGAGTAA	
CO II – F	TTCATGATCACGCCCTCATA	-
CO II – R	TAAAGGATGCGTAGGGATGG	
CO III – F	AAAGCACATACCAAGGCCAC	-
CO III – R	CTTCTAGGGGATTTAGCGGG	
ATPase 6 – F	GCCCTAGCCCACTTCTTACC	-
ATPase 6 – R	TTAAGGCGACAGCGATTTCT	
ATPase 8 – F	CCCACCATAATTACCCCAT	-
ATPase 8 – R	TTTTATGGGCTTTGGTGAGG	
ND1	GACGCCATAAACTCTTCAC GGTTGGTCTCTGCTAGTGTG	-
GDel	TCAATGCTCTGAAATCTGTGG GTTGACCTGTTAGGGTGAGAAG	Externos
GD Nested	ACAGTTTCATGCCCATCGTC GCGTTTGTGTATGATATGTTTGC	Internos
ND3	CCTGCCACTAATAGTTATGTC GATATGAGGTGTGAGCGATA	-

3.5. ANÁLISES DOS DADOS

Os dados obtidos após os processos de PCR e Sequenciamento do DNA foram analisados com auxílio do software BioEdit 7.2.5 (Hall, 2013) para identificação e caracterização das alterações, e a criação de um banco de dados destas alterações no Microsoft Excel 2016[®] (Microsoft[©], 2016).

3.5.1. ANÁLISES ESTRUTURAIS

As regiões do mtDNA que codificam genes, quando encontradas alterações que resultassem na mudança dos aminoácidos traduzidos, foram submetidas a análise estrutural através de modelagem 3D de proteínas com o auxílio do software SWISS-MODEL (BIASINI et al., 2014).

3.5.2. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Após os registros das alterações no banco de dados, foram aplicados testes estatísticos com o objetivo de verificar a significância desses dados, conseqüentemente, validando-os ou descartando seu valor, de acordo com os critérios de cada teste e as características de cada dado avaliado isoladamente ou em comparação à outra variável adicional. Portanto, para consideração dos resultados, foram realizados os testes descritos abaixo de modo unilateral e/ou bilateral, e somente os valores de (p) menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes, e, em consequência, os iguais ou maiores que 0,05 foram considerados *borderlines* e estatisticamente inválidos, respectivamente.

As Análises estatísticas foram realizadas com auxílio dos programas BioEstat 5.0 (AYRES, 2008) e *Graphpad Prism* (Radushev, 2007). Para isso, as variáveis categóricas preditoras definidas para as análises estatísticas foram sexo (dicotômica), idade (quantitativa discreta) e grau de estadiamento tumoral (qualitativa ordinal); e as variáveis de desfecho foram presença/ausência de alteração nas regiões

propostas do DNA mitocondrial. Todas as variáveis de desfecho foram testadas com as preditoras. As hipóteses a serem testadas foram a existência (H_1) ou não (H_0) de relação das alterações no mtDNA com a doença neoplásica, neste caso, a comparação entre as amostras tumorais. Definidas as variáveis e delimitando que foram 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 ($p < 0,05$). 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 ($p < 0,05$), 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, análise multivariada relacionando mais de dois parâmetros preditores e/ou de efeito; a análise do Risco Relativo, que apesar de não ser um teste estatístico, é uma medida da força de associação entre um fator de risco e o desfecho; e o cálculo do *Odds Ratio*, cujo princípio é baseado na estimativa do risco relativo, ambos, em associação, são medidas importantes para avaliação das possíveis relações de causalidade e efeito.

4. RESULTADOS

Todas as amostras utilizadas neste trabalho são de tumores malignos de origem glial, sendo estas oito astrocitomas, dentre os quais foi incluída uma amostra de glioma angiocêntrico em razão da origem astrocitária em comum; dois oligoastrocitomas; três oligodendrogliomas; cinco ependimomas; um gliossarcoma; e, oito glioblastomas. Em relação ao grau de estadiamento tumoral, foram contadas duas amostras grau I; 10 amostras grau II; sete amostras grau III; e oito amostras grau IV (tabela 4).

As variáveis preditoras (gênero, idade, grau de estadiamento) foram pareadas duas a duas e analisadas estatisticamente a fim de se avaliar a distribuição da amostra. As 29 amostras foram compostas por 16 (55,55%) do gênero masculino e 13 (44,45%) do gênero feminino, onde as medianas etárias foram 56 e 27, respectivamente (figura 11). O estadiamento tumoral apresentou diferença quando dividido por gênero, onde as medianas ficaram em grau III para o gênero masculino e grau II para o feminino (figura 12).

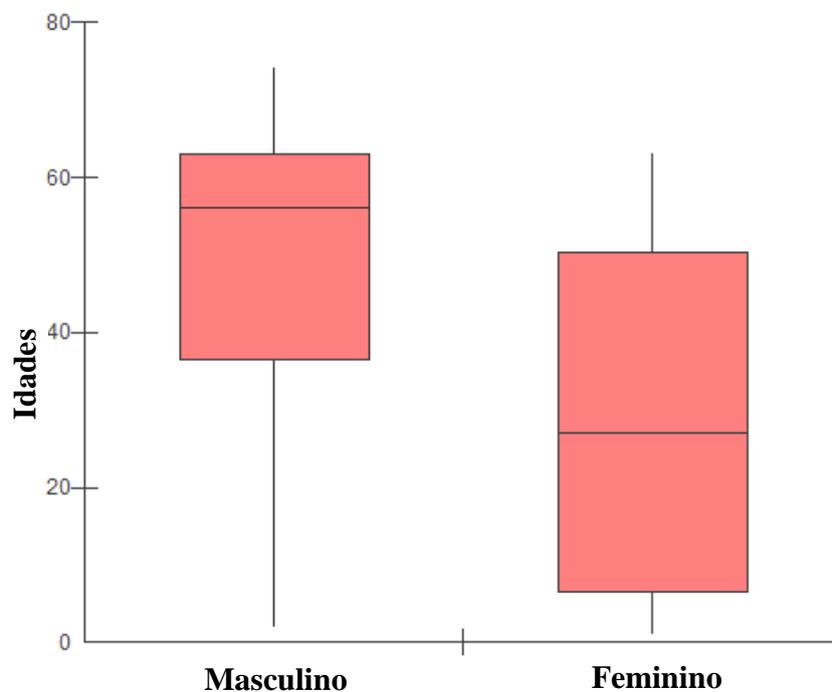


Figura 11: *Boxplot* ilustrando as faixas etárias das amostras utilizadas neste estudo, divididas por gênero

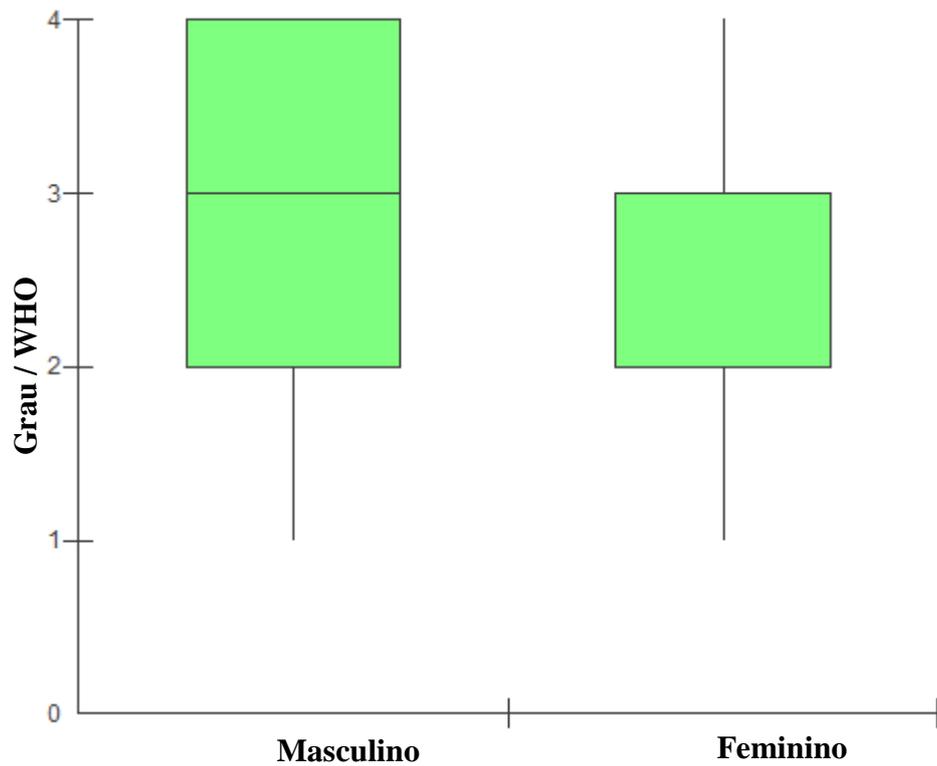


Figura 12: *Boxplot* ilustrando o grau de estadiamento tumoral distribuído de acordo com o gênero dos pacientes. Mediana masculina de grau 3, equivalente ao quartil superior das amostras do gênero feminino.

Quando comparadas as variáveis idade e grau tumoral (Tabela 7), os graus mais altos (III e IV) apresentaram as variâncias e desvios mais uniformes e com menor coeficiente de variação (figura 13).

Tabela 7: Distribuição etária das amostras de acordo com o grau tumoral.

Grau	I	II	III	IV
Tamanho da amostra	2	11	8	8
Mínimo	1	1	31	43
Máximo	30	64	64	74
Amplitude	29	63	33	31
Mediana	15,5	13	59	52,5
Variância	420,5	412,62	130,95	116,79
Desvio padrão	20,51	20,31	11,44	10,81
Coeficiente de variação	132,30%	108,05%	20,65%	19,56%

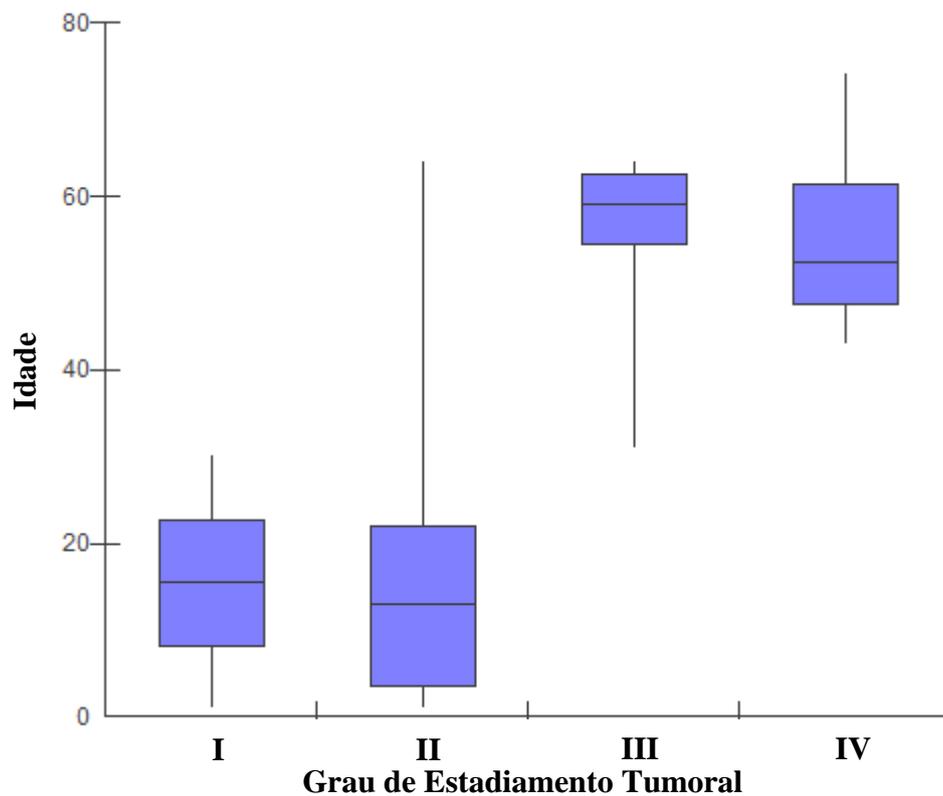


Figura 13: *Boxplot* ilustrando o grau de estadiamento tumoral distribuído de acordo com o gênero dos pacientes.

4.1. D-LOOP

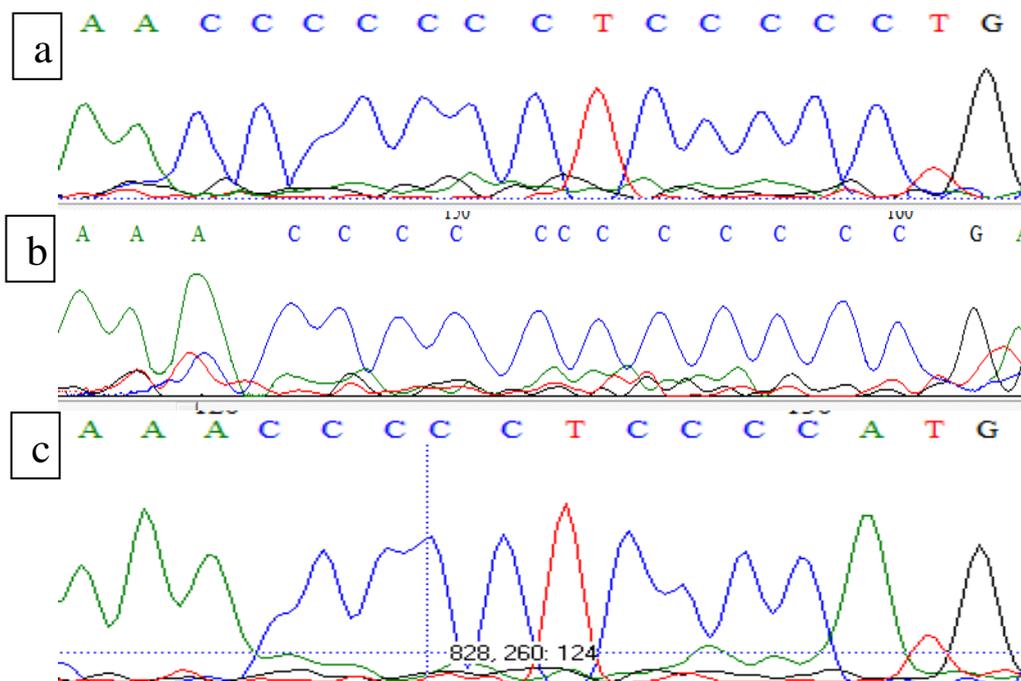
Após o sequenciamento das amostras, foram identificadas várias alterações nucleotídicas (Tabela 8) em comparação ao fragmento padrão (NC_012920.1). Todas as amostras apresentaram mais de uma alteração nucleotídica tanto em pontos isolados quanto em pontos de maior frequência, considerados *hotspots*. Os locais com maior índice de alteração nucleotídica foram o microssatélite observado entre as posições 303-315 (SHARMA *et al.*, 2005; MONTANINI *et al.*, 2005) e os polimorfismos A16139T, T16189C, ins16190CC e T16519C.

Na região do microssatélite 303-315, cujo o genótipo selvagem é 7CT5C, foram encontradas 13 amostras alteradas (figura 14), sendo 7 amostras com genótipo 5TC4C (referência do polimorfismo do inglês *Reference SNP rs66492218*), com frequência alélica de 16,65%; três amostras com o genótipo 12C (*rs369786048*), com frequência alélica de 10,71%.

Tabela 8: Alterações nucleotídicas (*D-LOOP*) encontradas em cada amostra

Amostras	Grau WHO	Gênero	Idade	Mutações				
				303-315	C16139A	T16189C	Ins16190CC	T16519C
CSN192	I	F	1			+		
CSN194	I	M	30	5CT4C				+
CSN077	II	F	1					+
CSN022	II	M	2			+		+
CSN038	II	F	2	5CT4C		+		+
CSN138	II	F	8	12C*				+
CSN010	II	F	12					+
CSN167	II	M	14					+
CSN095	II	M	19					+
CSN184	II	F	23	5CT4C				+
CSN126	II	F	34					+
CSN096	II	F	43					+
CSN136	II	M	64	4CT4C	+			+
CSN146	III	F	31	AT3C2TCTC				+
CSN102	III	F	54			+		
CSN031	III	F	55	5CT4C				
CSN190	III	M	59					+
CSN044	III	M	60			+		
CSN141	III	M	62	12C*				
CSN088	III	F	63					+
CSN047	III	M	64	12C*				
CSN073	IV	M	43					
CSN168	IV	M	46	5CT4C				
CSN199	IV	M	48	4CA6C		+		
CSN169	IV	F	49		+			
CSN193	IV	M	56					
CSN153	IV	M	60	5CT4C	+			+
CSN200	IV	M	66					
CSN198	IV	M	74	12C*		+	+	

Obs: *D310 (del310T)

**Figura 14:** Cromatograma da região do microsatélite 303-315 ilustrando os alelos (a) selvagem, (b) D310 e (c) 5CT4C.

Outras três alterações, cada uma em uma única amostra, 4CT4C; a 4CA6C, que possui uma transição T310A; e AT3C2TCTC, todas com frequência alélica de 3,45% cada. Os genótipos alterados não apresentaram diferença estatística significativa em comparação às demais alterações nem ao alelo selvagem quando avaliados os graus de estadiamento e as idades de cada classe.

Três amostras apresentaram a transversão A16139T, sendo dois GBM (grau IV) e um astrocitoma difuso (grau II). A média de idade das amostras com a alteração foi de 57,67 anos. A frequência alélica foi de 10,34% para o alelo mutante e 89,66% para o selvagem. O baixo número amostral não permitiu a realização de teste estatístico.

Foram encontradas seis amostras com a transição T16189C (rs28693675) (figura 15) e, dentre estas, uma com a INS16190CC (rs369574569), com as frequências alélicas de 24,14% para as mutantes e 75,86% para o alelo selvagem. Estas alterações não apresentaram diferença estatisticamente significantes em relação ao grupo com o alelo selvagem. O grupo alterado concentrou-se entre os tumores com graus mais baixos, porém, com faixa etária relativamente semelhante aos do grupo sem a alteração nessas regiões.

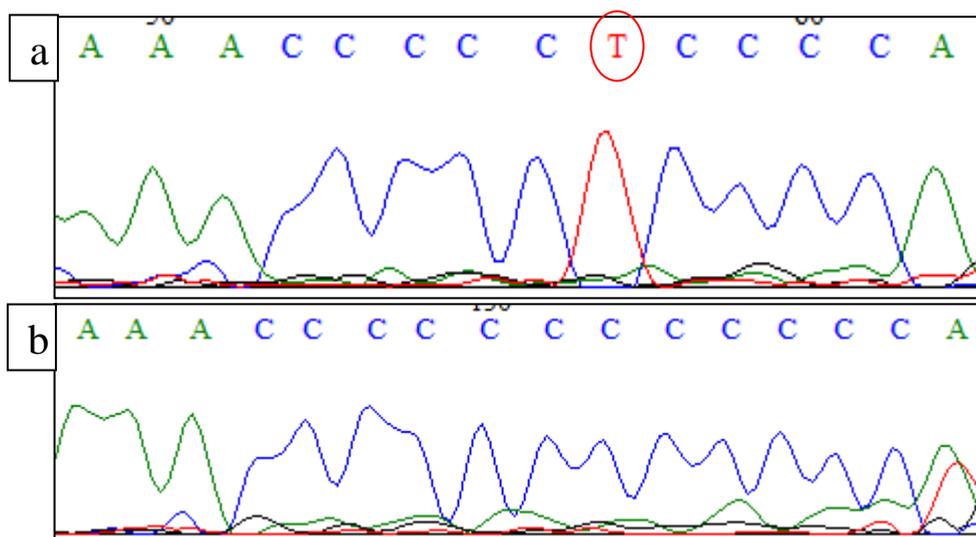


Figura 15: Cromatogramas do sítio 16189 ilustrando os alelos (a) selvagem e (b) mutante, após evento de transição T→C e a inserção de duas citosinas no referido sítio.

Foram encontradas 14 amostras com a transição T16519C (rs3937033) (figura 16), cujas frequências alélicas foram 48,28% para as amostras mutantes e 51,72% para as amostras com o alelo selvagem. O Teste t e o MW (figura 17) mostraram diferença significativa em relação ao grau de estadiamento do grupo com alelo selvagem, sendo que o alelo mutante apresentou média de 2,28 e o selvagem 3,2 (p-u 0,0035 e p-b 0,0071; MW p-u 0,0053 e p-b 0,0107).

Em relação às idades (figura 18), o grupo com alelo mutante apresentou mediana de 26,5 e selvagem de 54 anos. A análise destes dados através do teste de MW mostrou diferença significativa (p-u 0,0235 e p-b 0,0471) e, no teste t, a média etária mutante foi 29,14 enquanto a selvagem foi 49 anos (p-u 0,0098 e p-b 0,0196).

