



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

ANÁLISE DE ALTERAÇÕES MOLECULARES NOS GENES *ND1* E *ND3* EM
CÂNCER DE PULMÃO NÃO PEQUENAS CÉLULAS NA POPULAÇÃO
PARAENSE

LORENA DUARTE FERNANDES

BELÉM – PA

2018

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES MOLECULARES NOS GENES *ND1*
E *ND3* EM CÂNCER DE PULMÃO NÃO PEQUENAS CÉLULAS
NA POPULAÇÃO PARAENSE**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientadora: Prof^a. Dra. Bárbara do Nascimento Borges (UFPA)

BELÉM - PA

Março – 2018



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

- F363a Fernandes, Lorena Duarte
 Análise de alterações moleculares nos genes nd1 e nd3 em câncer de pulmão não pequenas células na população paraense / Lorena Duarte Fernandes. — 2018
 59 f. : il. color
- Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia celular (PPGNBC), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.
 Orientação: Profa. Dra. Bárbara do Nascimento Borges
1. Cancer aspectos moleculares. 2. DNA mitocondrial. 3. Tórax tumores. 4. Pará. I. Borges, Bárbara do Nascimento, *orient.* II. Título
-

CDD 616.99494

LORENA DUARTE FERNANDES

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES MOLECULARES NOS GENES *ND1* E *ND3* EM
CÂNCER DE PULMÃO NÃO PEQUENAS CÉLULAS NA POPULAÇÃO PARAENSE**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientadora: Prof^a. Dra. Bárbara do Nascimento Borges (UFPA)

Dissertação aprovada em 09 de Março de 2018

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Matos Carvalho Bastos
Prof. Dr. Carlos Antônio da Costa Junior

BELÉM-PA

Março – 2018

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação aos meus filhos, meus tesouros, fonte de toda minha inspiração, Luísa, Isadora e Felipe, que mesmo sem entenderem muito bem a importância de todo meu esforço para chegar até aqui, estiveram sempre prontos a me dar um sorriso e muitos beijinhos para alegrar-me nos momentos de maior angústia.

AGRADECIMENTOS

Sou grata a DEUS por me permitir viver e me abençoar com um belo amanhecer todos os dias e com uma família linda, pois, sem o amor e carinho que sempre me deram ao longo dos anos, possivelmente não estaria aqui.

Aos meus pais, João Rogério e Maria de Fátima, agradeço por me darem o dom da vida e moldarem o meu caráter, tornando-me o ser humano que sou hoje, além de serem as pessoas em quem me espelho a todo momento. Aos meus irmãos, Luane e Artur, por sempre acreditarem em mim, mesmo quando nem eu pensava que conseguiria.

Agradeço ao meu esposo Alessandro, por seu amor e pela oportunidade de estar em Belém e indiretamente, ingressar no mestrado. Mesmo me mostrando todas as dificuldades que eu encontraria pela frente, ao final, sem compreender muito bem os meus motivos, fica orgulhoso e feliz com minhas conquistas.

Agradeço a Rose, por cuidar com todo carinho dos meus filhos durante minhas ausências.

A orientadora Prof^ª. Dr^ª. Bárbara do Nascimento Borges, por me receber de braços abertos quando cheguei, sem mesmo saber qual era meu perfil como aluna e por me permitir conhecer um mundo completamente novo para mim, o dia-a-dia da bancada de um laboratório; além de toda paciência dispensada ao longo desses dois anos. Agradeço a todos os membros do LOHC, por dividirem um pouco de seus conhecimentos comigo e por me ajudarem nessa caminhada e conclusão desse processo, em especial a Maricele, Rayssa e o Francisco.

À UFPA, ao PNBC, ao CNPQ, HUIBB e HOL pela estrutura e apoio para realização deste trabalho; assim como a Marinha do Brasil e ao HNBe por apoiar e entender o quão importante é a boa formação de seus profissionais.

Agradeço aos amigos, que muito me ajudaram na coleta dos dados e amostras dessa pesquisa.

Por fim, mas não menos importante, agradeço aos pacientes por permitirem que pesquisas pudessem ser realizadas na busca do melhor conhecimento sobre essa tão grave doença chamada câncer de pulmão.

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

Universidade Federal do Pará (UFPA)

Hospital Universitário João de Barros Barreto – (HUJBB)

Hospital Ophir Loyola (HOL)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

RESUMO

O carcinoma broncopulmonar é o mais frequente em todo o mundo, sendo uma das neoplasias mais agressivas, possuindo uma razão mortalidade/incidência em torno de 90%, com sobrevida global em cinco anos baixa, cerca de 10 a 15%, na maioria das populações do mundo. Na Região Norte do Brasil, esta patologia é a terceira mais frequente entre os homens e a quarta entre as mulheres. Do ponto de vista anatomopatológico, o câncer de pulmão é classificado em dois tipos principais: pequenas células e não-pequenas células, sendo este último o mais incidente, respondendo por 75% dos casos. Atualmente, a distinção entre os subtipos se baseia em diferenças histológicas, imunohistoquímicas e moleculares. Nesse contexto, é importante ressaltar que as informações moleculares influenciam não só no diagnóstico, prognóstico, mas também na conduta terapêutica. Diversas alterações genéticas e epigenéticas do genoma nuclear estão relacionadas a patogênese deste tumor. Entretanto, alterações na fosforilação oxidativa resultantes da disfunção mitocondrial tem sido há muito tempo sugeridas como envolvidas no processo de tumorigênese. Dessa forma, o presente estudo analisou dois genes do DNA mitocondrial (*ND1* e *ND3*) integrantes do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial em 66 amostras de tecido pulmonar de pacientes com e sem câncer de pulmão não pequenas células na população do estado do Pará. Após a análise pelo sequenciamento, foram identificadas quatro alterações no gene *ND1*: C3553T, T3552A, C3595ins e G3666A e apenas duas alterações no gene *ND3*: A10398G e C10400T. Dentre as alterações encontradas no gene *ND1*, não foram observadas significância estatística em relação ao desenvolvimento do câncer de pulmão. Entretanto, foi descoberto uma alteração estrutural no gene *ND1* na presença de C3595ins, ainda não descrita na literatura. Ao passo que, a presença do alelo A, observada em T3552A no gene *ND1*, foi associada de forma significativa ao um efeito protetor ao desenvolvimento de câncer de pulmão. Já alterações no gene *ND3* (G10398A e T10400C) foram significativamente associadas com o câncer de pulmão, sendo estas alterações em *ND3* potenciais para utilização como marcadores em pacientes com câncer de pulmão não pequenas células.

Palavras-chave: Câncer de pulmão não pequenas células, DNA mitocondrial, *ND1*, *ND3*, Marcadores de valor diagnóstico e prognóstico.

ABSTRACT

Bronchopulmonary carcinoma is the most frequent in the world, being one of the most aggressive neoplasms, with a mortality / incidence ratio of around 90%, with overall survival in five years low, about 10 to 15%, in most populations of the world. In the Northern Region of Brazil, this pathology is the third most frequent among men and the fourth among women. From the anatomopathological point of view, lung cancer is classified into two main types: small cells and non-small cells, the latter being the most incident, accounting for 75% of cases. Currently, the distinction between subtypes is based on histological, immunohistochemical, and molecular differences. In this context, it is important to emphasize that molecular information influences not only diagnosis, prognosis, but also therapeutic behavior. Several genetic and epigenetic alterations of the nuclear genome are related to the pathogenesis of this tumor. However, changes in oxidative phosphorylation resulting from mitochondrial dysfunction have long been suggested as involved in the process of tumorigenesis. Thus, the present study analyzed two mitochondrial DNA (ND1 and ND3) genes belonging to the I complex of the mitochondrial respiratory chain in 66 lung tissue samples from patients with and without non-small cell lung cancer in the population of the state of Pará. The sequencing analysis identified four alterations in the ND1 gene: C3553T, T3552A, C3595ins and G3666A and only two changes in the ND3 gene: A10398G and C10400T. Among the alterations found in the ND1 gene, no statistical significance was observed in relation to the development of lung cancer. However, a structural alteration in the ND1 gene was found in the presence of C3595ins, not yet described in the literature. Whereas, the presence of the A allele, observed in T3552A in the ND1 gene, was significantly associated with a protective effect on the development of lung cancer. Already changes in the ND3 gene (G10398A and T10400C) were significantly associated with lung cancer, these changes in ND3 being potential for use as markers in patients with non-small cell lung cancer

Keywords: Non-small cell lung cancer, mitochondrial DNA, *ND1*, *ND3*, Diagnostic value and prognostic markers.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Adenosina Trifosfato Desidrogenase

CPNPC- Câncer Pulmão Não Pequenas Células

DNA – Ácido desoxiribonucleico

FAD - Dinucleotídeo de flavina e adenina

mtDNA- Ácido desoxiribonucleico mitocondrial

NADH - Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido

OR- *Odds ratio*

OXPHOS - Fosforilação Oxidativa

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RR- Risco relativo

SNP – Polimorfismo de Único Nucleotídeo

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

URP – Resposta de Proteína Desdobrada

TCA – Ácido Tricarboxílico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: As Características do Câncer	14
Figura 2: Características Emergentes e Habilitadoras	15
Figura 3: Estimativa de neoplasias malignas para 2016 no Estado do Pará.....	17
Figura 4: Via Glicolítica na célula normal e tumoral	24
Figura 5: Representação do mtDNA humano	25
Figura 6: Esquema geral dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial	27
Figura 7: Eletroferograma da alteração C3543T do gene ND1	37
Figura 8: Eletroferograma da alteração T3552A do gene ND1	38
Figura 9: Eletroferograma da alteração C3595ins do gene ND1	39
Figura 10: Alinhamento da proteína selvagem (seminsC) com a proteína mutada pela C3595ins (insC), evidenciando a mudança do quadro de leitura na posição 97, com um códon de parada na posição 101	39
Figura 11: Modelagem tridimensional da proteína ND1	40
Figura 12: Eletroferograma da alteração G3666A do gene ND1	40
Figura 13: Eletroferograma da alteração A10398G do gene ND3.....	41
Figura 14: Eletroferograma da alteração C10400T do gene ND3	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estadiamento do câncer de pulmão 8th edição.....	22
Tabela2: Primers utilizados nas PCR deste trabalho	32
Tabela3: Caracterização da população tumoral	36
Tabela4: Caracterização da população não tumoral	38
Tabela5: Correlação dos tipos histológicos com o estadiamento ao diagnóstico..	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Distribuição dos casos por faixa etária.....	34
Gráfico2: Correlação dos tipos histológicos com o grau de estadiamento tumoral.....	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	CÂNCER DE PULMÃO: CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	14
1.2	EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA DO CÂNCER DE PULMÃO.....	16
1.3	PATOLOGIA E GENÉTICA	18
1.3.1	CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA	18
1.3.2	CLASSIFICAÇÃO TNM	20
1.3.3	ALTERAÇÕES GENÉTICAS	22
1.4	MITOCONDRIAS E A CARCINOGENESE.....	23
1.4.1	CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL.....	26
2	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVO GERAL.....	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	PACIENTES E AMOSTRAS TUMORAIS.....	30
3.2	COLETA DE DADOS.....	31
3.3	RISCOS E BENEFÍCIOS AOS PARTICIPANTES.....	31
3.4	EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	31
3.5	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	32
3.6	SEQUENCIAMENTO DO DNA.....	33
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
4	RESULTADOS	34
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO	34
4.2	ALTERAÇÕES NO GENE <i>ND1</i>	36
4.3	ALTERAÇÕES NO GENE <i>ND3</i>	41

5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÕES	52
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
8 ANEXOS	60

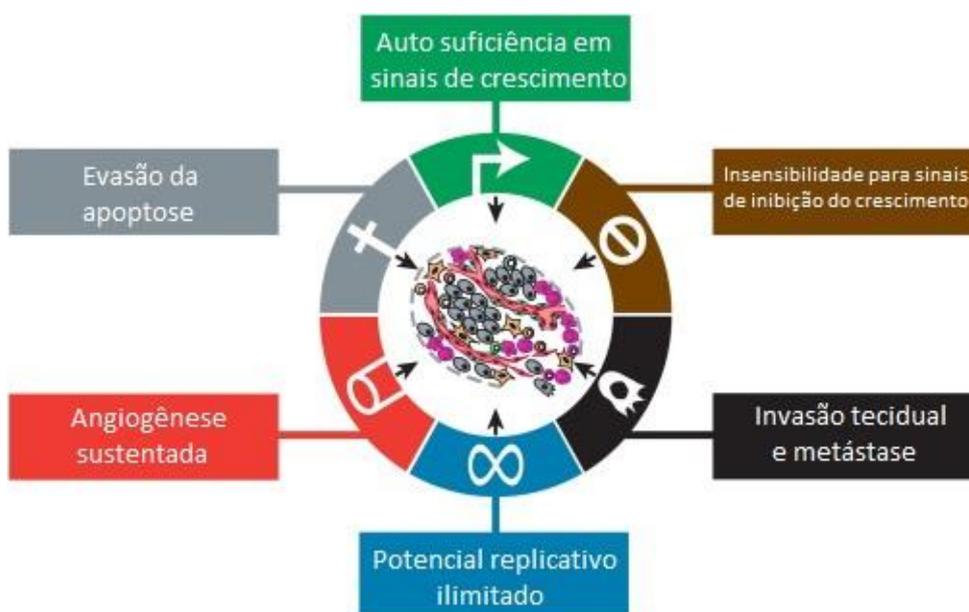
1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE PULMÃO: CONSIDERAÇÕES GERAIS

O câncer pode ser definido como uma doença resultante do acúmulo de alterações genéticas que interagem com vários fatores internos e externos (Hanahan & Weinberg, 2011). Esse acúmulo de alterações nos principais genes, que controlam o crescimento e a diferenciação celular, gera um crescimento descontrolado da célula, comprometendo a estabilidade genômica do indivíduo. Após iniciada, a proliferação celular exacerbada pode alcançar outros tecidos e órgãos, dando origem à metástase (Jelonek et al., 2010).

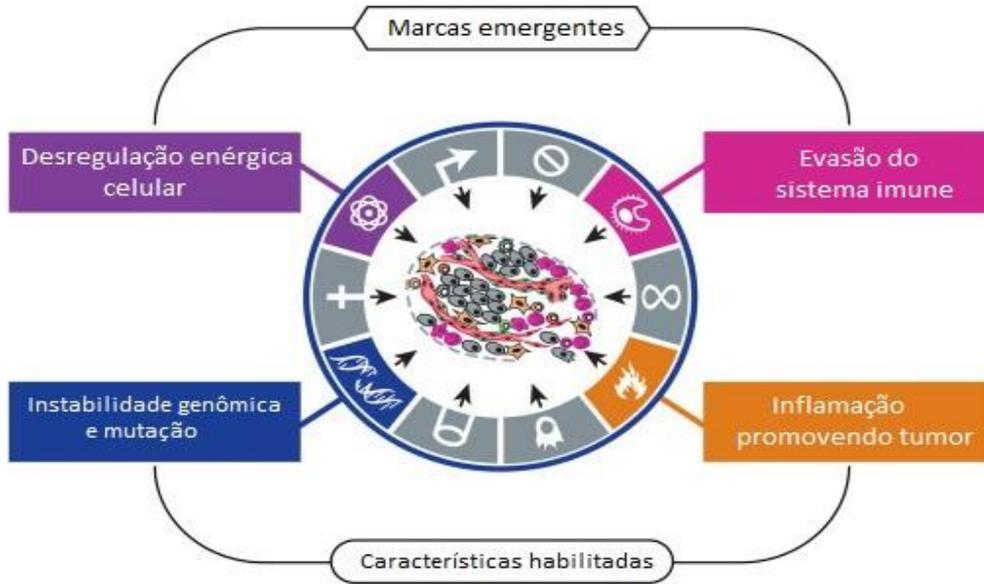
Hanahan & Weinberg (2011) propuseram 10 características biológicas essenciais para que uma célula tumoral surja e então se diferencie nos mais de cem distintos tipos de tumores já descritos, independentemente se a diferenciação foi causada por fatores endógenos ou exógenos. Essas características consistem em: manutenção da sinalização proliferativa, evasão de supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, indução à angiogênese, ativação de mecanismos de invasão e metástase, reprogramação do metabolismo energético e escape da eliminação pelo sistema imunológico (Figuras 1 e 2).