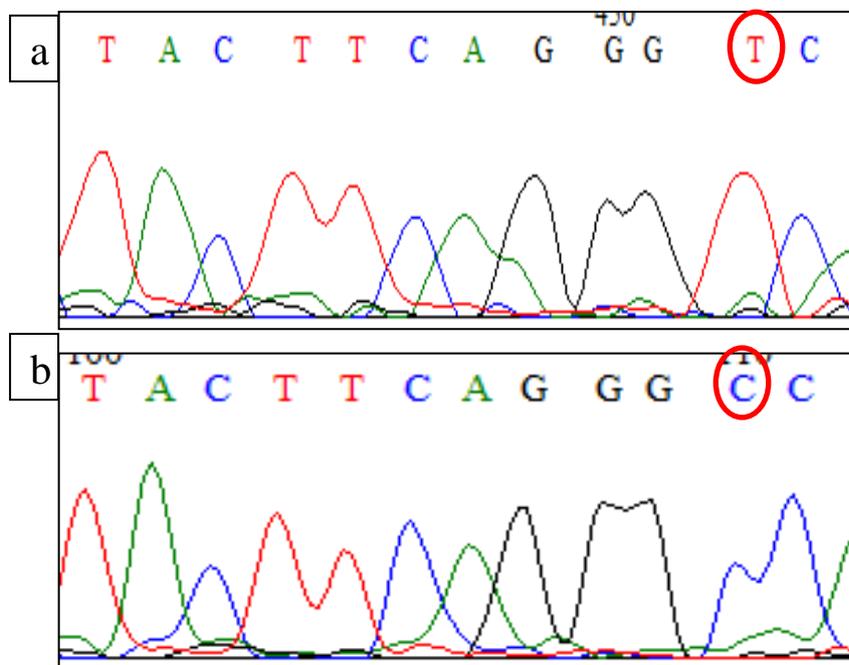


Figura 16: Cromatogramas do sítio 16519 ilustrando os alelos (a) selvagem e (b) mutante do polimorfismo T/C no referido sítio.

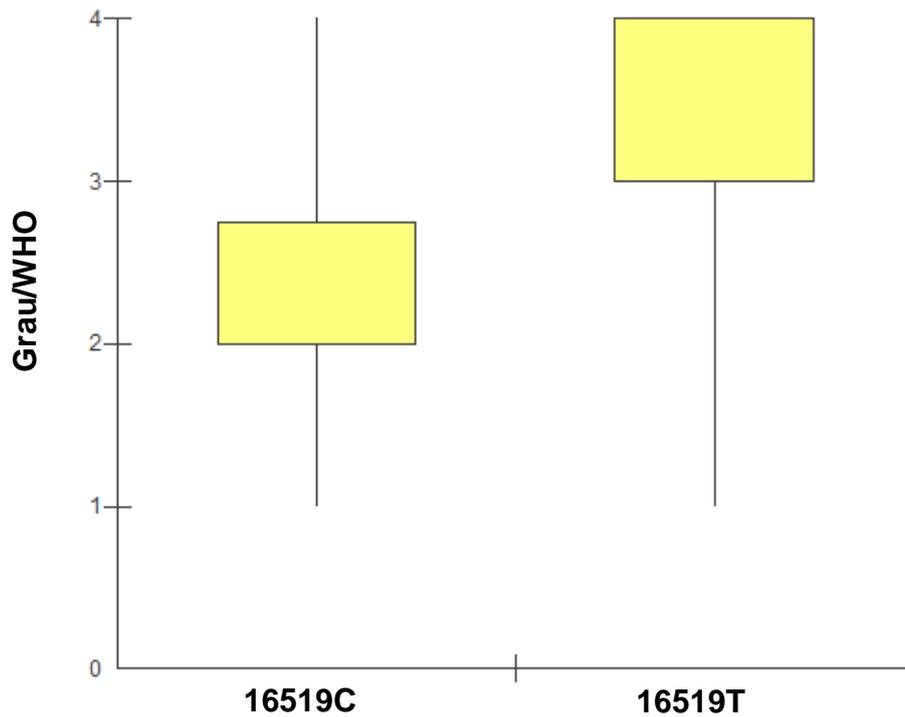


Figura 17: *Boxplot* ilustrando a diferença entre o grupo com a alteração T16519C e os alelos mutante (C) e selvagem (T) em comparação aos seus respectivos graus de estadiamento tumoral através do teste de MW.

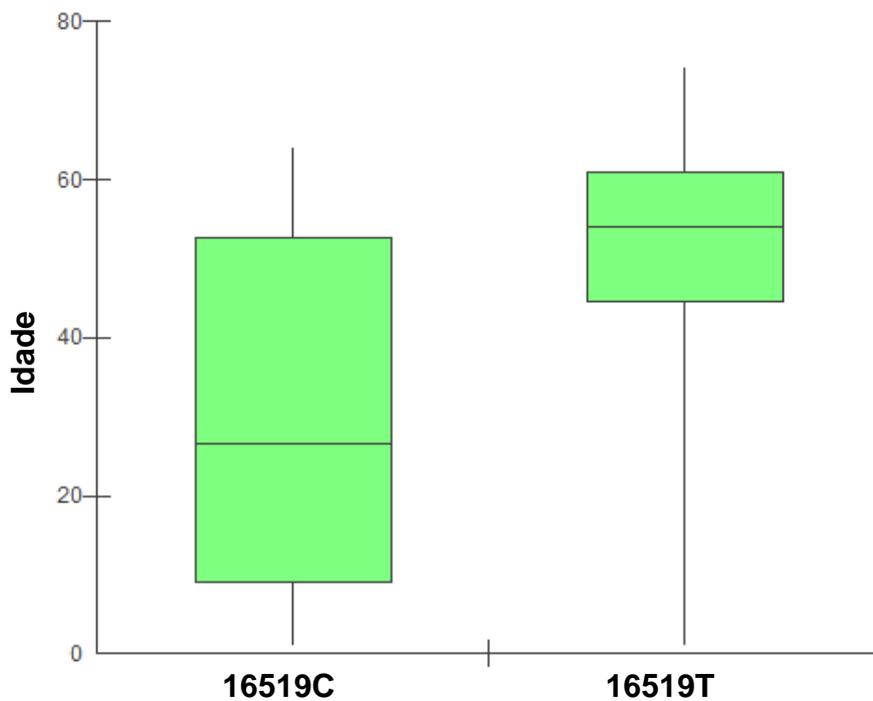


Figura 18: *Boxplot* ilustrando a diferença entre o grupo com a alteração T16519C. Alelo mutante (C) e selvagem (T) comparando as idades entre os dois grupos através do teste de MW.

Foram, também, observadas na região *D-LOOP* 17 alterações heteroplásmicas em 19 amostras (tabela 9). O teste de KS mostrou diferença estatisticamente significativa entre as amostras heteroplásmicas e as homoplásmicas em relação ao grau tumoral. As amostras heteroplásmicas concentraram-se entre as amostras de menor grau, porém, sem diferença significativa em relação às idades.

Tabela 9: Mutações heteroplásmicas observadas na *D-LOOP*.

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%	
	16118	2	6,89%	
T/G	16196	1	3,45%	
	16470	1	3,45%	

4.2 ND1

Este gene apresentou cinco alterações em 16 amostras (tabela 10), sendo estas quatro amostras com inserções 3883A, seis com a transversão T3552A (rs28358587), e 12 amostras com transições, sendo quatro G3880A e oito A3547G (rs28358586) (figura 19).

A inserção 3883A, quando submetida à análise estatística pelo teste de KS, comparando os graus tumorais entre as amostras com a inserção (mutante) e as sem (selvagem), apresentou significância com $(p) < 0,01$. Esta inserção gera uma mudança de aminoácido no códon 193 (Treonina \rightarrow Asparagina, ambos polares não carregados), seguida de uma mudança no quadro de leitura que culmina com o aparecimento de um códon de parada na posição 203, o que resulta em uma proteína com 115 aminoácidos a menos na sua porção amino-terminal (figura 22). As amostras com a transição A3547G também mostraram significância estatística ($p < 0,01$) nos mesmos parâmetros da alteração anterior (figura 20). A transversão T3552A, quando submetida ao teste ANOVA apresentou diferença estatisticamente significativa (tabela 10) em relação ao grau tumoral ($p = 0,02$) quando comparada às amostras com alelo selvagem. Em relação à transição G3880A (figura 21), não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as amostras mutantes e selvagens em comparação ao grau tumoral e/ou idade dos pacientes ($p > 0,05$).

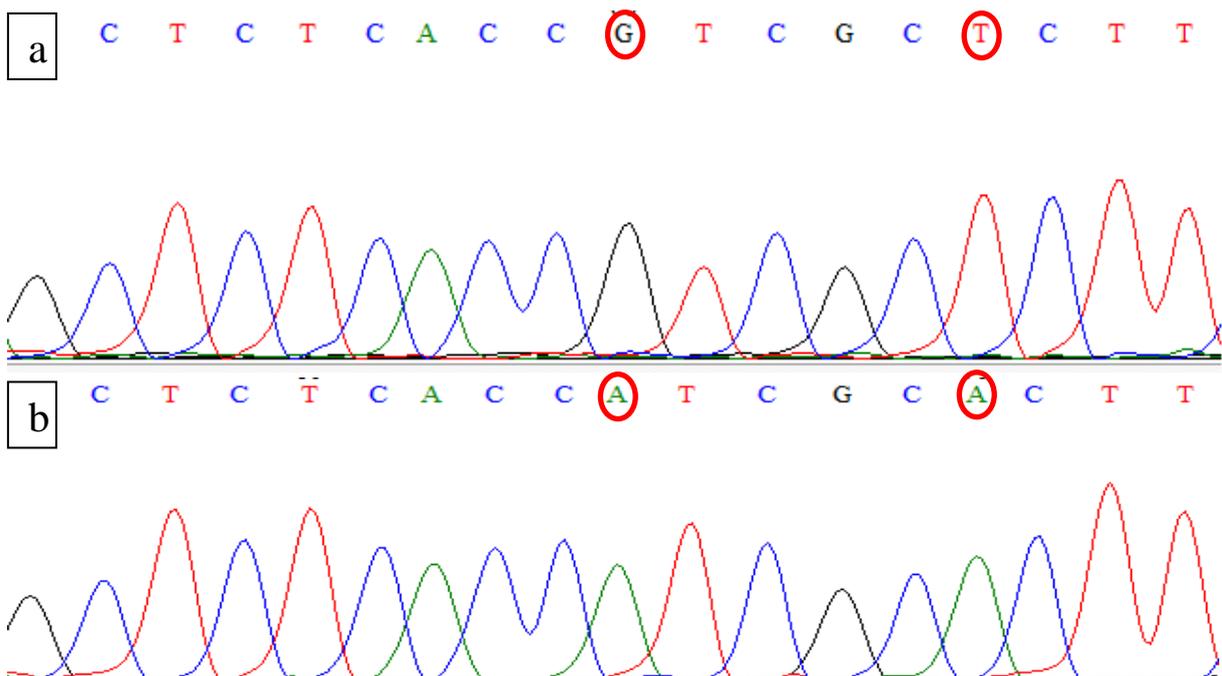


Figura 19: Cromatograma ilustrando a transição A3547G e a transversão T3552A e os alelos (a) selvagem e (b) mutante.

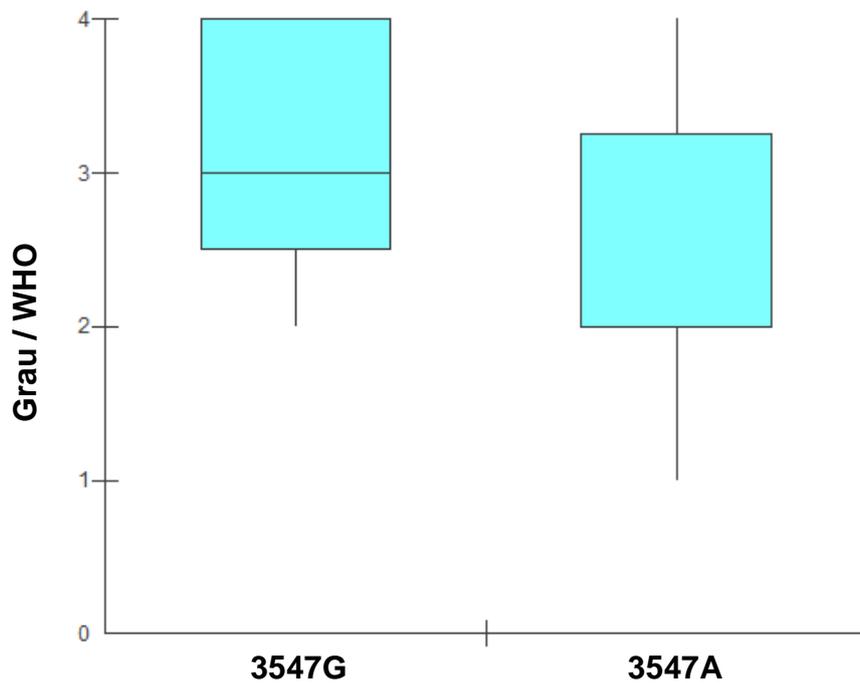


Figura 20: *Boxplot* comparando a transição A3547G no alelo mutante (G) e o selvagem (A) em relação ao grau de estadiamento das amostras.

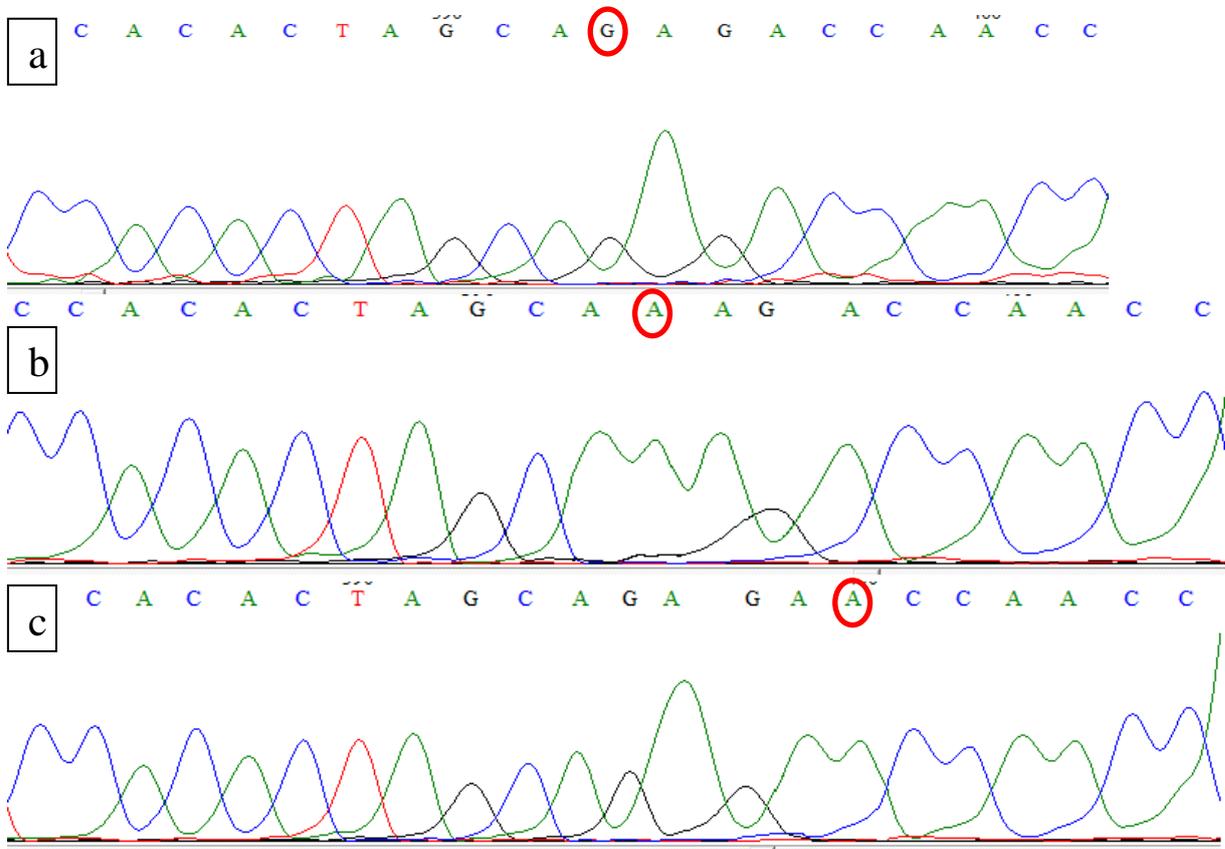
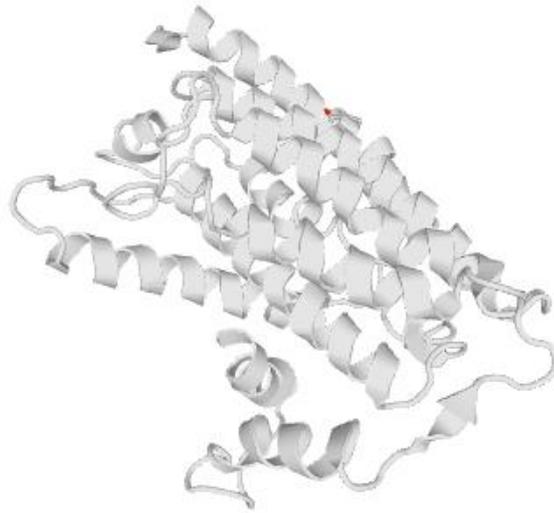


Figura 21: Cromatogramas ilustrando a transição G3880A comparando os alelos (a) selvagem, (b) mutante; e a (c) inserção ins3883A em destaque.

a



b



Figura 22: Estruturas 3D comparando o complexo I mitocondrial (a) normal e (b) após a ins3883A. Atenção para os tamanhos das duas proteínas, e seus respectivos índices de solvatação e torção. **Fonte:** obtida através de modelagem via Swiss-Model (BIASINI et al., 2014).

Tabela 10: Frequência das alterações encontradas com base no tipo histológico.

Tipo tumoral/WHO		Astro	Oligoas	Oligod	Epend	Glios	GBM	(p)
Região	Alteração	I-III	II-III	II	II-III	III	IV	
ND1	INS3883A ^B	1	-	-	2	-	1	<0,01
	A3547G ^a	2	1	2	2	-	1	<0,01
	T3552A	2	-	1	-	-	3	0,02
	G3880A ^b	1	1	-	1	-	1	ns
ND3	DEL10358A ^B	2	-	-	-	-	1	0,065
	G10398A ^a	5	-	2	2	1	4	ns
	T10400C	4	-	2	1	-	4	ns
ND5	C13506T	-	-	-	-	1	-	ns
mt-CO1	A7131T ^{a,b}	-	1	-	-	-	-	ns
	G7092A ^b	-	1	-	-	-	-	ns
	T7173C ^{a,b}	-	1	-	-	-	-	ns
	DEL7175T ^b	-	-	-	1	-	1	ns
	DEL7177T ^b	1	1	1	1	-	-	ns
	DEL7181C ^b	1	1	1	1	-	1	<0,05
	REARRANJO	3	-	-	-	-	2	ns
	HP7171C/T	-	-	-	-	-	1	ns
mt-CO2	HP7835-39	2	2	1	2	1	1	ns
	C8217T ^b	-	-	-	-	1	-	ns
	G8251A	-	-	-	-	1	-	ns
	DEL8244A	7	2	-	2	1	5	0,014
	T8260C ^b	-	-	-	2	-	-	ns
	DEL8271-79	2	1	-	2	-	-	ns
mt-CO3	T9540C/G	1	-	-	1	-	5	0,05
	DEL9541T ^a	3	2	-	3	-	3	ns
	DEL9545A	-	-	-	-	-	3	ns
	DEL9548G	2	1	-	-	-	-	ns
	HP9588G/A	4	1	3	1	1	3	0,06
ATP6	G8584A ^a	-	-	-	-	-	1	ns
	G8994A	-	-	-	-	1	-	ns
	HP9008C/T	1	-	-	-	-	-	
	HP9022G/A	1	1	-	-	-	-	
	HP9043C/G	-	-	-	-	-	2	ns
	HP9053G/T	1	-	-	-	-	2	
ATP8	A8401G ^b	-	-	-	1	-	-	ns
	C8414T ^a	1	-	-	-	-	-	ns
	A8422G ^b	-	-	-	1	-	-	ns
	C8468T ^a	-	-	-	-	1	-	ns
Deleção 4977pb		8	2	3	2	1	6	
tRNA-Lisina	T8306A ^b	-	-	-	-	-	1	ns
	T8310A ^b	-	-	-	1	-	-	ns
	T8325G ^b	-	-	-	1	-	-	ns
	A8327G ^b	-	-	-	1	-	-	ns
	T8337G ^b	-	-	-	1	-	-	ns
Outras heteroplasmias		-	2	-	1	-	5	0,021
Total de amostras por tipo histológico		8	2	3	5	1	8	

*incluída 1 amostra de glioma; ^a com alteração de aminoácido; ^b nova alteração; astro: astrocitomas; oligoas: oligoastrocitomas; oligod: oligodendroglomas; epend: ependimomas; glios: gliossarcomas; GBM: glioblastoma multiforme.

4.3. *ND3*

O gene mitocondrial que codifica a subunidade *ND3* do mesmo complexo apresentou três alterações em 16 amostras, das quais três possuíam a deleção 10358A, 14 a transição G10398A (rs2853826) e 11 a transição T10400C (rs28358278).

As amostras com a deleção 10358A não apresentaram diferença estatística significativa quando comparada às amostras sem a deleção em relação à idade ($p = 0,16$) e ao grau de estadiamento tumoral ($p = 0,06$) no teste de MW. As transições G10398A e T10400C (figura 23), quando avaliadas separadamente, não apresentaram diferença significativa entre as amostras com o alelo selvagem e controle. Porém, quando estas mesmas alterações foram avaliadas simultaneamente, mostraram um aumento do risco de 61,09% para a doença de alto grau em relação às demais amostras, com intervalo de confiança de 95% (IC) entre 2,37 e 16,88 no teste de *Odds Ratio*, com (p) = 0,003.

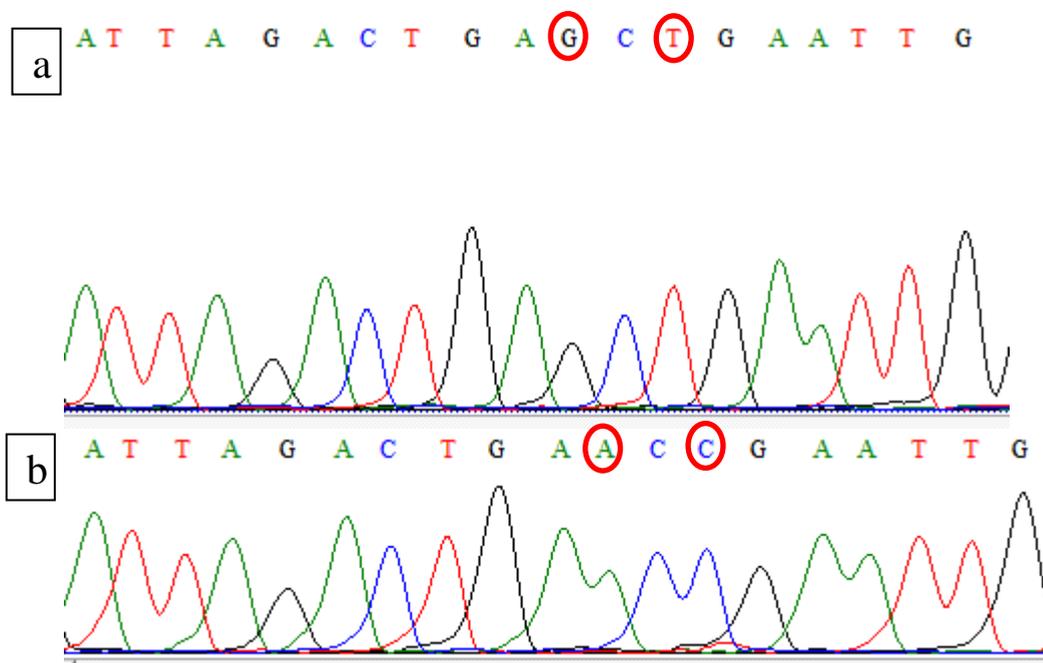


Figura 23: Cromatogramas ilustrando amostra com alelo selvagem (a) e mutante (b) após as alterações G10398A e T10400C na mesma amostra.

4.4. *ND5*

O gene que codifica a subunidade *ND5*, também do complexo I, apresentou a transição C13506T (rs2857287) (figura 24) em apenas uma amostra de gliossarcoma, sem diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo mutante e selvagem, relacionados ao grau tumoral e idade dos pacientes, testados com MW ($p > 0,05$), teste t ($p > 0,05$), KS ($p > 0,05$) e ANOVA ($p > 0,05$), além de não terem apresentado risco nos mesmos parâmetros na análise do Risco Relativo ou *Odds Ratio* ($p > 0,05$).

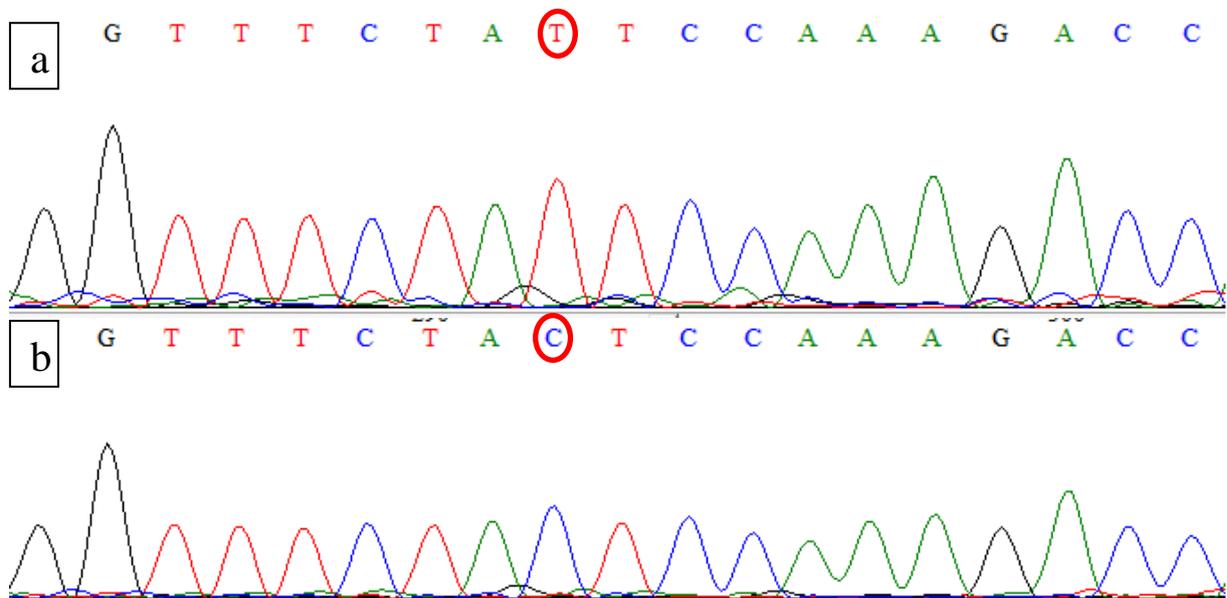


Figura 24: Cromatogramas comparando os alelos (a) mutante e (b) selvagem em relação à transição C13506T.

4.5. *mt-CO1*

A região que codifica a *CO I*, do complexo mitocondrial IV apresentou oito alterações em 19 amostras (Tabela 10), sendo uma com a transversoão A7131T, duas com as transições G7092A e T7173C; três deleções DEL7175T (rs28358874 refere apenas alelos C/T), del7177T e del7181C; uma com a heteroplasmia HP7171C/T; e um rearranjo de repetição invertida em cinco amostras (figura 25).

A alteração DEL7181C (figura 26) apresentou diferença estatística significativa do grupo sem alteração quando comparados em relação à idade, no teste

de MW ($p = 0,01$) (figura 27). As demais amostras não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo não alterado quando comparadas as idades e o grau de estadiamento tumoral através dos testes de MW ($p > 0,05$), KS ($p > 0,05$), teste t ($p > 0,05$), ANOVA ($p > 0,05$), não apresentando, também, aumento do risco para a doença neoplásica através dos testes de OR e RR ($p > 0,05$ em ambos).

Homo sapiens haplogroup U4a2 mitochondrion, complete genome

GenBank: KX594326.1

[GenBank](#) [FASTA](#)

[Link To This Page](#) | [Feedback](#)

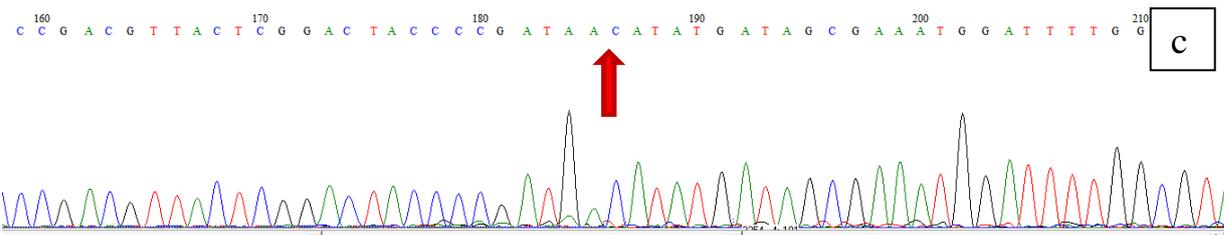
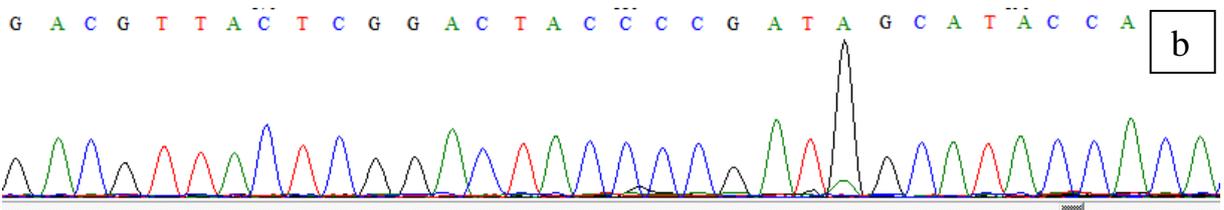


Figura 25: (a) Imagem do *NCBI Blast Nucleotide* ilustrando o pareamento da sequência inserida no *Genbank*; (b) cromatograma normal e (c) com seta apontando o início do segmento reverso duplicado no novo rearranjo encontrado no mtDNA.

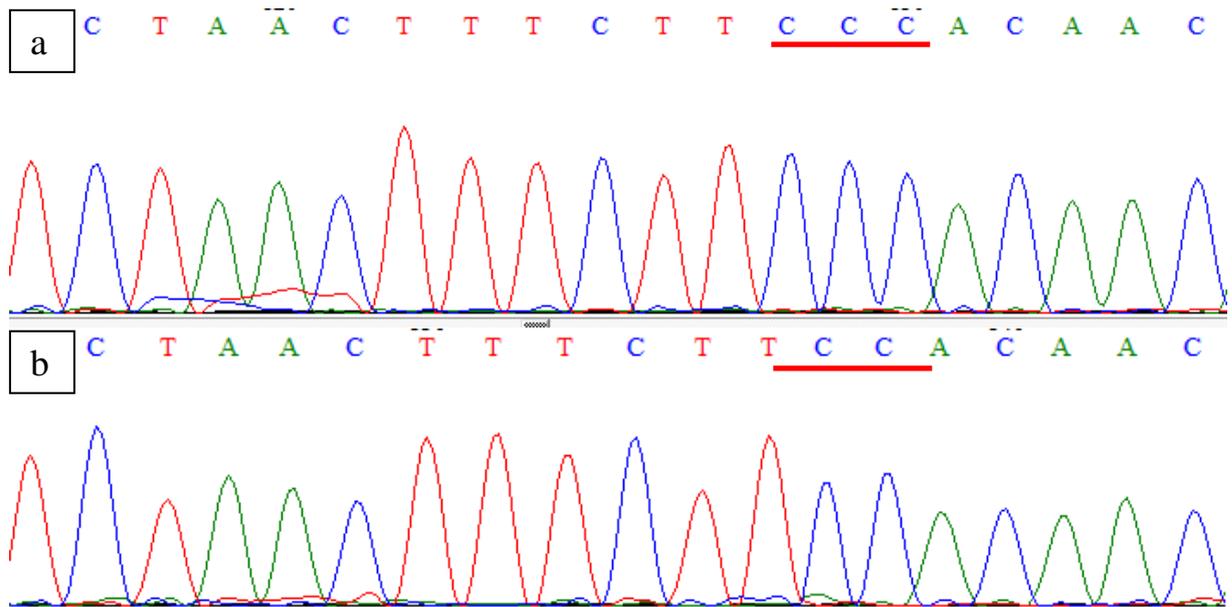


Figura 26: Cromatogramas ilustrando a alteração del7181C em relação aos alelos (a) selvagem e (b) mutante, com destaque para a citosina deletada (círculo).

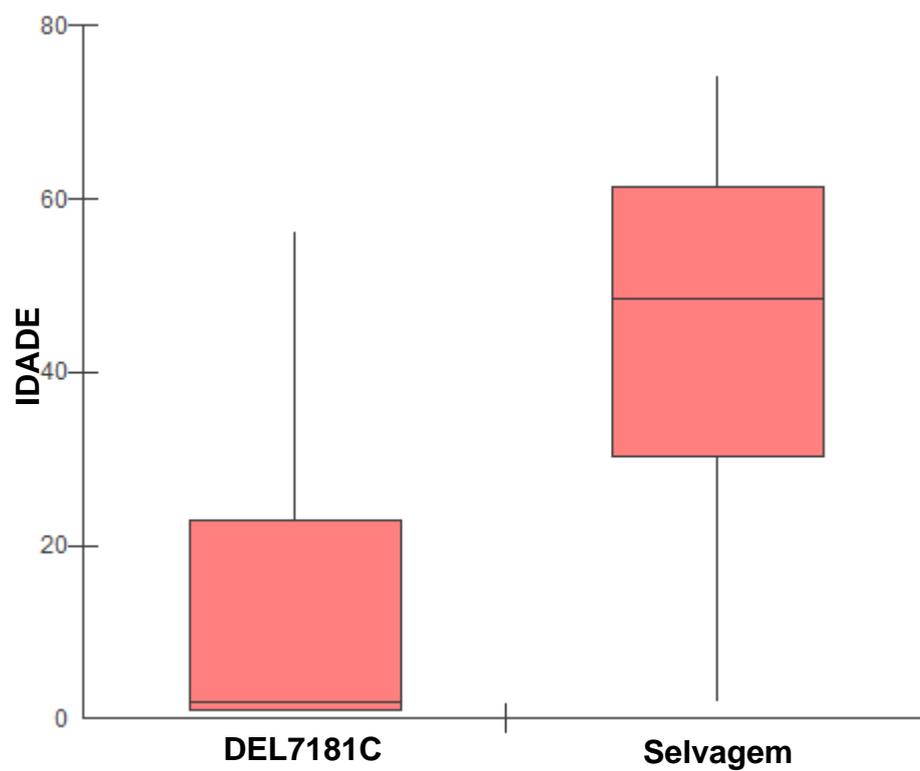


Figura 27: *Bloxplot* comparando as medianas etárias em relação às amostras com a Deleção7181C e o alelo selvagem (MW p-u 0,0134 / p-b 0,0267).

4.6. *mt-CO2*

A região *mt-CO2* apresentou seis alterações, a heteroplasmia de cinco nucleotídeos HP7835-39 em nove amostras tumorais; as transições C8217T, G8251A (rs3021089) em uma mesma amostra e a transição T8260C em outras duas amostras; além das deleções DEL8244A (figura 28) e DEL8271-79 (rs371604158) (figura 29).

Outra alteração observada na *mt-CO2* foi um novo rearranjo (figura 25), em cinco amostras, no qual ocorre a inversão entre as cadeias pesada e leve do mtDNA, seguido da duplicação de um segmento de cerca de 94 pb da cadeia leve, da posição 7074 à 7168, aproximadamente, ligando-se na cadeia pesada a partir da posição 7238.

A DEL8244A, presente em 17 amostras, sendo estas, 7 astrocitomas (87,5%), 2 oligoastrocitomas (100%), 2 ependimomas (40%), 1 gliossarcoma (100%) e 5 GBM (62,5%), mostrou diferença estatística significativa em relação ao alelo selvagem em comparação ao grau tumoral através do teste de MW com $(p) = 0,014$ (tabela 10). Esta deleção foi identificada em 5 amostras de grau IV, 6 amostras de grau III, 4 de grau II e 2 de grau I.

As demais alterações, tanto as transições quanto o rearranjo, não evidenciaram diferença significativa quando comparadas as idades e grau tumoral em relação às amostras do grupo selvagem em comparação ao grau de estadiamento tumoral e à faixa etária dos grupos mutante e selvagem, submetidos aos testes MW, KS, teste t, ANOVA ($p > 0,05$), assim como também não evidenciaram aumento do risco nos testes de OR e RR ($p > 0,05$).

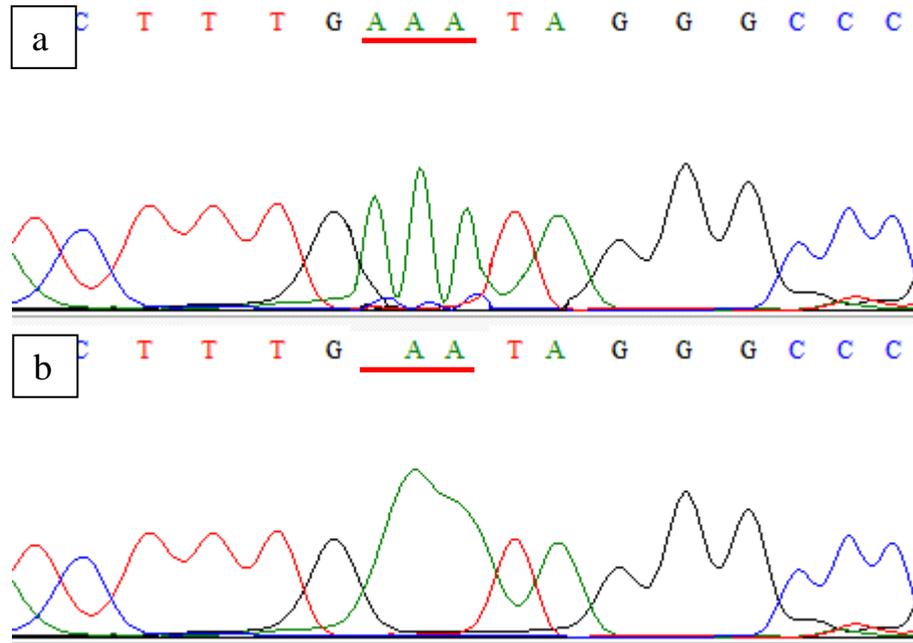


Figura 28: Cromatogramas ilustrando amostra com alelo (a) selvagem e (b) mutante em relação à alteração del8244A, com destaque para a adenina no alelo selvagem que sofre a excisão.

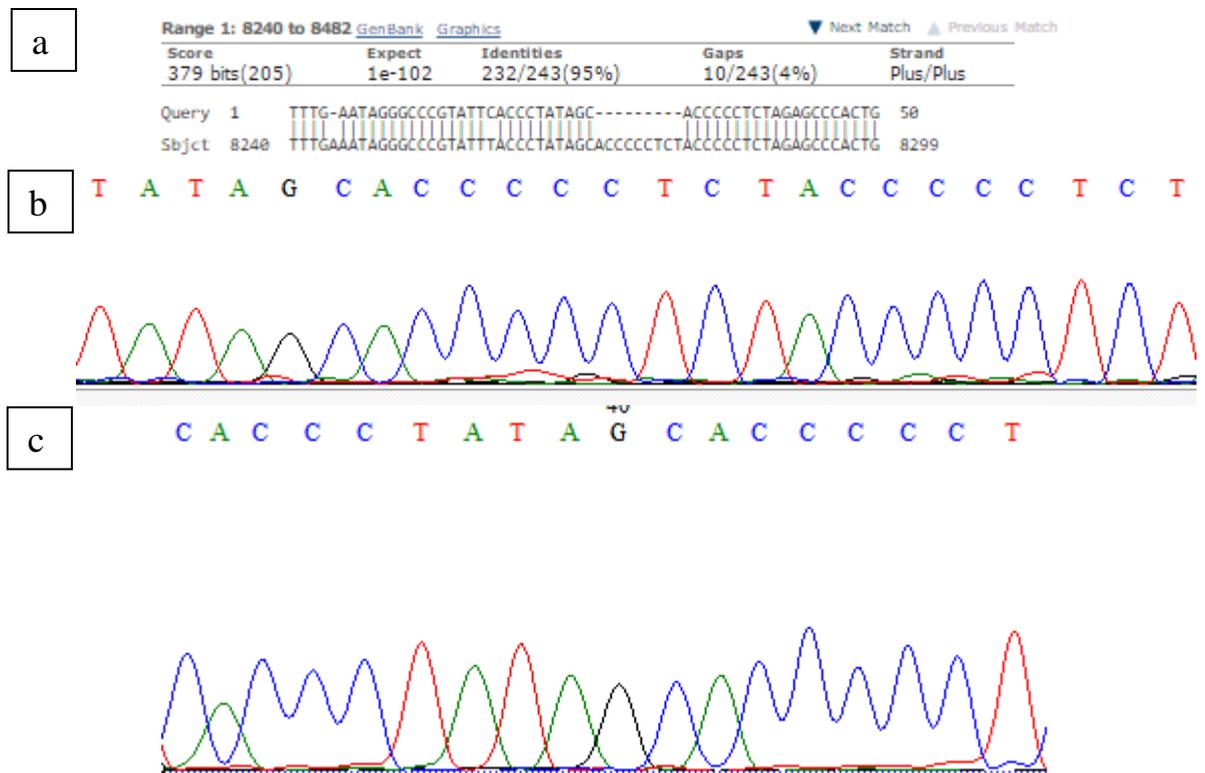


Figura 29: Comparação entre a (a) região da deleção DEL8271-79; (b) cromatogramas ilustrando o alelo selvagem e (c) após a deleção DEL8271-79 (- / ACCCCC).

4.7. *mt-CO3*

A região *CO III* apresentou uma alteração trialélica denominada T9540C/G (rs2248727) em sete amostras: cinco GBM, um astrocitoma com o alelo C e um ependimoma com o alelo G. Apresentou, ainda, outras três deleções: del9541T em 11 amostras; del9545A em três amostras e del9548G (rs386829084 somente com os alelos C/T) em outras três amostras; além de uma heteroplasmia denominada HP9558G/A em 13 amostras.

A alteração T9540C/G (figura 30) mostrou diferença estatística limítrofe ou *borderline* dos grupos com alelos mutantes e selvagem, quando testados através de MW em relação ao grau tumoral ($p= 0,05$) (figura 31), não apresentando significância em relação às idades ou quando submetidas aos demais testes. A heteroplasmia HP9558G/A também se mostrou limítrofe nos mesmos parâmetros ($p= 0,06$). As demais alterações não evidenciaram diferença significativa quando avaliadas as idades e grau de estadiamento nos testes MW, KS, teste t, ANOVA, OR ou RR ($p > 0,05$).