Figura 1: As Características do Câncer



Fonte: Hanahan & Weinberg (2011)

Figura 2: Características Emergentes e Habilitadoras



Fonte: Hanahan & Weinberg (2011)

Estas características são adquiridas pela célula tumoral por meio da ativação e modificação de mecanismos celulares, que coordenam processos como a proliferação celular, migração, polaridade, apoptose e diferenciação durante a embriogênese e homeostase dos tecidos (Hanahan & Weinberg, 2011). Muitas destas características podem ser provocadas por alterações genéticas como a mutação, a amplificação e /ou a superexpressão de oncogenes em conjunto com a perda de função, deleção, e/ou silenciamento epigenético de genes supressores tumorais importantes (Lu et al., 2009).

Por volta do final do século XIX, o câncer de pulmão era uma doença raríssima. Os tumores malignos de pulmão correspondiam, em 1878, a apenas 1% de todos os tumores observados em autópsias, mas tiveram um aumento para 10–15% no final da década de 1920, sendo mais expressivo após a I Guerra Mundial. Na Alemanha, em 1929, o médico Fritz Lickint reconheceu uma ligação entre o fumo e o câncer de pulmão, o que levou a uma agressiva campanha antitabagismo (Witschi, 2001). No entanto, apenas na década de 1950, em um estudo prospectivo de coorte britânico, foi publicada a primeira evidência epidemiológica sólida sobre a correlação entre o câncer de pulmão e o tabagismo (Doll et al., 1956).

As opiniões sobre os fatores etiológicos do câncer de pulmão – cuja incidência era cada vez maior - mudaram radicalmente em relação ao início do século: além do papel do tabagismo, discutido exaustivamente, a poluição do ar e produtos químicos associados a determinadas

profissões, começavam a ser associados ao desenvolvimento da doença (Witschi, 2001).

Apesar de décadas dos esforços para melhorar os resultados através de terapia multimodal, incluindo cirurgia, radioterapia e quimioterapia, a taxa de sobrevida global têm permanecido sombria, não ultrapassando 20% em 5 anos (Zhou, 2014). Sendo portanto, o câncer de pulmão um dos tipos de câncer mais agressivos, possuindo uma razão mortalidade/incidência (M/I) de, aproximadamente, 90% (INCA, 2015; Hirsch et al., 2017).

Além da perda de vidas humanas causada por câncer, o custo financeiro da doença é substancial, tornando-se um grande desafio, especialmente para sistemas de saúde pública com acesso universal, como no caso do Brasil. O cuidado do paciente com câncer incorre em muitas despesas para enfrentar a alta carga da doença, que deve ser observada em um cenário de crescentes necessidades de investimento, recursos finitos e busca de estratégias mais eficazes e eficientes. Um estudo de coorte, que avaliou os custos com insumos, procedimentos e tratamento de 277 pacientes com diagnóstico de câncer de pulmão avançado matriculados no Instituto Nacional do Câncer em 2011, evidenciou um custo de R\$ 2.473.559,91, sendo 71,5% relacionados à atenção ambulatorial e 28,5% às internações (Knust et al., 2017).

1.2 EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA DO CÂNCER DE PULMÃO

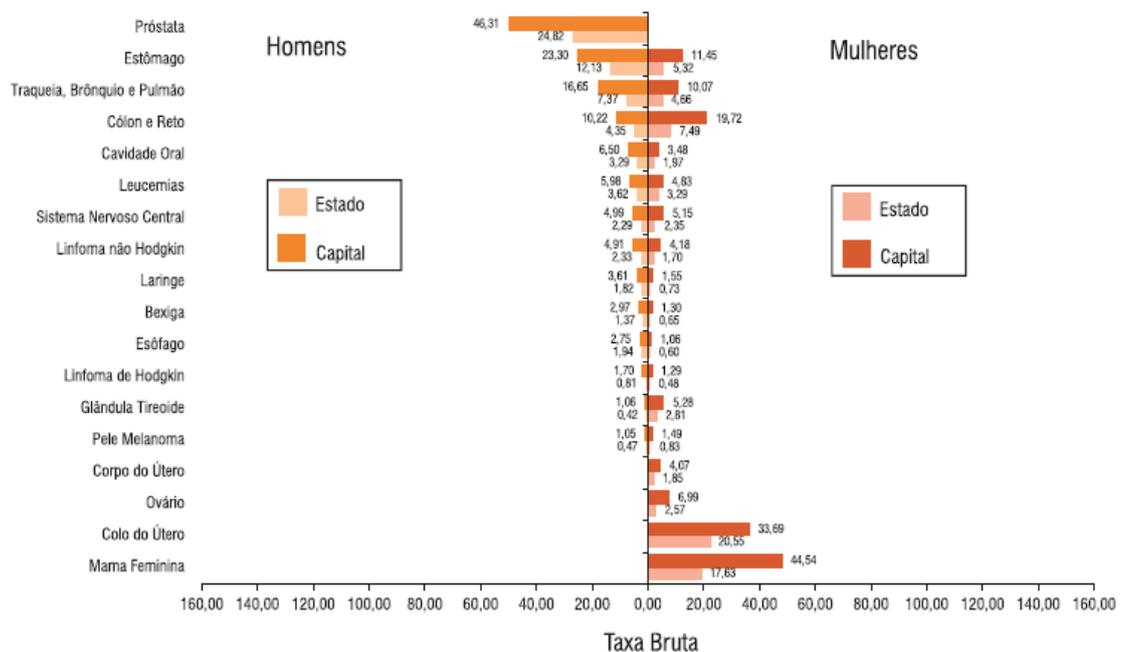
O carcinoma broncopulmonar continua sendo o câncer mais frequente em todo o mundo. Ocorreram mais de 1,8 milhão de novos casos (13% da incidência total de câncer) e quase 1,6 milhão mortes (20% da mortalidade total por câncer), conforme estimado em 2012 (Hirsch et al., 2017). Devido a uma taxa de mortalidade alta e bastante estável, os padrões e as tendências das taxas de mortalidade são semelhantes aos das taxas de incidência, independentemente do nível de recursos dentro de um determinado país (Stewart & Wild, 2014).

No Brasil, para o biênio de 2018-2019, estima-se 420.000 novos casos de cancer excetuando-se os de pele não melanoma, sendo 18.740 casos novos de câncer de traquéia, brônquios e pulmões entre homens e 12.530 entre mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 18,16 casos novos a cada 100 mil homens e 11,81 para cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de traquéia, brônquios e pulmões em homens é o segundo mais frequente nas Regiões Sul e Centro-Oeste, e o

terceiro mais frequente nas Regiões Sudeste, Nordeste e Norte. Em relação as mulheres, é o terceiro mais frequente na Região Sul e Sudeste, enquanto que nas Centro-Oeste, Norte e Nordeste, ocupa a quarta posição. Já no Estado do Pará, fica no quinto lugar entre as mulheres. (Figura 3) (INCA, 2018).

Este perfil epidemiológico observado para o país assemelha-se ao do restante dos países da América Latina e do Caribe, onde o câncer de pulmão é o segundo mais frequente em homens e o quarto mais frequente em mulheres (INCA, 2015).

Figura 3: Estimativa de neoplasias malignas para 2018 no Estado do Pará



Fonte: INCA,2018

Apesar de ocorrer em cerca de 15% de indivíduos não fumantes, a causa mais comum (85% dos pacientes com câncer de pulmão) é o consumo de cigarro, sendo a fumaça deste a mais intensamente investigada de todos os carcinógenos conhecidos (Pallis & Syrigos, 2013). Assim, o tabagismo é considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de pulmão, sendo que geralmente, os tabagistas têm cerca de 20 a 30 vezes mais risco de desenvolver câncer de pulmão, quando comparados a pessoas que nunca fumaram (INCA, 2015).

Devido a associação entre o tabagismo e o desenvolvimento do câncer de pulmão, políticas públicas contra o fumo foram implantadas no Brasil, o que resultou em uma queda de 35% na população fumante. Apesar disso, cerca de 20% da população em geral continua

consumindo o cigarro (Sá et al., 2016).

Embora o consumo de cigarro seja responsável pela maioria dos casos de câncer de pulmão, uma grande variedade de agentes são reconhecidos como causadores desta patologia: a poluição do ar, seja ambiental ou ocupacional (com asbestos, níquel, cromo e arsênico), além das doenças pulmonares crônicas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, entre outros (Baan et al., 2009; Straif et al., 2009; Zhou, 2014; Pandiri, 2015).

A poluição do ar foi considerada realmente como um potencial fator de risco para o desenvolvimento do câncer de pulmão a partir de uma meta-análise baseada em 17 estudos de coortes de nove países europeus. Os dados revelaram uma associação estatisticamente significativa entre risco de câncer de pulmão e partículas com um diâmetro inferior a 10 μm . Vale ressaltar que categorias de poluição atmosférica reconhecidas como causadoras de câncer de pulmão também incluem o fumante passivo e as emissões domésticas da combustão de carvão (Yorifuji & Kashima, 2013).

Por outro lado, casos familiares de câncer de pulmão são raros e quando comparados com casos não familiares, aqueles pacientes apresentam estágio patológico precoce e mais câncer do subtipo adenocarcinoma (Haraguchi et al., 2012).

1.3 PATOLOGIA E GENÉTICA

1.3.1 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA

O sistema de classificação dos tumores fornece uma base para o diagnóstico do tumor e para terapia a adotar em cada paciente, além de fornecer uma base crítica para estudos epidemiológicos e clínicos.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, do ponto de vista anatomopatológico, o câncer de pulmão é classificado em dois tipos principais: pequenas células e não pequenas células. O tumor de pulmão não pequenas células corresponde a um grupo heterogêneo composto principalmente de três tipos histológicos distintos: carcinoma epidermóide (também conhecido como carcinoma de células escamosas), adenocarcinoma e carcinoma de grandes células, ocorrendo em cerca de 85% dos pacientes diagnosticados com

câncer de pulmão. Dentre os tipos celulares restantes, destaca-se o carcinoma de pequenas células, com os três subtipos celulares: linfocitóide (*oat cell*), intermediário e combinado (células pequenas mais carcinoma epidermóide ou adenocarcinoma). A expressão *oat cell* ganhou importância na linguagem médica por ser um subtipo especial de câncer pulmonar. As principais características são rápido crescimento, grande capacidade de disseminação e invasão cerebral frequente (INCA, 2015; Travis, 2015; Inamura, 2017).

O subtipo histológico atualmente mais comum de neoplasia de pulmão é o adenocarcinoma que representa 40% de todos os cânceres de pulmão nos EUA. Um tumor é classificado como sendo um adenocarcinoma ao apresentar morfologia glandular clara, como acinar, papilar, lepidico ou sólido com padrões de mucina. Tumores sem uma morfologia celular clara para diagnóstico definitivo, tanto de adenocarcinoma como de carcinoma escamoso, requerem uma avaliação adicional com imunohistoquímica, utilizando pelo menos um marcador de adenocarcinoma (ex: TTF-1) e um marcador escamoso (ex: p63 ou p40). No entanto, na presença de resultados morfológicos e imunohistoquímicos inconclusivos, o tumor é classificado como "carcinoma de pulmão não pequenas células - não especificado de outra forma" (Travis et al., 2015).

Os adenocarcinomas podem ser classificados basicamente nesses subtipos: adenocarcinoma in situ, adenocarcinoma minimamente invasivo e adenocarcinoma invasivo que agora é classificado com cinco padrões predominantes: adenocarcinoma lepidico, papilar, acinar, micropapilar e sólido (Inamura, 2017).

Já o carcinoma de células escamosas representa aproximadamente 20% de todos os cânceres de pulmão nos EUA. Os tumores deste tipo são subclassificados como carcinoma de células escamosas in situ, carcinoma escamoso queratinizado, não queratinizado e basalóide. A diferenciação escamosa é identificada morfológicamente por ponte intercelular, formação de pérolas escamosas e queratinização celular individual (Travis et al., 2015).

A maioria dos pacientes com câncer de pulmão não pequenas células apresenta doença em estádios avançados na ocasião do diagnóstico, estimando-se que 20% dos pacientes têm doença localizada, 25% têm extensão da neoplasia para os linfonodos mediastinais e 55% já apresentam metástases a distância, sendo isso um dos motivos da sua alta taxa de mortalidade (Capelozzi, 2001).

1.3.2 CLASSIFICAÇÃO TNM

O estágio da doença desempenha um papel fundamental na orientação do tratamento, seleção, e na determinação do prognóstico (Tabela1). Além disso, a avaliação da resposta ao tratamento e a pesquisa clínica do câncer são facilitados por um sistema de classificação universal. O estadiamento TNM pulmonar oferece uma descrição clínica consistente e reprodutível do câncer de pulmão com base no grau de envolvimento anatômico. Isso é conseguido por definição das características do tumor primário (T), envolvimento linfonodal (N), e metástase à distância (M). A oitava edição do estadiamento TNM foi publicada recentemente e compreende os seguintes parâmetros:

T – Descrição do Tumor Primário:

TX – Tumor primário não individualizado.

T0 – Sem evidência de tumor.

Tis – Carcinoma “in situ”.

T1 – Tumor ≤ 3 cm no maior diâmetro, circundado por pulmão ou pleura visceral, sem evidência broncoscópica de invasão proximal além do brônquio lobar:

. T1a – tumor ≤ 1 cm

. T1b – tumor >1 cm mas ≤ 2 cm

. T1c – tumor >2 cm mas ≤ 3 cm

T2 – Tumor >3 cm mas ≤ 5 cm ou qualquer destes achados: envolvimento do brônquio principal indiferentemente da distância da carina principal mas sem comprometê-la, invasão da pleura visceral, associação com atelectasia ou pneumonia obstrutiva que se estenda para região hilar,envolvendo parte ou todo o pulmão.

. T2a – tumor > 3 cm mas ≤ 4 cm

. T2b – tumor >4 cm mas ≤ 5 cm

T3 – Tumor >5 cm mas ≤ 7 cm ou que invade qualquer uma das seguintes estruturas: parede torácica, nervo frênico, pericárdio; ou nódulo(s) tumoral (ais) no mesmo lobo do tumor primário.

T4 – Tumor >7 cm ou de qualquer tamanho que invade qualquer uma das seguintes

estruturas: mediastino, coração, grandes vasos, diafragma, nervo laríngeo recorrente, traquéia, esôfago, corpo vertebral, carina principal; nódulo(s) tumoral (ais) isolado em outro lobo ipsilateral.

N – Envolvimento Linfonodal

NX – Linfonodo regional não foram avaliados.

N0 – Sem metástase em linfonodo regional.

N1 – Metástase em linfonodo peribrônquico ipsilateral e/ou hilar ipsilateral e intrapulmonares, incluindo envolvimento por extensão direta.

N2 – Metástase em linfonodo mediastinal ipsilateral e/ou subcarinal

N3 – Metástase em linfonodo mediastinal contralateral; hilar contralateral; escalênico ipsilateral ou contralateral; ou supraclavicular.