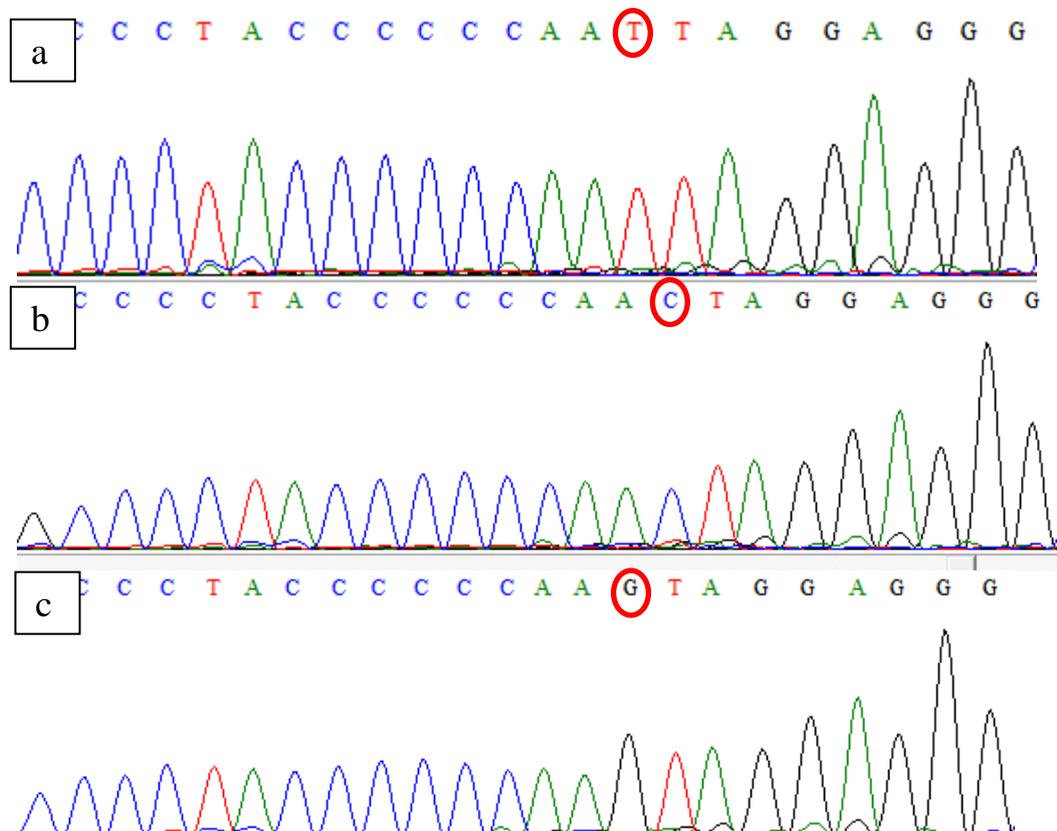


Figura 30: Cromatogramas comparando os alelos (a) selvagem, (b) mutante C e (c) mutante G em relação à alteração T9540C/G, com destaque para o nucleotídeo alterado (T) e os alelos resultantes de transição (C) e transversão (G).

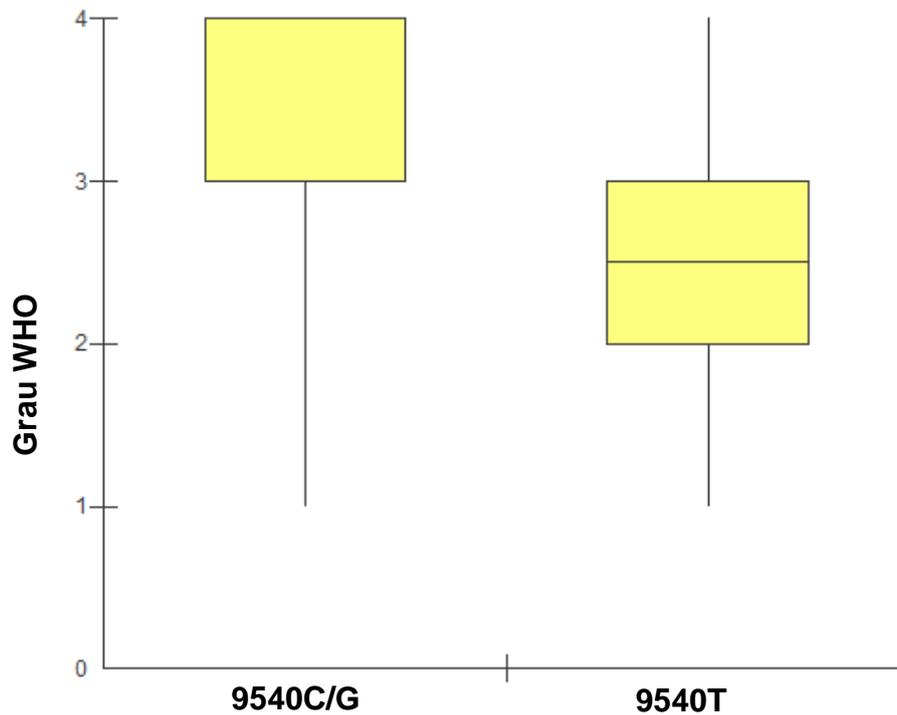


Figura 31: *Boxplot* comparando as amostras alteradas 9540C/G e o alelo selvagem 9540T em relação ao grau tumoral de ambos os grupos (MW 0,05).

4.8. ATP6

A região que codifica a subunidade *ATP6* do complexo V apresentou três alterações as quais foram as transições G8584A (rs3135028) e G8994A (rs28358887), uma em cada amostra; e a heteroplasmia HP9043C/G em duas amostras (figura 32).

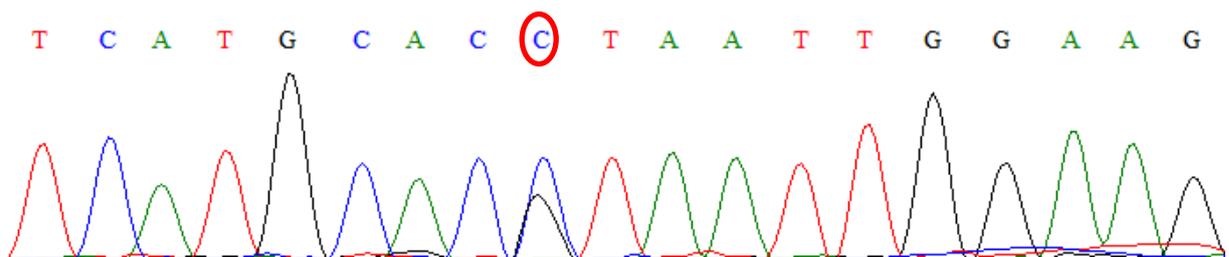


Figura 32: Cromatograma ilustrando a heteroplasmia HP9043C/G no gene da ATPase 6 das amostras tumorais estudadas.

As transições encontradas neste gene não mostraram diferença estatisticamente significativa em relação ao alelo selvagem quando comparadas as idades e grau de estadiamento tumoral nos testes deste estudo ($p > 0,05$). A heteroplasmia, semelhantes às transições, também não mostraram diferença significativa ($p > 0,05$) nas mesmas comparações.

4.9. *ATP8*

A região da subunidade 8 do gene da ATPase, também pertencente ao complexo V mitocondrial e apresentou quatro transições as quais foram A8401G em uma amostra, C8141T em uma amostra, A8422G em uma amostra e C8468T (rs1116907), também em uma amostra. As alterações encontradas neste gene, quando comparadas as idades e grau de estadiamento tumoral das amostras alteradas e não alteradas, não evidenciaram diferença estatisticamente significativa nos testes utilizados neste estudo, tanto, testadas individualmente quanto, quando testadas de forma agrupada, nos testes de MW, KS, teste t, ANOVA ($p > 0,05$) e sem aumento do risco para o câncer de sistema nervoso em relação ao grupo sem estas alterações nos testes de OR e RR ($p > 0,05$).

4.10 DELEÇÃO 4977pb

Das amostras analisadas, 22 (75,86%) apresentaram a deleção de 4977pb (figuras 33-35), sendo que, das amostras que não possuíam a deleção, três eram ependimomas e dois glioblastomas. As amostras com deleção, não evidenciaram diferença estatisticamente significativa em relação às amostras sem a alteração nos testes de MW ($p > 0,05$), KS ($p > 0,05$). Além disso, não foi possível realizar o teste t em razão do tamanho amostral do grupo selvagem (cinco amostras), o que retorna o valor crítico como não confiável em relação às idades, devido à discrepância entre média (38,8 anos) e mediana (54 anos) deste grupo, estando acima do limite do

intervalo de confiança. A deleção, isoladamente, não aumentou o risco (OR e RR) para a doença neoplásica ($p > 0,05$).

Quando associada às amostras heteroplásmicas, esta deleção mostrou diferença significativa em relação às amostras selvagens quando submetidas ao teste de MW (p -unilateral = 0,026 e p -bilateral = 0,042) e ao teste t (p -unilateral = 0,0179 e p -bilateral = 0,035) em relação ao grau de estadiamento tumoral (figura 36).

Esta deleção, para análise estatística, também foi associada às alterações presentes nos genes *ND1* e *ND3*. Embora o gene *ND3* apareça deletado no genoma com a deleção 4977pb, vale ressaltar que o alto número de cópias do mtDNA garante a presença do mesmo na célula.

Quando associada às alterações presentes no gene *ND1*, o teste de OR mostrou um aumento do risco absoluto de 36,36% e um aumento do risco relativo de 14% para a doença neoplásica (IC 95% 1,02 – 1,68; $p = 0,0174$). Quando associada às alterações presentes no gene *ND3*, através do teste de OR, foi observado um aumento do risco absoluto de 31,82% e do risco relativo de 36% (IC 95% 1,14 – 1,85; $p = 0,0351$). Porém, quando avaliada a associação entre as deleções 4977pb, as alterações no gene *ND1* e *ND3*, simultaneamente, houve uma redução no risco relativo de 85% e no risco absoluto de 77,27% no teste de OR (IC 95% 0,0238 – 0,9815; $p < 0,0001$).

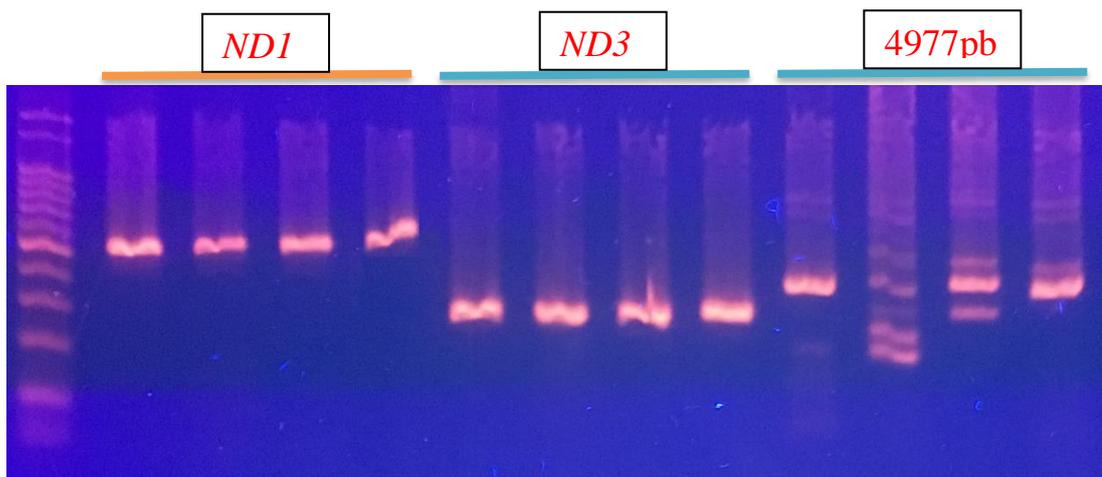


Figura 33: Gel de agarose a 2% comparando os fragmentos amplificados de *ND1*, *ND3* e o fragmento com a região em que ocorre a deleção 4977pb. Os fragmentos de *ND1* e *ND3* apresentam padrão homogêneo enquanto o da região da deleção 4977pb mostra-se heterogêneo, especialmente o poço 11, sem a deleção. (1) ladder; (2-5) *ND1*; (6-9) *ND3*; (10, 12 e 14) amostras com a deleção e (11) sem a deleção.

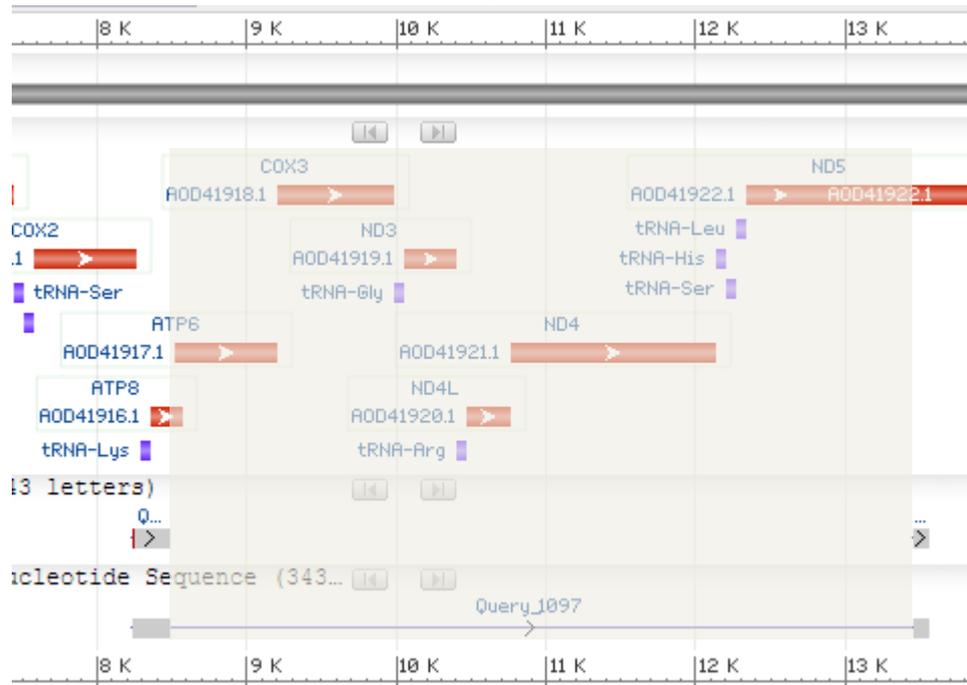


Figura 34: Ilustração obtida após inserir sequência no *NCBI Blast*. Detalhe para a área de deleção abrangendo vários genes mitocondriais e codificantes de RNA transportadores.

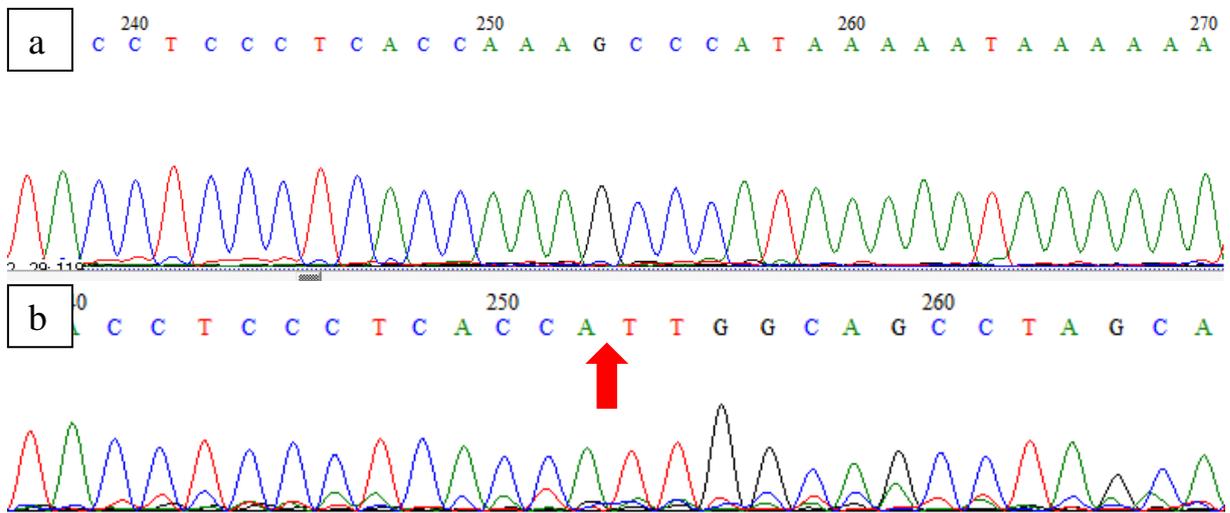


Figura 35: Cromatogramas ilustrando a sequência sem a deleção 4977pb e (b) com a deleção, onde ocorre a junção dos nucleotídeos 8482 com o 13460 (seta).

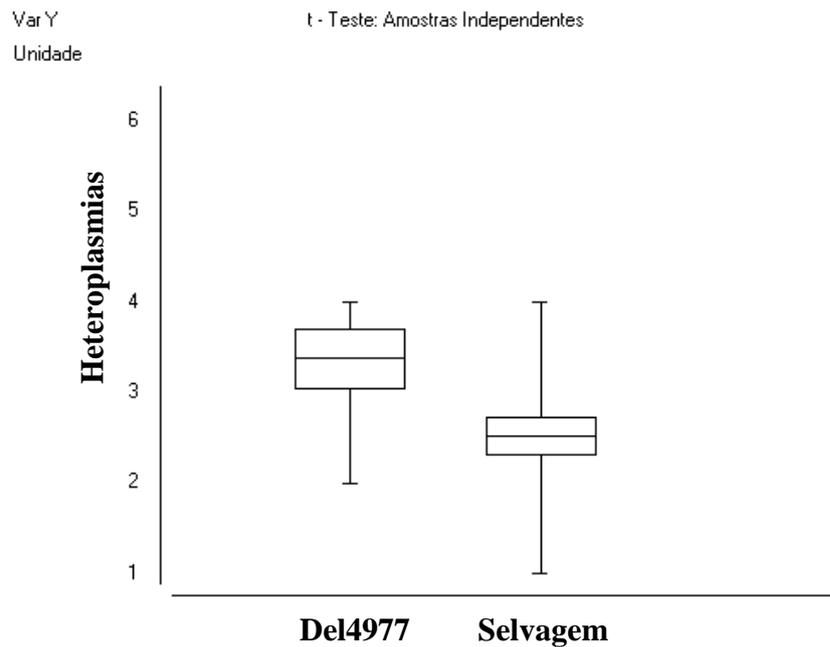


Figura 36: *Boxplot* comparando o grau de estadiamento tumoral entre os grupos com a deleção 4977 e selvagem, relacionando-os com o número de heteroplasmas ocorridas em ambos os grupos. O grupo de amostras heteroplásmicas com a deleção demonstrou predomínio de maior grau tumoral em relação ao grupo sem a deleção.

4.11. ALTERAÇÕES NO tRNA-LISINA

A região que codifica o RNA transportador de lisina (tRNA-lis) apresentou cinco alterações as quais foram a T8306A em uma amostra de GBM; e as demais, T8310A, T8325G, A8327G e T8337G todas em ependimomas. Estas alterações, após serem submetidas aos testes utilizados neste estudo, tanto por alteração isolada quanto agrupadas no conjunto da região codificante do tRNA-lis, não evidenciaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) quando comparadas com as amostras sem alteração.

Tabela 11: Análise de Variância das alterações encontradas.

ANOVA					
		Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	(p)
DEL4977pb	Entre Grupos	,075	3	0,025	0,858
	Nos grupos	4,415	45	0,098	
	Total	4,490	48		
Del8244A	Entre Grupos	2,306	3	0,769	0,014
	Nos grupos	8,796	45	0,195	
	Total	11,102	48		
Heteroplasmia	Entre Grupos	22,567	3	7,522	0,021
	Nos grupos	94,494	45	2,100	
	Total	117,061	48		
G10398A	Entre Grupos	1,029	3	0,343	0,261
	Nos grupos	11,175	45	0,248	
	Total	12,204	48		
T10400C	Entre Grupos	,000	3	0,000	0,172
	Nos grupos	,000	17	0,000	
	Total	,000	20		
Del8271-79	Entre Grupos	1,039	3	0,346	0,074
	Nos grupos	6,308	45	0,140	
	Total	7,347	48		
A3547G	Entre Grupos	,435	3	0,145	0,673
	Nos grupos	12,626	45	0,281	
	Total	13,061	48		
Ins3883A	Entre Grupos	,093	3	0,031	0,870
	Nos grupos	5,907	45	0,131	
	Total	6,000	48		
T3552A	Entre Grupos	1,942	3	0,647	0,025
	Nos grupos	8,466	45	0,188	
	Total	10,408	48		
Del10358	Entre Grupos	,773	3	0,258	0,065
	Nos grupos	4,492	45	0,100	
	Total	5,265	48		

5. DISCUSSÃO

Sabe-se que o acúmulo de mutações no mtDNA está relacionado com o aumento da taxa de proliferação celular e a inibição da apoptose. Células cancerosas se adaptam a fim de maximizar suas habilidades de sintetizar substratos para membranas, ácidos nucleicos e proteínas, aumentando a taxa de proliferação, fator chave destas células (DING et al., 2010). A ausência de histonas no mtDNA é um fator que contribui para a ocorrência de mutações neste genoma, visto que essas proteínas desenvolvem um papel protetor no nDNA. Além disso, deve-se levar em conta a baixa atividade da enzima mtDNA-polimerase em comparação à polimerase do nDNA e também o reparo genômico ineficiente dependente da excisão de nucleotídeos (KASSEM et al., 2011).