M – Metástases

MX – Metástase à distância não estudada

M0 – Sem evidência de metástase à distância

M1 – Metástase à distância:

. M1a – Nódulo (s) tumoral (ais) em lobo contralateral; tumor com nódulo pleural ou pericárdico ou derrame pleural ou pericárdico maligno.

. M1b – Metástase extratorácica única

. M1c– Metástases extratorácica múltiplas em um ou mais órgão

Tabela1: Estadiamento do câncer de pulmão 8th edição

T/M	Descrição	N0	N1	N2	N3
T1	T1a ≤ 1	IA1	IIB	IIIA	IIIB
	T1b > 1-2	IA2	IIB	IIIA	IIIB
	T1c > 2-3	IA3	IIB	IIIA	IIIB
T2	T2a Cent / Pl Visc	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2a > 3-4	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2b > 4-5	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3	T3 > 5-7	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 Inv	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 Satel	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
T4	T4 > 7	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T4 Inv	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T4 Nod Ipsi	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
M1	M1a Nod Contr	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1a Pl Dissem	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1b Único	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1c Multi	IVB	IVB	IVB	IVB

Fonte: Adaptado Detteberg, 2017

1.3.3 ALTERAÇÕES GENÉTICAS

Com o avanço da tecnologia, a distinção entre adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas não se restringiu apenas as diferenças morfológicas ou imunohistoquímicas, sendo identificados diferentes subgrupos moleculares relacionados ao câncer de pulmão. Tais informações moleculares, também influenciam não só no diagnóstico, mas também na conduta terapêutica e acompanhamento (Sakashita et al., 2014; Hirsch et al., 2017).

As mutações *drivers*, aquelas envolvidas com a oncogênese e que conferem vantagem no crescimento clonal das células tumorais, em adenocarcinoma de pulmão são, principalmente, observadas em *KRAS* (22,9%), *EGFR* (14,8%), *PIK3CA* (2,1%), *BRAF* (1,9%) e *ERBB2* (0,9%). Deve-se ressaltar que pacientes não fumantes e/ou fumantes leves apresentam, em sua maioria, mutações em *EGFR* (predominantemente entre os éxons 18 e 21) ou *ERBB2*. Além desses genes, também são observadas fusões em *ROS1* e *ALK*, bem como a amplificação de *MET*. No momento, apenas três dessas alterações (*EGFR*, *ALK* e *ROS1*) apresentam tratamento direcionado com drogas quimioterápicas atualmente aprovadas:

Gefitinib ou Erlotinib para mutações em *EGFR* e Crizotinib para fusão *ALK* e *ROS1* (Boyer et al., 2014; Meador et al., 2014; Sakashita et al., 2014; Stewart & Wild, 2014).

Em carcinomas de células escamosas foram identificadas alterações em *TP53* (80%), *CDKN2A* (72%), *KEAP1* (34%), *PIK3CA* (16%) e *PTEN* (8%). Curiosamente, muitas das alterações somáticas identificadas no carcinoma de células escamosas foram reconhecidas como *drivers* de iniciação e progressão tumoral (Sakashita et al., 2014; Stewart & Wild, 2014).

Durante o processo de carcinogênese, não são observadas apenas alterações no genoma celular: alterações na fosforilação oxidativa resultantes da disfunção mitocondrial tem sido há muito tempo sugeridas como envolvidas na tumorigênese (Lu et al., 2009).

Para tal, podemos citar resultados evidenciando a incidência de variantes de nucleotídeos únicos não sinônimos (SNVs) e polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) selecionados preditos em diminuir a atividade do complexo I sendo significativamente associada a metástases à distância (Koshikawa, 2017). Assim como, trabalho realizado por Yuan em 2015 onde se verificou que a frequência de mutações do gene *ND6* correlacionava-se com a metástase dos linfonodos em pacientes com adenocarcinoma pulmonar (Yuan, 2015).

1.4 MITOCÔNDRIAS E A CARCINOGENESE

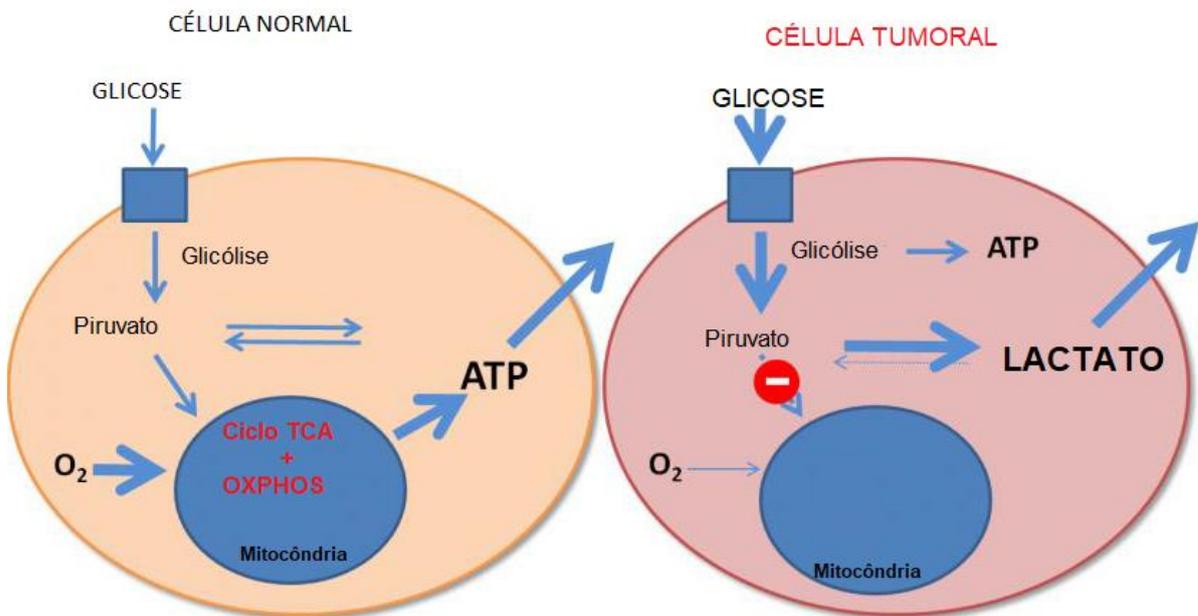
As mitocôndrias são organelas intracelulares presentes em células eucarióticas, responsáveis pela geração de ATP por um processo chamado fosforilação oxidativa (OXPHOS). A mitocôndria é constituída por uma membrana externa (MEM), lisa e esférica, e interna (MIM) com numerosas cristas que delimitam o espaço intermembranar do espaço intramitocondrial, a matriz.

Além de desempenhar um papel importante na respiração celular e no fornecimento de substratos energéticos para vias metabólicas intracelulares, as mitocôndrias ainda apresentam uma função importante na sinalização celular, particularmente na regulação da morte celular por apoptose. Na mitocôndria também ocorrem várias vias metabólicas importantes, incluindo a fosforilação oxidativa, o ciclo de Krebs, β -oxidação e a síntese de lipídeos e colesterol; portanto devido ao seu papel fundamental no organismo humano, defeitos na função mitocondrial pode levar a consequências desastrosas (Bonifácio, 2011).

Durante a fosforilação oxidativa, processo catalisado por complexos enzimáticos localizados na membrana interna mitocondrial, são produzidas espécies reativas de oxigênio (ROS) como subproduto desse processo, que podem provocar danos no DNA e sendo as mitocôndrias o principal local de produção de ROS, o DNA mitocondrial se torna mais propenso a sofrer esses danos (Lu et al., 2009; Khrapko & Turnbull, 2014).

Ao contrário das células saudáveis, que geram energia pela OXPHOS, células cancerosas adquirem uma propriedade não usual de metabolizar glicose em lactato, mesmo na presença de oxigênio, por um desvio metabólico chamado Efeito Warburg (Warburg, 1956). Apesar deste efeito ter sido descrito em células cancerosas, atualmente se sabe que nem todas as células tumorais compartilham esta característica (Gatenby & Gillies, 2004; Zong et al., 2016) (Figura 4).

Figura 4 :Via Glicolítica na célula normal e tumoral.



Fonte: Adaptado tese de doutorado Costa Jr, 2016

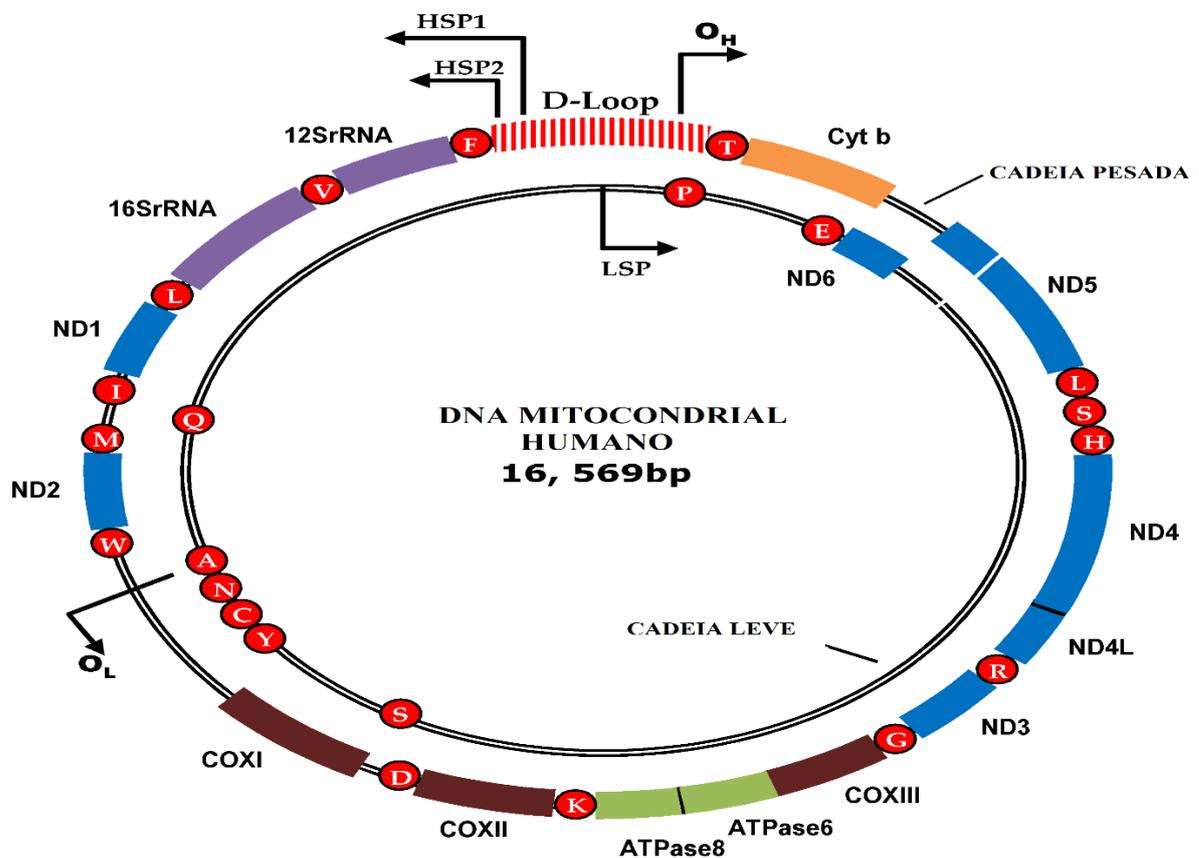
O DNA mitocondrial humano (mtDNA) é uma pequena molécula circular de DNA com 16.569 pares de bases (bp) (Ralph et al., 2010). Em animais, o mtDNA codifica 13 polipeptídeos codificantes de subunidades da cadeia respiratória (excetuando-se as do Complexo II), bem como 22 RNAs transportadores (tRNAs) e dois ribossômicos (rRNAs) (Wallace, 1994; Khrapko & Turnbull, 2014) (Figura 5). É um genoma altamente vulnerável a

danos oxidativos e genotóxicos e, por isso, apresenta uma taxa de mutação maior (de 10 a 200 vezes) que o DNA nuclear (Giannattasio et al., 2013).

Cada mitocôndria possui de duas a vinte cópias do mtDNA, sendo que o número de cópias do mtDNA em cada célula varia de algumas centenas a mais de 10.000, dependendo da célula (Ralph et al., 2010). Por essa razão, o estudo do mtDNA apresenta várias vantagens, quando comparado com o nDNA, pois além de ser menor e mais bem caracterizado, apresenta um elevado número de cópias, sendo necessário menos tecido para análise. Fora isso, o mtDNA é mais resistente aos danos provocados pelo isolamento e armazenamento, devido ao seu pequeno tamanho e sua estrutura covalentemente fechada e circular (Bonifácio, 2011).

Alterações no genoma mitocondrial podem representar um papel importante no desenvolvimento do câncer humano (Tong et al., 2003). Em tumores, as alterações no mtDNA incluem mutações de ponto, deleções, inserções e alterações no número de cópias, e estão associadas a vários tipos de câncer, incluindo o de pulmão (Jakupciak et al., 2008; Ding et al., 2012; Dai et al., 2013; Giannattasio et al., 2013; Hu et al., 2015; Lee et al., 2015).

Figura 5 :Representação do mtDNA humano.



Embora uma série de mecanismos possa contribuir para a iniciação e propagação do câncer de pulmão, a disfunção mitocondrial durante os estágios iniciais da transformação neoplásica pode resultar em produção excessiva de ROS, podendo levar a mais alterações do mtDNA. As anomalias nos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial e os mecanismos de geração de ROS não apenas prejudicam a estabilidade normal da autofagia-apoptose e, assim, iniciam a tumorigênese, mas também podem tornar as células cancerosas menos suscetíveis a agentes quimioterapêuticos (Aravamudan et al., 2013).

A disfunção metabólica mitocondrial é uma aberração comum em neoplasias. A fissão e a fusão mitocondrial são um ciclo complexo, necessário para manter a função mitocondrial e a viabilidade celular. A segmentação da dinâmica mitocondrial pode inibir a proliferação celular, migração, invasão e crescimento tumoral. Novas terapias estão emergindo para alvejar a dinâmica mitocondrial alterada no câncer, mas pesquisas adicionais são necessárias para entender completamente esse processo complexo e explorar seu potencial terapêutico (Lennon et al., 2014).

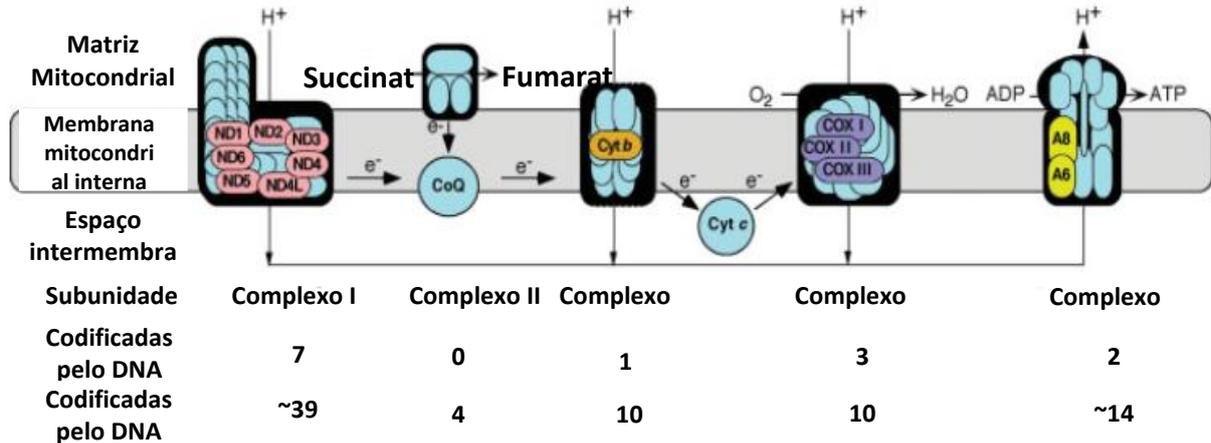
1.4.1 CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

A cadeia de transporte de elétrons consiste de quatro complexos multienzimáticos (Complexos I-IV) e dois pequenos carreadores de elétrons (Ubiquinona ou CoQ e Citocromo c). A energia gerada pelas reações catalisadas pela cadeia de transporte de elétrons, bombeia prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas formando um gradiente eletroquímico de prótons. Estes prótons voltam para a matriz mitocondrial por um 5º complexo multimérico chamado ATP sintase ou Complexo V, que age como uma turbina biológica, convertendo energia física em química, formando ATP pela OXPHOS (DiMauro et al., 2006) (Figura 6).

O complexo I mitocondrial ou NADH desidrogenase, executa o “passo inicial” da cadeia respiratória, convertendo NADH em NAD^+ , gerando um potencial transmembrana requerido para a síntese de ATP (Garcia-Heredia & Carnero, 2015; Guerra et al., 2017). É o maior complexo da cadeia de transporte de elétrons, formado por 47 subunidades, sendo 7 mitocondriais (*ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND4L*, *ND5* e *ND6*) e 40 nucleares, e possuindo uma forma característica em L. Se liga ao NADH e transfere dois elétrons, um de cada vez, para seu grupo protético FMN e para seus sete centros Ferro-Enxofre e, posteriormente, para a

Ubiquinona (Morris et al., 2013; Chaban et al., 2014).

Figura 6: Esquema geral dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial.



Fonte: DiMauro et al. (2016)

Em nosso estudo, avaliamos duas dessas subunidades (*ND1* e *ND3*) cuja alterações já foram descritas em estudo realizado com 60 pacientes e publicado em 2012 evidenciando que a maioria das mutações de mtDNA codificantes voltadas para o complexo respiratório I e a sobreexpressão forçada de uma dessas mutações resultaram em aumento da proliferação *in vitro*, invasão e produção de superóxido em células de câncer de pulmão (Dasgupta, 2012).

Juntamente com o Complexo III, o Complexo I é um dos principais formadores de ROS na mitocôndria (Barja, 2014), e mais de 600 mutações diferentes já foram descritas afetando o Complexo I em diferentes tipos de câncer, incluindo câncer de pulmão (Robert & Thomas, 2013; Garcia-Heredia & Carnero, 2015).

A redução da Ubiquinona induz uma mudança conformacional na proteína, resultando na translocação de quatro prótons para o espaço intermembranas da mitocôndria (Chaban et al., 2014).

O complexo II, também chamado de Succinato Desidrogenase, é uma entrada independente de elétrons na cadeia de transporte de elétrons. Oxida o succinato, em uma reação acoplada ao Ciclo de Krebs, e transfere elétrons para três centros Ferro-Enxofre para a Ubiquinona. Por não ser uma bomba de prótons, não contribui para o gradiente eletroquímico no espaço intermembranas (Chaban et al., 2014).

O complexo III ou Citocromo c Oxidorredutase, existe na membrana como um dímero, oxidando a Ubiquinona em Ubiquinol, resultando no bombeamento de dois prótons para o espaço intermembranas. Os elétrons do Ubiquinol são transferidos via Citocromo b para a Citocromo c presente no Complexo III (Chaban et al., 2014).

O complexo IV, também chamado Citocromo c Oxidase, recebe os elétrons da Citocromo c e transfere para o Oxigênio, convertendo-o em duas moléculas de água. Durante este processo, quatro prótons são transferidos para o espaço intermembranas (Chaban et al., 2014).

O Complexo V ou ATP sintase, utiliza a energia gerada pelo gradiente de prótons para formar ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (Chaban et al., 2014).

Para tentar reduzir o impacto do câncer sobre a população e sobre o orçamento público, são necessárias pesquisas que visem melhorias no diagnóstico precoce, bem como marcadores que podem ser utilizados para acompanhamento de resposta ao tratamento. Nesse contexto, sabe-se que pacientes com alterações moleculares específicas, tem se beneficiado de terapias moleculares também específicas (Black & Khurshid, 2013; Hirsch et al., 2017). E alterações no DNA mitocondrial, tais como: aumento no número de cópias e alterações de instabilidade microsatélite, já se mostraram associadas como marcadores moleculares de diagnóstico de câncer de pulmão não pequenas células (Dai et al., 2013; Lee et al., 2015), além de polimorfismos no mtDNA, descritos como relacionados com a idade ao diagnóstico (Hu et al., 2015).

Por isso, esse trabalho, buscou identificar marcadores moleculares de diagnóstico e prognóstico para o cancer de pulmão.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar das alterações nos genes codificadores de subunidades do Complexo I do DNA mitocondrial, em câncer de pulmão não pequenas células na população paraense.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Identificar alterações nucleotídicas nos genes *ND1* e *ND3* do DNA mitocondrial em tecidos neoplásicos de pacientes acometidos por câncer de pulmão não pequenas células, bem como em tecidos pulmonares de indivíduos sem diagnóstico de tumor na população paraense;

b) Relacionar os resultados obtidos aos diferentes tipos histológicos, hábito tabágico e etílico, idade ao diagnóstico, estadiamento e sobrevida em pacientes acometidos por câncer de pulmão não pequenas células, buscando a identificação de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PACIENTES E AMOSTRAS TUMORAIS

Neste trabalho foram analisadas 66 amostras de tecido pulmonar sendo 36 amostras de câncer de pulmão não pequenas células em parafina, obtidas do Hospital Ophir Loyola e 30 amostras de tecido fresco, coletadas em microtubos com *RNA later*, sendo 18 amostras de indivíduos submetidos a biópsias ou ressecções pulmonares decorrentes do diagnóstico e/ou tratamento cirúrgico de câncer de pulmão não pequenas células e 12 amostras para o grupo controle, de tecido pulmonar não tumoral, de indivíduos admitidos no Hospital Universitário João de Barros Barreto.

Todas as amostras coletadas foram transportadas para o Laboratório de Biologia Molecular “Francisco Mauro Salzano” do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, para processamento e análises moleculares.

As amostras tiveram seu diagnóstico histopatológico realizado pela equipe de patologia do hospital de origem, como parte da rotina diagnóstica, utilizando para tal, os padrões de classificação de tumores pulmonares da Organização Mundial de Saúde, assim como para estadiamento.

Os indivíduos recrutados 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 1).

Crítérios de inclusão: Foram incluídos indivíduos com diagnóstico de câncer de pulmão não pequenas células (os casos), bronquiectasia, doenças infecciosas pulmonares e suas complicações e doenças congênitas (grupo controle).

Crítérios de Exclusão: Foram excluídos i) pacientes com histórico de outra neoplasia; ii) pacientes com histórico de tratamento com quimioterapia ou radioterapia.

3.2 COLETA DE DADOS

Os dados coletados através tanto do preenchimento de um questionário por parte do paciente quanto das informações obtidas dos prontuários (Anexo 2), incluíram na grande maioria: idade ao diagnóstico, sexo, tipo histológico do tumor e seu estadiamento, hábito tabágico e etílico, histórico pessoal e familiar de neoplasias, etnia, histórico de doenças pulmonares, entre outros.

3.3 RISCOS E BENEFÍCIOS AOS PARTICIPANTES

Esse estudo acarretou risco mínimo de possibilidade de constrangimento dos indivíduos recrutados que responderem ao questionário (Anexo 2). Além disso, a realização das biópsias e ressecções pulmonares foram indicadas e realizadas para estabelecimento de diagnóstico e/ou tratamento de alguma patologia pulmonar, sendo para tanto, necessária a remoção de material biológico relacionado à esta enfermidade. Parte do material retirado foi então encaminhado para as análises moleculares. Esses indivíduos tiveram livre arbítrio de participar ou não da pesquisa.

Não foram oferecidos aos participantes da pesquisa quaisquer benefícios diretos por meio da participação na pesquisa em questão. Porém, os resultados dessa pesquisa buscaram gerar informações que visam ampliar o conhecimento sobre a biologia do câncer pulmonar e posteriormente promover campos de pesquisa para busca não apenas de novas drogas no combate ao câncer de pulmão, mas principalmente métodos diagnósticos para detecção precoce da doença, assim como métodos menos invasivos de diagnósticos e de acompanhamento de resposta ao tratamento.

3.4 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para a extração do DNA das amostras coletadas, foi seguido o protocolo do *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega). A concentração do DNA obtido foi determinada por análise espectrofotométrica (Espectrofotômetro Nanodrop 1000, Thermo Scientific). Para

verificar a integridade do DNA extraído, todas as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% corados com Gel Red™ (Biotium).

3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Após a extração do DNA, foram realizadas amplificações dos genes-alvo, utilizando os *primers* (iniciadores) descritos por Maximo et al. (2001), para os genes *ND1* e *ND3*. (Tabela 2).

As PCR foram realizadas em uma reação contendo 0,05 mM de dNTP; tampão de reação 1x; 1,5mM de MgCl₂, 100ng de DNA total, 10pM de cada iniciador e 1U de Taq DNA polimerase. A amplificação com 40 ciclos, consistiu de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento em uma temperatura dependente do iniciador utilizado, e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

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%, usando um marcador de peso molecular de 1 kilobase. A eletroforese foi realizada em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA), a uma corrente de 100 V, por aproximadamente 20 minutos, e o gel foi posteriormente visualizado em luz ultravioleta.

Tabela2: Iniciadores utilizados no presente trabalho

REGIÃO	INICIADORES	SEQUÊNCIA(5' - 3')	TAMANHO DO FRAGMENTO (pb)
<i>ND1</i>	ND1F	GACGCCATAAAACTCTTCAC	390
	ND1R	GGTTGGTCTCTGCTAGTGTG	
<i>ND3</i>	ND3F	CCTGCCACTAATAGTTATGTC	210
	ND3R	GATATGAGGTGTGAGCGATA	

3.6 SEQUENCIAMENTO DO DNA

O produto da PCR na sequência F, após ser purificado com o *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 realizada utilizando o *Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (ThermoFisher) e os iniciadores utilizados na PCR.

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 estabilizada em 18°C. Ao término da reação, as amostras foram precipitadas com isopropanol a 65% e os precipitados sequenciados em aparelho ABI 310 (ThermoFisher). Os eletroferogramas resultantes do sequenciamento foram analisados no programa BioEdit (Hall, 1999).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2008). A correlação entre as alterações nucleotídicas encontradas e as variáveis como sexo, idade ao diagnóstico, hábito tabágico e etílico, diagnóstico histopatológico e estadiamento foi analisada pelo teste Exato de Fisher. Também realizado o teste de *Odds Ratio*, para avaliar os riscos. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

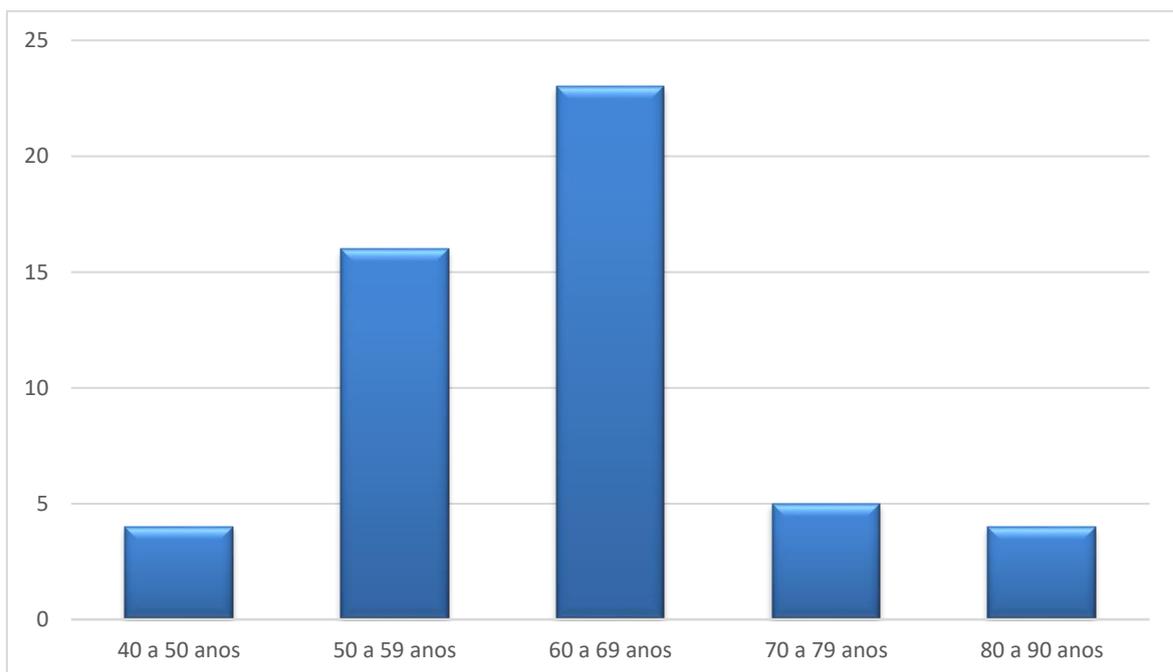
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

Neste trabalho foram analisadas 66 amostras, sendo 54 de tecido neoplásico, dentre elas 36 extraídas de parafina e 18 de tecido fresco. De parênquima pulmonar não neoplásico, foram analisadas 12 amostras sendo todas elas de tecido fresco.

Do total de amostras tumorais, 39 foram homens e 15 mulheres, em uma proporção de 2.6:1, estando a idade média ao diagnóstico de 63 anos, sendo de 62 anos para os homens e 67 anos para as mulheres.

No Gráfico 1, apresenta-se a distribuição dos pacientes portadores de neoplasia broncopulmonar distribuídos por faixa etária, onde pode-se observar um pico de incidência entre a sexta e sétima décadas de vida.

Gráfico 1: Distribuição dos casos por faixa etária



Com relação aos hábitos tabágicos, o grupo de casos foi composto por 47 indivíduos com hábito tabágico ativo ou história progressa de tabagismo, sendo considerados como

tabagistas (87%), e sete indivíduos sem histórico de tabagismo. No grupo controle, nove indivíduos se declararam como tabagistas (75%), enquanto três não apresentaram histórico de tabagismo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, quando correlacionamos a presença do hábito tabágico com o desenvolvimento do câncer de pulmão ($p= 0.2585$; OR: 2.2381, $p= 0.5439$).

Quanto ao hábito etilista, no grupo de casos 21 indivíduos (42,9%) se autodeclararam como fazendo uso de bebida alcoólica, enquanto 28 indivíduos não faziam uso de álcool sendo que informações acerca deste hábito não estavam disponíveis para cinco pacientes. Já no grupo controle, disponíveis informações apenas para oito indivíduos, sendo seis com hábito etilista. Também não houve correlação estatisticamente significativa quando comparamos o hábito etílico com a presença do câncer de pulmão ($p= 0.0954$; OR: 0.2500, $p= 0.1914$).

Em relação a sobrevida em cinco anos, 36 pacientes vieram a óbito enquanto 13 pacientes permanecem vivos após cinco anos de cirurgia. Quando é correlacionada a sobrevida do paciente com o hábito tabágico ou etílico, foi observada correlação estatística entre o hábito etílico e o óbito do paciente em até cinco anos ($p= 0.0001$; OR= 9.4444, $p= 0.0470$, IC95%= 1.0893-81.9957).