A mitocôndria está encarregada de manter o balanço energético celular e também está envolvida no disparo da apoptose em resposta ao estresse oxidativo (YUSOFF et al., 2015). A modificação do perfil metabólico das células tumorais dos mais variados tipos histológicos tem atraído a atenção para as alterações respiratórias nas células em frequente processo de mitose.

O rápido crescimento, ao demandar vascularização imediata, nem sempre é acompanhado na mesma velocidade pelo processo de angiogênese, cuja baixa taxa de oxigênio aumenta os níveis de ROS, e as chances de morte celular (FEICHTINGER et al., 2014). Deste ponto em diante, se a célula não modificar seu metabolismo, pode iniciar um processo de necrose ou mesmo de apoptose (FEICHTINGER et al., 2014; JAROSZ et al., 2016).

Esta adequação no metabolismo tumoral, é provável que seja decorrente de várias alterações nos genomas mitocondrial e nuclear, tornando a célula mais adaptada à baixa tensão de oxigênio, passando a nutrir-se a partir de outras fontes de energia (YAKES; VAN-HOUTEN, 1997; PUTIGNANI et al., 2008; FEICHTINGER et al., 2014).

As alterações encontradas neste estudo podem ajudar a elucidar o papel do genoma mitocondrial na gênese tumoral, especialmente no câncer de sistema nervoso de origem glial.

5.1. *D-LOOP*

Acredita-se que algumas mutações somáticas que ocorrem na *D-LOOP* estão relacionadas com a diminuição do número de cópias do mtDNA e consequente decaimento do metabolismo celular, levando a célula a demandar energia da via glicolítica. No entanto, o aumento do número de cópias do mtDNA pode também estar associado a uma tentativa de compensação necessária à proliferação celular (CHATTERJEE; MAMBO; SIDRANSKI, 2006).

A região 303-315 do mtDNA, que está localizada dentro da região hipervariante HVII, é considerada um microssatélite do genoma mitocondrial (msmtDNA) por sua grande variabilidade (TOKARZ; BLASIAK, 2014). Trata-se de uma sequência de 7 citosinas interrompida por uma timina no nucleotídeo 310 e seguida por outras 5 citosinas, representada pela nomenclatura 7CT5C. A variante 5CT4C é uma alteração comum que, apesar de não ter demonstrado significância estatística neste estudo, foi previamente descrita, em estado de heteroplasmia, como relacionada ao risco de câncer de mama, sendo a variação mais comum na *D-LOOP* neste tipo tumoral (ZHAO et al., 2010; LIU et al., 2011). Em outro estudo, Lee et al. (2012) relaciona esta alteração, também observada em estado heteroplásmico, à metaplasia de Barrett, uma transformação celular pré-neoplásica que ocorre nas proximidades do esfíncter esofágico inferior e, cujo aparecimento, está intimamente relacionado com o desenvolvimento do câncer de esôfago.

A inserção ou deleção de vários nucleotídeos leva à instabilidade do msmtDNA e pode ser decorrente de replicação errada, comumente atribuída ao surgimento do câncer, de acordo com estudos de Sharma (2005). Uma instabilidade na região *D-LOOP* pode comprometer muitas funções deste genoma, até mesmo a principal via apoptótica pela ativação de caspases (PANG et al., 2007). A região *D-LOOP* abriga inteiramente o sítio de transcrição da cadeia pesada do mtDNA e a inativação da região controle deste genoma pode comprometer firmemente tal via apoptótica pela simples inibição da liberação do citocromo-c. Ainda, relatos na literatura sugerem que a ocorrência de mutações em grande escala na região HVII pode afetar a transcrição e a tradução, contribuindo para o surgimento do câncer (SHAKSSALIM et al., 2013).

Já Oberdoerffer (2007) e Sinclair et al (2012) relacionam a instabilidade de microssatélites na *D-LOOP* com o envelhecimento, e Montanini et al (2005), que

relaciona essas mesmas alterações com tumores gliais, citam a prevalência de mutações que levam a um mtDNA instável em indivíduos de idade avançada. Nossos dados, no entanto, mostraram-se diferentes dos estudos citados, uma vez que ocorreram em indivíduos mais jovens e, ainda, com menor grau tumoral. O fato desta variante estar presente em indivíduos mais jovens, mas com câncer de sistema nervoso, sugere que este tipo de alteração ocorra como consequência do ambiente altamente reativo, provavelmente em decorrência da demanda energética tumoral, o que pode acontecer semelhante à Doença de Alzheimer, onde, a maioria das alterações genéticas e estruturais acontecem cumulativamente ao longo da vida, culminando com a doença em indivíduos com idade mais avançada.

Em relação à variante D310, presente em quatro amostras, mostrou-se estatisticamente “*borderline*” quando comparada com o grupo de outras alterações ($p = 0,06$) da região 303-315 ou com o grupo com alelo selvagem ($p = 0,08$). HU et al (2014), relacionaram esta alteração ao aumento do risco para o câncer de nasofaringe em relação ao alelo selvagem, portanto não se deve descartar que o baixo número amostral talvez tenha influenciado nossos resultados. Boaventura et al. (2013), em estudo com linhagem celular de câncer de pele, observaram um aumento de 43% a mais desta mutação em células submetidas a raios ultravioleta em relação às não irradiadas. Além disso, no mesmo estudo, o autor relata um aumento da prevalência de 77% em pacientes submetidos a altas doses de irradiação em comparação ao grupo controle, enfatizando o efeito da radiação no aumento das mutações D310.

As demais alterações da região controle do mtDNA, até o momento, foram relacionadas com câncer ovariano e câncer oral (TRAPPEN et al., 2007). Apesar de já relatadas em estudos com neoplasias, parecem não ter relação com a doença.

A transição T16189C, ocorrida em sítio localizado na região HVI, é uma transição relacionada à descendência africana em estudos populacionais (LIU et al., 2011). Já a INS16190CC, apesar de ter sido observada em apenas uma amostra em nosso trabalho, pode estar relacionada à instabilidade do genoma mitocondrial. Este tipo de alteração (indel de mais de um nucleotídeo) está relacionado ao surgimento e progressão de diversos tumores malignos como carcinoma basocelular (BOAVENTURA et al., 2014), câncer de próstata (JERONIMO et al., 2001) e astrocitomas (LUETH et al., 2009).

A transição no sítio C16519T foi encontrada em 16 amostras tumorais e trata-se também de uma variante populacional comum do genoma mitocondrial (MITOMAP, 2016). Apesar de ser relatada em estudos com populações africanas (BEHAR et al., 2008), esta alteração não está relacionada a nenhum haplogrupo específico (BILAL et al., 2008) e já foi descrita como relacionada a vários tipos tumorais como câncer de ovário (TRAPPEN et al., 2007; BRAGOSZEWSKI et al., 2008), câncer da nasofaringe (PANG et al., 2008), e a leucemias linfoides (PICCOLI et al., 2008).

Vários estudos relatam o sítio 16519, presente na região HV-I, como uma região não crucial por não ser codificante (KIRCHES et al., 2001; PANG et al., 2007; BILAL et al., 2008). No entanto, esta região é essencial para a replicação do mtDNA por localizar-se no sítio de ligação da membrana, conhecido como 7S (YEUNG et al., 2014). Trata-se de um importante elemento que atua na *D-LOOP* como origem de replicação da cadeia pesada, término de ligação da cadeia leve e região de concentração dos promotores da mesma. Muitas moléculas de mtDNA contêm uma terceira cadeia ou fita de DNA conhecida como 7S DNA a qual forma, de fato a alça de deslocamento (*displacement loop*), cobrindo a maior parte da região controle (YEUNG et al., 2014; AKMAN et al., 2016). Esta terceira alça se estende por aproximadamente 500pb e está presente em cerca de 1-65% das moléculas de mtDNA. A frequência da síntese do 7S DNA através de uma região elementar para o genoma mitocondrial implica em um importante papel para a *D-LOOP* no metabolismo da mitocôndria, implicando no recrutamento de proteínas e organização do mtDNA (AKMAN et al., 2016).

Algumas células humanas carregam RNases mutantes, capazes de reduzir o RNA em uma isoforma recém descrita chamada R-LOOP no mtDNA. Esse RNA é semelhante em tamanho e localização ao *D-LOOP* e complementar ao 7S DNA. Baixos níveis de R-LOOP estão associados à agregação do mtDNA, sugerindo um papel de organização e segregação desse genoma (AKMAN et al., 2016).

Akman et al. (2016) relatam, ainda, que, com exceção das regiões hipervariantes da *D-LOOP*, a maior parte da região controle é bem conservada e a porção conhecida como domínio central conservado define a sobreposição entre a *D-LOOP* e a R-LOOP e sugere um importante papel desse mecanismo na manutenção e expressão do mtDNA.

Semelhante aos estudos de Yeung et al. (2014) com GBM, a frequência da alteração C16519T presente em quase metade dos casos (48,28%), porém, particularmente em nosso estudo, as amostras alteradas concentraram-se em graus mais baixos e entre os pacientes mais jovens. Além disso, com base nas observações de Akman et al. (2016), as alterações na região 16519 podem comprometer a ligação do 7S DNA à *D-LOOP* e, em consequência, a replicação e tradução do mtDNA. Esse tipo de alteração pode ser um dos fatores determinantes para o aumento do número de cópias do mtDNA em células tumorais após mutação na região *D-LOOP* (DING et al., 2010; KASSEM et al., 2011; LIU et al., 2011). Esse aumento ocorre visando manter um metabolismo ativo e viável ao tecido neoplásico garantindo assim o aporte energético celular (LIU et al., 2016). Além disso, a diferença significativa em nosso estudo em relação ao predomínio desta mutação, em uma região que é considerada como polimorfismo populacional, nos pacientes mais jovens com CSN, pode estar relacionada a uma suscetibilidade ao câncer em geral por parte dos portadores do alelo mutante. Esta hipótese baseia-se nos dados de Yeung et al (2014), cujo trabalho relata uma frequência alélica mutante superior a 50% nos pacientes com GBM e, comparativamente, presente em aproximadamente 14% de seu grupo controle.

Outro fato que pode ajudar a sustentar a hipótese dessa suscetibilidade seria a pré-existência da alteração antes do surgimento do tumor. Ainda de acordo com Yeung et al (2014), a ausência de heteroplasmia relacionada à C16519T, sugere que a alteração tenha sido herdada. Dados na literatura também citam esta alteração como homoplásmica, o que pode ajudar a reforçar tal hipótese (PANG et al., 2007; BEHAR et al., 2008; BRAGOSZEWSKI et al., 2008; YEUNG et al., 2014).

As 19 amostras tumorais com mutações heteroplásmicas em 17 sítios diferentes da *D-LOOP* apresentaram diferença significativa ($p < 0,0001$ unilateral e $p < 0,01$ bilateral), no teste de KS, em relação às amostras tumorais homoplásmicas, quando confrontadas as idades de ambos os grupos. A ocorrência de mutações no genoma mitocondrial, quando não confere um benefício seletivo, pode levar à apoptose pela via das caspases, a qual é mediada pela liberação do citocromo-c pela mitocôndria (FALAVORO et al., 2012).

A heteroplasmia pode ser uma via alternativa que visa a sobrevivência celular e a obtenção de energia extra como resposta à grande demanda do metabolismo tumoral. A ocorrência deste tipo de alteração em locais essenciais para

o genoma mitocondrial, como o sítio de ligação 7S, por exemplo, pode comprometer a viabilidade deste genoma e, dependendo do número de cópias comprometidas, até mesmo uma redução da atividade da organela. Por outro lado, se há um declínio da fosforilação oxidativa devido ao dano mitocondrial, a célula tumoral pode recorrer à glicólise em busca de energia (VANDER-HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009). Nossos dados sugerem que as mutações heteroplásmicas estão associadas ao aumento do risco de ocorrência de astrocitomas em relação à linhagem celular homoplásmica, onde as células cancerosas podem beneficiar-se das duas vias de obtenção de energia: glicolítica e respiratória, semelhante a estudo realizado com câncer de mama (BAI et al., 2011).

5.2. COMPLEXO MITOCONDRIAL I

Os genes que codificam as subunidades *ND1* e *ND3* desempenham um papel fundamental na formação do complexo I da cadeia de transporte de elétrons. Essas subunidades formam, junto com as outras subunidades mitocondriais, uma espécie de poro seletivo na membrana interna, responsável pela passagem dos prótons de hidrogênio, o que vai gerar inicialmente um gradiente eletroquímico, fundamental para o transporte de elétrons e a geração de energia para a célula. Tokarz e Blasiak (2013) relacionam alterações deletérias nestas subunidades aos cânceres de colon, pâncreas, próstata, tireoide e bexiga. Até o momento, não há estudo relatando relação com tumores do sistema nervoso.

O complexo I é crítico para o balanço energético da célula. É onde inicia todo o processo da cadeia de transferência de elétrons, que culminará com a geração de energia. Mutações no mtDNA podem ser classificadas em dois grupos funcionais em relação ao efeito na tumorigênese; neutro ou pró-tumorigênico, o qual permite ou promove o crescimento tumoral e as mutações que desencadeiam a tumorigênese (IOMARINI et al., 2013).

A inserção 3883A, no gene *ND1*, encontrada em quatro amostras, mostrou-se estatisticamente significativa ($p < 0,01$) no teste de KS quando comparada às demais amostras em relação ao grau tumoral, predominando entre as amostras de maior grau. Este tipo de alteração é capaz de promover um efeito semelhante à deleção de um

único nucleotídeo, uma vez que é capaz de alterar toda a matriz de leitura e transcrever aminoácidos diferentes dos originais, comprometendo a estrutura e função da proteína. As mudanças resultantes desta alteração afetam os aminoácidos entre as posições 193 e 203, resultando em uma proteína com 115 aminoácidos a menos, como resultado de um códon precoce de parada, e sem três das oito alças transmembrana da região amino-terminal da proteína. A proteína resultante (figura 22) desta mutação, em razão de um códon stop precoce na posição 203, aparenta uma estrutura menor, com menor índice de solvatação (- 0,45) e torção (- 4,04) em comparação à normal (- 0,10 e - 5,94, respectivamente). O índice de solvatação, que é o índice de dissolução de composto iônico polar em substância polar reflete uma menor interação da molécula com o meio, no caso a membrana interna mitocondrial. Vale lembrar que o gradiente iônico existente no espaço intermembranar mitocondrial pode ser comprometido pelo índice de solvatação. Em relação à torção, a proteína mutante também apresentou menor índice, o que também pode comprometer a seletividade do “poro” para o hidrogênio, permitindo a passagem de um número maior de prótons ou mesmo de outras moléculas, contribuindo para o aumento do gradiente hidrogeniônico, reduzindo o pH do espaço intermembranar, o que pode levar a uma disfunção de toda a cadeia de transporte de elétrons e, conseqüentemente, o aumento da demanda de glicose como resultado na queda da OXPHOS.

Musicco et al (2014) relatam que alterações do tipo *indel* no gene *ND1*, de um modo geral, resultam em uma proteína do complexo I truncada e pouco ou nada efetiva. Em seu estudo, onde avalia bioquimicamente células com *ND1* alterado, demonstrou que o prejuízo energético causado pela inserção quase homoplásmica de nucleotídeos, perturba o metabolismo celular, levando a uma redução estável de componentes dependentes da NADH, ou seja, dependente da OXPHOS.

Em relação ao grupo de transições encontradas neste gene, o teste de KS também mostrou significância estatística (p-bilateral < 0,01; p-unilateral = 0,0017). Tais dados sugerem que estas alterações sejam mais prevalentes em amostras de maior grau tumoral. A transição A3547G, encontrada em oito amostras tumorais, é um polimorfismo predominante em populações europeias, africanas subsaarianas e asiáticas. Embora alguns estudos relatem as transições como mutações comuns e que dificilmente resultam em troca de aminoácido, esta alteração provoca a substituição de uma interleucina por uma valina. Somado a isso, o teste de KS mostrou

significância em comparação às outras amostras, aparecendo mais prevalente nos graus tumorais mais altos e com menor intervalo interquartil. Wallace (2013) relata que, embora mutações não deletérias sejam frequentes no mtDNA, elas não ocorrem isoladas em processos patológicos, podendo servir para carrear outras deleções e que o mtDNA alterado possui uma taxa de replicação maior que o selvagem. Calabrese et al. (2013) em seus estudos, demonstraram que é necessário um complexo I funcional para a indução do fenótipo Warburg. Os estudos de Calabrese et al (2013) indicam que existe um mecanismo no qual o complexo I regula a mudança glicolítica, permitindo a adaptação das células tumorais e continuidade do processo proliferativo. Seus achados sugerem que existe uma relação de mão dupla entre o fator-induzível por hipóxia 1α (HIF- 1α), fator de resposta celular adaptativa à hipóxia, e a mitocôndria em que a alteração no genoma mitocondrial pode influenciar a geração dessa resposta pela HIF- 1α como o contrário (CALABRESE et al., 2013).

Já a transversão T3552A, presente em seis amostras, também é um polimorfismo com alelos C/T/A, cuja variação está associada ao câncer de próstata de fenótipo altamente invasivo (ARNOLD et al., 2015), mostrou-se estatisticamente significativa (ANOVA $p = 0,02$), em comparação com as amostras com o alelo selvagem, concentrando-se nas amostras de alto grau, corroborando com os achados de Arnold et al. (2015). Outros estudos relacionaram esta alteração a outras doenças como a neuropatia óptica hereditária de Leber (MA et al., 2012) ou à propensão ao desenvolvimento de edema agudo de pulmão em grandes altitudes (LUO et al., 2012). Transversões parecem ter impacto negativo na função das proteínas, promovendo desordens nos níveis celulares de energia (SLASKA et al., 2015), podendo contribuir para a alteração do metabolismo celular.

Uma nova transição encontrada neste estudo, G3880A, presente em quatro amostras, não apresentou significância estatística. apesar disso, a alteração desse aminoácido foi relacionada, até o momento, somente ao glaucoma de ângulo aberto (MOHANTY et al., 2013).

Diferente dos estudos de Kirches et al. (2001), onde os mesmos sugerem que as transições que ocorrem no mtDNA não sejam deletérias por não promoverem, muitas vezes, alteração do aminoácido transcrito, neste estudo observamos algumas alterações de AA em transições. Estas alterações de AA, localizadas no complexo I da cadeia respiratória, podem comprometer de forma bastante significativa o processo

de OXPHOS, acarretando em prejuízo ou mesmo perda de função do genoma afetado.

Cruz-Bermudez et al. (2013) sugerem que variantes genéticas do mtDNA são capazes de modular uma linhagem celular de osteossarcoma e que o crescimento de células tumorais que carregam o mtDNA mutado provoca apenas leves disfunções na OXPHOS, o que favorece essas células em relação ao mtDNA selvagem. Isto pode explicar o alto índice de diversidade e quantidade de mutações no mtDNA encontrado em células tumorais humanas, muitos dos quais, decorrentes de discretas disfunções mitocondriais. Portanto, qualquer mutação no mtDNA que leve a discretas disfunções na OXPHOS pode iniciar um processo de pressão seletiva (GRZYBOWSKA-SZATKOWSKA; SLASKA, 2014).

A complexidade do metabolismo mitocondrial e sua genética peculiar sugere que os mecanismos ligando as mutações do mtDNA e a tumorigênese são bastante numerosos e muitos ainda precisam ser identificados e interpretados (IOMMARINI et al., 2014). Segundo Calabrese et al. (2013), o papel do complexo I na indução do fenótipo Warburg e a resposta à hipóxia sugere que o complexo I deva ser considerada como mais do que uma simples enzima que contribui para a função mitocondrial e que pode ser determinante para a alteração metabólica pós-desregulação durante a progressão tumoral. Os resultados do estudo de Iommarini et al. (2013) ressaltam a importância da produção de energia por via mitocondrial e resposta adaptativa à hipóxia na progressão tumoral, evidenciando a ligação entre mutações no mtDNA, disfunção mitocondrial e tumorigênese. O aumento da glicólise não só visa a produção de ATP, pois a indução da via das pentoses, a qual oferta ribose e NADPH para a biossíntese de nucleotídeos e proteínas (figura 37), contribui para a proliferação celular e proteção contra danos do estresse oxidativo (LIN et al., 2016). Dmitrenko et al. (2005) relatam ainda que a redução dos transcritos da COI está intimamente ligada ao risco para o surgimento de GBM. Os baixos níveis de genes mitocondriais sugerem a evidencia de que a hipoexpressão, resultante do baixo número de cópias do mtDNA está fortemente associado ao surgimento de GBM.