Em relação ao diagnóstico histopatológico, as amostras tumorais se dividiram em: 28 carcinomas epidermóides (51,9%), 18 adenocarcinomas (33,3%) e oito carcinomas de grandes células (14,8%). Não foram observadas correlações estatisticamente significantes entre os hábitos tabágicos, etílicos e a sobrevida em cinco anos e os tipos histológicos identificados. Já as amostras de tecido não neoplásico se dividiram entre casos de bronquiectasia, sequestro pulmonar, aspergiloma, criptococose, pseudotumor inflamatório, hamartoma e doenças inflamatórias.

A caracterização da população pode ser melhor visualizada nas tabelas abaixo, sendo dividida entre amostras tumorais (casos) (Tabela3) e não tumorais (controles) (Tabela4).

Tabela 3: Caracterização da população tumoral

SEXO	IDADE	HISTOPATOLOGICO	ESTADIAMENTO	TABAGISMO	ALCOOLISMO	Sobrevida em 5anos
M	42	adenocarcinoma	IIA	positivo	Positivo	negativo
M	43	carcinoma de grandes células	IIA	positivo	Positivo	negativo
M	46	adenocarcinoma	IA	positivo	Negativo	positivo
M	48	adenocarcinoma	IB	negativo	Negativo	positivo

SEXO	IDADE	HISTOPATOLOGICO	ESTADIAMENTO	TABAGISMO	ALCOOLISMO	Sobrevida em 5anos
M	50	carcinoma de grandes células	IIIA	positivo	Negativo	positivo
M	52	adenocarcinoma	IIIA	negativo	Negativo	negativo
F	52	carcinoma de grandes células	IIIA	positivo	Negativo	positivo
M	52	carcinoma epidermóide	IIA	positivo	Negativo	negativo
F	54	Adenocarcinoma	IB	positivo	Xxx	positivo
M	54	carcinoma de grandes células	IIIA	ex - fumante	Negativo	negativo
M	54	carcinoma epidermóide	IV	positivo	Negativo	negativo
M	55	adenocarcinoma	IIB	ex - fumante	Negativo	positivo
F	55	adenocarcinoma	IIB	positivo	Positivo	negativo
M	55	carcinoma epidermóide	IB	positivo	Negativo	negativo
M	56	carcinoma epidermóide	IIA	positivo	Negativo	negativo
F	56	carcinoma epidermóide	IV	positivo	Positivo	negativo
M	56	carcinoma epidermóide	IIB	positivo	Negativo	negativo
M	57	carcinoma epidermóide	IB	positivo	Negativo	negativo
M	57	carcinoma epidermóide	IIB	positivo	Negativo	positivo
M	58	carcinoma epidermóide	IA	positivo	Positivo	positivo
M	60	carcinoma epidermóide	IIIA	positivo	Positivo	negativo
F	61	Adenocarcinoma	IIIA	positivo	Positivo	negativo
M	62	carcinoma epidermóide	IB	ex - fumante	Negativo	positivo
F	62	carcinoma epidermóide	IV	positivo	Negativo	negativo
M	62	Epidermóide	IB	ex-fumante	Xxx	positivo
M	63	Adenocarcinoma	IIIA	positivo	Xxx	xxx
M	63	carcinoma de grandes células	IIB	ex - fumante	Negativo	positivo
M	63	carcinoma epidermóide	IIIA	positivo	Negativo	negativo
M	63	carcinoma epidermóide	IIB	positivo	Positivo	negativo
M	64	carcinoma epidermóide	IIB	ex - fumante	Negativo	negativo
M	65	carcinoma de grandes células	IIIB	positivo	Positivo	negativo

SEXO	IDADE	HISTOPATOLOGICO	ESTADIAMENTO	TABAGISMO	ALCOOLISMO	Sobrevida em 5anos
M	65	carcinoma epidermóide	IIB	positivo	Positivo	negativo
F	65	carcinoma epidermóide	IV	positivo	Negativo	negativo
M	66	Adenocarcinoma	IIB	positivo	Xxx	xxx
M	66	carcinoma de grandes células	IIIB	positivo	Positivo	negativo
M	66	carcinoma epidermóide	IIIB	ex - fumante	Negativo	negativo
F	66	carcinoma epidermóide	IIIB	positivo	Negativo	negativo
M	67	adenocarcinoma	IIIB	negativo	Negativo	negativo
M	67	Adenocarcinoma	IIIA	ex-fumante	Positivo	negativo
F	67	Adenocarcinoma	IIA	negativo	Negativo	positivo
F	67	Adenocarcinoma	IA	negativo	Negativo	positivo
F	68	Epidermóide	IIA	positivo	Positivo	xxx
M	69	Epidermóide	IIIA	positivo	Positivo	xxx
M	71	carcinoma epidermóide	IIB	positivo	Positivo	negativo
F	71	Epidermóide	IIIA	positivo	Negativo	negativo
M	74	Epidermóide	IIIA	positivo	Positivo	negativo
M	76	carcinoma de grandes células	IV	ex - fumante	Positivo	negativo
M	77	carcinoma epidermóide	IIIB	negativo	Negativo	negativo
M	80	Epidermóide	IIIA	positivo	Positivo	negativo
M	83	Adenocarcinoma	IIA	positivo	Positivo	negativo
M	83	Adenocarcinoma	IIA	positivo	Positivo	negativo
F	85	Adenocarcinoma	IA	negativo	Positivo	xxx
F	85	Epidermóide	IIIB	positivo	Xxx	negativo
F	87	Adenocarcinoma	IIIA	ex-fumante	Negativo	negativo

Tabela 4: Caracterização da população não tumoral

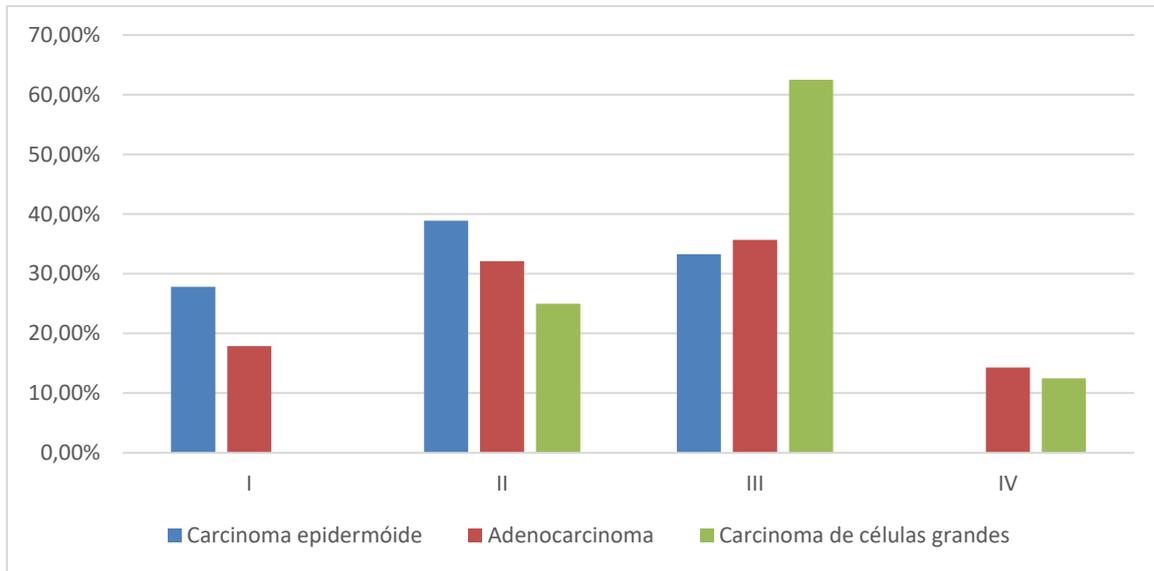
SEXO	IDADE	HISTOPATOLÓGICO	TABAGISMO	ALCOOLISMO
F	19	Sequestro Pulmonar	negativo	negativo
F	24	Bronquiectasia	negativo	negativo
M	49	Aspergiloma	ex-fumante	positivo
F	54	Aspergiloma	negativo	xx

SEXO	IDADE	HISTOPATOLÓGICO	TABAGISMO	ALCOOLISMO
F	54	Bronquiectasia	positivo	xxx
M	58	Hamartoma	ex-fumante	positivo
F	59	Criptococose	ex-fumante	positivo
M	62	Processo inflamatório	ex-fumante	xxx
M	63	Bronquiectasia	positivo	positivo
M	66	Bronquiectasia	positivo	xxx
M	67	Pseudotumor inflamatório	positivo	positivo
M	83	Bronquiectasia	positivo	positivo

A distribuição da amostra dentre os estadiamentos do câncer de pulmão se fez da seguinte forma: 10 amostras em estadio I, 18 amostras em estadio II, 21 amostras em estadio III e cinco amostras em estadio IV. Quando o estadiamento é correlacionado com o diagnóstico histopatológico, pode-se perceber que carcinomas epidermóides e adenocarcinomas são os mais frequentemente diagnosticados em estágios mais precoces (estadio I), enquanto que carcinomas de grandes células são os mais diagnosticados em estágios mais avançados (estádios III e IV) (Tabela 5, Gráfico 2).

Tabela 5: Correlação dos tipos histológicos com o estadiamento ao diagnóstico

	I	II	III	IV
ADENOCARCIONOMA	5 (27,8%)	7 (38,9%)	6 (33,3%)	0 (0%)
CARCINOMA EPIDERMÓIDE	5 (17,9%)	9 (32,1%)	10 (35,7%)	4 (14,3%)
CARCINOMA DE GRANDES CÉLULAS	0 (0%)	2 (25%)	5 (62,5%)	1 (12,5%)

Gráfico 2: Correlação dos tipos histológicos com o grau de estadiamento tumoral

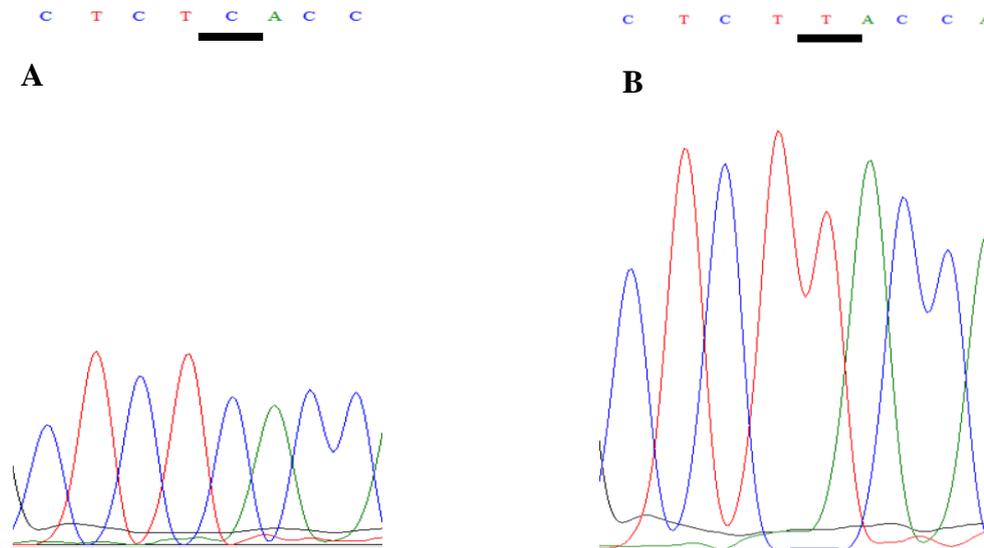
4.2 ALTERAÇÕES NO GENE *NDI*

Após a análise pelo sequenciamento, foram identificadas quatro alterações no gene *NDI*: C3553T, T3552A, C3595ins e G3666A. Não foi observada significância estatística quando comparamos a frequência das alterações encontradas com os dados clínicos (idade ao diagnóstico, hábito etílico e tabágico, sexo e sobrevivência) e a histopatologia dos pacientes com câncer de pulmão.

A alteração C3553T (Figura 7) foi observada em apenas uma amostra no grupo de casos (um indivíduo com adenocarcinoma, do sexo masculino, com 83 anos, fumante e fazendo uso de álcool, que veio a óbito em menos de cinco anos) e em uma amostra no grupo controle.

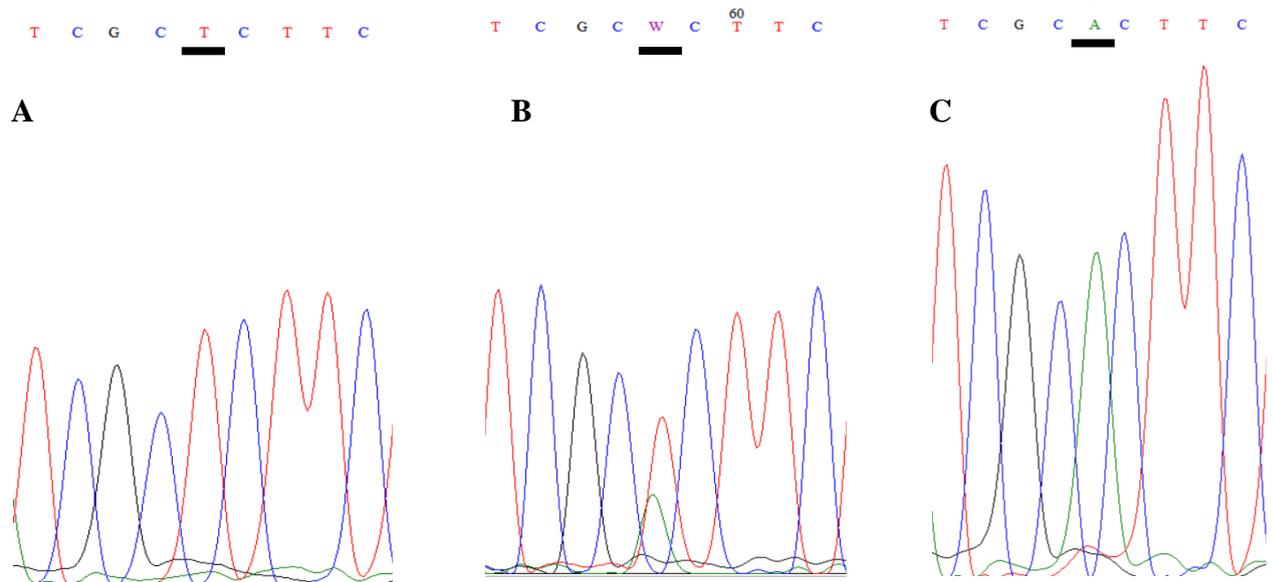
Assim, as frequências para os alelos C e T foram, respectivamente de 0,9815 e 0,0185 no grupo de casos, e de 0,9167 e 0,0833 no grupo controle, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Essa mutação é responsável por uma substituição sinônima no códon 79 do *NDI* (L79L).

Figura 7. Eletroferograma da alteração C3543T do gene *NDI*. A) Amostra homoplásmica para o alelo C; B) Amostra homoplásmica para o alelo T.



Em relação a alteração T3552A (Figura 8), responsável por uma alteração sinônima no códon 82 (A82A) foi observada a presença de cinco indivíduos homoplásmicos para o alelo A, tanto no grupo de casos como no de controles, e de quatro indivíduos heteroplásmicos encontrados apenas no grupo de casos. A frequência dos alelos T e A foi de, respectivamente, 0,8704 e 0,1296 no grupo de casos, e de 0,5833 e 0,4167 no grupo controle, tendo sido observada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p= 0,0134$). Quando o risco de desenvolver câncer de pulmão não pequenas células em relação a presença de um dos alelos, foi verificado que a presença do alelo A em homoplasmia, possui um efeito protetor em relação ao desenvolvimento de câncer de pulmão (OR= 0.1429; $p= 0,0170$; IC95%= 0,0328-0,6219).