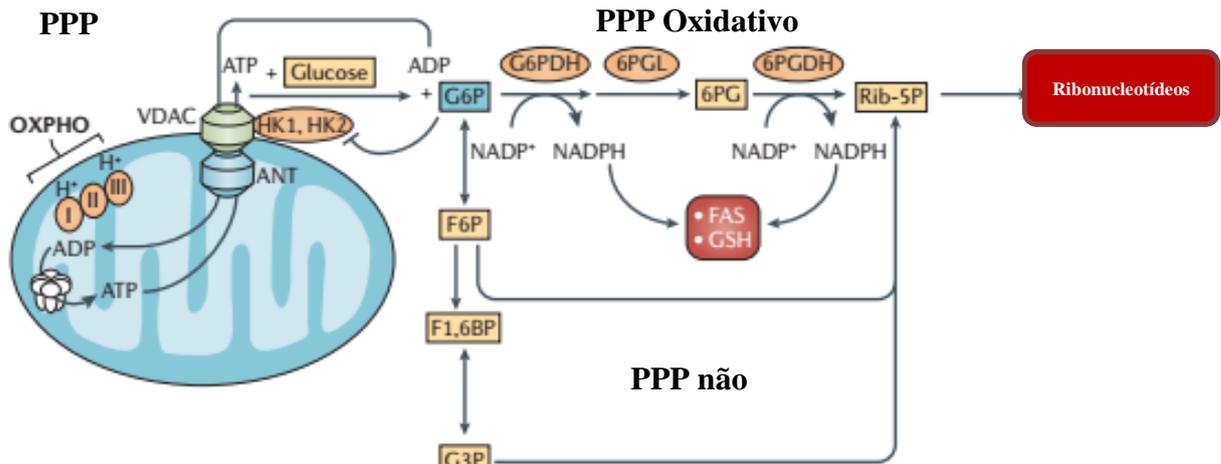


Figura 37: Esquema ilustrando a via pentose-fosfato (PPP), gerando NADPH e fosfatos. As hexoquinases mitocondriais (HK1 e HK2) fosforilam glicose em glicose-6-fosfato (G6P) utilizando preferencialmente ATP derivada da fosforilação oxidativa (OXPHOS) que ocorre na mitocôndria. Fonte: adaptado de Hay (2016).

Além disso, muitos estudos mostraram que a perda do complexo III pode contribuir para a desestabilização da HIF-1 α mediada por ROS, semelhante às mutações deletérias que desestruturam o complexo I (CALABRESE et al., 2013). Lloyd et al. (2015) levantam a possibilidade do complexo I atuar como um inibidor do complexo III, o qual, por sua vez, age como um gatilho para a apoptose disparada por via mitocondrial em alguns grupos de GBM. Portanto, as alterações no complexo I, parecem não influenciar somente o metabolismo celular, mas, também, o disparo da via apoptótica mitocondrial. Alterações neste complexo podem se firmar futuramente como critérios de prognóstico por ter grande impacto na adaptação metabólica das células neoplásicas (CALABRESE et al., 2013; IOMMARINI et al., 2013).

Em relação ao gene *ND3*, a deleção 10358A, presente em três amostras, é uma alteração ainda não descrita na literatura, e que provoca uma mudança na matriz de leitura, semelhante às demais deleções e inserções de base única. Embora tenha ocorrido em poucas amostras, a análise de variância mostrou uma estatística próxima à considerada *borderline* ($p = 0,065$), mesmo diante de uma pequena prevalência. Neste caso, um aumento do número de amostras talvez possa validar essa alteração, confirmando sua influência na doença neoplásica.

A transição G10398A, é outro polimorfismo de caráter populacional, onde o alelo A é predominante em populações europeias e o alelo G predomina em populações de origem africana subsaariana. Esta posição é altamente polimórfica, cuja variante A é encontrada entre 9-13% em afroamericanos e 79-80% entre

caucasianos americanos (CZARNECKA et al., 2010). Nossos estudos não encontraram diferença significativa que relacione a alteração unicamente dessa posição com o câncer de sistema nervoso, semelhante ao estudo de Mao et al. (2013) que relata que o polimorfismo G10398A, isoladamente, não é um marcador confiável para o câncer de mama, uma vez que, é estatisticamente incapaz de modular o risco para este tipo de tumor. Da mesma forma, Yu et al. (2015) sugerem que a mutação G10398A, por ser um marcador genético muito comum na população humana, pode não estar associada com o risco para câncer de mama. Setiawan et al. (2008) também relatam em seu estudo que a G10398A não tem relação com o risco para câncer de mama em pacientes afro americanos, porém, relatam que o alelo A tem papel significativo na produção de ROS em doenças neurodegenerativas. Os autores sugerem ainda que a interação entre fatores de risco ambientais e genéticos podem causar discrepância entre os grupos étnicos, atuando como modificadores de risco existentes em diversas áreas geográficas, justificando os dados de Darvishi et al. (2007) que sugerem que o alelo 10398A possui risco significativamente aumentado para câncer de mama esporádico, e que este alelo aparentemente contribui para o aumento do risco para o desenvolvimento do câncer de mama na população indiana.

Outro trabalho reporta uma maior prevalência do genótipo 10398G em pacientes com câncer, onde o pH da matriz mitocondrial é mais baixo nas células com genótipo 10398A em comparação ao genótipo 10398G (CZARNECKA et al., 2010). Além disso, os autores relatam que células com alelo 10398A têm maior nível de cálcio citosólico em relação ao G, sugerindo que este fenômeno esteja associado a um fenótipo mais agressivo.

A variante 10398A possui maior resistência à apoptose, o que pode conferir uma vantagem seletiva que permite, além da progressão, um aumento da agressividade por estar mais presente nas linhagens metastáticas (KULAWIEC; OWENS; SINGH, 2009) e ao aumento do câncer cervical altamente invasivo (CANTER et al., 2005). Arnold et al. (2015) também relacionam a presença do alelo mutante à ocorrência de metástase óssea decorrente de câncer de próstata. Além disso, esta variante possui maior número de cópias em relação à 10398G em cultura células de câncer cervical. O alto número de cópias de mtDNA, associado a presença do alelo 10398A, foi relatado como um marcador em potencial de mau prognóstico de câncer de pulmão de não pequenas células. A redução do número de cópias

associado a este alelo pode levar à disfunção mitocondrial, além de, influenciar na resposta da sensibilidade a terapias anticâncer (XU et al., 2013). Outro estudo relata que o aumento do número de cópias de mtDNA associado ao alelo 10398A sugere pior prognóstico para câncer cervical (FENG et al., 2015). Apesar da ausência de dados que relacionem alterações estruturais comparando as células com os diferentes alelos (10398A e 10398G), uma hipótese é que a variante 10398G esteja relacionada com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em consequência da alteração do complexo I. Outra hipótese é que 10398G seja um modificador de risco tumoral de baixa penetrância, mas que associada com outras alterações no mtDNA pode promover o desenvolvimento do câncer como consequência de dano não específico no DNA, porém com causa e efeitos ainda não avaliados até o momento (CZARNECKA et al., 2010).

Singh et al. (2014) relatam que a alta produção de ROS decorrente de alterações no mtDNA resulta em aumento no estresse oxidativo, afetando proteínas envolvidas na via de proliferação celular. Os autores também propuseram um modelo onde genes codificadores do mtDNA, principalmente *ND3*, devido ao ambiente rico em ROS, podem desestabilizar a taxa de equilíbrio apoptose/não-apoptose através de regulação epigenética, facilitando a transformação de células pré-cancerosas em malignas. Em outro estudo, Canter et al. (2005) sugerem que a mudança não conservativa de aminoácido resultante deste polimorfismo pode resultar em aumento do “vazamento” de elétrons e geração de ROS, contribuindo para mutações no nDNA e mtDNA e disfunção mitocondrial cumulativa, sugerindo, portanto, que o alelo 10398A resulta na codificação de um complexo I menos eficiente em comparação ao alelo G.

Um fator de risco já estabelecido para o câncer de mama é o álcool, devido ao aumento dos níveis do metabólito acetaldeído, um tipo de ROS que aumenta o nível de estresse oxidativo (PEZZOTTI et al., 2009). Os estudos com o alelo 10398G sugerem que esta variante tenha um menor potencial de gerar ROS. Isto, em conjunto com a observação profissionais da área da saúde que não consomem álcool mostraram uma redução de 21% do risco de câncer de mama em comparação ao grupo não etilista portador do alelo A, e cerca de 33% menor em relação ao grupo de alelo A etilista (PEZZOTTI et al., 2009). Outro dado que pode ajudar a sustentar a hipótese de um maior risco da população paraense ao está nos estudos de Garcia e Freitas (2013) que relatam uma maior prevalência no consumo abusivo de álcool pelas

regiões Norte (14,2%) e Nordeste (15,65) em relação à média nacional (13,7%), com destaque para o sexo masculino (23,1% e 25,5% respectivamente)

Quando avaliada em associação, as alterações G10398A e T10400C apresentaram aumento do risco de 61,09% [IC 2,37 – 16,88 ($p = 0,003$)] para o câncer do sistema nervoso de alto grau em relação às amostras com os alelos selvagens. Esse resultado é semelhante aos dados relatados no estudo de Li et al. (2016), que sugerem que a ocorrência destas alterações associadas confere um aumento do risco para a iniciação do câncer cervical em populações chinesas, além do aumento do risco para o câncer de mama em população polonesa (GRZYBOWSKA-SZATKOWSKA, L; SLASKA, B, 2014). Esta associação foi descrita por Silva-Jr et al. (2002) como um haplótipo comum (A e C) que ocorre em populações asiáticas, ameríndios e siberianos. Embora sejam populações de origens geográficas distintas, asiáticos e ameríndios já foram relacionados a um ancestral comum (BURBANO et al., 2012) devido a suas semelhanças genéticas, especialmente no que diz respeito ao genoma mitocondrial. Esta associação pode sustentar uma hipótese de susceptibilidade de ambas as populações, asiática e ameríndia, ao câncer, quando os dois alelos mutantes estão presentes.

5.3. COMPLEXO MITOCONDRIAL IV

Na região que codifica o gene *mt-CO1* do complexo mitocondrial IV, seis novas alterações foram descritas neste trabalho. A deleção del7175T, encontrada em apenas duas amostras parece não ter relação com a doença neoplásica, semelhante ao estudo recentemente reportado por Richads et al. (2015), o qual relata a mesma como uma alteração benigna. Particularmente, a deleção del7181C apresentou significância estatística quando comparada as idades dos grupos com e sem a alteração, o que sugere uma relação desta deleção com a doença neoplásica em pacientes jovens. O *bloxplot* (figura 27) mostra que a concentração dos indivíduos que apresentaram essa alteração é de, no máximo, vinte e dois anos, e a mediana é de um ano de idade, o que evidencia clara diferença entre os grupos. A ocorrência deste tipo de alteração por ser mais frequente em indivíduos mais jovens, pode estar relacionada à progressão tumoral, semelhante aos estudos de Ohgaki et al. (2013), que também relatam que a predominância de mutações no mtDNA em indivíduos mais

jovens pode conferir um caráter rapidamente progressivo nos tumores do sistema nervoso humano. Portanto, esse tipo de mutação pode sugerir uma propensão à progressão de tumores menos agressivos, em indivíduos jovens, até um GBM secundário. LIN et al. (2016) relatam que células-tronco tumorais com alterações no mtDNA no complexo IV têm alta atividade invasiva e são altamente resistentes a agentes quimioterápicos. As mutações neste complexo, de um modo geral, quando alteram a estrutura da proteína, parecem influenciar positivamente a proliferação celular, contribuindo para a progressão tumoral (LLOYD et al., 2015).

No gene *mtCO1* foi identificado um rearranjo em cinco amostras de aproximadamente 180 pb: uma inversão entre as cadeias leve e pesada com repetição da cadeia leve. Embora as análises estatísticas não tenham atribuído diferença significativa em relação às demais amostras, este rearranjo ocorreu em cinco amostras de origem astrocitária, sendo duas em GBM. Yang et al. (2013) observaram a ocorrência de repetições diretas e invertidas no mtDNA de camundongos, atribuindo uma redução na expectativa de vida com repetições invertidas. Relataram, ainda, que ambas as inversões são cumulativamente relacionadas com a idade, especialmente em células do cérebro e do coração. Nossos dados discordam dos dados de Yang et al (2013), uma vez que a média etária dos pacientes portadores da alteração foi de 43 anos, ocorrendo em três pacientes abaixo dos 50 anos de idade (14, 31 e 46 anos). Dimberg et al. (2014), descrevem um mecanismo de dupla deleção e inversão de fitas (figura 38) em umas das amostras entre as regiões 8290 e 13117, relatando ser o primeiro caso de inversão longa (515 pb). Nossos estudos relatam um mecanismo inédito de repetição e inversão de fitas na região codificante do *mtCO1* sugerindo que, dentre outras alterações encontradas, pode ser uma alteração característica de câncer do sistema nervoso originários de astrócitos.

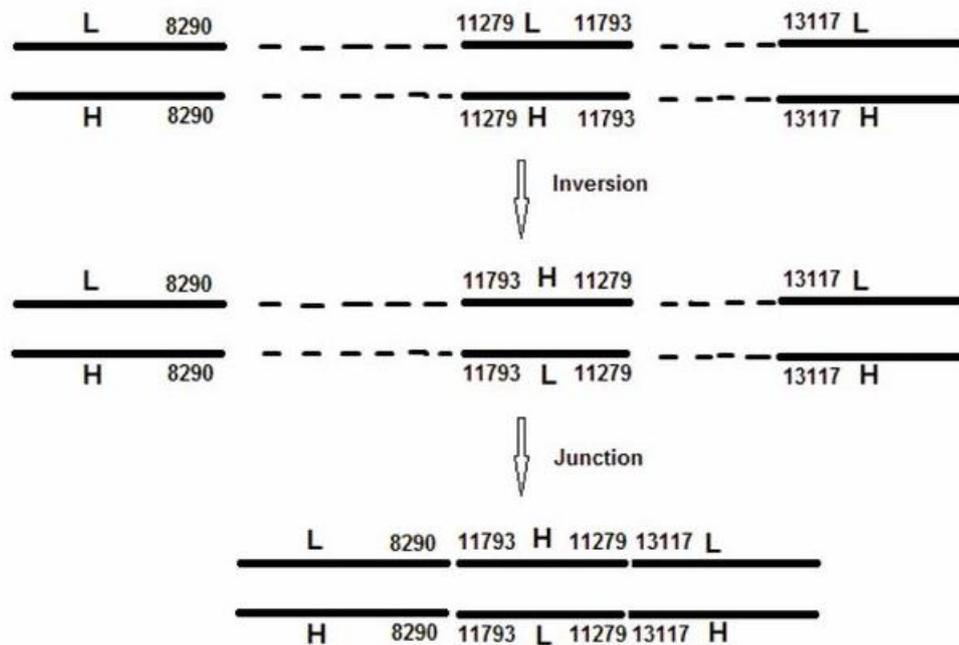


Figura 38: Rearranjo de 515pb no mtDNA após dupla deleção. **Fonte:** Adaptado de Dimberg et al. (2014).

Dentre as alterações apresentadas na subunidade da *mtCO2*, a única com significância estatística ($p = 0,014$) foi a del8244A, ainda não relatada na literatura, predominando entre os astrocitomas (100% das amostras) e entre as amostras de alto grau. A deleção ocorre no nucleotídeo central da trinca que codifica a glutamina da região carboxiterminal da subunidade II da citocromo oxidase (*mtCO2*). Esta deleção pode comprometer a OXPHOS, contribuindo para o aumento da demanda glicolítica. Esta alteração, dentre outras, pode contribuir para a alteração metabólica conhecida como efeito Warburg. Em estudo recente, Alam et al. (2016) relatam que a glutamina é o combustível oxidativo preferido das células tumorais mas que, apesar disto, estas células podem usar uma variedade de combustíveis como a glicose, a própria glutamina, ácidos graxos e acetato. Os autores concluem que a respiração mitocondrial pode ser reestabelecida nas células tumorais com defeito na OXPHOS (em especial no complexo IV), o que é crítico para a iniciação e metástase de diversos tipos tumorais. Nosso estudo corrobora com os dados de Alam et al. (2016) uma vez que, com o predomínio em indivíduos com tumores de alto grau, esta transformação pode estar associada com a progressão tumoral.

A deleção de 9 nucleotídeos del8271-79, que ocorre em região não codificante, entre a *mtCO2* e a região que codifica o tRNA de lisina, foi encontrada em

cinco amostras e não parece estar associada à doença neoplásica. A alteração é relatada como um polimorfismo (-/ACCCCCTCT) ainda não validado no banco de dados do NCBI (WARNICH, 2013), embora Ren et al (2016) sugeriram que este seja um marcador em potencial para carcinoma hepatocelular, não existem dados que confirmem tal relação, semelhante aos nossos dados.

Na subunidade *mtCO3*, a transição encontrada na posição 9540 foi encontrada em sete amostras como T9540C/G. Esta alteração foi previamente associada à neuropatia óptica hereditária de Leber (KUMAR et al., 2012).

As deleções DEL9541T e DEL9545T, embora não tenham apresentado significância estatística, provocam alteração na matriz de leitura, inviabilizando o produto gênico da região ou do gene onde ocorre. A del9548G, localizada na região do polimorfismo G/A parece também desempenhar papel semelhante. A heteroplasmia HP9588G/A, que foram encontradas em 13 amostras, isoladamente parecem não estar associadas de forma direta na progressão dos tumores do sistema nervoso de origem glial ($p = 0,06$).

Foi observado previamente que os astrocitomas são caracterizados frequentemente por baixos níveis de complexos respiratórios IV e uma redução gradual de complexos I à medida que o grau deste tipo tumoral aumenta (FEICHTINGER et al., 2014). Outro estudo (BREUING et al., 2011) relata que deficiência nos complexos I e IV em tumores astrocíticos serve de apoio para o modelo das células-tronco neurais, onde essas alterações podem ser um evento precoce no desenvolvimento tumoral. Alterações nos genes mitocondriais que codificam as proteínas do complexo IV estão associadas aos cânceres de cólon (BAI et al., 2011), pâncreas (JONES et al., 2001), próstata (ARNOLD et al., 2015) e tireoide (MAXIMO et al., 2012), não tendo, até o momento, associação com as neoplasias malignas do sistema nervoso humano, especialmente em se tratando das deleções DEL7181C, no gene da *mtCO2*, significativamente relacionada ao câncer em pacientes com idades mais avançadas e presentes em quase todos os tipos histológicos deste estudo (exceto gliossarcoma); e a DEL8244A, presente nas amostras de alto grau, predominando naquelas de origem astrocitária, podem ocasionar um defeito na OXPHOS, contribuindo assim para o surgimento do fenótipo tumoral de alto grau mais propenso, inclusive, a metástase (ALAM et al., 2016). Alterações funcionais no complexo IV são candidatas em potencial a marcadores de início da formação de

gliomas (LLOYD et al., 2015). Se essas mutações funcionais no mtDNA contribuírem de alguma forma para a gliomagenese e, com auxílio de parâmetros-chave de correlação clínica, como idade do diagnóstico, resposta terapêutica e sobrevida, isto impactará na maneira como os subgrupos de GBM poderão ser abordados futuramente.

5.4. COMPLEXO MITOCONDRIAL V

Em relação às regiões que codificam as subunidades 6 e 8 do complexo V mitocondrial, as seis transições relatadas não apresentaram valor significativo, porém, três delas resultam em alteração de aminoácido. A G8584A altera o aminoácido 20 da *ATP6* (Ala → Thr), e a C8414T altera o aminoácido 17 (Leu → Phe) da *ATP8*. Tais alterações não parecem causar um efeito deletério, apesar da mudança. Outra transição, G8994A, encontrada em uma única amostra de gliossarcoma, segundo Knoll et al. (2014), está associada à obesidade, sendo mais frequente nos indivíduos do gênero masculino. Tais dados corroboram os estudos de Klonisch et al. (2016) e Blomain et al. (2016) os quais, através de estudos com peptídeos da família dos receptores de insulina e hormônios sinalizadores da guanilil ciclase-c, respectivamente, relacionam a obesidade à predisposição ao câncer.

Inicialmente, para inclusão das alterações das amostras como heteroplásmicas, nos baseamos nos estudos de Berger et al. (2011) o qual relatam, após estudos comparativos com sequenciamento de alta performance e comum, que este tipo de alteração pode ser determinado pelo padrão do pico no cromatograma. Em muitos casos, os picos podem alcançar uma proporção de 1:1 a 1:0,80, alterando a leitura do nucleotídeo. Porém, alguns picos, mais baixos, embora possam levantar dúvidas, devem ser considerados, pois, segundo Sachadyn et al. (2008), a altura do pico já pode ser considerada como heteroplasmia a partir de 50% do pico original. Lim et al. (2008) reforçam a informação ao analisar a área dos picos heteroplásmicos, o qual classifica como *heteroduplex*, sugerindo que a heteroplasmia está estabelecida quando a área dessa *heteroduplex* ultrapassa a metade da área do pico nativo. A partir dessas informações, analisamos as heteroplasmias encontradas em nossos estudos.

Em estudo com estas regiões em câncer de mama, Grzybowska-Szatkowska et al. (2014) sugerem que, mesmo que o genoma mitocondrial não seja submetido à recombinação, o mtDNA é corrigido através de “carona genética” (*hitchhiking*) o que causa heteroplasmia e, na próxima geração, homoplasmia. O autor relata ainda que, quando a heteroplasmia acarreta benefício para a célula, pode levar à eliminação do alelo selvagem, o que explicaria a homoplasmia da geração seguinte. Em estudo com populações chinesas, Thapa et al. (2016) sugerem que alto nível de ingestão de gordura animal em idade reprodutiva está associada ao aumento do risco para câncer de mama nessa população chinesa. Semelhante ao observado nas mutações ocorridas no complexo I, que relaciona predisposição étnica ao risco para o câncer, este é outro achado em comum com populações asiáticas e a população paraense (MONTEIRO; CONDE, 1999; NEUTZLING et al., 2007), que também apresenta consumo frequente de dietas ricas em gordura e pobre em fibra, sugerindo uma suscetibilidade em comum nos portadores das variantes descritas. Outra semelhança com os estudos de Thapa, é o relato do autor de que as alterações no gene *ATP6* predispõem muito mais ao risco de câncer de mama nessa população em comparação ao *ATP8*.

5.5. ALTERAÇÕES NO tRNA-LIS

O RNA transportador de lisina também é codificado pelo mtDNA. Alterações nesta região podem dificultar a atividade nos ribossomos relacionadas à síntese proteica de qualquer natureza. Algumas alterações ocorridas nesta região, relatadas na literatura, estão relacionadas à diversas patologias como Doença de Parkinson (HORVAT et al., 2007), cardiomiopatias (VALLANCE et al., 2004) doenças desmielinizantes, (EROL et al., 2009) ou epilepsias (WIEDEMANN et al., 2008).

5.6. DELEÇÃO 4977pb + MUTAÇÃO *ND1/ND3*

As deleções 4977 estão presentes em 22 (81,48%) amostras, sendo estas oito astrocitomas (100%), dois oligoastrocitomas (100%), três oligodendrogliomas (100%), dois ependimomas (40%), um gliossarcoma (100%) e seis glioblastomas (75%).

Trata-se de uma deleção comum, bastante frequente em doenças relacionadas com a idade avançada. A ocorrência desta deleção compromete, no genoma afetado, a *ATP6*, parte da *ATP8*, a *CO III*, a *ND3*, *ND4*, *ND4L*, e parte da *ND5*, além dos tRNA de glicina, arginina, histidina, serina e leucina. Embora esta deleção atribua um grande prejuízo ao genoma mitocondrial, as heteroplasmias podem exercer um efeito compensatório ao assumir a demanda dos genomas portadores da deleção. Apesar disso, as amostras com a deleção 4977 e heteroplasmia apresentaram diferença em relação às demais em relação ao grau de estadiamento (MW p-unilateral= 0,026; p-bilateral= 0,042; teste-t p-unilateral= 0,0179; p-bilateral= 0,035), sugerindo que o “mecanismo” gerador da heteroplasmia possa atuar com a finalidade de compensar o genoma lesado pela deleção. Além do mais, por tratarem-se de modificações não deletérias neste genoma, o que demanda um tempo considerável, sugere-se que os GBM que contenham estas duas alterações podem ser de origem tumoral menos agressiva, ou seja, um GBM secundário.

Louis et al. (2016) sugerem que os tumores gliais com mutação em qualquer dos genes *IDH* (1/2) tem origem a partir de um fenótipo menos agressivo, o que lhe confere um caráter progressivo, ao contrário daqueles com *IDH* selvagem, os quais, no caso dos GBM, podem ser classificados como primários, segundo esses critérios. Em um estudo prévio com as mesmas amostras deste trabalho, Pessoa et al. (2015) descrevem um perfil homogêneo das amostras de GBM para os genes *IDH*, sugerindo que todos sejam primários.

Ohgaki et al. (2013) sugerem que, embora infrequentes, os GBM secundários com *IDH1/2* selvagem existem e são derivados, em sua maioria, de gliomas anaplásicos (grau III), enquanto que os GBM com *IDH1/2* mutante originam-se de gliomas de grau II. O mesmo estudo relata ainda que 90% dos GBM são primários e com prevalência em indivíduos acima dos 55 anos, o que difere de nossos dados, onde 50% das amostras de GBM está abaixo de 50 anos. Embora apresentem-se distintos da literatura, essas amostras descritas em nosso estudo ainda podem ser

incluídas no grupo de GBM secundário, ou seja, com *IDH1/2* selvagem, mas originários de gliomas de grau III. Como suporte, todas as quatro amostras de GBM com idade inferior a 50 anos apresentaram a deleção 4977pb somadas a significantes alterações no *ND1* e/ou *ND3*. As únicas amostras com *IDH* mutante eram astrocitomas anaplásicos (grau III), oligoastrocitomas (grau III) e oligodendroglioma (grau II) e, com exceção do oligodendroglioma, todas com faixa etária superior a 50 anos.

Quando ocorre concomitantemente a deleção 4977pb e alguma alteração no *ND1*, o *Odds ratio* relata um risco de 36,36% ($p= 0,0174$) com aumento relativo do risco de 114%. Quando há a deleção 4977pb e a alteração ocorre no gene *ND3*, o risco é de 31,82% ($p = 0,0351$) e o aumento relativo do risco é de 36% ($p= 0,046$). Esses dados podem apontar para o mesmo efeito compensatório que ocorre na heteroplasmia, visto que, quando a alteração ocorre em apenas umas das subunidades (*ND1/ND3*) somadas à deleção 4977, significa que a outra subunidade ainda é funcional e talvez possa desempenhar seu papel metabólico. Com a ocorrência de uma GD e apenas uma das subunidades do complexo I alterada (*ND1* ou *ND3*), parece aumentar o risco de progressão da doença neoplásica. Em análise, essas amostras de GBM que apresentaram a deleção 4977pb associada a alteração no *ND1/ND3*, conferindo um genótipo favorável à progressão para um tipo de maior malignidade e reforça a sugestão do valor prognóstico destas alterações associadas como um marcador de valor prognóstico (figura 39).

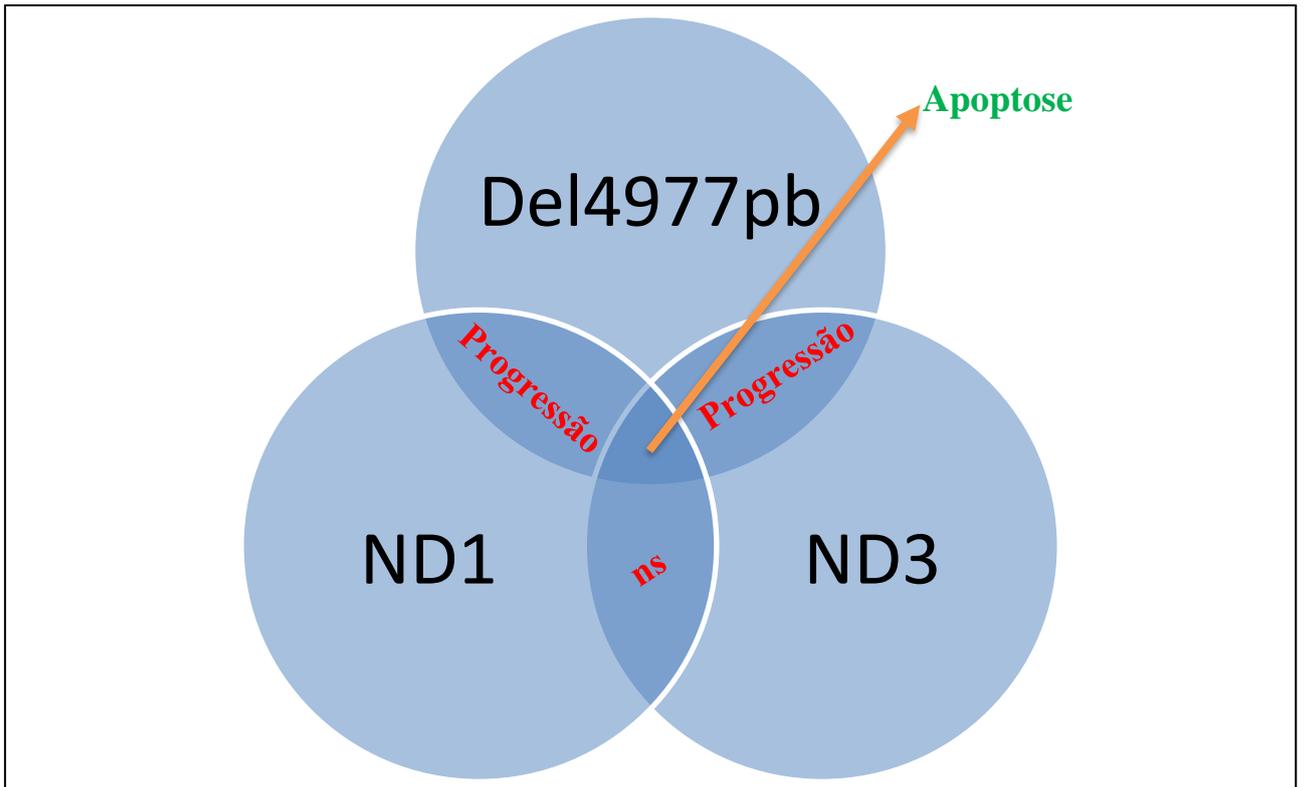


Figura 38: Correlação entre a deleção 4977pb e as alterações encontradas nos genes *ND1* e *ND3* ilustrando as condições de coexistência e possível valor prognóstico.

Por outro lado, a coexistência de GD, alterações nos genes *ND1* e *ND3*, simultaneamente, mostram uma redução relativa no risco de 85% e uma redução absoluta de 77,27% ($p < 0,0001$). Embora pareça contraditório, o resultado sugere que a ocorrência destas três alterações, quando simultâneas, possa causar um dano mitocondrial que dificulte a sobrevivência da célula, o que poderia servir como um marcador de melhor prognóstico em relação às demais amostras (figura 38).

6. CONCLUSÃO

- A DEL7181C parece estar relacionada com o surgimento da doença em pacientes de idade avançada;
- A transição T16189C, presente na D-LOOP, relaciona-se fortemente com o risco para o surgimento da doença neoplásica;
- A transição C16519T, também presente na D-LOOP, pode estar associado a uma disfunção mitocondrial por localizar-se no sitio de ligação do 7S DNA, comprometendo a transcrição e a tradução dos genes do mtDNA.
- As alterações encontradas no complexo I parecem ser determinantes para o surgimento e progressão dos tumores malignos gliais, estando relacionadas com o risco para a doença de alto grau;
- A INS3883A, presente no gene *ND1*, pode comprometer gravemente a proteína codificada pelo gene, o que pode levar a uma disfunção de toda a cadeia de transporte de elétrons e, conseqüentemente, o aumento da demanda de glicose como resultado na queda da OXPHOS.
- A DEL8244A, no gene da *mtCO2*, parece estar relacionada com o surgimento de astrocitomas de alto grau, podendo ser, futuramente, validada com um marcador tumoral de boa afinidade para este tipo histológico;
- A deleção 4977pb, quando associada a alterações em um dos genes *ND1* ou *ND3* sugere associação ao mau prognóstico da doença neoplásica, podendo estar ligado à progressão tumoral. Porém, a coexistência dessa deleção e das alterações nos dois genes pode estar relacionado a um melhor prognóstico provavelmente devido ao grave dano no genoma mitocondrial.

7. REFERÊNCIAS

AKMAN, G; DESAI, R; BAILEY, LJ; YASUKAWA, T; ROSA, ID; DURIGON, R; BRADLEY, J; MOSS, CF; MENNUNI, M; HOULDEN, H; CROUCH, RJ; HANNA, MG; PITCEATHLY, RDS; SPINAZZOLA, A; HOLT, I. Pathological ribonuclease H1 causes R-LOOP depletions and aberrant DNA segregation in mitochondria. **PNAS**. E4276-e4285. Doi: 10.1073/pnas.1600537113. 2016.

ALAM, M; LAL, S; FITZGERALD, K E; ZHANG, L. A holistic view of cancer bioenergetics: mitochondrial functions and respiration play fundamental roles in the development and progression of diverse tumors. **Clinical and Translational Medicine**. 5. 2016. DOI: 10.1186/s40169-016-0082-9.

ALDIRI I; VETTER, ML. PRC2 during vertebrate organogenesis: a complex in transition. **Development Biology**. 367(2). 91-99. 2012.

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 tumors in Turkish patients. **Genetics and Molecular Biology**. 33(1). 1-4. 2010.

ARAÚJO, LF. Instabilidade do genoma mitocondrial em adenomas e adenocarcinoma colorretal. Dissertação de Mestrado. **FMRP-USP**. 2013.

ARNOLD, RS; FEDEWA, SA; GOODMAN, M; OSUNKOYA, AO; KISSICK, HT; MORISSEY, C; TRUE, LD; PETROS, JA. Bone metastasis in prostate cancer: recurring mitochondrial DNA mutation reveal selective pressure exerted by the bone environment. **Bone**. 78. 81-86. 2015.

ASHUTOSH, L; GOMEZ, E; CALLOWAY, C. Increased mitochondrial DNA deletions and copy number in transfusion-dependent thalassemia. **Clinical Medicine**. 1(12). E88150. Doi: 10.1172/jcl.insight.88150. 2016.

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.

BEHAR, DM; VILLEMS, R; SOODYALL, H; BLUE-SMITH, J; PEREIRA, L; METSPALU, E; SCOZZARO, R; MAKKAN, H; TZUR, S; COMAS, D; BERTRANDPETIT, J; QUINTANA-MURCI, L; TYLER-SMITH, C; WELLS, RS; ROSSET, S. The dawn of the human matrilineal diversity. **The American Journal of Human Genetics**. 82. 1-11. 2008

BERGER, C; HATZER-GRUBWIESER, P; HOHOFF, C; PARSON, W. Evaluating sequence-derived mtDNA length heteroplasmy by amplicon size analysis. **Forensic Sciences International Genetics**. 5(2). 142-145. 2011.

BETANCOURT, A M; KING, A L ; FETTERMAN, J L; MILLENDER-SWAIN, T; FINLEY, R D; OLIVA; C R; CROWE, D R; BALLINGER, S W; BAILEY, S M. Mitochondrial-nuclear genome interactions in non-alcoholic fatty liver disease in mice. **Biochemical Journal**. 461(2): 223-232. 2014.

BIASINI, M; BIENERT, S; WATERHOUSE, A; ARNOLD, K; STUDER, G; SCHMIDT, T; KIEFER, F; CASSARINO, TG; BERTONI, M; BORDOLI, L; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: modeling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**. 42(1). 252-258. 2014.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes development**. 16(1). 6-21. 2002.

BLOMAIN, ES; MERLINI, DJ, PATTISON, AM; SNOOK, AE; WALDMAN, AS. Guanylyl cyclase C hormone axis at the intersection of obesity and colorectal cancer. **Molecular Pharmacology**. 90(3). 199-204. 2016.

BOAVENTURA, P; PEREIRA, D; MENDES, A; BATISTA, R; SILVA, AF; GUIMARAES, I; HONAVAR, M; TEIXEIRA-GOMES, J; LOPES, JM; MAXIMO, V; SOARES, P. Mitochondrial D310 D-Loop instability and histological subtypes in radiation-induced cutaneous basal cell carcinomas. **Journal of Dermatological Science**. 73. 31-39. 2014.

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.

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

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

CALABRESE, C; IOMMARINI, L; KURELAC, I; CALVARUSO, MA; CAPRISTO, M; LOLLINI, PL; NANNI, P; BERGAMINI, C; NICOLETTI, G; GIOVANNI, CD; GHELLI, A; GORGIO, V; GASPARRE, G; PORCELLI, AM. Respiratory complex I is essential to

induce a Warburg profile in mitochondria-defective tumor cells. **Cancer & Metabolism**. 1(11). Doi: 10.1186/2049-3002-1-11. 2013.

CANTER, JA; KALLIANPUR, AR; PARL, FF; MILIKAN, RC. Mitochondrial DNA G10398A polymorphism and invasive breast cancer in African- American women. **Cancer Research**. 65(17). 8028-8033. 2005.

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; SINGH, K K. 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.

CHATTERJEE, A; MAMBO, E; SIDRANSKY, D. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. **Oncogene**. 25. 4663-4674. 2006.

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

CONLEY, J. New tools bring greater understanding to cellular metabolism research. **Drug Discovery World**. 1. 43-53. 2014.

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

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

CRUZ-BERMUDEZ, A; VALLEJO, CG; GARESSE, R. Enhanced tumorigenicity by mitochondrial DNA mild mutations. **Oncotarget**. 6(15). 13628-13643. 2015.

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.

DARVISHI, K; SHARMA, S; BHAT, AK; RAI, E; BAMEZAI, RNK. Mitochondrial DNA G10398A polymorphism imparts maternal haplogroup N a risk for breast and esophageal cancer. **Cancer Letters**. 249. 249-255. 2007.

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

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.

DMITRENKO, V; SHOSTAK, K; BOYKO, O; KHOMENKO, O; ROZUMENKO, V; MALISHEVA, T; SHAMAYEV, M; ZOZULYA, Y; KAVSAN, V. Reduction of the transcriptional level of the mitochondrial genome in human glioblastoma. **Cancer Letters**. 218(1). 99-107. 2005.

EROL, I; ALEHAN, F; HORVATH, R; SCHNEIDERAT, T; TALIM, B. Demyelinating disease of central and peripheral nervous systems associated with a A8344G mutation in tRNA^{Lys}. **Neuromuscular Disorders**. 19(4). 275-278. 2009.

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. Disponível em: <http://anatpat.unicamp.br/taneugliomas> Acesso em: 21 jun 2015.

FALAVORO, B; ALLOCATI, N; GRAZIANO, V; DI ILIO, C; DE LAURENZI, V. Role of apoptosis in disease. **Aging**. 4(5). 330-349. 2012.

FEICHTINGER, RG; WEIS, S; MAYR, JA; ZIMMERMANN, F; GEILBERGER, R; SPERL, W; KOFLER, B. Alterations of oxidative phosphorylation complexes in astrocytomas. **Glia**. 62. 514-525. 2014.

FENG, D; XU, H; LI, X; WEI, Y; JIANG, H; XU, H; LUO, A; ZHOU, F. An association analysis between mitochondrial DNA content, G10398A polymorphism, HPV infection,

and the prognosis of cervical cancer in the Chinese Han Population. **Tumor Biology**. Doi: 10.1007/s13277-015-4429-4. 2015.

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.

GARCIA, LP; FREITAS, LRS. Consumo abusivo de álcool no Brasil: resultados da Pesquisa Nacional de Saúde 2013. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. 24(2). 227-237. 2015.

GATENBY, RA; GILLIES, RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? **Nature Reviews of Cancer**. 4(11). 891-899. 2004.

GENEBASE. mtDNA and its role in ancestry. *Genebase Tutorials*. Disponível em: <http://www.genebase.com/learning/article/17> Acesso em 19 abr 2015.

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.

GOMEZ-DURAN, A; PACHEU-GRAU, D; LOPEZ-GALLARDO, E; DIEZ-SANCHEZ, C; MONTOYA, J; LOPEZ-PEREZ, M; RUIZ-PESINI, E. Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. **Human Molecular Genetics**. 19(17). 3343-3353. 2010.

GÓMEZ-NICOLA, B; VALLE-ARGOS, B; PALLAS-BAZARRA, N; NIETO-SAMPEDRO, M. Interleukin-15 regulates proliferation and self-renewal of adult neural stem cells. **Molecular and Biology Cellular**. 22(12). 1960-70. 2011.

GRZYBOWSKA-SZATKOWSKA, L; SLASKA, B. Mitochondrial NADH dehydrogenase polymorphisms are associated with breast cancer in Poland. *Journal of Applied Genetics*. 55(2). 173-181. 2014.

GRZYBOWSKA-SZATKOWSKA, L; SLASKA, B; RZYMOWSKA, J; BRZOZOWSKA, A; FLORIANCZYK, B. Novel mitochondrial mutations in the ATP6 and ATP8 in patients with breast cancer. **Molecular Medicine Reports**. 10(4): 1772-1778. 2014.

HALL, T. BioEdit. Biological sequence alignment editor for win95/98/NT/2K/XP/7/8/10. **Tom Hall. Ibis Biosciences**. Carlsbad, CA. Current Version 7.2.5. 2013.

HANAHAN, D; WEINBERG, R A. hallmarks of cancer: the next generation, **Cell**, **144**(5): 646-674. 2011.

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

HAY, N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? **Nature Reviews Cancer**. 16. 635-649. Doi: 10.1038/nrc.2016.77. 2016.

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

HOLCIK, M; SONENBERG, N. Translational control in stress and apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 6. 318-327. 2005.

HOLT, IJ; DUNBAR, DR; JACOBS, HT. Behavior of a populations of partially duplicates mitochondrial DNA molecules in cell culture: segregation, maintenance and recombination dependente upon nuclear background. **Human Molecular Genetics**. 6(8). 1251-1260. 1997.

HORVATH, R; KLEY, RA; LOCHMÜLLER, H; VORGERD, M. Parkinson syndrome, neuropathy and myopathy caused by the mutation A8344G (MERRF) in tRNALys. **Neurology**. 68(1). 56-58. 2007.

HU, SP; DU, JP; LI, DR; YAO, YG. Mitochondrial DNA haplogroup confers genetic susceptibility to nasopharyngeal carcinoma in chaoshanese from Guandong, China. **Plos One**. 9(1). e87795. 2014.

IARC. Epidemiology of Cancer. Chapter 1. Introduction do Cancer Epidemiology. 2016.

IARC. Epidemiology of Cancer. Chapter 17. The role of Cancer Registries. 2016.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <http://www.iarc.fr/> Acesso em 21 fev 2016.

ICHIKAWA, T; OTANI, Y; KUROSOMI, K; DATE, I. Phenotypic transition as a survival strategy of glioma. **Neurologia Medico-Cirurgica Advance Publication**. 2016. Doi: 10.2176/nmc.ra.2016-0077.

INCA. Estimativa | 2016 – Incidência de Câncer no Brasil. BVS/MS. Rio de Janeiro-RJ. 2016.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br> Acesso em: 12 fev 2016.