Figura 8. Eletroferograma da alteração T3552A do gene *NDI*. A) Amostra homoplásmica para o alelo T; B) Amostra heteroplásmica (W); C) Amostra homoplásmica para o alelo A.



Foi observada a inserção de uma Citosina na posição 3595 (C3595ins) (Figura 9), o que leva a uma alteração do quadro de leitura a partir do aminoácido 97, resultando em um códon de parada na posição 101 e, conseqüentemente, em uma proteína com 218 aminoácidos a menos quando comparada com a proteína selvagem (Figuras 10 e 11), com um ângulo de torção de $-2,54$ e grau de solvatação de $1,39$, em comparação com o ângulo de torção de $-4,28$ e grau de solvatação de $1,48$ observados na proteína selvagem.

Essa inserção foi observada em duas amostras no grupo de casos (uma mulher de 61 anos com adenocarcinoma e um homem de 80 anos com carcinoma epidermóide, ambos com histórico de fumo e consumo de álcool e que vieram a óbito em menos de cinco anos) e em duas amostras do grupo controle. A frequência alélica da presença da inserção foi, respectivamente, para o grupo de casos e de controle, de $0,0370$ e $0,1667$, não havendo diferença estatística entre os grupos ($p= 0.1482$).

Figura 9. Eletroferograma da alteração C3595ins do gene *NDI*. A) Amostra sem a inserção de Citosina; B) Amostra com a inserção de Citosina.

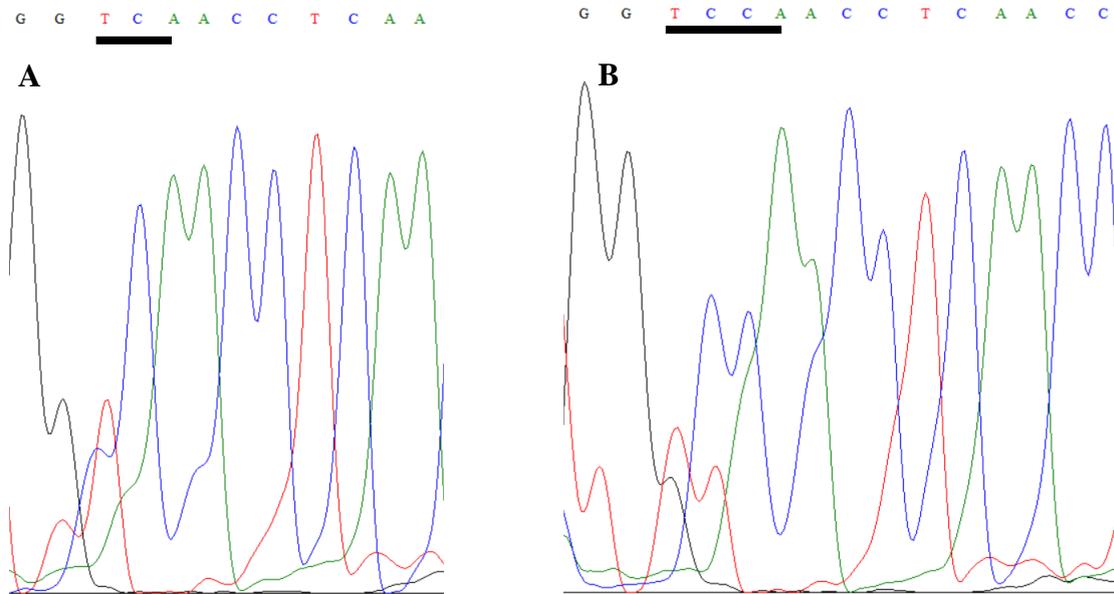


Figura 10. Alinhamento da proteína selvagem (seminsC) com a proteína mutada pela C3595ins (insC), evidenciando a mudança do quadro de leitura na posição 97, com um códon de parada na posição 101.

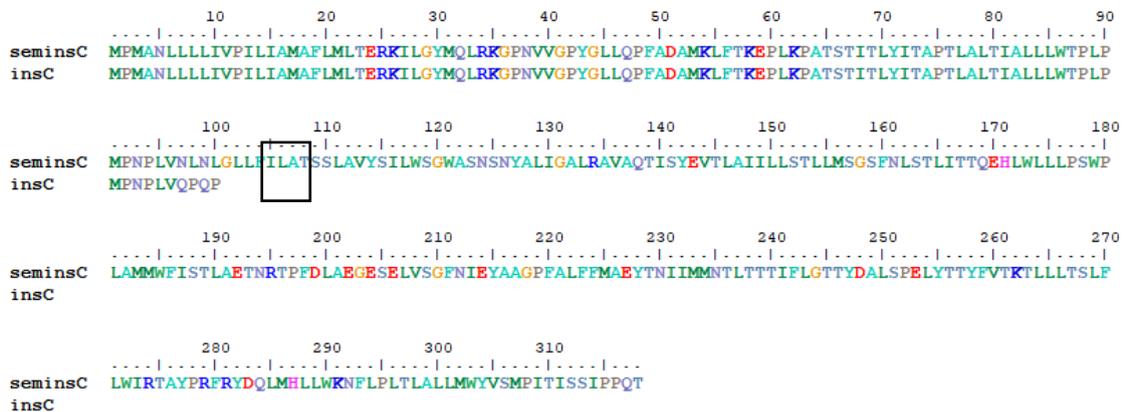
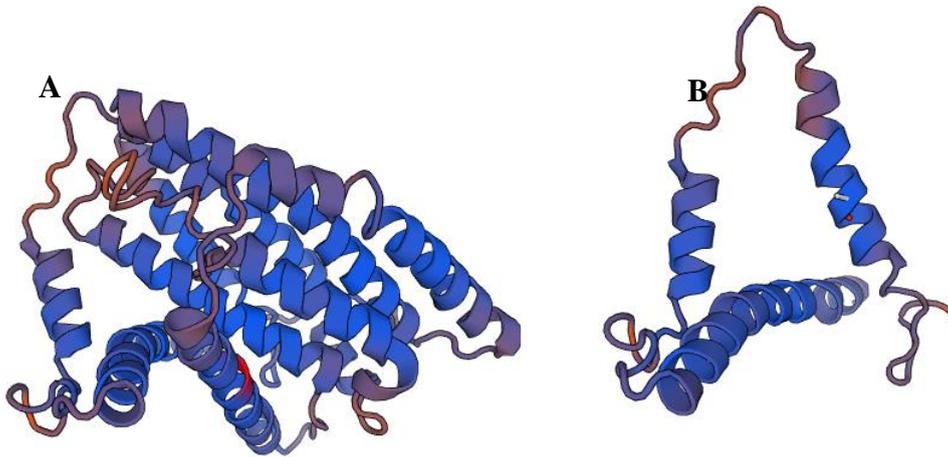
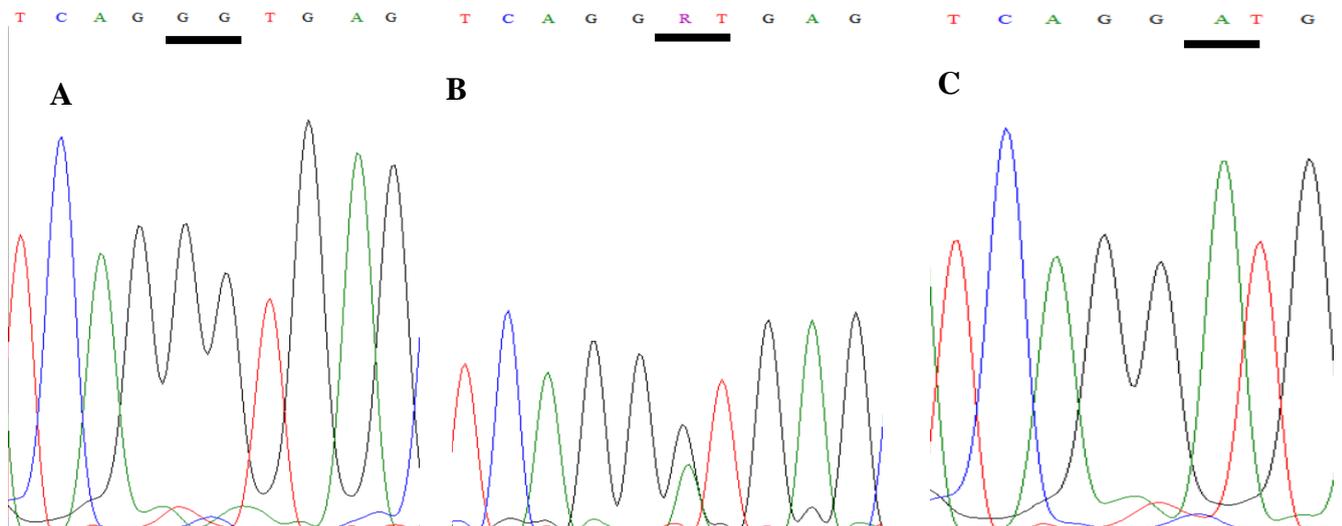


Figura 11. Modelagem tridimensional da proteína ND1. A) Proteína selvagem com 318 aminoácidos formando oito alfa-hélices; B) Proteína mutada (C3595ins) com 100 aminoácidos e três alfa-hélices na sua estrutura.



A alteração G3666A (Figura 12), que resulta em uma substituição sinônima na posição 120 (G120G), foi observada em homoplasmia em um único indivíduo do grupo de casos, enquanto que na sua forma heteroplásmica, a mesma foi identificada em três pacientes com câncer de pulmão. No grupo controle, foram identificados dois indivíduos homoplásmicos para a alteração, não tendo sido observados indivíduos com heteroplasmia. A frequência dos alelos G e A foi de, respectivamente, 0,9352 e 0,0648 no grupo de casos, e de 0,8333 e 0,1667 no grupo controle.

Figura 12. Eletroferograma da alteração G3666A do gene *ND1*. A) Amostra homoplásmica para o alelo G; B) Amostra heteroplásmica (R); C) Amostra homoplásmica para o alelo A.

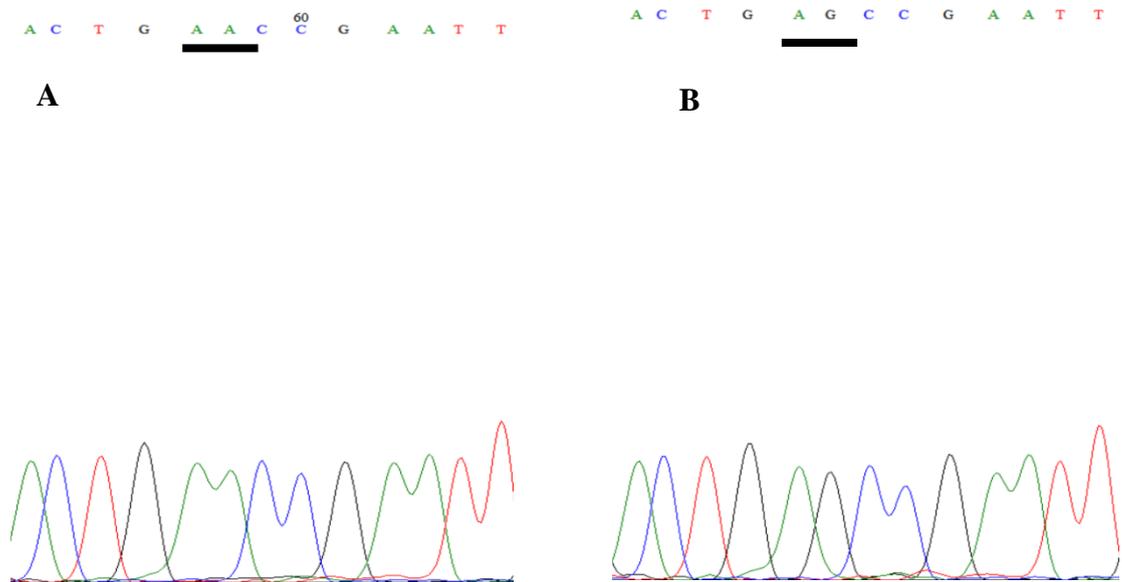


4.3 ALTERAÇÕES NO GENE *ND3*

Foram observadas apenas duas alterações no gene *ND3*: A10398G e C10400T, ambas sem apresentar diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso e controle.

O polimorfismo A10398G (Figura 13) resulta em uma substituição não sinônima no códon 114 (T114A), que resulta na troca de uma Treonina, que é um aminoácido polar (hidrofílico) não carregado para uma Alanina, um aminoácido apolar (hidrofóbico). A frequência dos alelos A e G são, respectivamente, de 0,5556 e 0,4444 no grupo de casos, e de 0,5833 e 0,4167 no grupo controle.

Figura 13. Eletroferograma da alteração A10398G do gene *ND3*. A) Amostra homoplásmica para o alelo A; B) Amostra homoplásmica para o alelo G.

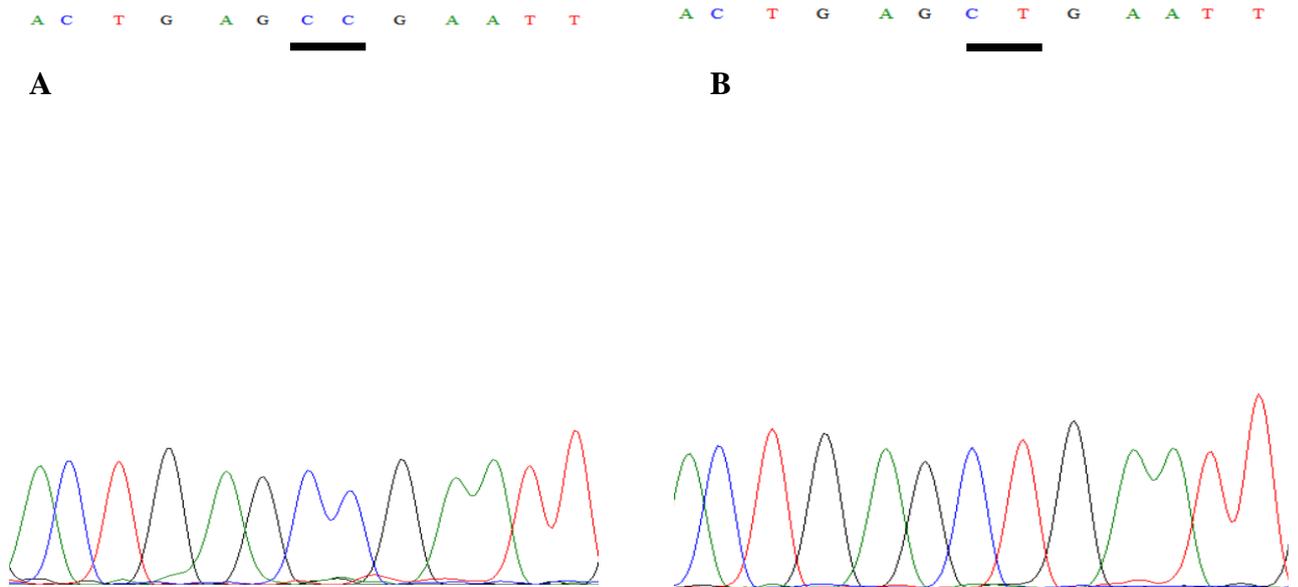


Ao analisar a presença do alelo G com os dados clínicos e o histopatológico, foi observada uma correlação estatisticamente significativa com a ausência do consumo de álcool em pacientes com câncer de pulmão ($p=0,0005$). Quando na presença deste alelo, mesmo sem o consumo de álcool, foi observado um aumento de quase 11 vezes no desenvolvimento de câncer de pulmão ($OR=10,800$; $p=0,0013$; $IC95\%=2,5430-45,8677$).

A outra alteração observada, C10400T (Figura 14), resulta em uma substituição sinônima no aminoácido da posição 114 (T114T). A frequência dos alelos C e T foram, respectivamente, de 0,7963 e 0,2037 no grupo de casos, e de 0,7500 e 0,2500 no grupo

controle.

Figura 14. Eletroferograma da alteração C10400T do gene *ND3*. A) Amostra homoplásmica para o alelo C; B) Amostra homoplásmica para o alelo T.



Foi observada uma correlação estatisticamente significativa entre a presença do alelo T e o câncer de pulmão mesmo sem o consumo de álcool ($p= 0,0069$), sendo que este está relacionado a um aumento de quase 10 vezes no desenvolvimento do tumor ($OR= 9,4500$; $p= 0,0451$; $IC95\%= 1,0954-81,5228$). É interessante ressaltar que todas as amostras que possuíam o alelo T também possuíam a alteração 10398G, ou seja, possuíam a mudança de aminoácido T114A.

5. DISCUSSÃO

As evidências acumuladas sugerem que o câncer de pulmão representa um grupo de doenças histologicamente e molecularmente heterogêneas mesmo dentro do mesmo subtipo histológico(Inamura,2017). A compreensão atual das vias moleculares no câncer de pulmão é algo que vem mudando o dia-a-dia dos pacientes pelo seu potencial como alvo terapêutico (Shtivelman,2014).

O risco relativo de câncer de pulmão associado ao tabagismo relatado em estudos na China é substancialmente menor que o relatado em estudos norte-americanos e europeus. No entanto, isso pode ser porque, na China, as taxas de câncer de pulmão em pacientes sem história de tabagismo são maiores e em tabagistas, semelhantes às do ocidente (Lee, 2013). Já as estimativas de risco atribuível à população para câncer de pulmão indicam que nos Estados Unidos, o tabagismo ativo é responsável por 90% do câncer de pulmão (entre os 10% restantes, 1/3 é de fumantes passivos), e entre os nossos casos esse percentual ficou em 87% (Ridge,2013).

Apesar disso, não evidenciamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos, quando correlacionamos a presença do hábito tabágico com o desenvolvimento do câncer de pulmão.

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), são considerados grupos de alto risco para o câncer de pulmão pessoas entre 55 e 74 anos com histórico de tabagismo intenso (um maço por dia por 30 anos seguidos), que ainda sejam fumantes ou que tenham interrompido o hábito de fumar há menos de 15 anos; o que corrobora com os nossos resultados aonde encontramos 72,2% dos nossos pacientes com câncer associados ao hábito tabágico entre os 50 e 70 anos (INCA,2015).

Muito mais homens do que as mulheres ainda morrem de câncer de pulmão a cada ano, mas a diferença de gênero na mortalidade por câncer de pulmão está se reduzindo e deve nivelar-se (Ridge,2013). Houveram mudanças temporárias substanciais nas taxas de incidência. As taxas de incidência para homens e mulheres na maioria dos países classificados como tendo um índice de desenvolvimento humano (IDH) alto ou muito alto (Austrália, Canadá, Dinamarca, Alemanha, Holanda, Rússia, Suécia, Reino Unido e Estados Unidos) convergiram gradualmente ao longo do tempo . Isso se deveu às significativas tendências descendentes entre os homens e ao aumento sustentado das taxas de câncer de pulmão

feminino. Em contraste, as taxas de incidência estão aumentando em paralelo para ambos os sexos no Brasil e no Japão. As análises da incidência entre os sexos em nossa população evidenciaram uma proporção entre homens e mulheres de 2,6:1, estando semelhante ao percentual dos países em desenvolvimento no qual essa proporção é de 2,7:1 (Cheng,2016; Stewart, 2014).

Estimativas mostram que o Japão teve entre os mais altos índices de sobrevida em 5 anos em todo o mundo em torno de 30%, enquanto a Líbia, Mongólia, Chile, Bulgária e Tailândia apresentaram as menores taxas de sobrevivência de menos de 10%. A diferença não se relaciona apenas com os níveis de desenvolvimento socioeconômico específicos do país, porque também há variação mesmo entre países altamente desenvolvidos; por exemplo, a taxa de sobrevida no Reino Unido é de cerca de 10%, muito inferior à relatada para vários outros países com um IDH alto (Cheng,2016; Torre, 2015). Em nosso estudo, a taxa de sobrevida ficou em 26,5% enquanto essa taxa de sobrevida global em 5 anos, no Brasil, está em torno de 18%. Essa diferença talvez se explique pelo fato de que aproximadamente metade da nossa amostra se encontra nos estádios iniciais ao momento do diagnóstico, fato pouco usual no câncer de pulmão, mas justificado por serem esses os pacientes que frequentemente são eleitos como candidatos ao tratamento cirúrgico. Além disso, alguns pacientes habitam no interior do estado, dificultando o acesso e o retorno as consultas, perdendo então o acompanhamento.

Em um estudo prospectivo realizado Breslow, num período de 10 anos na população dos EUA, relacionando o consumo de álcool com a frequência e a mortalidade por câncer, evidenciou que pacientes com relato de consumo frequente de bebidas alcoólicas apresentaram o maior risco de mortalidade por câncer de pulmão, com riscos significativamente aumentados de 30% entre todos os participantes e 37% entre as mulheres (Breslow, 2011). Também em nosso estudo foi evidenciado correlação significativamente estatística entre o hábito etílico e a redução na sobrevida dos pacientes com câncer de pulmão.

Em relação aos tipos histológicos, nosso estudo evidenciou que os carcinoma de grandes células são diagnosticado mais tardiamente em relação ao adenocarcinoma e o carcinoma escamoso, sem entretanto encontrarmos significância estatística com a sobrevida e o tipo histológico, porém Cheng em levantamento estatístico publicado em 2016, evidenciou que a sobrevida relativa de 5 anos foi maior para o adenocarcinoma e o carcinoma de células escamosas, em comparação com carcinoma de grandes células ou câncer de pulmão de pequenas células, podendo corresponder ao diagnóstico tardio da doença.

A mitocôndria é uma organela citoplasmática crucial para a célula, sendo responsável pela manutenção da respiração aeróbia, produzindo energia na forma de ATP pela OXPHOS, e gerando ROS como substâncias acessórias. Além disso, desempenha um papel importante na manutenção da homeostase do cálcio citosólico, apoptose, biossíntese do grupamento heme e de hormônios esteróides, além de controlar múltiplas vias metabólicas, como o ciclo de Krebs (Zhu & Wang, 2017).

Uma das principais características das células tumorais é a habilidade de reprogramar seu metabolismo para se adaptar à rápida proliferação e ao crescimento exponencial da célula. Isso é conseguido graças ao aumento da taxa de glicólise anaeróbia, conhecido como Efeito Warburg, suprindo, assim, as células em divisão com intermediários metabólicos que serão utilizados em processos anabólicos (Cruz-Bermúdez et al., 2015).

O complexo I é um componente crucial da cadeia respiratória, na manutenção do balanço $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ e dos níveis de ROS, além de contribuir para geração de potencial de membrana mitocondrial e, conseqüentemente para a produção de ATP. Dessa forma, disfunções neste complexo são frequentemente a causa de distúrbios mitocondriais e diversas doenças, incluindo o câncer (Koshikawa,2017). Tal correlação advém do aumento da produção de ROS devido a alterações no Complexo I, o que resulta em um aumento nos danos ao mtDNA (Akouchekian et al., 2011; Sultana et al., 2011).

Considerando que as células cancerosas possuem mais mutações em seu mtDNA do que as células normais, já foi relatada a presença de mutações nos genes que codificam as subunidades mitocondriais de NADH desidrogenase (ND), sendo estas associadas ao aumento da capacidade invasiva e metastática de várias células tumorais em experimentos com animais (Koshikawa,2017).

Apesar disso, a maioria das alterações encontradas no gene *NDI* (C3553T, T3552A e G3666A) eram substituições sinônimas, onde não é observada a troca de aminoácidos na proteína. Este resultado é similar ao relatado por Thapa et al. (2016) que observaram, em câncer de mama, que a ocorrência de mutações não-sinônimas no gene *NDI* não são frequentes.

No entanto, apesar de ser uma alteração sinônima, a presença do alelo A, observada em T3552A, foi associada de forma significativa ao um efeito protetor ao desenvolvimento de câncer de pulmão não pequenas células. Correlações estatisticamente significativas dessa alteração em relação a tumores, foram observadas no trabalho de Costa Júnior (2016), onde,

diferentemente do relatado no presente trabalho, o mesmo observou a correlação deste polimorfismo com o grau de estadiamento tumoral em gliomas na população paraense.

A alteração C3595ins, que ainda não foi descrita na literatura, é responsável pela produção de uma proteína 218 aminoácidos menor que a proteína selvagem. Sabe-se que a proteína *ND1* possui, em sua estrutura, oito alfa-hélices, sendo que a região localizada entre as hélices 1 e 2, se encontra na porção citoplasmática da célula, desempenhando um papel importante na formação do contato com o domínio hidrofílico (Bridges et al., 2011). Apesar desta região se manter intacta nas amostras com a alteração C3575ins, cinco alfa-hélices foram excluídas da estrutura final da proteína, resultando em uma proteína potencialmente sem função. Talvez, ampliando-se o número de amostras, esse achado possa vir apresentar significância estatística em relação ao cancer de pulmão.

Uma outra característica observada no gene *ND1* foi a presença de heteroplasmias em dois sítios diferentes: T3552A e G3666A. Sabe-se que a presença de heteroplasmias, que se caracterizam por ser a co-existência de múltiplas populações clonais de diferentes genomas mitocondriais, pode contribuir significativamente com a heterogeneidade clínica dos pacientes (Kasleck et al., 2017). Além disso, as heteroplasmias observadas em genes que codificam proteínas do Complexo I da cadeia de transporte de elétrons, são associadas a uma acentuação no crescimento tumoral, visto que o Complexo I disfuncional pode alterar a taxa de balanço redox (NADH/NAD⁺), além de ativar a via de sinalização AKT (Li et al., 2017).

No entanto, a observação do estado heteroplásmico em apenas dois dos polimorfismos encontrados em ambos os genes analisados pode ser considerado resultado de uma seleção intramitocondrial, onde um tipo de mtDNA mutante começa a dominar na mitocôndria, podendo levar à eliminação do alelo selvagem, o que explicaria a homoplasmia da geração seguinte e o início do desenvolvimento do processo neoplásico (Grzybowska-Szatowska, 2014).

Em relação ao gene *ND3*, foram identificados dois polimorfismos com significância estatística entre a presença de suas variantes e o desenvolvimento de câncer de pulmão não pequenas células mesmo sem o consumo de álcool: A10398G e C10400T, ambos frequentemente relatados na literatura (Qi, 2016). Esse resultado é discordante do relatado por Pezzotti et al. (2009) que observaram uma correlação da variante A10398G associada ao consumo de álcool ao risco de desenvolver câncer de mama na população americana.

Em termos populacionais, as frequências alélicas do polimorfismo A10398G

encontradas no presente trabalho foram similares às descritas por Sultana et al. (2011) relatadas para a população do norte da Índia. Além disso, já foi observado que o alelo 10398A é mais prevalente em populações africanas, afro-americanas e europeias, enquanto que o alelo 10398G é mais frequentemente encontrado em asiáticos e indianos (Sultana et al., 2011).

Apesar de ser associada às diferentes populações, a variante A10398G já foi relatada na literatura como significativamente associada a presença de metástases ósseas em tumores de próstata (Kalsbeck et al., 2017), ao desenvolvimento de câncer de mama (Czarnecka et al., 2010; Tianing & Sudarsa, 2017) e de gliomas de alto grau (Costa Júnior, 2016). Além disso, essa variante também já foi associada ao câncer de pulmão não pequenas células, sendo considerado um marcador de pior prognóstico e associado a resistência ao tratamento (Choi et al., 2011; Xu et al., 2013). Em estudo realizado por Qi et al. , os achados sugeriram que, entre pacientes com cancer de pulmão não pequenas células (CPCNP), há grandes mudanças na heteroplasmia mutante do mtDNA 10398G e um baixo grau de mutação da mtDNA 10398G heteroplasmática pode ser um marcador de mau prognóstico em pacientes com CPCNP (Qi, 2016).

Tal associação do polimorfismo A10398G com o desenvolvimento de tumores se dá pelo aumento na produção de ROS, devido ao déficit no Complexo I, com consequente aumento de danos ao DNA (Kalsbeck et al., 2017; Tianing & Sudarsa, 2017; Martínéz-Ramirez et al., 2018). Já a presença do polimorfismo C10400T, já foi relatado na literatura que, assim como observado em nossa população, o mesmo ocorre como consequência da variante G10398A (Sultana et al., 2011).

Como uma visão futurista, a ampliação de pesquisas para um melhor entendimento das alterações mitocondriais, seja por mutações em seu DNA ou por alterações em vias de sinalização, poderiam proporcionar não só biomarcadores de diagnóstico ou prognóstico como também uma área a se explorar na reprogramação do metabolismo da glicose direcionado seletivamente as células cancerígenas, proporcionando uma possível abordagem terapêutica atraente e efetiva. Essas abordagens podem ser desafiadoras porque serão necessárias para superar as respostas compensatórias e adaptativas mediadas pela natureza enraizada e sofisticada do metabolismo da glicose (Hay,2016).

6. CONCLUSÕES

-Não foram observadas no gene *ND1* alterações com significância estatística em relação ao desenvolvimento do câncer de pulmão não pequenas células;

- Descoberta uma alteração estrutural no gene *ND1* na presença de C3595ins, ainda não descrita na literatura.

-A presença do alelo A, observada em T3552A no gene *ND1*, foi associada de forma significativa ao um efeito protetor ao desenvolvimento de câncer de pulmão não pequenas células;

-Alterações no gene *ND3* (G10398A e T10400C) foram significativamente associadas com o câncer de pulmão, mesmo quando o paciente não fazia uso de bebida alcoólica;

-Estas alterações em *ND3* possuem potencial para utilização como marcadores em pacientes com câncer de pulmão não pequenas células.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKOUCHEKIAN, Mansoureh et al. Analysis of mitochondrial ND1 gene in human colorectal cancer. **Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 16, n. 1, p. 50, 2011.
- ARAVAMUDAN, Bharathi et al. Mitochondria in lung diseases. **Expert review of respiratory medicine**, v. 7, n. 6, p. 631-646, 2013.
- AYRES M, et al. *Biostat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém-PA: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília, 2008. 290 pp.
- BAAN, Robert et al. A review of human carcinogens—part F: chemical agents and related occupations. 2009.
- BARJA, Gustavo. The mitochondrial free radical theory of aging. In: **Progress in molecular biology and translational science**. Academic Press, p. 1-27, 2014.
- BLACK, ROBERT C.; KHURSHID, HUMERA. NSCLC: An update of driver mutations, their role in pathogenesis and clinical significance. **RI Med J**, v. 98, n. 10, p. 25-8, 2015.
- BONIFÁCIO, Ana Catarina da Silva. **Avaliação do número de cópias do DNA mitocondrial como biomarcador no cancro do pulmão**. 2011. Tese de Doutorado
- BOYER, Michael et al. Preparing for tomorrow: Molecular diagnostics and the changing nonsmall cell lung cancer landscape. **Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology**, v. 10, n. S2, p. 2-10, 2014.
- BRESLOW, Rosalind A. et al. Prospective study of alcohol consumption quantity and frequency and cancer-specific mortality in the US population. **American journal of epidemiology**, v. 174, n. 9, p. 1044-1053, 2011.
- BRIDGES, Hannah R.; BIRRELL, James A.; HIRST, Judy. The mitochondrial-encoded subunits of respiratory complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase): identifying residues important in mechanism and disease. **Biochemical Society Transactions**, v.3, p.799-806,2011.
- CALABRESE, Claudia et al. Respiratory complex I is essential to induce a Warburg profile in mitochondria-defective tumor cells. **Cancer & metabolism**, v. 1, n. 1, p. 11, 2013.
- CAPELOZZI, Vera Luiza. Understanding the role of biological markers in lung cancer. **Jornal de Pneumologia**, v. 27, n. 6, p. 321-328, 2001.

- CHABAN, Yuriy; BOEKEMA, Egbert J.; DUDKINA, Natalya V. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1837, n. 4, p. 418-426, 2014.
- CHANDRA, Dhyan; SINGH, Keshav K. Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1807, n. 6, p. 620-625, 2011.
- CHENG, Ting-Yuan David et al. The international epidemiology of lung cancer: latest trends, disparities, and tumor characteristics. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 11, n. 10, p. 1653-1671, 2016.
- CHOI, So-Jung et al. Mutational hotspots in the mitochondrial genome of lung cancer. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 407, n. 1, p. 23-27, 2011.
- COSTA JR CA. Avaliação da integridade genômica mitocondrial em gliomas de alto e baixo grau na população paraense. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Pará, 2016.
- CRUZ, Charles S. Dela; TANOUE, Lynn T.; MATTHAY, Richard A. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. **Clinics in chest medicine**, v. 32, n. 4, p. 605-644, 2011.
- CRUZ-BERMÚDEZ, Alberto et al. Enhanced tumorigenicity by mitochondrial DNA mild mutations. **Oncotarget**, v. 6, n. 15, p. 13628, 2015.
- CZARNECKA, Anna M. et al. Mitochondrial genotype and breast cancer predisposition. **Oncology reports**, v. 24, n. 6, p. 1521-1534, 2010.
- DAI, Ji-Gang et al. Mitochondrial genome microsatellite instability and copy number alteration in lung carcinomas. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 4, p. 2393-2399, 2013.
- DASGUPTA, Santanu et al. Mitochondrial DNA mutations in respiratory complex-I in never-smoker lung cancer patients contribute to lung cancer progression and associated with EGFR gene mutation. **Journal of cellular physiology**, v. 227, n. 6, p. 2451-2460, 2012.doi:10.1002/jcp.22980.
- DE SÁ, Vanessa Karen et al. Lung cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. **Lung Cancer: Targets and Therapy**, v. 7, p. 141, 2016.
- DETTERBECK, Frank C. et al. The eighth edition lung cancer stage classification. **Chest**, v.

151, n. 1, p. 193-203, 2017.

DIMAURO, Salvatore; HIRANO, Michio; SCHON, Eric A. Approaches to the treatment of mitochondrial diseases. **Muscle & nerve**, v. 34, n. 3, p. 265-283, 2006.

DING C, et al. Sequence polymorphisms of the mitochondrial displacement loop and outcome of non-small cell lung cancer. **Exp Ther Med**, n. 3, p. 861-864, 2012.

DOLL R, HILL AB. Lung cancer and other causes of death in relation to smoking; a second report on the mortality of British doctors. **Br Med J**, n. 2, p. 1071-1081, 1956.

FERREIRA, Mariana; AGUIAR, Tatiana; VILARINHO, Laura. Cadeia Respiratória Mitocondrial Aspectos Clínicos, Bioquímicos, Enzimáticos e Moleculares Associados ao Déficit do Complexo I. **Arquivos de medicina**, v. 22, n. 2-3, p. 49-56, 2008.

GARCIA-HEREDIA JM, CARNERO A. Decoding Warburg's hypothesis: tumor-related mutations in the mitochondrial respiratory chain. **Oncotarget**. 6, p. 41582-41599, 2015.

GATENBY, Robert A.; GILLIES, Robert J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 11, p. 891, 2004.

GIANNATTASIO, Sergio et al. Stress-Related Mitochondrial Components and Mitochondrial Genome as Targets of Anticancer Therapy. **Chemical biology & drug design**, v. 81, n. 1, p. 102-112, 2013.

GRZYBOWSKA-SZATKOWSKA, Ludmiła; ŚLASKA, Brygida. Mitochondrial NADH dehydrogenase polymorphisms are associated with breast cancer in Poland. **Journal of applied genetics**, v. 55, n. 2, p. 173-181, 2014.

GUERRA, Flora; ARBINI, Arnaldo A.; MORO, Loredana. Mitochondria and cancer chemoresistance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1858, n. 8, p. 686-699, 2017.

HALL TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl Acids Symp Ser**, v. 41:95-98, 1999.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARAGUCHI, Shuji et al. Clinicopathological characteristics and prognosis of non-small cell lung cancer patients associated with a family history of lung cancer. **International journal of medical sciences**, v. 9, n. 1, p. 68, 2012.

- HAY, Nissim. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 10, p. 635, 2016.
- HIRSCH, Fred R. et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. **The Lancet**, v. 389, n. 10066, p. 299-311, 2017.
- HU, W. X. et al. Single nucleotide polymorphisms in the mitochondrial displacement loop and age-at-onset of non-small cell lung cancer. **Genet Mol Res**, v. 14, p. 2512-2517, 2015.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <http://www.iarc.fr/> Acesso em 25 Jan 2018.
- INAMURA, Kentaro. Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. **Frontiers in oncology**, v. 7, p. 193, 2017.
- INCA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: **INCA**, 2015.
- INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: **INCA**, 2018.
- JAKUPCIAK, John P. et al. Performance of mitochondrial DNA mutations detecting early stage cancer. **BMC cancer**, v. 8, n. 1, p. 285, 2008.
- JELONEK, K. et al. Association between single-nucleotide polymorphisms of selected genes involved in the response to DNA damage and risk of colon, head and neck, and breast cancers in a Polish population. **Journal of applied genetics**, v. 51, n. 3, p. 343-352, 2010.
- JU, Young Seok et al. Origins and functional consequences of somatic mitochondrial DNA mutations in human cancer. **Elife**, v. 3, 2014.
- KALSBECK, Anton MF et al. Mitochondrial genome variation and prostate cancer: a review of the mutational landscape and application to clinical management. **Oncotarget**, v. 8, n. 41, p. 71342, 2017.
- KHRAPKO, Konstantin; TURNBULL, Doug. Mitochondrial DNA mutations in aging. In: **Progress in molecular biology and translational science**. Academic Press, p. 29-62, 2014.
- KIM, Aekyong. Mitochondria in cancer energy metabolism: culprits or bystanders? **Toxicological research**, v. 31, n. 4, p. 323, 2015.
- KNUST, Renata Erthal et al. Estimated costs of advanced lung cancer care in a public reference hospital. **Revista de saúde pública**, v. 51, 2017.

- KOCHER, Thomas D.; WILSON, Allan C. Sequence evolution of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees: control region and a protein-coding region. In: **Evolution of life**. Springer, Tokyo, 1991. p. 391-413.
- KOSHIKAWA, Nobuko et al. Association of predicted pathogenic mutations in mitochondrial ND genes with distant metastasis in NSCLC and colon cancer. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 15535, 2017.
- LEE, Deok Heon et al. Nuclear and mitochondrial DNAs microsatellite instability and mitochondrial DNA copy number in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of lung: a pilot study. **Apmis**, v. 123, n. 12, p. 1048-1054, 2015.
- LEE, Peter N.; FOREY, Barbara A. Indirectly estimated absolute lung cancer mortality rates by smoking status and histological type based on a systematic review. **BMC cancer**, v. 13, n. 1, p. 189, 2013.
- LENNON, Frances E.; SALGIA, Ravi. Mitochondrial dynamics: biology and therapy in lung cancer. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 23, n. 5, p. 675-692, 2014.
- LI, Weiyang et al. Heteroplasmy and Copy Number Variations of Mitochondria in 88 Hepatocellular Carcinoma Individuals. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 19, p. 4011, 2017.
- LU, Jianxin; SHARMA, Lokendra Kumar; BAI, Yidong. Implications of mitochondrial DNA mutations and mitochondrial dysfunction in tumorigenesis. **Cell research**, v. 19, n. 7, p. 802, 2009.
- MARTÍNEZ-RAMÍREZ, Mónica et al. Complete sequence of the ATP6 and ND3 mitochondrial genes in breast cancer tissue of postmenopausal women with different body mass indexes. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 32, p. 23-27, 2018.
- MATSUYAMA, Wataru et al. Mitochondrial DNA mutation correlates with stage progression and prognosis in non-small cell lung cancer. **Human mutation**, v. 21, n. 4, p. 441-443, 2003.
- MÁXIMO, Valdemar et al. Microsatellite instability, mitochondrial DNA large deletions, and mitochondrial DNA mutations in gastric carcinoma. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 32, n. 2, p. 136-143, 2001.
- MEADOR, Catherine B. et al. Beyond histology: translating tumor genotypes into clinically effective targeted therapies. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 9, p. 2264-2275, 2014.
- MELO, Andréia Cristina de. Estudo epidemiológico de biomarcadores em câncer de pulmão não pequenas células. 2011.

- NCBI. NCBI Genome Data Viewer. 2018. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/>. Acesso em 28 jan 2018.
- PALLIS, Athanasios G.; SYRIGOS, Konstantinos N. Lung cancer in never smokers: disease characteristics and risk factors. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 88, n. 3, p. 494-503, 2013.
- PANDIRI, Arun. Comparative pathobiology of environmentally induced lung cancers in humans and rodents. **Toxicologic pathology**, v. 43, n. 1, p. 107-114, 2015.
- PEZZOTTI, Annamaria et al. The mitochondrial A10398G polymorphism, interaction with alcohol consumption, and breast cancer risk. **PloS one**, v. 4, n. 4, p. e5356, 2009.
- QI, Yuexiao et al. Heteroplasmy of mutant mitochondrial DNA A10398G and analysis of its prognostic value in non-small cell lung cancer. **Oncology letters**, v. 12, n. 5, p. 3081-3088, 2016.
- RALPH, Stephen J. et al. The causes of cancer revisited: “mitochondrial malignancy” and ROS-induced oncogenic transformation—why mitochondria are targets for cancer therapy. **Molecular aspects of medicine**, v. 31, n. 2, p. 145-170, 2010.
- RIDGE, Carole A.; MCERLEAN, Aoife M.; GINSBERG, Michelle S. Epidemiology of lung cancer. In: **Seminars in interventional radiology**. Thieme Medical Publishers, 2013. p. 93.
- SAKASHITA, Shingo; SAKASHITA, Mai; TSAO, Ming Sound. Genes and pathology of non-small cell lung carcinoma. In: **Seminars in oncology**. Elsevier, 2014. p. 28-39.
- SHTIVELMAN, Emma et al. Molecular pathways and therapeutic targets in lung cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 6, p. 1392, 2014.
- STEWART, Bernard W.; WILD, C. P. World cancer report 2014. International agency for research on cancer. **World Health Organization**, v. 505, 2014.
- STRAIF, Kurt et al. A review of human carcinogens—part C: metals, arsenic, dusts, and fibres. 2009..
- SULTANA, Gazi Nurun Nahar et al. Breast cancer risk associated mitochondrial NADH-dehydrogenase subunit-3 (ND3) polymorphisms (G10398A and T10400C) in Bangladeshi women. **Journal of Medical Genetics and Genomics**, v. 3, n. 8, p. 131-135, 2011.
- THAPA, Sunaina et al. Mitochondrial complex I and V gene polymorphisms associated with breast cancer in mizo-mongloid population. **Breast Cancer**, v. 23, n. 4, p. 607-616, 2016.

- TIANING, Wayan. ND3 Mitochondrial Polimorphism G-10399-A and C-10401-T Significantly Associated with Elevated Serum 8-OhdG Concentration and Increased Risk of Malignant Behavior in Breast Cancer. **Journal of Global Pharma Technology**, v. 9, n. 9, 2017.
- TONG, Betty C. et al. Mitochondrial DNA alterations in thyroid cancer. **Journal of surgical oncology**, v. 82, n. 3, p. 170-173, 2003.
- TORRE, Lindsey A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.
- TRAVIS, William D. et al. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. **Journal of thoracic oncology**, v. 10, n. 9, p. 1243-1260, 2015.
- WALLACE DC. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. **Proc Natl Acad Sci USA**, 91:8739-8746, 1994.
- WARBURG, Otto. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309-314, 1956.
- WITSCHI, Hanspeter. A short history of lung cancer. **Toxicological sciences**, v. 64, n. 1, p. 4-6, 2001.
- YORIFUJI, Takashi; KASHIMA, Saori. Air pollution: another cause of lung cancer. **The Lancet Oncology**, v. 14, n. 9, p. 788-789, 2013.
- YUAN, Yang et al. Nonsense and missense mutation of mitochondrial ND6 gene promotes cell migration and invasion in human lung adenocarcinoma. **BMC cancer**, v. 15, n. 1, p. 346, 2015.
- XU, Hui et al. Prognostic value of mitochondrial DNA content and G10398A polymorphism in non-small cell lung cancer. **Oncology reports**, v. 30, n. 6, p. 3006-3012, 2013.
- ZHOU, Caicun. Lung cancer molecular epidemiology in China: recent trends. **Translational lung cancer research**, v. 3, n. 5, p. 270, 2014.
- ZHU, Zhenhua; WANG, Xiangdong. Significance of Mitochondria DNA Mutations in Diseases. In: **Mitochondrial DNA and Diseases**. Springer, Singapore, 2017. p. 219-230.
- ZONG, Wei-Xing; RABINOWITZ, Joshua D.; WHITE, Eileen. Mitochondria and câncer. **Molecular cell**, v. 61, n. 5, p. 667-676, 2016.

ANEXO 1



**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 Universitário João de Barros Barreto, está desenvolvendo uma pesquisa que permitirá conhecer melhor os mecanismos que ocasionam o desenvolvimento de tumores pulmonares, 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 biópsias 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 pulmonar 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 Profa. Dra. Bárbara Borges do Nascimento ou com a médica Lorena Duarte Fernandes, através dos telefones 3201-7585 ou 981124114.

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-PA, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Paciente ou Responsável

Nome: _____

RG: _____

ANEXO 2

Registro: _____

**Universidade Federal do Pará****Pesquisa de biomarcadores de pacientes com câncer pulmão****PRONTUÁRIO**

Nome do Paciente: _____

Telefone para Contato: _____

Data de nascimento: ____/____/____

INFORMAÇÕESGênero: Masculino Feminino

Peso: _____ Altura: _____

Idade: _____

PACIENTEEstado Civil: Solteiro Casado Separado/Divorciado Viúvo

Ocupação: _____

Naturalidade: Cidade: _____ Estado: _____

Endereço atual: Cidade: _____ Estado: _____

Etnia: Amarelo Branco Pardo Negro

Tabagismo: Sim Parou Nunca fumou

Frequência (cigarros/dia/anos): _____

Há quanto tempo parou de fumar? _____

Consumo de bebidas alcoólicas: Sim Não Raramente Nunca usou

Qual? _____

Frequência (doses/semana): _____

Doenças Pulmonares: DPOC

Tuberculose

Outras _____

Medicamentos (uso regular): _____

Há quantos anos: _____

Presença de outros tipos de câncer: Positivo Negativo

Qual? _____

Quando? _____

Realizou algum tratamento? Qual? _____

Histórico de câncer na família: Positivo Negativo

Qual o câncer? _____

Grau de parentesco: _____

Responsável:

_____ Data: ____/____/____

—