IOMMARINI, L; KURELAC, I; CAPRISTO, M; CALVARUSO, MA; GIORGIO, V; BERGAMINI, C; GHELLI, A; NANNI, P; RUGOLO, M; GASPARRE, G; PORCELLI, AM. Different mtDNA mutations modify tumor progression in dependence of the degree of respiratory complex I impairment. **Human Molecular Genetics**. 23(6). 1453-1466. 2013.

JAROSZ, A; SKODA, M; DUDEK, I; SZUKIEVICZ, D. Oxidative stress and mitochondrial activation as the main mechanisms underlying graphene toxicity against human cancer cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. Doi: 10.1155/2016/5851035. 2016.

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.

JOHNSTONE, RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**. 1. 287-299. 2002.

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.

KAMALIDEHGHAN, B; HOUSHMAND, M. Archives of Medical Research. 44. 79-80. 2013.

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.

KAUFHOLD, S; GARBÁN, H; BONAVIDA, B. Yin Yang 1 is associated with cancer stem cell transcription factor (SOX2, OCT4, BMI1) and clinical implication. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 35(84). 2016. Doi: 10.11886/s13046-016-0359-2.

KELLY, D P and SCARPULLA, R C. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. Genes & Development. 18. 357-368. 2004.

KIM, A. Mitochondria in Cancer energy metabolism. **Toxicological Research**. 31(4). 323-330. 2015.

KIM, H K; MENDONÇA, K M; HOWSON, P A; BROTCHE, J M; ANDREAZZA, A C. The link between mitochondrial complex I and brain-derived neurotrophic factor in SH-SY5Y cells – The potential of JNX1001 as therapeutic agent. **European Journal of Pharmacology**. 764. 379-384. 2015.

KIM, S H; PARK, Y Y; YOO, Y S, CHO, H. Self-clearance mechanism of mitochondrial E3 ligase MARCH5 contributes to mitochondria quality control. **FEBS Journal**. 283(2): 294-304. 2016.

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 indentified by direct sequence comparison to blood samples. **International Journal of Cancer**. 93. 534-538. 2001.

KLEMB 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.

KLONISCH, T; GLOGOWSKA, A; THANASUPAWAT, T; BURG, M; KRCEK, J; PITZ, M; JAGGUPILLI, A; CHELIKANI, P; WONG, GW; HOMBACH-KLONISCH, S. Structural commonality of C1q TNF-related proteins and their potential to activate relaxin/insulin-like family peptide receptor 1 signaling pathways in cancer cells. **British Journal of Pharmacology**. Doi: 10.1111/pbh.13559. 2016.

KLUCKOVA, K; BEZAWORK-GELETA, A; ROHLENA, J; DONG, L; NEUZIL, J. Mitochondrial complex II, a novel target for anti-cancer agents. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1827(5): 552-564. 2013.

KNOLL, N; JARICK, I; VOLCKMAR, AL; KLINGENSPOR, M; ILLIG, T; GRALLERT, H; GIEGER, C; WICHMANN, HE; PETERS, A; WIEGAND, S; BIEBERMANN, H; FISCHER-POSOVSZKY, P; WABITSCH, M; VOLZKE, H; NAUCK, M; TEUMER, A; ROSSKOPF, D; RIMMBACH, C; SCHREIBER, S; JACOBS, G; LIEB, W; FRANKE, A; HEBEBRAND, J; HINNEY, A. Mitochondrial DNA variants in obesity. **Plos One**. 9(5). e94882. 2014.

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

KOCHER, TD; WILSON, AC. Sequence evolution of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees: control region and a protein-coding region. **Evolution of life: fossils, molecules and culture** (Ed S. Osawa & T. Honjo). Pp. 391-413. Tokyo: Springer-Verlag. 1991.

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.

KULAWIEC, M; OWENS, KM; SING, KK. MtDNA G10398A variant in African-American women with breast cancer provides resistance to apoptosis and promotes metastasis in mice. **Journal of Human Genetics**. 54. 647-654. 2009.

KULIS, M; ESTELLER, M. DNA methylation and cancer. **Advances in genetics**. 70. 27-56. 2010.

KUMAR, M; KAUR, P; KUMAR, M; SAXENA, R; SHARMA, P; DADA, R. Clinical characterization and mitochondrial DNA sequence variations in Leber hereditary optic neuropathy. **Molecular Vision**. 18. 2687-2699. 2012

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

LEE, S; HAN, MJ; LEE, KS; BACK, SC; HWANG, D; KIM, HY; SHIN, JH; SUH, SP; RYANG, DW; KIM, HR; SHIN, MG. Frequent occurrence of mitochondrial DNA mutations in Barrett's metaplasia without the presence of dysplasia. **Plos One**. 7(5). E37571. 2012.

LI, Y; LI, X; WANG, Z; FENG, Z; LI, L; KE, X. Subhaplogroup D4b1 enhances the risk of cervical cancer initiation: A case-control study in southern China. **Journal of Obstetric and Gynecology Research**. 42(3). 325-330. 2016.

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.

LIM, KS; NAVIAUX, RK; WONG, S; HAAS, R. Pitfalls in the Denaturing High-performance liquid chromatography analysis of mitochondrial DNA mutation. **Journal of Molecular Diagnostics**. 10(1). 102-108. 2008.

LIN, CS; LEE, HT; LEE, MH; PAN, SC; KE, CY; CHIU, AWH; WEI, YH. Role of mitochondrial DNA copy number alteration in human renal cell carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**. 17(6). 814. 2016.

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 Otorhino-Laryngology**. 2011.

LIU, S; SHI, S; LI, Y; KONG, D. Identification of sequence nucleotide polymorphisms in the D-loop region of mitochondrial DNA as a risk factor for epithelial ovarian cancer. **Mitochondrial DNA A**. 27(1). 9-11. 2016.

LIU, Y; YIN, T; FENG, Y; CONA, MM; HUANG, G; LIU, J; SONG, S; JIANG, Y; XIA, Q; SWINNEN, V; BORMANS, G; HIMMELREICH, U; OYEN, R; NI, Y. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. **Quantitative Imaging in Medicine and Surgery**. 5(5). 708-729. 2015.

LLOYD, RE; KEATLEY, K; LITTLEWOOD, DTJ; MEUNIER, B; HOLT, WV; AN, Q; HIGGINS, SC; POLYZOIDIS, S; STEPHENSON, KF; ASHKAN, K; FILLMORE, HL; PILKINGTON, GJ; MCGEEHAN, JE. Identification and functional prediction of mitochondrial complex III and IV mutations associates with glioblastoma. **Neuro-Oncology**. 17(7). 942-952. 2015.

LOUIS, DN; PERRY, A; REIFENBERGER, G; VON DEIMLING, A; FIGARELLA-BRANGER, D; CAVENEE, WK; OHGAKI, H; WIESTLER, OD; KLEIHUES, P; ELLISON, DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**. 131. 803-820. 2016.

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.

MAO, Q; GAO, L; LIU, Q; ZOU, Y; YANG, X; WANG, H; WANG, Q; YU, H. The A10398G polymorphism of ND3 gene and breast cancer: a meta-analysis. **Biomedical Reports**. 1. 259-264. 2013.

MARIE, S K N; SHINJO, S M O. Metabolism and brain cancer. **Clinics**. 66(1). 33-43. 2011.

MASUI, K; MISCHEL; PS; REIFENBERGER, GR. **Handbook of Clinical Neurology**, vol 134. Chapter 6: Molecular classification of gliomas. **Elsevier**. 2016.

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.

MEDEIROS, BC; FATHI, AT; DINARDO, CD; POLLYEA, DA; CHAN, SM; SWORDS, R. Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies. **Leukemia**. Accepted article October 2016. Doi: 10.1038/ley.2016.275.

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.

MEISSNER, C. The 4977 bp deletion of mitochondrial DNA in human skeletal muscle, heart and different areas of the brain: a useful biomarker? **Experimental Gerontology**. 43(7). 645-652. 2008.

MICROSOFT. MS Excel. Microsoft Trademarks. United States. © 2016.

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

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.

MONTEIRO, CA; CONDE, WL. A tendência secular da obesidade segundo estratos sociais: Nordeste e Sudeste do Brasil, 1975-1989-1997. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**. 43(3). 186-194. 1999.

MORRIS, G; ANDERSON, G; BERK, M. Coenzyme Q10 depletion in medical and neuropsychiatric disorders: potential repercussions and therapeutic implications. **Molecular Neurobiology**. 48(3): 883-903. 2013.

MUSICCO, C; CORMIO, A; CALVARUSO, MA; IORMMARINI, L; GASPARRE, G; PORCELLI, AM; TIMPERIO, AM; ZOLLA, L; GADALETA, MN. Analysis of the mitochondrial proteome of cybrid cells harbouring a truncative mitochondrial DNA mutation in respiratory complex I. **Molecular Biosystems**. 10(6). 1313-1319. 2014.

NAKAMOTO, RK; SCANLON, JAB; AL-SHAWI, M. The rotary mechanism of the ATP synthase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 476(1). 43-50. 2008.

NCBI. NCBI Map Viewer. 2016. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/> Acesso em 11 jan 2016.

NCI. National Institute of Cancer. Disponível em: <http://www.cancer.gov> Acesso em: 19 mar 2016.

NEUTZLING, MB; ARAUJO, CLP; VIEIRA, MFA; HALLAL, PC; MENEZES, AMB. Frequência de consumo de dietas ricas em gordura e pobres em fibra entre adolescentes. **Revista de Saúde Pública**. 41(3). 336-342. 2007.

OBERDOERFFER, P; SINCLAIR, D. The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 8. 692-702. 2007.

OHGAKI, H; KLEIHUES, P. The definitions of primary and secondary glioblastoma. **Clinical Cancer Research**. Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002. 2013.

OLAR, A; ALDAPE, KD. Using de molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. **Journal of Pathology**. 232(2). 165-177. 2014.

PANG, LJ; SHAO, JY; LIANG, XM; XIA, YF; ZENG, YX. Mitochondrial DNA somatic mutations are frequent in nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Biology and 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.

PARKER, M; MOHANKUMAR, KM; PUNCHIHEWA, C; WEINLICH, R; DALTON, JD; LI, Y; LEE, R; TATEVOSSIAN, RG; PHOENIX, TN; THIRUVENKATAM, R; WHITE, E; TANG, B; ORISME, W; GUPTA, K; RUSCH, M; CHEN, X; LI, Y; NAGAHAWHATTE, P; HEDLUND, E; FINKELSTEIN, D; WU, G; SHRTLEFF, S; EASTON, J; BOGGS, K; YERGEAU, D; VADODARIA, B; MULDER, HL; BECKSFORD, J; GUPTA, P; HUETHER, R; MA, J; SONG, G; GAJJAR, A; MECHANT, T; BOOP, F; SMITH, AA; DING, L; LU, C; OCHOA, K; ZHAO, D; FULTON, RS; FULTON, L; MARDIS, ER; WILSON, RK; DOWNING, JR; GREEN, DR; ZHANG, J; ELLISON, DW; GILBERTSON, RJ. C11orf95-RELA fusions drive oncogenic NF-Kb signaling in ependymoma. **Nature**. 506(7489). 451-455. 2014.

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.

PAVICIC, WH; RICHARD, SM. Correlation analysis between mtDNA 4977-bp deletion and ageing. **Mutation Research**. 670. 99-102. 2009.

PERRY, A; WESSELING, P. **Handbook of Clinical Neurology**, vol 134. Chapter 5: Histologic classification of gliomas. **Elsevier**. 2016.

PESSÔA, IA; SAGICA, FES; ANSELMO, NP; BRITO, JRN; OLIVEIRA, ECH. IDH1 and IDH2 mutations in different histologic subtypes and WHO grading gliomas in a sample from Northern Brazil. **Genetics and Molecular Research**. 14(2). 6533-6542. 2015.

PEZZOTI, A; KRAFT, P; HANKINSON, SE; HUNTER, DJ; BURING, J; COX, DG. The mitochondrial A10398G polymorphism, interaction with alcohol consumption, and breast cancer risk. **Plos One**. 4. E5356. 2009.

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. 2004. Disponível em: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi> Acesso em 14 mar 2014.

PUTIGNANI, L; RAFFA, S; PESCOSSOLIDO, R; AIMATI, L; SIGNORE, F; TORRISI, MR; GRAMMATICO, P. Alteration of expression levels of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS) in breast cancer cell mitochondria. **Breast Cancer Research and Treatment**. 110. 439-452. 2008.

RACKER, E. History of the Pasteur effect and its pathobiology. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 5(1-2). 17-23. 1974.

RAK, M; SU, CH; XU, JT; AZPIROZ, R; SINGH, AM; TZAGOLOFF, A. Regulation of mitochondrial translation of the ATP8/ATP6 Mrna BY Smt1p. **Molecular Biology of the Cell**. 27. 919-929. 2016.

REN, W; LI, Y; LI, R; FENG, H; WU, S; MAO, Y; HUANG, L. Mitochondrial intergenic COII/rRNA^{Lys} 9-bp deletion, a biomarker for hepatocellular carcinoma? **Mitochondrial DNA Part A**. 27(4). 2520-2522. 2016.

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 JÁ. 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.

SACHADYN, P; ZHANG, XM; CLARK, LD; NAVIAUX, RK; HEBER-KATZ, E. Naturally-occurring mitochondrial DNA heteroplasmy in the MRL mouse. **Mitochondrion**. 8(5-6). 358-366. 2008.

SANTIDRIAN, A F; MATSUNO-YAGI, A; RITLAND, M; SEO, B B; LEBOEUF, S E; GAY, L J; YAGI, T; FELDING-HABERMANN, B. Mitochondrial complex I activity and NAD⁺/NADH balance regulate breast cancer progression. **The Journal of Clinical Investigation**. 123(3): 1068-1081. 2013.

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

SCHMIDT M, GRUENSFELDER, 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.

SEQUEIRA, A; MARTIN, MV, ROLLINS, B; MOON, EA; BUNNEY, WE; MACCIARDI, F; LUPOLI, S; SMITH, EN; KELSOE, J; MAGNAN, CN; VAN OVENN, M; BALDI, P; WALLACE, DC; VAWTER, MP. Mitochondrial mutations and polymorphism in psychiatric disorders. **Frontiers in Genetics**. 3(103). 1-16. Doi: 10.3389/fgene.2012.00103. 2012.

SETIAWAN, VW; CHU, LH; JOHN, EM; DING, YC; INGLES, SA; BERNSTEIN, L; PRESS, MF; URSIN, G; HAIMAN, CA; NEUHAUSEN, SL. Mitochondrial DNA

G10398A variants is not associated with breast cancer in African-American women. **Cancer Genetics and Cytogenetics**. 181(1). 16-19. 2008.

SHAFFREY, ME; MUT, M; ASHER, AL; Brain metastases. **Current Problems on Surgery**. 41. 665-741. 2004.

SHAKHSSALIM, N; HOUSHMAND, M; KAMALIDEHGHAN, B; FARAJI, A; SARHANGNEJAD, R; DAGDAR, S; MOBARAKI, M; ROSLI, R; SANATI, MH. The mitochondrial C16069T polymorphism, not mitochondrial D310 (D-loop) mononucleotide sequence variations, is associated with bladder cancer. **Cancer Cell International**. 13. 120-129. 2013.

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.

SILVA-JR, W; BONATTO, SL; HOLANDA, AJ; RIBEIRO-DOS-SANTOS, AK; PAIXAO, BM; GOLDMAN, GH; ABE-SANDES, K; RODRIGUEZ-DELFIN, L; BARBOSA, M; PAÇO-LARSON, ML; PETZL-ERLER, ML; VALENTE V; SANTOS, SEB; ZAGO, MA. Mitochondrial genome diversity of native americans supports a single early entry of founder populations into America. **American Journal of Human Genetics**. 71. 187-192. 2002.

SINGH, RK; SRIVASTAVA, A; KALAIARASAN, P; MANVATI, S; CHOPRA, R; BOMEZAI, RNK. MtDNA germline variation mediated ROS generates retrograde signaling and induces pro-cancerous metabolic features. **Scientific Reports**. 4. 6571. Doi: 10.1038/srep06571. 2014.

SLASKA, B; GRZYBOWSKA-SZATKOWSKA, L; NISZTUK, S; SURDYKA, M; ROZANSKA, D. Mitochondrial DNA polymorphism in genes encoding ND1, COI and CYTB in canine malignant cancers. **Mitochondrial DNA**. 26(3). 452-458. Doi: 10.3109/19401736.840594. 2015

SNOWDEN, AW; GREGORY, PD; CASE, CC; PABO, CO. Gene-specific targeting of H3K9methylation is sufficient for initiating repression in vivo. **Current Biology**. 12. 2159-2166. 2002.

SOBENIN, IA; MITROFANOV, KY; ZHELANKIN, AV; SAZONOVA, MA; POSTNOV, AY; REVIN, VV; BOBRY SHEV, YV; OREKHOV, AN. Quantitative assessment of heteroplasmy of mitochondrial genome: perspectives in diagnostics and methodological pitfalls. **BioMed Research International**. ID: 292017. Doi: 10.1155/2014/292017. 2014.

STEFANO, GB; KREAM, RM. Mitochondrial DNA heteroplasmy in human health and disease. **Biomedical Reports**. 4. 259-262. 2016.

TAIT, S W G; GREEN, D R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 11. 621-632. 2010.

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.

THAPA, S; LALROHLUI, F; GHATAK, S; ZOHMINGTHANGA, J; LALLAWMZUALI, D; PAUTU, JL; KUMAR, NS. Mitochondrial complex I and V gene polymorphisms associated with breast cancer in mizo-mongoloid population. **Breast Cancer**. 23(4). 607-616. 2016.

TOKARZ, P; BLASIAK, J. Role of mitochondria in carcinogenesis. **Acta Biochimica Polonica**. 61(4): 671-8. 2014.

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.

TRAPPEN, POV; CULLUO, T; TROKE, R; SWANN, D; SHEPHERD, JH; JACOBS, IJ; GAYTHER, AS; MEIN, CA. Somatic mitochondrial DNA mutations in primary and metastatic ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**. 104. 129-133. 2007.

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.

VALLANCE, HD; JEVEN, G; WALLACE, DC; BROWN, MD. A case of sporadic infantile histiocytoid cardiomyopathy caused by the A8344G (MERRF) mitochondrial DNA mutation. **Pediatric Cardiology**. 25(5). 538-540. 2004.

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.

VIGNESWARAN, K; NEILL, S; HADJIPANAYIS, CG. Beyond de World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification. **Annals of Translational Medicine**. 3(7). 95. 2015.

VIRANI, S; COLACINO, JA; KIM, JH; ROZEK, L. Cancer epigenetics: a brief review. **ILAR Journal**. 53(3-4). 359-369. 2012.

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.

WALLACE, DC. Bioenergetics in human evolution and disease: implications for the origins of biological complexity and the missing genetic variation of common diseases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, series B: Biological Sciences**. 368: 20120267. 2013.

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.

WEIL, RJ; PALMIERI, DC; BRONDER, JL; STARK, AM; STEEG, PS. Breast cancer metastasis to the central nervous system. **American Journal of Pathology**. 167(4). 913-920. 2005.

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.

WHO: WORLD HEALTH ORGANIZATION. USA. 2016. Disponível em: <http://www.who.int/en/> Acesso em: 13 jan 2016.

WIEDMANN, FR; BARTELS, C; KIRCHES, E; MARWIN, C; WALLESH, CW. **Clinical Neurology and Neurosurgery**. 110(8). 859-863. 2008.

XU, H; HE, W; JIANG, HG; ZHAO, H; PENG, XH; WEI, YH; WEI, JN; XIE, CH; LIANG, C; ZHONG, YH; ZHANG, G; DENG, D; ZHOU, YF; ZHOU, FX. Prognostic value of mitochondrial DNA content and G10398A polymorphism in non-small cell lung cancer. **Oncology Reports**. 30. 3006-3012. 2013.

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, M F; 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.

YANG, JN; SELUANOV, A; GORBUNOVA, V. Mitochondrial Inverted repeats strongly correlate with lifespan: mtDNA inversions and aging. **Plos One**. 8(9). e73318. 2013.

YEUNG, KY; DICKINSON, A; DONOGHUE, JF; POLENKHINA, G; WHITE, SJ; GRAMMATOPOULOS, DK; MCKENZIE, M; JOHNS, TG; ST JOHN, JC. The identification of mitochondrial DNA variants in glioblastoma multiforme. **Acta Neuropathologica Communications**. 2(1). 2014.

YU, Y; LIN, H; QIAN, G; JIANG, YS; PANG, LX; WANG, YP; WANG, XF; KANG, YM; LI, CB; LIU, Q; XU, JZ; YOU, W. Mitochondrial ND3 G10398A mutation: a biomarker for breast cancer. **Genetics and Molecular Research**. 14(4). 17426-17431. 2015.

YUSOFF, A A M; AHMAD, F; IDRIS, Z; JAAFAR, H; ABDULLAH, M A. **Molecular Considerations and Evolving Surgical Management Issues in the Treatment of Patients with a Brain Tumor**. Chapter 1: Understanding Mitochondrial DNA in Brain Tumorigenesis. ISBN: 978-953-51-2031-5. 2015.

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

ZHANG, T; COOPER, S; BROCKDORFF, N. The interplay of histone modifications. **EMBO reports**. 16. 1467-1481. 2016.

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.

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

ZONG, W X; RABINOWITZ, J D; WHITE, E. Mitochondria and Cancer. **Aging and metabolism**. 61(5): 667-676. 2016.

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: