**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

LUIZA FERREIRA DE ARAÚJO

**INSTABILIDADE DO GENOMA MITOCONDRIAL EM ADENOMA E
ADENOCARCINOMA COLORRETAL**

Ribeirão Preto

2013

LUIZA FERREIRA DE ARAÚJO

**Instabilidade do genoma mitocondrial em adenoma e
adenocarcinoma colorretal**

**Dissertação de Mestrado apresentada a
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de mestre em Ciências**

Área de Concentração: Genética

**Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva
Júnior**

Ribeirão Preto

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Araújo, Luiza Ferreira de.

Instabilidade do genoma mitocondrial em adenomas e adenocarcinoma colorretal.

Ribeirão Preto, 2013.

94 f.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Genética

Orientador: Silva Jr, Wilson Araújo

1. Genoma mitocondrial. 2. Adenoma colorretal.
3. Adenocarcinoma colorretal. 4. Mutações. 5. Instabilidade.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luiza Ferreira de Araújo
Instabilidade do genoma mitocondrial em adenoma e adenocarcinoma
colorretal.

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva
Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, por toda a dedicação, amor, confiança e
por sempre me apoiarem.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela dádiva da vida e por, em muitos momentos aflitivos, proporcionar-me a sua paz e a serenidade para enfrentar os obstáculos.

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior, meu orientador, agradeço pela confiança e auxílio no meu crescimento profissional.

Aos meus pais pelo amor incondicional, carinho, apoio e compreensão que eles sempre me deram ao longo dos anos.

À minha irmã Clara, por sempre está presente em minha vida.

À toda a minha família, que sempre me apoia, conforta e me ama incondicionalmente. Sou muito abençoada e agradecida por tê-los em minha vida. Em especial as minhas avós BA e Di (in memoriam), exemplos a serem seguidos.

Às minhas amigas do CEI, que mesmo a distância, tornam os dias mais fáceis pelo companheirismo, cumplicidade, apoio, incentivo e carinho. Crescemos juntas, amadurecendo, formando valores e compartilhando cada fase da vida.

À Ana Paula e Lilian por dividirem comigo o mesmo teto e também todas as aflições com os experimentos, as dificuldades e o tempo. Muito obrigada pela amizade, pelo companheirismo, por serem a minha família durante esse tempo.

Ao meu amigo Hudson Bezerra, companheiro de todas as horas, por tornar os dias mais fáceis sempre compartilhando risos e comentários sobre a vida alheia.

À minha companheira de mestrado Rafaella Lemes, por dividir comigo todos os momentos de diversão e angustia no decorrer do curso, compartilhando as emoções da pós graduação.

Aos membros titulares da banca, por aceitarem avaliar meu trabalho.

Aos médicos Dra. Fernanda Maris Peria, Dr. Omar Feres e Dr. José Joaquim Ribeiro da Rocha pelo auxílio nas coletas das amostras utilizadas.

Aos pacientes e familiares que permitiram a realização desse trabalho de pesquisa.

Aos amigos de laboratório, Rafaela Bueno, Júlio Lorenzi, Karina Alves e Aline Simoneti, pela amizade e toda ajuda concedida nos momentos que mais precisei. Um agradecimento especial a Aline Simoneti, pela disponibilidade das amostras utilizadas nesse trabalho e pela paciência sempre que eu pedia por mais.

Aos amigos de laboratório, Nathália e Willys por alegrar todas as minhas manhãs com seu bom-humor impecável

À Greice Molfetta, Dalila Zanette e Cristiane Ayres por toda a ajuda, conselhos, risos e amizade.

À Anemari Santos e Adriana Marques por todo o auxílio nas técnicas utilizadas e pelos momentos de descontração ao longo desses anos.

À todos os amigos de laboratório, Ana Júlia, Bruna e Carol, pelos momentos de descontração durante o trabalho.

À Meire Tarlá pela disponibilidade em resolver todos os problemas financeiros e administrativos, sempre prestativa e com bom humor.

À Jorge Souza e David Marco Antonio por toda a ajuda nas análises bioinformáticas.

A todos do Biocentro, Aline, Marcela, Everton e Luiza, pela convivência diária e pelas descontrações nos corredores. Em especial a Maryna e a Camila, que mesmo após a saída do Biocentro, continuaram dividindo comigo as angústias da pós graduação.

André Camargo e Fernando Amaral por todo o auxílio para a realização da técnica de sequenciamento realizada nesse trabalho.

À Susie, secretária do departamento de genética, por cuidar de toda a parte burocrática ao longo do mestrado.

À CNPQ pelo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa.

À Fundação Hemocentro, pelo local e equipamentos de trabalho proporcionados.

À todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho.

RESUMO

ARAÚJO, LF. Instabilidade do genoma mitocondrial em adenoma e adenocarcinoma colorretal. 2013. 94f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2013.

A mitocôndria é a organela citoplasmática responsável pelo maior sistema produtor de energia, a fosforilação oxidativa (OXPHOS). Foi proposto que em células tumorais a hiper-regulação da glicólise em condições normais de oxigênio (Efeito Warburg), está associada a defeitos na OXPHOS e pode regular o fenótipo tumoral, por exemplo, o potencial metastático da célula por meio da indução de vias pseudo-hipóxicas durante a normóxia. Estudos recentes mostraram que vários tipos de tumores possuem mutações somáticas em seu genoma mitocondrial, o que pode alterar as funções da OXPHOS levando a troca de metabolismo energético nas células tumorais e induzindo a tumorigênese. Diante disto, o presente trabalho avaliou a instabilidade do genoma mitocondrial em etapas bem definidas da progressão do câncer colorretal. O DNA genômico foi extraído de amostras de adenoma, adenocarcinoma, tecido adjacente e sangue periférico de nove pacientes diagnosticados com Câncer colorretal. O genoma mitocondrial foi amplificado e sequenciado para que fossem feitas as buscas por mutações nas amostras de sangue periférico, adenomas e adenocarcinoma. Foi também medido o número de cópias relativas do mtDNA. Foram encontradas um total de 233 mutações, das quais 162 foram em comum entre os três tecidos avaliados. As amostras de adenocarcinoma foram as que apresentaram uma maior média de mutações por amostra (44,6), seguidas dos adenoma (40,2) e do sangue periférico (34). As amostras de adenocarcinoma apresentaram uma maior instabilidade do mtDNA refletidas a partir de um maior número de mutações somáticas (tanto do tipo InDel como mutações de uma única base), mutações não sinônimas com maior patogenicidade, maior número de mutações em heteroplasmia e com taxa de heteroplasmia elevada. Já as amostras de adenoma apresentaram instabilidade dos seus mtDNA intermediários entre o tecido não tumoral e tumoral, refletindo bem a etapa de modificação celular no qual esses tecidos se encontram. Na análise do número de cópias relativas, as amostras de adenocarcinoma tiveram diminuição no número de cópias relativas quando comparadas com tecido adjacente ($p= 0,01$) e com adenomas ($p= 0,04$). Em síntese, o presente trabalho sugere que a instabilidade do genoma mitocondrial parece ter um papel importante no desenvolvimento de tumores colorretais.

Palavras-chave: Genoma mitocondrial, Adenoma colorretal, Adenocarcinoma colorretal, Mutações, Instabilidade.

ABSTRACT

ARAÚJO, LF. Mitochondrial genomic instability in colorectal adenomas and adenocarcinoma. 2013. 94f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2013

The mitochondrion is a cytoplasmic organelle responsible for the major energy producing system, which is the oxidative phosphorylation enzyme pathway (OXPHOS). It was proposed that glycolysis up-regulation during normal oxygen conditions (Warburg effect) may induce defects in the mitochondrial respiration and regulate tumoral phenotypes, for example, metastatic potential through the induction of pseudohypoxic pathways during normoxia. Recent studies have shown that many kinds of tumors have mtDNA somatic mutations, which could alter the OXPHOS functions, leading to changes in glucose metabolism and improving tumorigenesis. This study analyzed the mitochondrial genome instability of well defined stages of colorectal cancer. Genomic DNA was extracted from adenoma, adenocarcinoma, adjacent tissue and peripheral blood of patients diagnosed with Colorectal cancer. The mitochondrial genome was amplified and sequenced for mutations screening in adenoma, adenocarcinoma e blood samples. It was also analyzed the relative mtDNA copy number. It was found a total of 233 mutations, which 162 were in common among the three analyzed tissues. The adenocarcinoma samples presented a greater mutation mean per sample (44.6) followed by adenoma's samples (40.2) and blood samples (34). The adenocarcinoma samples also shown a greater mitochondrial genome instability reflected by increased of somatic mutations (Indels and single nucleotide variation), non synonymous mutations with higher pathogenicity, increased number of heteroplasmatic mutations and higher heteroplasmatic levels. The adenoma samples showed intermediate instability of its mtDNA, which well reflects the intermediate stage of cellular modifications of this tissue. The mtDNA copy number analysis shown that the adenocarcinoma samples presented decreased number of mtDNA content when compared with adjacent tissue ($p= 0.01$) and adenoma samples ($p= 0.04$). In summary the present study suggests that the mitochondrial genomic instability seems to play an important role in colorectal tumorigenesis.

Key words: Mitochondrial genome, Colorectal Adenoma, Colorectal Adenocarcinoma, Mutations, Instability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sequência adenoma-carcinoma	21
Figura 2 – Mapa do genoma mitocondrial humano.....	22
Figura 3 – Heteroplasmia	24
Figura 4 – Cadeia transportadora de elétrons e seus complexos protéicos	25
Figura 5 – Metabolismo	27
Figura 6 – Resposta molecular a hipóxia.....	28
Figura 7 – Via succinato-fumarato de sinalização metabólica	29
Figura 8 - Disfunção mitocondrial e ativação do HIF α	30
Figura 9 - Associações de regiões mitocondriais e câncer.....	32
Figura 10 - Fragmentos da primeira etapa de amplificação.....	41
Figura 11 - Metodologia para sequenciamento no Ion Personal Genome Machine	43
Figura 12 - Gel de agarose representando fragmentos da primeira etapa de amplificação.....	49
Figura 13 – Bioanalyzer	49
Figura 14 - Detecção de mutações.....	50
Figura 15 – Dados das corridas no Sequenciamento de próxima geração ..	51
Figura 16 - Mapa dos genomas mitocondriais sequenciados por Sequenciamento de Próxima Geração	53
Figura 17 - Topologia das mutações encontradas no genoma mitocondrial em pacientes com câncer colorretal.....	53
Figura 18 - Mutações encontradas nos diferentes tecidos analisados	55
Figura 19 - Mutações do tipo InDel observadas nos tecidos	58
Figura 20 - Mutações em heteroplasmia encontradas nos diferentes tecidos analisados	59
Figura 21 - Patogenicidade média das mutações não sinônimas medida através do software MutPred	60
Figura 22 - Topologia das mutações no genoma mitocondrial em adenoma.....	61
Figura 23 - Topologia das mutacoes no genoma mitocondrial em adenocarcinoma	66
Figura 24 - Número de cópia relativas do genoma mitocôndrial nos tecidos estudados.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações clínicas dos pacientes	38
Tabela 2 - <i>Primers</i> para a primeira etapa de amplificação	40
Tabela 3 - <i>Primers</i> PCR quantitativa	46
Tabela 4 - Correlação mutações encontradas pelo sequenciamento capilar e pelo SPG.....	50
Tabela 5 - Pacientes com câncer colorretal e seus respectivos haplogrupos mitocondriais.....	54
Tabela 6 - Transições e transversões.....	56
Tabela 7 - Trocas nucleotídicas.....	57
Tabela 8 - Mutações exclusivas das amostras de adenoma	62
Tabela 9 - Mutações exclusivas das amostras de adenocarcinoma.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenoma colorretal
AdC	Adenocarcinoma colorretal
ADP	Adenosina difosfato
APC	do inglês, <i>adenomatous polyposis coli</i>
ATP	Adenosina trifosfato
ATP6	do inglês, <i>ATP synthase F0 subunit 6</i>
ATP8	do inglês, <i>ATP synthase F0 subunit 8</i>
CCR	Câncer colorretal
CEP	Comitê de ética em Pesquisa
CO ₂	Gás carbônico
COXI	do inglês <i>cytochrome oxidase subunit I</i>
COXII	do inglês <i>cytochrome oxidase subunit II</i>
COXIII	do inglês <i>cytochrome oxidase subunit III</i>
Ct	do inglês, cycle threshold
CYB	do inglês <i>cytochrome b</i>
D-loop	do inglês, <i>displacement loop</i>
DCC	do inglês, Deleted Colorectal Cancer
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FADH ₂	Dinucleotideo de flavina e adenina
FH	Fumarato hidratase
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
G6P	Glicose-6-fosfato
H ⁺	Protón de hidrogênio
H ₂ O	Água
HCl	Ácido clorídrico
HIF	Do inglês, <i>Hypoxia-inducible factor</i>
HK2	Hexoquinase 2
HNPCC	Câncer colorretal hereditário não polipóide
HS	do inglês <i>Heavy strand</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
<i>InDel</i>	Mutações do tipo Inserção e deleção
ISPs	do inglês, <i>Ion Sphere™ Particles</i>
KRAS	do inglês, <i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LS	LS, do inglês <i>Light strand</i>
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MLH1	do inglês, <i>human mutL homolog 1</i>
MSH2	do inglês, <i>mutS homolog 2</i>
mtDNA	DNA mitocondrial
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido hidreto

NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzido
ND1	do inglês, <i>NADH dehydrogenase subunit 1</i>
ND2	do inglês, <i>NADH dehydrogenase subunit 2</i>
ND3	do inglês, <i>NADH dehydrogenase subunit 3</i>
ND4	do inglês, <i>NADH dehydrogenase subunit 4</i>
ND5	do inglês, <i>NADH dehydrogenase subunit 5</i>
ND6	do inglês, <i>NADH dehydrogenase subunit 6</i>
NGS	do inglês, <i>Next generation sequencing</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXPHOS	do inglês, <i>Oxidative phosphorylation</i>
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGM	Equipamento Ion Personal Genome Machine
PHD	Prolyl hidroxilase
pol Y	DNA polimerase Y
POLG	Gene codificador da DNA polimerase mitocondrial Y
PPP	Via das pentoses-fosfato
pVHL	proteína Von Hippel Lindau
qPCR	PCR quantitativa
ROS	do inglês <i>Reactive oxygen species</i>
rRNA	RNA ribossômico
SDH	Succinato desidrogenase
SMAD2	do inglês, <i>mothers against DPP homolog 2</i>
SMAD4	do inglês, <i>mothers against DPP homolog 4</i>
SPG	Sequenciamento de próxima geração
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
TIGAR	do inglês, <i>TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator</i>
TP53	do inglês, <i>transformation related protein 53</i>
tRNA	RNA transportador
TUBB	do inglês, <i>tubulin, beta class I</i>
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcento
cm ³	Centímetros cúbicos
kb	Kilobase
M	Molar
Mb	Megabase
mg	Microgramas
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanogramas
°C	Grau Célsio
rpm	Rotações por minuto
μL	microlitro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Câncer colorretal	16
1.1.1	Câncer colorretal esporádico e familiar	17
1.1.2	Adenoma e Adenocarcinoma colorretal	18
1.1.3	Base genética do CCR.....	19
1.2	A mitocôndria e seu genoma.....	21
1.3	A mitocôndria e o câncer.....	26
1.3.1	Efeito Warburg	26
1.3.2	Mecanismos moleculares do efeito Warburg	28
1.4	Alterações no mtDNA e suas consequências no Câncer	31
2	OBJETIVOS.....	36
2.1	Objetivo geral	36
2.2	Objetivos específicos	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	Obtenção de material biológico	38
3.2	Aspectos éticos	39
3.3	Extração de DNA.....	39
3.4	Amplificação do genoma mitocondrial	40
3.4.1	Primeira etapa de amplificação	40
3.4.2	Segunda etapa de amplificação	41
3.5	Purificação e quantificação	42
3.6	Sequenciamento de DNA.....	42
3.6.1	<i>Next Generation sequencing</i>	43
3.6.1.1	Construção da biblioteca	43
3.6.1.2	Preparação do template	44
3.6.1.3	Reação de Sequenciamento	45
3.6.1.4	Análise de dados.....	45
3.6.2	Sequenciamento pelo método de Sanger	46
3.7	Análise do número de cópias do mtDNA.....	46
3.8	Análises estatísticas.....	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1	Amplificação do genoma mitocondrial.....	49
4.2	Sequenciamento do genoma mitocondrial	50
4.3	Análise de Instabilidade genômica	52
4.4	Determinação dos haplogrupos mitocondriais	54
4.5	Instabilidade do genoma mitocondrial tecido-específico	54
4.5.1	Análise das mutações do tipo substituição.....	56
4.5.2	Avaliação das mutações do tipo Inserção e deleção.....	57
4.5.3	Avaliação de heteroplasmia	58
4.5.4	Avaliação da patogenicidade das mutações não-sinônimas	60
4.5.5	Topologia das mutações no genoma mitocondrial	61
4.6	Análise do número cópias relativas do mtDNA	66
5	CONCLUSÃO	70
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
7	APÊNDICES	84
8	ANEXOS	93

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer colorretal

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer mais diagnosticado no mundo em homens e o segundo em mulheres, com mais de 1,2 milhão de casos novos e 608.700 mortes estimadas em 2008. As taxas de incidência do CCR variam bastante entre diferentes regiões do mundo. A Austrália, Nova Zelândia, Europa e América do Norte são as regiões com maior incidência, enquanto que a África e o centro-sul da Ásia possuem as menores taxas (JEMAL *et al.*, 2011). No entanto, a incidência do CCR vem crescendo cada vez mais em áreas que possuíam baixa incidência no passado, isto se deve a uma combinação de alguns fatores como dieta inadequada, obesidade e aumento de tabagismo (CENTER *et al.*, 2009).

No Brasil, para o ano de 2012 calcula-se um total 30.140 casos novos de CCR, sendo 14.180 em homens e 15.960 em mulheres. Isto corresponde a um risco estimado de 15 casos novos a cada 100 mil homens e 16 a cada 100 mil mulheres. Entre os Estados mais afetados estão os Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, com mais de 23 casos para cada 100 mil habitantes, incluindo homens e mulheres (INCA, 2013). A diferença de incidência em relação aos outros Estados brasileiros pode ser devido aos hábitos alimentares locais, que atuam como fatores de risco do CCR, como por exemplo a ingestão de carne vermelha. O Rio Grande do Sul, por exemplo, possui uma média de aquisição alimentar domiciliar *per capita* anual de 39,21 kg de carne, enquanto a média brasileira é 25,42 kg, segundo o Instituto brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010). Segundo o senso de 2013 do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o Brasil registrou em 2010 13.344 óbitos causados pelo CCR.

Os principais fatores de risco do CCR são: idade avançada, presença anterior de pólipos colônicos, ou câncer colorretal, e fatores ambientais como ingestão de carne vermelha, ingestão de alimentos gordurosos, ingestão inadequada de fibras, obesidade, sedentarismo, diabetes mellitus, tabagismo e consumo elevado de álcool (CUNNINGHAM *et al.*, 2010).

Devido a implementação de novos procedimentos como a detecção do CCR em estágios iniciais e terapias mais eficazes, a taxa de mortalidade em países com alta incidência de CCR, como os Estados Unidos, vêm diminuindo cada vez mais. Tais procedimentos são importantes pois a maioria dos casos de CCR ocorrem no reto (38%) ou no colón sigmoide (29%), duas partes do intestino grosso que são bem avaliadas no exame de sigmoidoscopia flexível (HAYNE *et al.*, 2001). Estudo recente revelou que o exame de sigmoidoscopia flexível, quando adotado na triagem do CCR, causa uma redução significativa nas taxas de incidência e de mortalidade (SCHOEN *et al.*, 2012). Além disso, a adoção também de medidas preventivas, aumentou a taxa de sobrevivência média de pacientes com CCR em cinco anos: no início da década de 80, a sobrevivência era de 56,5%, enquanto que na década de 90 passou para 63,2%, e em 2004 foi de 65,9% (HOWLADER *et al.*, 2012).

1.1.1 Câncer colorretal esporádico e familiar

O câncer pode ser definido como uma doença genética atípica. Genética, por ter como base mutações que afetam a função de genes supressores tumorais e oncogenes, e atípico por ser caracterizado em hereditário ou familiar e o não-hereditário ou esporádico. No câncer familiar, uma mutação é herdada de um dos pais (germinativa) e outra mutação (somática) é adquirida ao longo da vida (Modelo de Knudson). No câncer esporádico, as duas mutações são do tipo somática e adquiridas ao longo da vida (HUANG *et al.*, 1997). Os principais genes alterados são: KRAS (do inglês, *v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), DCC (do inglês *Deleted Colorectal Cancer*) e TP53 (do inglês, *transformation related protein 53*). A maioria dos casos de CCR são esporádicos (85%), os 15% remanescentes são hereditários ou familiar (DAVIES *et al.*, 2005).

Nos casos de CCR do tipo familiar, as principais síndromes hereditárias são o Câncer Colorretal Hereditário Não-Polipóide ou HNPCC (do inglês, *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*), também conhecido como Síndrome de Lynch, e a Polipose Adenomatosa Familiar ou FAP (do inglês, *Familial Adenomatous Polyposis*) (CUNNINGHAM *et al.*, 2010). Ambos os casos surgem devido a mutações de alta penetrância. No caso do HNPCC, os genes afetados estão ligados

ao sistema de reparo de pareamento de DNA incorreto, em especial os genes MSH2 e MLH1. Enquanto que no FAP, o principal gene afetado é da polipose adenomatosa familiar (APC, do inglês, *adenomatous polyposis coli*), (DE LA CHAPELLE, 2004).

Nos casos de CCR esporádicos, a grande maioria possui uma elevada instabilidade cromossômica, desbalanço genético em vários *loci*, como no 5q, 8p, 17p e 18q, e amplificação e translocação cromossômica, favorecendo a aneuploidia tumoral (LENGAUER *et al.*, 1998; CUNNINGHAM *et al.*, 2010).

1.1.2 Adenoma e Adenocarcinoma colorretal

Os adenomas colorretais (AC) são lesões que tem o potencial de se desenvolver em adenocarcinomas (AdC) (TANNAPFEL *et al.*, 2010). Caso os AC não sejam removidos e continuem proliferando, seu volume aumentar em até 52% em dois anos (HOFF, 1987).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica os AC quanto ao seu grau de neoplasia intraepitelial em displasia de baixo e alto grau, e seu padrão histológico nos tipos viloso, tubular e túbulo-viloso. Quando o componente viloso é menor que 25%, o AC é classificado em adenoma tubular. Enquanto que se o componente viloso for maior que 75%, o AC é classificado como adenoma viloso. Por outro lado, se o componente viloso estiver num intervalo entre 25 % e 75%, o AC é classificado como do tipo túbulo-viloso (SILVA, JS *et al.*, 2010). Dos três tipos, o tipo tubular é o mais comum chegando a 80% dos casos (TANNAPFEL *et al.*, 2010). Quanto a sua morfologia, as displasias de baixo grau são classificadas em leve ou moderada, enquanto que as displasias de alto grau são classificadas por alterações morfológicas muito mais acentuadas (SILVA, JS *et al.*, 2010).

O tempo de transformação de um carcinoma a partir de um adenoma pode ser de 10 a 15 anos e somente uma pequena porcentagem de adenomas (5%) “evoluem” para carcinoma. Os sinais que indicam que o adenoma está se transformando em adenocarcinoma incluem o aumento da sua massa e do componente viloso, o grau de displasia e a idade do paciente (JORGENSEN *et al.*, 1993).

Segundo a WHO, os AdC podem ser caracterizados com base em vários tipos de classificação. Uma das mais utilizadas segue o padrão TNM de tumores malignos. A letra T refere-se ao grau de invasão do tumor primário. Por exemplo: T1, são tumores primários que invadem a submucosa do epitélio; T2, os que invadem a camada muscular própria; e T3, são tumores que invadem além da camada muscular. A letra N refere-se ao número de linfonodos regionais com metástase. O tipo N1 indica metástase em 1 a 3 linfonodos regionais e tipo N2 indica metástase em 4 ou mais linfonodos. Já a letra M informa se há metástase a distância. Por exemplo: M0, indica ausência de metástase a distância e M1, presença de metástase a distância (INCA, 2004) .

Em razão da facilidade em definir histologicamente as etapas da progressão do adenoma em adenocarcinoma no CCR, foi possível também identificar quais genes são mais frequentemente mutados e relacionados diretamente com tal progressão. Portanto, o CCR é o câncer que tem sua base genética mais bem caracterizados (FEARON e VOGELSTEIN (1990) (Figura 1).

1.1.3 Base genética do CCR

A sequência de alterações genéticas que estão relacionadas com a progressão do CCR foi um dos mais importantes achados relacionados com a oncogênese nas últimas décadas (Figura 1) (LESLIE *et al.*, 2002). O modelo descrito por FEARON e VOGELSTEIN (1990) descreve as etapas da progressão do CCR e os acúmulos de alterações genéticas desde a mucosa normal, passando pelo adenoma inicial, intermediário e adenoma tardio, até chegar no adenocarcinoma. Estas alterações pode afetar principalmente oncogenes (por exemplo, o KRAS) e genes supressores tumorais (TP53).

Mutações no gene APC, no estágio inicial, está relacionado com o estado hiperproliferativo do tecido epitelial em pacientes com CCR. Como já mencionado anteriormente, mutações germinativas nesse gene são responsáveis pela síndrome hereditária Polipose Adenomatosa Familiar (LESLIE *et al.*, 2002).

Alterações epigenéticas também estão relacionadas com este modelo. A análise do padrão de metilação dos tecidos normais adjacentes ao CCR mostraram uma hipometilação global em relação ao tecido tumoral (GOELZ *et al.*, 1985).

O segundo gene mais afetado no início da progressão do CCR é o gene KRAS. Este gene é fundamental na proliferação e diferenciação normal das células (BOS, 1989). Mutações nesse gene ocorrerem em uma única célula já mutada para o gene APC e a expansão clonal desta célula leva a um aumento do tumor a uma maior transformação histológica (FEARON e VOGELSTEIN, 1990). A alta frequência de adenomas que possuem mutação nesse gene reforça a hipótese de que o K-ras tem um papel fundamental na tumorigênese do CCR (LESLIE *et al.*, 2002).

Deleções no 18q são o segundo tipo de alterações mais comuns no CCR, afetando aproximadamente 70% dos casos. Essas alterações são observadas em cerca de 10-30% dos adenomas iniciais e sua incidência sobe para cerca de 60% em adenomas tardios (BOLAND *et al.*, 1995). Inicialmente acreditava-se que o gene DCC (Deleted Colorectal Cancer) era o gene supressor tumoral mais afetado pela deleções do 18q e, portanto, o principal candidato associado com a progressão do CCR (FEARON *et al.*, 1990). No entanto, experimentos com camundongos knockout para o gene DCC, desqualificaram-no como supressor tumoral (FAZELI *et al.*, 1997), reduzindo seu papel central na tumorigênese. Um outro estudo, apontam os genes SMAD2 (do inglês, *mothers against DPP homolog 2*) e SMAD4 (do inglês, *mothers against DPP homolog 4*), também localizados na região 18q, como os genes supressores tumorais associados com a progressão do CCR (HELDIN *et al.*, 1997).

Finalmente, o TP53 é quarto gene associado com a progressão do CCR, por estar mutado em 4-26% dos adenomas primários, em aproximadamente 50% dos adenomas tardios e em 50-75% dos adenocarcinomas. Acredita-se que a perda da função da proteína p53 esta associada com o estágio final da progressão do CCR (LESLIE *et al.*, 2002). O gene TP53 é o mais afetado em todos os cânceres humanos (CARON DE FROMENTEL e SOUSSI, 1992). Sua função é de bloquear o ciclo celular na presença de dano de DNA, estimular o reparo de DNA e de promover a apoptose se o reparo não for suficiente (LANE, 1992).

Embora essas mutações ocorram em uma ordem seguindo a sequência da progressão tumoral, é o acúmulo total de mutações que promove a tumorigênese (LESLIE *et al.*, 2002).

Figura 1. Sequência adenoma-adenocarcinoma. A progressão do epitélio normal, através do adenoma ao adenocarcinoma, caracterizada pelo acúmulo de mutações em genes específicos.

1.2 A mitocôndria e seu genoma

A mitocôndria é uma organela extremamente importante na evolução eucariota. Acredita-se que ela evoluiu a partir de um organismo procarioto que foi englobado por uma célula eucariótica primitiva e, assim, foi gerada uma relação simbiótica. Essa teoria explicaria o fato da mitocôndria possuir genoma próprio, que codifica algumas de suas proteínas. Desde que foi englobada pela célula eucariótica, há cerca de 1.5×10^9 anos atrás, essas organelas perderam bastante seu genoma e passaram a depender de genes nucleares (WALLACE, 1982; 2007).

O DNA mitocondrial (mtDNA) atual manteve somente 13 genes codificantes de polipeptídeos, os quais todos codificam componentes essenciais da fosforilação oxidativa (OXPHOS, do inglês, *Oxidative phosphorylation*). O genoma mitocondrial contém ainda, genes de RNA ribossômico (rRNA) 16S e 22 RNAs transportadores

(tRNA), necessários para a síntese de proteínas mitocondriais. Outras proteínas necessárias para OXPHOS, enzimas metabólicas e fatores reguladores do mtDNA são codificadas por genes nucleares, sintetizadas no citosol e importadas para dentro da organela (SHOFFNER e WALLACE, 1992).

O código genético usado pelas mitocôndrias humanas é diferente do código utilizado pelo genoma nuclear, assim os genes mtDNA não são lidos pelo sistema núcleo-citoplasma (WALLACE, 1982).

O genoma mitocondrial humano consiste em uma molécula circular, possuindo 16.569 pares de base (pb), localizada na matriz mitocondrial e com milhares de cópias presentes por célula (ANDERSON *et al.*, 1981). O mtDNA possui duas fitas: uma fita chamada pesada (H, do inglês *Heavy strand*), rica em guanina, e a outra leve (L, do inglês *Light strand*), rica em citosina. A fita H possui 12 dos 13 genes codificantes de proteínas, 12 dos 22 genes codificantes de tRNA e os genes de rRNA. Íntrons estão ausentes no genoma mitocondrial, sendo todos os genes contínuos (ANDERSON *et al.*, 1981; ZEVIANI *et al.*, 1998). O único segmento não codificante é o D-loop (do inglês, *displacement loop*), uma região com 1121pb, onde está localizada a origem de replicação da fita H (O_H) e os promotores de transcrição das fitas H e L (CLAYTON, 1982) (Figura 2).

Figura 2. Mapa do genoma mitocondrial humano. Estão ilustrados no mapa os sete genes codificadores de subunidades do complexo I em vermelho (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 e ND6), uma subunidade do complexo III, em laranja (CYB), três subunidades do complexo IV em roxo (COXI, COXII, COXIII), 22 genes codificadores de tRNA em azul. São mostradas também as origens de replicação da fita pesada (O_H) e da fita leve (O_L) e os promotores da transcrição da fita pesada (HSP) e da leve (LSP). ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6 do inglês *NADH dehydrogenase subunit 1, 2, 3, 4, 5, 6*. COXI, II, III, do inglês *cytochrome oxidase subunit I, II, III*. CYB, do inglês *cytochrome b*. Fonte: Retirada de SCHON *et al.* (2012).

O mtDNA é replicado a partir de duas origens através da DNA polimerase γ (pol γ). A replicação é iniciada na OH utilizando oligonucleotídeos gerados a partir de transcritos da fita L. Então, a síntese da fita H continua por, aproximadamente, 65% ao redor do mtDNA, deslocando a fita H parental até chegar a origem da fita L (OL). Uma vez exposto a fita H deslocada, o OL se dobra em uma estrutura de loop e a síntese da fita L é iniciada. Desse modo a replicação do mtDNA é caracterizada como bidirecional e assimétrica (CLAYTON, 1982).

A transcrição do mtDNA é iniciada a partir de dois promotores do D-loop, PL e PH. A transcrição de ambos os promotores prossegue em volta do genoma circular gerando um RNA policistrônico. Os genes de tRNAs que interrompem as grandes sequências de rRNA e mRNA se dobram sobre no transcrito e são cortadas. Os mRNA e rRNA liberados são, então, poliadenilados, enquanto que os tRNA sofrem modificações e tem a sequência CCA adicionada a ponta terminal 3' (ATTARDI *et al.*, 1982; ATTARDI e MONTROYA, 1983; CLAYTON, 1984; TAANMAN, 1999).

Uma das principais características do mtDNA é o seu padrão de herança: exclusivamente materno. Essa característica possibilitou o estudo de todas as variantes do mtDNA humano culminando na descrição do ancestral comum materno, denominada de Eva mitocondrial, que viveu há aproximadamente 200.000 anos atrás na África (BEHAR *et al.*, 2008). Ao longo das linhagens maternas, as variantes das sequências do mtDNA evoluíram a partir de uma acumulação sequencial de mutações, que podem ser representadas em uma árvore representando todas as relações filogenéticas entre as variantes do mtDNA. Os ramos da árvore filogenético mitocondrial são os haplogrupos, grupo de mutações que compartilham o mesmo ancestral comum (VAN OVEN e KAYSER, 2009).

Análises de filogeografia das linhagens mitocondriais levaram a identificação de haplogrupos que são específicos a algumas populações. Desse modo, a localização geográfica de uma determinada linhagem mitocondrial permite a inferência da sua origem continental, o que possibilita a avaliação da ancestralidade matrilinear de populações miscigenadas (ALVES-SILVA *et al.*, 2000).

Devido a presença de milhares de cópias de seu genoma nas células, é frequente a ocorrência da heteroplasmia. A taxa de heteroplasmia é usada para descrever a razão entre o mtDNA mutante comparado com o normal (HUANG, 2011), ou seja, coexistência de genomas mitocondriais com diferentes variações em células normais (Figura 3). Quando as variações são mutações patogênicas, o

fenótipo da célula permanece normal até que a taxa de mtDNA mutante chegue a um limite crítico, expressando assim o fenótipo mutante (WALLACE *et al.*, 1997). Esse limite varia entre diferentes tipos de mutações e tecidos afetados (HAYASHI *et al.*, 1991).

Figura 3. Esquema representando a Heteroplasma. Um evento mutacional cria heteroplasma em uma célula, mas a princípio o número de mitocôndrias mutantes (verdes) é bem menor que mitocôndrias normais (azul). A proliferação clonal levará a níveis diferentes de mitocôndrias mutadas, e o acúmulo destas, acima de um determinado nível, levará a expressão do fenótipo mutante (Wallace, Sturgard *et al.*, 1997).

Outra característica interessante do genoma mitocondrial é sua alta taxa de mutação: as variações se acumulam cerca de 10 a 17 vezes a mais do que no genoma nuclear (NECKELMANN *et al.*, 1987; WALLACE *et al.*, 1997). As mitocôndrias parecem ser deficientes em um sistema de reparo preciso (BOGENHAGEN, 1999) e carecem de proteínas protetoras, como as histonas. Além disso, estão fisicamente próximos da membrana mitocondrial interna, onde espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive oxygen species*) são gerados por subprodutos da OXPHOS (SCHON *et al.*, 2012).

As ROS danificam o mtDNA, gerando modificações oxidativas nas bases de DNA, substituições de base e rearranjos. A acumulação dessas mutações somáticas durante a vida pode levar ao déficit bioenergético, levando ao envelhecimento e morte celular (TROUNCE *et al.*, 1989; SIMONETTI *et al.*, 1992; OZAWA, 1995). Além do processo de senescência, mutações no mtDNA são importantes para progressão de doenças relacionadas com genoma mitocondrial. A maioria das mutações herdadas não são suficientes para suprimir a OXPHOS, no entanto, a acumulação de mutações somáticas podem levar a alterações na OXPHOS

Figura 4. Cadeia transportadora de elétrons e seus complexos proteicos. A cadeia respiratória é composta pelos complexos I, II, III, IV e V. Os transportadores de elétrons são a Coenzima Q (CoQ) e o Citocromo C (Cyt c). Os complexos I a IV bombeiam prótons derivados de NADH e FADH₂ produzidos no ciclo do ácido tricarboxílico, da matriz pela membrana mitocondrial interna (MIM) para o espaço entre membranas (IMS), para gerar um gradiente de prótons. O gradiente de prótons é utilizado pelo complexo V para a produção de ATP. Fonte: Adaptada de SCHON *et al.* (2012).

1.3 A mitocôndria e o câncer

1.3.1 Efeito Warburg

A mitocôndria é a principal fonte de energia da célula, graças aos seus complexos proteicos da OXPHOS. O ATP, produzido por essa organela, é essencial para todas as reações químicas necessárias para manter a homeostase celular. Além disso, mudanças na permeabilidade da membrana mitocondrial levam a liberação de mediadores pro-apoptóticos, que regulam diversas cascatas de sinalização, inclusive a de apoptose. Com isso, a mitocôndria tem papel crucial no controle da vida e morte da célula (SEOANE *et al.*, 2011).

Estudos sugerem que o sistema OXPHOS é severamente comprometido durante o câncer, inclusive, defeitos no nesse sistema são descritos como um dos fenótipos mais comuns (WARBURG, 1956; SINGH *et al.*, 1999; BIANCHI *et al.*, 2001; CHANDRA e SINGH, 2011). Uma propriedade comum dos cânceres invasivos é o metabolismo de glicose alterado (GATENBY e GILLIES, 2004). A glicólise, primeiramente, requer a conversão de glicose em piruvato e, em seguida, este é convertido em ácido láctico (Figura 5A). Na maioria das células de mamíferos, a glicólise é inibida na presença de oxigênio, o que permite a oxidação do piruvato, pela mitocôndria, em CO₂ e H₂O. A essa inibição dá-se o nome de “efeito Pasteur” (RACKER, 1974). A versatilidade metabólica das células é essencial para a manutenção da produção energética por meio da variação das concentrações de oxigênio (GATENBY e GILLIES, 2004).

Figura 5. Metabolismo: Diferenças entre fosforilação oxidativa, glicólise anaeróbica e glicólise aeróbica (Efeito Warburg). A: Na presença de oxigênio, tecido diferenciado metaboliza a glicose em piruvato e, em seguida, oxida o piruvato na mitocôndria durante a fosforilação oxidativa. Como oxigênio é necessário no final da cadeia transportadora de elétrons, essa molécula é fundamental nesse processo. Em condições limitadas de oxigênio, as células direcionam a síntese de piruvato pelo glicólise através da geração de lactato. B: O efeito Warburg consiste na conversão de glicose em lactato independente das condições de oxigênio, fenômeno observado em células tumorais e proliferativas. Adaptada de VANDER HEIDEN *et al.* (2009).

Em 1930, Otto Warburg propôs que o câncer força as células a mudar o processo de geração de energia para glicólise, independente das condições aeróbicas (GOTTLIEB e TOMLINSON, 2005; MODICA-NAPOLITANO *et al.*, 2007; KULAWIEC, OWENS, *et al.*, 2009; CHANDRA e SINGH, 2011). A conversão de glicose em ácido láctico, na presença de oxigênio, é chamado “efeito Warburg” e é, especialmente, observado em cânceres, o que levou Warburg a crer que essa doença resulta de defeitos no metabolismo (WARBURG, 1956) (Figura 5B).

Observações experimentais do aumento da glicólise em tumores, mesmo na presença de oxigênio, vem sido repetidamente verificada, reconsiderando a atenção dos pesquisadores no metabolismo tumoral (SEMENZA *et al.*, 2001). Linhagens celulares derivadas de tumores mantêm seu metabolismo em culturas com condições normais de oxigênio, indicando que a glicólise aeróbica é constantemente *hiper-regulada* através de estáveis mudanças genéticas ou epigenéticas. Por exemplo, a linhagem de câncer de mama não invasiva MCF-7 tem taxas de consumo de glicose aeróbica inferiores quando comparadas com a linhagem altamente invasiva MDA-mb-231 (GATENBY e GILLIES, 2004). A atividade metabólica alterada é fundamental para a manutenção da proliferação

descontrolada, inibição das vias de sinalização inibitórias do crescimento celular, migração celular e disseminação da metástase (SCHULZE e HARRIS, 2012).

1.3.2 Mecanismo moleculares do efeito Warburg

Os complexos HIF1 e HIF2 (Fator indutor de hipóxia) são os principais fatores de transcrição responsáveis pela mudança da expressão gênica na resposta celular a hipóxia (Figura 6). Os complexos são heterodímeros compostos pelas subunidades HIF1 β e HIF1 α ou HIF2 α que possuem expressão constitutiva e são rapidamente estabilizadas em situações de pouco oxigênio. Em condições normais de oxigênio, a subunidade HIF1 α sofre uma hidroxilação dependente de oxigênio pela enzima prolyl hidroxilase (PHD), resultando no reconhecimento da subunidade pela proteína Von Hippel Lindau (pVHL), a qual se liga e medeia sua ubiquitinação (BERTOUT *et al.*, 2008).

Além da sua estabilização em situações de hipóxia, o HIF1 α também pode ser ativado em situações de normóxia através de mutações em genes, como: Succinato desidrogenase (SDH) (SELAK *et al.*, 2005), Fumarato hidratase (FH) (KING *et al.*, 2006) e TP53 (MATOBA *et al.*, 2006). Uma vez ativado, o HIF1 α aumenta a transcrição de genes codificantes de transportadores de glicose e enzimas glicolíticas, aumentando a capacidade de glicólise da célula (SEMENZA, 2010).

Figura 6. Resposta molecular a hipóxia. Na presença de oxigênio (Normóxia), a PHD marca o HIF α , permitindo sua interação com a pVHL. A interação entre pVHL e HIF α causa a degradação do HIF pela ubiquitinação. Em resposta a baixas condições de oxigênio (Hipóxia), a pVHL é nitrosilada impedindo sua interação e posterior degradação com a HIF α . A HIF α irá então estimular a expressão do VEGF, estimulando assim a angiogênese. Fonte: Adaptada de RAHIMI (2012).

Mutações herdadas em genes que participam do complexo II, SDH e FH, foram associadas com síndromes hereditárias e isso levantou interesse sobre o papel desses genes como supressores tumorais. Ambas enzimas pertencem ao ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), que conecta o metabolismo da glicose do citosol a OXPHOS na mitocôndria (GOTTLIEB e TOMLINSON, 2005). O acúmulo do Succinato, devido a inibição da SDH ou FH, demonstrou transmitir um sinal oncogênico, a partir da mitocôndria para o citosol, inibindo a atividade da PHD, o que leva a estabilização da subunidade da HIF1 α em níveis normais de oxigênio. Isso resulta na transcrição de inúmeros genes que tem papel conhecido na tumorigênese, inclusive fatores angiogênicos como, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (SCHULZE e HARRIS, 2012) (Figura 7).

Figura 7. Via succinat –fumarato de sinalização metabólica. O acúmulo de succinato devido a inibição da SDH pode seguir para o citosol e inibir a atividade da PHD. Consequentemente a HIF α não é hidrolisada e escapa da ubiquitinação mediada pela pVHL. O HIF α é translocado para o núcleo, onde encontra-se com o HIF β e induz a expressão de vários genes de resposta a hipóxia. Fonte: Adaptada de GOTTLIEB e TOMLINSON (2005).

A cadeia respiratória é a maior fonte de ROS da célula, principalmente através da produção de radicais superóxidos pelos complexos I e III. Em baixos níveis, ROS aumentam a proliferação e sobrevivência celular e são fundamentais para eventos em vias que mantêm a homeostase celular (GIANNONI *et al.*, 2005). Em níveis intermediários, ROS induzem a expressão de genes de resposta ao estresse como a estabilização do HIF1. Já em níveis elevados, ROS podem causar danos a

macromoléculas, como o DNA, induzir a senescência e permeabilizar a membrana mitocondrial, levando a liberação do citocromo C e, por fim, apoptose (BELL *et al.*, 2005; GARRIDO *et al.*, 2006; RAMSEY e SHARPLESS, 2006) (Figura 8).

Figura 8. Disfunção mitocondrial e ativação do HIF α . A PHD necessita da presença de oxigênio e α -cetoglutarato, como substrato, e Ferro e ascorbato, como cofatores, para hidrolisar o HIF α . As duas reações acopladas catalisadas pela PHD são a hidroxilação da prolina e a descarboxilação do α -cetoglutarato em succinato, portanto, a inibição da atividade da PHD em células deficientes em SDH, talvez seja mediada por ROS. Fonte: Adaptada de GOTTLIEB e TOMLINSON (2005).

O papel dos ROS na estabilização do HIF α ainda não é bem claro (HAMANAKA e CHANDEL, 2009). Evidências sugerem que a oxidação do ferro no sítio catalítico da PHD talvez tenha uma função central nesse mecanismo (GERALD *et al.*, 2004). PATTEN *et al.* (2010), demonstraram que a inibição de ROS gerados a partir da mitocôndria, bloqueou a estabilização e a transcrição dependente de HIF1 α .

Vias supressoras tumorais também afetam o metabolismo (SCHULZE e HARRIS, 2012). Por exemplo, o TP53 mantém a atividade mitocondrial através da expressão da SCO2, enzima necessária para a montagem do Citocromo C oxidase 2. A perda desse gene gera consequências metabólicas do efeito Warburg (MATOBA *et al.*, 2006).

Além disso, o TP53 possui papel regulador na glicólise (CAIRNS *et al.*, 2011). O TP53 ativa a expressão da Hexoquinase 2 (HK2), que converte glicose em glicose-6-fosfato (G6P) (MATHUPALA *et al.*, 1997). O GP6 pode seguir para a glicólise, para a produção de ATP, ou entrar na via das pentoses-fosfato (PPP), que mantém a produção da ribose e Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

reduzido (NADPH). Em algumas situações, a p53 pode inibir a glicólise através da indução do gene TIGAR (do inglês, *TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator*), enzima homóloga a frutose 2,6-bifosfato (BENSAAD *et al.*, 2006). O aumento da expressão do TIGAR aumenta a disponibilidade da G6P para entrada dessa macromolécula na PPP, inibindo assim atividade glicolítica como parte da resposta ao dano de DNA (JIANG *et al.*, 2011).

1.4 Alterações no mtDNA e suas consequências no Câncer

A instabilidade do genoma mitocondrial pode ser definida pela ocorrência de mutações em células tumorais que não são encontradas em células normais do mesmo indivíduo (BIANCHI *et al.*, 2001). Embora a instabilidade do mtDNA em outras doenças já tenha sido relatada há um certo tempo, o papel dessas alterações ganhou atenção a partir da descoberta das mutações em genes do TCA em células cancerígenas. Defeitos nos genes SDH e FH, ambos membros do complexo II e codificados no genoma nuclear, são bem estabelecidos no câncer (SCHULZE e HARRIS, 2012).

POLYAK *et al.* (1998) analisou pela primeira vez o genoma mitocondrial em linhagens tumorais colorretais, amostras tumorais e tecidos adjacente. Os resultados mostraram que células tumorais apresentam mais mutações mitocondriais que os tecidos não-cancerígenos (POLYAK *et al.*, 1998). Desde então, vários estudos analisaram e associaram uma ou mais genes do genoma mitocondrial com alguns tumores como, mama (Imanishi, Hattori *et al.*, 2011), tireóide (Abu-Amero, Alzahrani *et al.*, 2006), próstata (Petros, Baumann *et al.*, 2005, Kloss-Brandstatter, Schafer *et al.*, 2010), fígado (Nomoto, Yamashita *et al.*, 2002), pâncreas, cabeça e pescoço (Ha, Tong *et al.*, 2002) e pulmão (Fliss, Usadel *et al.*, 2000; Jakupciak, Maragh *et al.*, 2008) (Figura 9).

Proteínas com sequências alteradas, resultantes de mutações somáticas no mtDNA, demonstraram ter sua montagem e estabilidade prejudicadas e, com isso, resultam em estruturas deficientes nos complexos da cadeia respiratória levando a deficiência de OXPHOS (CAREW e HUANG, 2002; PIETKA *et al.*, 2008; PLAK *et al.*, 2008).

Figura 9. Associações de regiões mitocondriais e câncer. Genoma mitocondrial mostrando regiões foram associadas com diferentes tipos de cânceres. Fonte: Adaptada de CHATTERJEE *et al.* (2006).

Ainda, estudos com cíbridos, híbridos citoplasmáticos no qual pode-se combinar um genoma nuclear de uma fonte com o genoma mitocondrial de outra fonte (CAIRNS *et al.*, 2011), apresentaram a possibilidade de mutações no mtDNA estarem envolvidos no desenvolvimento do potencial metastático (ISHIKAWA, KOSHIKAWA, *et al.*, 2008).

ISHIKAWA e HAYASHI (2010) em seus resultados, propuseram um mecanismo no qual mutações no mtDNA podem regular a metástase na célula tumoral por meio da super produção de ROS. Tal potencial metastático é controlado reversivelmente pelo tratamento com sequestradores de ROS. No entanto, nem todas as metástases são mediadas via mtDNA, embora mutações podem ser um dos fatores indutores (ISHIKAWA e HAYASHI, 2010). Imanishi, Hattori *et al.*, 2011, utilizando a linhagem de carcinoma de mama humano, demonstrou mutações no mtDNA induzindo defeitos no complexo I e elevando a produção do lactato, efeito correspondente ao Warburg, o que pode resultar em parte no potencial metastático dessa célula. Outro estudo desse mesmo grupo, também encontrou mutações no mtDNA induzindo metástase em linhagem de carcinoma de pulmão em camundongos (ISHIKAWA, TAKENAGA, *et al.*, 2008).

Assim como mutações no mtDNA, alterações no número de cópias do genoma mitocondrial podem alterar a homeostase celular. O conteúdo do mtDNA é modulado de acordo com as condições fisiológicas da célula e podem sofrer mudanças significativas em microambientes diferentes (HOPPELER *et al.*, 2003; SHADEL, 2008). Evidências que o número de cópias do mtDNA são diminuídas em câncer de mama e Sarcoma de Ewing estão associadas com a ocorrência de mutações somáticas localizadas próximas as origens de replicação da fita pesada no D-loop (YU *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2010).

A diminuição no número de cópias mitocondriais também podem estar envolvida com a deficiência na via de sinalização mediada pela proteína p53 (YU, 2011). A proteína p53 mantém a estabilidade do genoma mitocondrial em resposta a danos de DNA induzidos por ROS, através de sua translocação para dentro da mitocôndria e interação com a DNA polimerase γ , e também estimula a biogênese mitocondrial como uma proteína mito-checkpoint (ACHANTA *et al.*, 2005; KULAWIEC, AYYASAMY, *et al.*, 2009) Com isso, perda ou variações na p53 pode levar ao aumento da sensibilidade do mtDNA a ROS, acarretando em variações do seu conteúdo na célula (LEBEDEVA *et al.*, 2009).

A busca por mutações no mtDNA eram feitas de maneiras pontuais, analisando apenas algumas regiões mitocondriais, dado a tecnologia que existia. O trabalho de POLYAK *et al.* (1998), assim como alguns trabalhos posteriores, foi pioneiro também em analisar o genoma mitocondrial completo, pelo método de Sanger. Outros trabalhos seguiram essa mesma metodologia, no entanto, é um método caro e dispendioso (LIEVRE *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2011).

Com o advento plataformas de *Next Generation Sequencing* (NGS), a obtenção de sequências do genoma foi facilitada e a análise de todo o genoma mitocondrial passou a ser feita rapidamente e com baixo custo. Apenas alguns trabalhos analisaram o mtDNA em células tumorais colorretais utilizando esse método (HE *et al.*, 2010; LARMAN *et al.*, 2012).

Como já comentado, foi proposto que a *hiper*-regulação da glicólise durante condições normais de oxigênio, efeito Warburg, pode induzir defeitos na respiração mitocondrial e regular o fenótipo tumoral, como o potencial metastático, através da indução de vias pseudo-hipoxica durante a normóxia. Paralelamente a isso, proteínas com sequências alteradas, resultantes de mutações somáticas no mtDNA, demonstraram ter sua montagem e estabilidade prejudicadas e, com isso,

resultaram em estruturas deficientes nos complexos da cadeia respiratória levando a deficiência de OXPHOS (CAREW e HUANG, 2002; PIETKA *et al.*, 2008; PLAK *et al.*, 2008).

Vários estudos sugeriram que as funções mitocondriais são profundamente alteradas em células transformadas e mutações e alterações no número de cópias do mtDNA são importantes para processo carcinogênico (SMIRAGLIA *et al.*, 2008; KULAWIEC, OWENS, *et al.*, 2009).

O câncer colorretal possui as suas etapas de progressão bem caracterizadas tanto em relação as modificações histológicas como em relação a mutações em oncogenes e genes supressores tumorais, caracterizadas na sequência adenoma-carcinoma (FEARON e VOGELSTEIN, 1990). Vários estudos procuraram as mutações do mtDNA nos carcinomas colorretais (POLYAK *et al.*, 1998; LIEVRE *et al.*, 2005; HE *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011; LARMAN *et al.*, 2012) e apenas um estudo focou em adenoma (MEHRABI *et al.*, 2010), no entanto nenhum estudo avaliou os adenomas e adenocarcinomas do mesmo indivíduo.

Portanto, o presente estudo procurou avaliar a instabilidade do genoma mitocondrial dos adenomas e adenocarcinomas colorretais a fim de encontrar mutações que auxiliem a elucidar os mecanismos moleculares por trás das alterações mitocondriais na progressão tumoral.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a instabilidade do genoma mitocondrial em adenomas e adenocarcinomas colorretal em relação a tecidos normais do mesmo paciente.

2.2. Objetivos específicos

- Rastrear mutações específicas de adenoma e adenocarcinoma colorretal com base na análise do genoma mitocondrial;
- Estimar a patogênicidade das mutações específicas de adenomas e adenocarcinomas colorretal;
- Avaliar o grau de heteroplasmias em adenomas e adenocarcinomas colorretal;
- Calcular o número de cópias relativas do genoma mitocondrial em adenomas e adenocarcinomas colorretal.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção das amostras

Foram utilizadas amostras de nove pacientes diagnosticados com adenocarcinoma colorretal, coletadas através de exame colonoscópico ou durante procedimento cirúrgico no período de novembro de 2010 a março de 2012. Como critério de inclusão os pacientes deveriam apresentar adenoma e adenocarcinoma no momento do exame. Nenhum dos pacientes recebeu tratamento químico ou radioterápico antes da coleta dos tecidos. Pacientes com histórico de polipose familiar, doença inflamatória do intestino ou câncer colorretal hereditário foram excluídos do estudo. Todas as amostras haviam sido coletadas e armazenadas no Banco de Tumores Proctológicos (processo do Comitê de Ética nº 2374/2008) do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP) do *campus* de Ribeirão Preto. Colaboram com o estudo a Profa. Dra. Fernanda Maris Peria, Oncologista do Departamento de Clínica Médica da FMRP/USP e os Profs. Drs. Omar Feres e José Joaquim Ribeiro da Rocha do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP/USP. Foram também utilizadas amostras de adenoma, tecidos adjacentes (não-tumoral) e sangue periférico dos mesmos pacientes (Tabela 1). As amostras fazem parte originalmente da tese de doutorado da aluna Aline Simoneti Fonseca.

Tabela 1. Informações clínicas dos pacientes

Paciente	Sexo	Idade	Local	Cor	Pólipo ¹	Lesão ²	Estadiamento ³
1	M	77	sigmóide	branco	A.T.D.L	A.T.I.M.D	T1N0
2	F	88	reto	branca	A.T.V.D.L	A.T.I.P.D	T2N2
3	F	69	Reto-sigmóide	mulata	A.T.D.L	A.T.I.M.D	T3N1
4	M	87	sigmóide	branco	A.T.D.L	A.T.I.M.D	T3N0
5	F	72	ascendente	branca	A.T.D.M	A.T.I.M.D	T3N1
6	M	66	reto baixo	branco	A.T.D.M	A.T.I.M.D	-----
7	F	35	sigmóide	mulata	A.T.D.M	A.T.I.M.D	T3N1
8	M	88	reto baixo	branco	A.T.D.L	A.T.I.M.D	T3N2
9	M	75	reto-sigmóide	mulato	A.T.D.A.B	A.T.I.M.D	T3N2

M: Masculino, F: Feminino.

¹A.T.D.L: Adenoma Tubular com displasia leve, A.T.D.M: Adenoma Tubular com displasia moderada, A.T.D.A.B: Adenoma Tubular com displasia de alto e baixo grau, A.T.V.D.L: Adenoma Túbulo-viloso com displasia leve.

²A.T.I.M.D: Adenocarcinoma Tubular Invasivo Moderadamente diferenciado, A.T.I.P.D: Adenocarcinoma Tubular Invasivo Pouco diferenciado.

³Classificação TMN de tumores malignos: T: extensão do tumor primário; N: Ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais; M: Ausência ou presença de metástase a distância.

3.2. Aspectos éticos

O projeto foi aprovado em 18/08/2012 pelo comitê de ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto FMRP/USP, processo número 72902/2012.

3.3. Extração de DNA

Para a extração de DNA foi utilizado aproximadamente 1 cm³ de tecido das amostras de adenomas, adenocarcinomas e tecido adjacente. Cada amostra foi envolvida em gelo seco e submetida à maceração com nitrogênio líquido. No tecido macerado foi acrescentado 1000ul de trizol e em seguida adicionados 200 ul de clorofórmio e 10uL de glicogênio. A solução foi homogeneizada e em seguida centrifugada a 13000 rpm, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante (contendo RNA) foi processado e armazenado em freezer freezer -80°C para análise futura. No restante (parte rosa) foi adicionado 600 uL de etanol 100%. A solução foi novamente homogeneizada e centrifugada por 10 minutos, em 13000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 1000ul de solução de lavagem (citrato de sódio em etanol). Em seguida foi centrifugado por 15 minutos, em 13000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado novamente e ao pellet adicionado 1000 ul de solução de lavagem. Em seguida a solução foi, novamente, centrifugada por 10 minutos, a 13000 rpm a 4°C. Foi adicionado 1000 ul de etanol 75% ao pellet e centrifugado por 10 minutos, a 13000 rpm a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o pellet ficou secando por 15 min. Por fim, foi adicionado 50 ul de H₂O.

Para extração do DNA do sangue periférico dos pacientes foi utilizado o kit de extração Super Quik-Gene-Rapid DNA Isolation (Promega) seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado, diluído para a obtenção de uma alíquota de trabalho com concentração de 100ng/μL de DNA e posteriormente foram armazenadas a -20°C até as análises.

3.4. Amplificação do genoma mitocondrial

A amplificação do genoma mitocondrial ocorreu através da Reação em cadeia da polimerase (PCR) em duas etapas. A princípio, o genoma foi amplificado em três fragmentos longos (Tabela 2) que cobrem toda a extensão do genoma mitocondrial. Na segunda etapa, foram utilizados 28 pares de *primers* para amplificar, a partir dos três fragmentos gerados na primeira etapa, fragmentos sobrepostos de aproximadamente 650pb (TAYLOR *et al.*, 2001).

3.4.1. Primeira etapa da amplificação

O genoma mitocondrial foi amplificado utilizando três pares de *primers* desenhados com auxílio do software Primer3¹ usando a montagem do genoma mitocondrial humano CRCh37/hg19 como referência² (Figura 10). Os *primers* foram avaliados quanto a sua eficiência pelo software OligoAnalyzer 3.1³. Para a amplificação dos fragmentos foi utilizado o protocolo *LongRange* PCR (QIAGEN LongRange PCR Kit, Qiagen) com 500ng de DNA genômico numa reação final de PCR de 50µL. O protocolo foi conduzido conforme as especificações do fabricante. As condições de temperatura para a PCR foram estabelecidas como: 93°C por 3 minutos para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos de 15 segundos a 93°C para desnaturação, anelamento (Tabela 2) por 30 segundos, elongação a 68°C por 1 minuto por cada quilobase de DNA genômico.

Tabela 2. *Primers* para a primeira etapa de amplificação.

Fragmentos	Sequências dos <i>primers</i>	Fragmento (pb)	Anelamento (°C)
Fragmento I	F: AGAACACTACGAGCCACAG R: GATGAGATATTTGGAGGTGGG	7.500	56
Fragmento II	F: TACTCCCGATTGAAGCCCCCATTC R: CAGTTCACTTTAGCTACCCCCAAG	8.500	62
Fragmento III	F: CCTCCCTGACAAGCGCCTATAGC R: CTTTGGCTCTCCTTGCAAAGT	4.919	60

¹ http://frodo.wi.mit.edu/primer3_code.html

² <http://genome.ucsc.edu>

³ <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>

Figura 10. Representação esquemática das regiões dos fragmentos amplificados do genoma mitocondrial na primeira etapa.

3.4.2. Segunda etapa da amplificação

Na segunda etapa de amplificação foi utilizado um conjunto de *primers* publicados em TAYLOR *et al.* (2001) (Apêndice 1). Todas as amplificações foram realizadas em um volume total de 25 µL de reação. Cada reação continha tampão 1X ((NH₄)₂SO₄ 2M, Tris-HCl 2M, MgCl₂ 1M e Tween 20 a 1%), 100 µM de dNTP, 0,1pM de cada primer, 1U de Taq DNA Polimerase (Biotools, Madri, Espanha), 2µL do produto da PCR da primeira etapa.

Como descrito em TAYLOR *et al.* (2001) todos os primers foram desenhados com a temperatura de anelamento de 58°C. As condições de temperatura para a PCR foram estabelecidas como: 94°C por 12 minutos para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C para desnaturação, anelamento a 58°C por 1 minuto, alongação a 72°C por 1,5 minutos e alongação final de 72°C por 5 minutos.

3.5. Purificação e quantificação

Todos os fragmentos amplificados das duas etapas descritas anteriormente, foram purificados com o kit da Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, seguindo recomendações do fabricante. Em seguida, o DNA purificado foi quantificado em NanoVue CTC 1547 (GE Healthcare Life Sciences) e avaliado quanto a sua integridade no Bioanalyzer 2100 (Agilent), kit DNA 12000, e no QuantiFluor™-ST Fluorimeter (Promega), utilizando o kit Quantifluor TM dsDNA System, conforme orientações dos fabricantes. A integridade do amplicon, o tamanho correto e a ausência de bandas inespecíficas, são parâmetros essenciais para obter um resultado de alta qualidade em plataformas de *Next Generation Sequencing*, como a que utilizamos nesse estudo.

3.6. Sequenciamento do genoma mitocondrial

A montagem do genoma mitocondrial foi feita em duas plataformas de sequenciamento de DNA. Inicialmente, algumas amostras foram sequenciadas pelo de Sanger em sequenciador de eletroforese capilar. Depois, em colaboração a LifeTech do Brasil, foi possível sequenciar grande parte dos genomas mitocondriais no sequenciador PGM (*Personal Genome Machine*) da Ion Torrent Life Technologies).

No PGM foram utilizados os três amplicons gerados da primeira etapa de amplificação, uma vez que essa plataforma permite o sequenciamento preciso de amplicons longos. No caso dos amplicons gerados segunda etapa, a tecnologia utilizada foi a de eletroforese capilar.

Figura 11. Workflow do sequenciamento de DNA genômico no *Personal Genome Machine*, Life Tech.

3.6.1. Next generation sequencing

3.6.1.1. Construção da biblioteca

A figura 11 descreve as etapas do sequenciamento no PGM. É uma abordagem que pode ser aplicada para qualquer tipo de sequenciamento no PGM, incluindo o do genoma mitocondrial.

Um pool formado por 33 ng de cada amplicon, por amostra, gerado na primeira etapa de amplificação foi fragmentado enzimaticamente em sequências de 200pb, utilizando o Ion Shear Plus Kit. Em seguida, a reação de fragmentação foi purificada com o kit Agencourt AMPure XP em coluna magnética. Nas extremidades dos fragmentos foram ligados adaptadores que são essenciais para o

sequenciamento no PGM. Para tanto, foi utilizando o kit Ion Xpress Plus Fragment Library (Life Technologies). Em seguida, cada amostra foi etiquetada com um *Barcode* diferente, permitindo assim o sequenciamento de varias amostras em um mesmo chip. Para esse procedimento foi utilizado o kit Ion Xpress Barcode Adaptors 1-16 (Life Technologies). A seleção de fragmentos com 200pb em todas as amostras foi realizada no E-Gel SizeSelect (Invitrogen) em Géis 2%. Os fragmentos selecionados foram purificados usando o kit Agencourt AMPure XP.

Por fim, o *pool* de cada amostra foi quantificado em PCR em tempo real, no 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystem), com o Ion Library Quantification Kit (Life Technologies). Cada amostras foi quantificada em triplicata e diluída 20x, 2000x e 20000x, para determinar o fator de diluição aplicando o seguinte calculo: Fator de diluição da amostra= [(quantidade relativa da qPCR)x (diluição da amostra)]/0,32. Cada amostra foi diluída por seu respectivo fator de diluição e foi feito um *pool* com a mesma quantidade de cada amostra para que todas fossem amplificadas em emulsão no Ion OneTouch™ System (Life Technologies) a partir da concentração inicial de 15×10^6 moléculas de DNA por microlitro para produção dos *templates* (fitas molde de DNA).

3.6.1.2. **Preparação do template**

Todos os *templates* foram produzidos num sistema em emulsão utilizando o kit The Ion OneTouch™ 200 Template Kit, no equipamento Ion OneTouch™ System (Life Technologies). Esse procedimento é fundamental para promover a ligação de um único fragmento de 200pb em um único Ion Sphere™ Particles (ISPs). Em seguida, nesse mesmo sistema, uma reação de PCR realizada para que haja a amplificação clonal de cada fragmento. Em seguida, uma reação de enriquecimento é realizada para excluir os ISPs que não se ligaram a nenhum fragmento de DNA. Assim, temos apenas ISPs ligadas a vários fragmentos idênticos prontos para sequenciamento.

3.6.1.3. *Reação de sequenciamento*

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o Ion PGM™ 200 Sequencing Kit (Life technologies). Na reação de sequenciamento, um *primer* se liga especificamente ao adaptador para que ocorra o sequenciamento de cada fragmento dos ISPs. A reação de sequenciamento ocorreu no chip Ion 314, que possui capacidade de sequenciar até 100 Mb.

Cada chip contém milhões de microporos, que tem sob eles uma camada sensível a variações iônicas e por fim um sensor iônico. Cada microporo é preenchido por uma ISPs. O Ion PGM adiciona um tipo de base de cada vez, se o nucleotídeo for incorporado haverá liberação de H⁺ e consequente alteração iônica. Caso o nucleotídeo não seja incorporado, não haverá alteração iônica. Por meio dessas variações iônicas, o chip capta qual nucleotídeo foi incorporado em cada microporo e assim é realizado o sequenciamento de cada fragmento. Por fim, essas variações químicas são transformadas pelo Ion PGM em informação digital, ou seja, em sequência de DNA.

3.6.1.4. *Análise dos dados*

As sequências geradas pelo PGM foram analisadas no Ion Reporter Software (Life Technologies), que executa um aplicativo de mapeamento e montagem *de novo* contra a Sequência referência do genoma mitocondrial (rCRS, NC_012920). O algoritmo utilizado foi o *tmap*, com o parâmetro *mapall*. Foram excluídas da análise sequências policlonais e com Phred score abaixo de 17, ≥ 17 . O aplicativo também identifica mutações no Genoma Mitocondrial, que podem ser usadas na análise de haplogrupos mitocondriais de cada indivíduo. Nesse caso, a análise é realizada com o software Haplogrep (KLOSS-BRANDSTATTER *et al.*, 2011). Adicionalmente, o software Geneious Basic 5.5.7 foi usado para confirmação das mutações encontradas no Ion Reporter Software.

As mutações encontradas foram plotadas e visualizadas no genoma mitocondrial através do software CGView (STOTHARD e WISHART, 2005).

3.6.2. Sequenciamento pelo método de Sanger

O genoma mitocondrial de apenas duas amostras de um mesmo paciente (adenocarcinoma e sangue periférico) foi sequenciado no sequenciador automático 3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems), que usa a metodologia de Sanger. Nas reações de sequenciamento foram usados: 1 a 2 µL do produto da reação de amplificação da segunda etapa; 2 µL de Big Dye Terminator v3.1 Cycle 2 µL de 5X *Sequencing Buffer* (Applied Biosystems); 0,01 µM de *primer* e água em quantidade suficiente para completar 10 µL. Os parâmetros das reações de sequenciamento foram: 95°C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 95°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos cada.

As análises dos resultados de sequenciamento foram feitas no software Geneious Basic 5.5.7, onde os fragmentos obtidos a partir do sequenciamento capilar foram mapeados contra a sequência referência NC_012920 do genoma mitocondrial.

3.7. Análise do número de cópias do mtDNA

Para determinar o número de cópias do genoma mitocondrial foi usado os valores de Ct (do inglês, *cycle threshold*) do genoma mitocondrial em relação ao Ct do genoma nuclear nas amostras de cada paciente. Os valores de Ct foram obtidos por qPCR no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Life Technologies). Os *primers* específicos de DNA mitocondrial e de DNA nuclear utilizados na reação de qPCR estão descritos (Tabela 3) (VENEGAS *et al.*, 2011). Todas as reações foram realizadas utilizando Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies), seguindo orientações do fabricante.

Tabela 3. *Primers* PCR quantitativa.

Primers	Sequências dos <i>primers</i>	Temp. de Anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)
Mt	F: TCTCCATCTATTGATGAGGGTCT R: TGTAGCCGTTGAGTTGTGGT	59°C	183pb
TUBB	F: TCAACACCTTCTTCAGTGAAACG R: AGTGCCAGTGCGAACTTCATC	59°C	241pb

3.8. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software GraphPad Prism* (versão 5.0, 2007). A princípio foram aplicados os testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov ou Shapiro-Wilk, para avaliar se a distribuição dos dados está normal ou não. A partir desta informação foram aplicados os testes t de Student (2 categorias) ou Anova (3 categorias) em dados com distribuição normal, e os testes Mann-Whitney (2 categorias) ou Kruskal-Wallis, em dados que não seguem a distribuição normal.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Amplificação do genoma mitocondrial

Os três fragmentos do genoma mitocondrial amplificados para uso posterior no sequenciamento das amostras dos pacientes pelo método de Sanger e no PGM estão descritos na figura 12. Todas as amostras seguiram o mesmo padrão de amplificação. A qualidade dos fragmentos foi avaliada no Bioanalyzer 2100 antes de serem sequenciadas no PGM. A figura 13 mostra o resultado do fragmento II com qualidade boa para o sequenciamento.

Figura 12 - Gel de agarose 1% das reações de PCR com o resultado da amplificação dos três fragmentos de 7.500 pb, 8.500 pb e 4.919 pb do genoma mitocondrial. M= marcador de peso molecular *High Range* (Fermenta). B = controle negativo.

Figura 13. Perfil da análise no bioanalyzer de um fragment de boa qualidade. Todos os fragmentos sequenciados no PGM seguiram este padrão.

4.2. Sequenciamento do genoma mitocondrial

Foram sequenciados um total de 24 genomas relativo a 9 pacientes. De cada paciente foram sequenciados 3 genomas: um a partir do sangue, um a partir do adenoma e outro do adenocarcinoma. Porém, em dois destes não foi possível sequenciar o mtDNA do sangue periférico, enquanto que em um outro, não foi possível o sequenciamento do adenoma. O sequenciamento do genoma mitocondrial pelo método de Sanger foi realizado em apenas um paciente.

Para avaliar a eficiência do PGM em relação ao método de Sanger, realizamos um estudo piloto comparado o resultado do sequenciamento de 50% do genoma mitocondrial do sangue periférico e do adenocarcinoma de um paciente. O resultado das mutações identificadas está descrito na tabela 4.

Tabela 4. Correlação mutações encontradas pelo sequenciamento capilar e pelo SPG.

Posição das Mutações	PGM sangue	Sanger sangue	PGM Adenocarcinoma	Sanger Adenocarcinoma
m.1438	G	G	G	G
m.1736	G	G	G	G
m.2128	G	G	A	G
m.2706	G	G	G	G
m.3423	T	T	T	T
m.3535	T	T	C	C
m.4248	C	C	T	T
m.4769	G	G	G	G
m.4824	G	G	G	G
m.4985	A	A	A	A
m.7028	T	T	T	T
m.8027	A	A	A	A
m.8794	T	T	T	T
m.8860	G	G	G	G

Figura 14. Identificação de mutações através do sequenciamento capilar, cromatograma acima, e do SPG, reads alinhados abaixo. A: Mutação sinônima m.7028 C>T encontrada no gene COI, em homoplasia em várias amostras. B: Mutação não sinônima m.8027 G>A, que leva a troca A148T no gene COII. C: Mutação tumoral m.2128 G>A em heteroplasma (18,87%) não identificada pelo sequenciamento capilar.

A grande maioria das mutações foi correspondente em ambas as tecnologias, tanto no sangue periférico, quanto no adenocarcinoma (mutações m.1438, m.1736, m.2706, m.3423, m.4769, m.4824, m.4985, m.7028, m.8027, m.8794 e m.8860), demonstrando a eficiência da tecnologia PGM. Tal eficiência permite a identificação de mutações específicas de sangue periférico e de adenocarcinoma, mutações m.4248 e m.3535, respectivamente (tabela 4). A sensibilidade do PGM pode ser demonstrada na detecção da heteroplasma revelada pela mutação m.2128 apenas na amostra de tumor (Tabela 4). O sequenciamento pelo método de Sanger não consegue detectar heteroplasma com taxa inferior a 20% (IRWIN *et al.*, 2009). Portanto, devido a estas qualidades os oito pacientes restantes foram sequenciados no PGM.

Na primeira corrida no PGM foi sequenciado o genoma mitocondrial de 10 amostras (4 de sangue periférico e 6 de adenocarcinomas), que geraram um total de 535.736 *reads* (70,6Mb), com uma média de 53.363 *reads* e cobertura de 350x por amostra. O tamanho médio dos *reads* foi de 131bp.

Na segunda corrida foi sequenciado mais 10 mostras (1 sangue periférico, 1 adenocarcinoma e 8 adenomas), que geraram um total de 324.878 *reads* (44,5Mb), com uma média de 6.832 *reads* e cobertura de 23x por amostra. O tamanho médio dos *reads* foi de 136 pb. Apesar do baixo número de *reads* produzidos nesta corrida, devido a problemas técnicos durante a preparação das bibliotecas, o resultado final não ficou comprometido. A cobertura média de 23x registrada é suficiente para identificar as mutações, inclusive as em heteroplasma (Figura 15). Cerca de 97% dos *reads* de todas as corridas foram alinhados com sucesso. A maioria deles são de alta qualidade com Phred score igual ou maior que 20 (Q20).

Figura 15. Dados do número e tamanho de *reads* da primeira e segunda corrida no PGM.

4.3. Análise de Instabilidade genômica

Vários estudos analisaram a instabilidade do genoma mitocondrial, revelada por mutações e alterações no número de cópias do mtDNA, em células tumorais de CCR (POLYAK *et al.*, 1998; LIEVRE *et al.*, 2005; HE *et al.*, 2010; FENG *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011; LARMAN *et al.*, 2012; SKONIECZNA *et al.*, 2012). No entanto, a maioria destes utilizaram como tecido não-tumoral, para fins comparativos, o tecido adjacente ao adenocarcinoma. Segundo a teoria da cancerização de campo, proposta por DAKUBO *et al.* (2007), tecidos adjacentes ao tumor não são necessariamente normais, pois podem ser infiltrados pelas células tumorais vizinhas. Por esse motivo, sugere-se, sempre que possível a utilização do sangue periférico do paciente como células não-tumoral controle. O presente estudo é original por avaliar a instabilidade do genoma mitocondrial em amostras de sangue, adenoma e adenocarcinoma do mesmo do mesmo paciente.

Foram identificadas um total de 233 mutações, sendo 104 em regiões D-loop, tRNA e rRNA, e 129 nas regiões codificadoras (Figura 16). Destas 85 foram do tipo sinônimas e 44 do tipo não-sinônimas (Figura 17). As regiões não codificantes, D-loop, os tRNA e rRNA, foram os mais afetados (43%), seguido dos genes do Complexo I que sofreram 32% do total de mutações, com 18% do tipo não-sinônimas (Figura 17B) localizados nos genes ND2, ND4 e ND5 (Figura 17C).

O gene CYB é o único gene do Complexo III. O número de mutações detectadas nele representa 9% do total das mutações, onde 6% delas são do tipo não-sinônimas. No caso dos genes do Complexo IV (COI, COII e COIII) o número de mutações detectadas representa 12% do total identificadas em todo genoma mitocondrial, sendo 5% do tipo não-sinônima. Já os genes do Complexo V, o número de mutações detectadas representa 3% do total encontradas no genoma mitocondrial, onde 5% delas são do tipo não-sinônimas.

Para estabelecer a diferença real do número de mutações em cada Complexo, calculamos o número de mutações por pares de bases do total das regiões codificadoras de cada complexo (Figura 17D). O resultado revelou que o gene do Complexo III (CYB) é o mais mutado, seguido dos genes do Complexo I. Quanto as alterações não-sinônimas, os genes do Complexo V foram os que sofreram mais alterações desse tipo, seguido do complexo III e I, respectivamente (Figura 17D).

Figura 16. Mapa dos genomas mitocondriais sequenciados por SPG. Estão representadas todas as mutações de troca única (traços cinza) e InDels (traços rosa). Ainda, todas as mutações em heteroplasmia (HT) e os tratos policisteína (TpC). A: Genomas das amostras de adenocarcinomas nas camadas externas e genomas das amostras de sangue nas camadas internas. Os genomas estão na seguinte ordem (camadas externas, de dentro para fora; camadas internas: de fora para dentro): 4, 6, 7, 8. B: Genomas das amostras de adenocarcinomas nas camadas externas e genomas das amostras de adenoma nas camadas internas. Os genomas estão na seguinte ordem (camadas externas, de dentro para fora; camadas internas: de fora para dentro): 4, 6, 7, 8. C: Genomas das amostras de adenocarcinomas nas camadas externas e genomas de sangue internamente. Os genomas estão na seguinte ordem: 2 e 9. D: Genomas das amostras de adenocarcinomas nas camadas externas e genomas de adenoma internamente. Os genomas estão na seguinte ordem: 2, 3 e 5.

Figura 17. Topologia das mutações encontradas no genoma mitocondrial em pacientes com câncer colorretal. A) Percentagem de mutações de acordo com a região do genoma mitocondrial. B) Percentagem das mutações em regiões codificadoras do genoma mitocondrial. C) Número de mutações por gene. D) Frequências de mutações por pares de bases (pb) em cada Complexo mitocondrial.

4.4. Determinação dos haplogrupos mitocondriais

Com base nos resultados da análise de mutação foi possível determinar os tipos de haplogrupos na nossa amostragem. Essa informação é amplamente usada para a caracterização da origem étnica de uma população (RANDO *et al.*, 1998). Portanto, esses dados podem eventualmente auxiliar na definição do grau de instabilidade do genoma mitocondrial no tumor colorretal em diferentes populações. A tabela 5 descreve os haplogrupos identificados na população de estudo, predominando os haplogrupos do tipo Europeu e nativo Americanos.

Os resultados encontrados são consistentes com a formação da população brasileira, que resultou da mistura das populações europeias, ameríndias e africanas (ALVES-SILVA *et al.*, 2000). No entanto, vale ressaltar que para estudos de inferência ancestral genômica, o uso de marcadores uniparentais, como o caso do mtDNA, deve ser complementado com marcadores do genoma nuclear ou paterno pois exclui a influência de toda a linhagem paterna na ancestralidade da amostra (BAMSHAD *et al.*, 2004)

Tabela 5. Pacientes com câncer colorretal e seus respectivos haplogrupos mitocondriais.

Amostras	Haplogrupo mitocondrial	Região
1	HV+A73G!	Européia
2	U1a1	Européia
3	A2+C64T	Nativo Americana
4	HV0d	Européia
5	L2a1+G143A	Africana
6	D1	Nativo Americana
7	A2+C64T+T16111C!	Nativo Americana
8	H7	Européia
9	C1d1	Nativo Americana

4.5. Instabilidade do genoma mitocondrial tecido-específico

A figura 18 descreve o total de mutações identificadas no sangue periférico, adenoma e adenocarcinoma colorretal. Os dados revelam um número maior nas amostras de adenocarcinoma com uma média de 44,6 mutações por amostra,

seguida das amostras de adenoma e sangue periférico, com médias de 40,2 e 34,0, respectivamente. Esses dados indicam que as amostras de adenocarcinoma possuem maior instabilidade do genoma mitocondrial quando comparado com o sangue periférico ($p=0,04$, teste t de Student), assim como já observado em outros estudos que compararam o genoma mitocondrial completo de adenocarcinoma com tecido não-tumoral (LIEVRE *et al.*, 2005; HE *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011).

As amostras de adenoma também apresentaram maior instabilidade em relação as amostras sanguíneas, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa ($p=0,19$, teste de Mann-Whitney) (Figura 18A). Alguns trabalhos que avaliaram variações no mtDNA em adenomas demonstraram que estes tecidos são geneticamente mais instáveis que o tecido adjacente normal (LEGRAS *et al.*, 2008; MEHRABI *et al.*, 2010). A frequência intermediária de mutações nos adenomas pode estar relacionada com o estágio intermediário de transformação celular em que essa célula se encontra.

A comparação do número de mutações nos três tipos de tecidos sw todos os pacientes revelou que 162 mutações são comuns entre os tecidos. Destas, 30 mutações são do tipo não-sinônimas e 12 do total das mutações estão em heteroplasma (Figura 18B). Também foram encontradas 28 mutações exclusivas de adenocarcinoma (12 do tipo não-sinônimas e 16 em heteroplasma), 11 mutações exclusivas das amostras de adenoma (5 do tipo não-sinônimas e 7 em heteroplasmas), e 12 mutações exclusivas das amostras de sangue periférico (4 em heteroplasmas e nenhuma delas do tipo não-sinônimas).

Figura 18. Mutações encontradas nos diferentes tecidos analisados. A) Número de mutações por tecidos. O teste-t de Student mostrou diferença estatisticamente significativa entre o número de mutações encontradas nas de amostras de adenocarcinoma e de sangue periférico ($p=0,04$). B) Diagrama de Venn mostrando o número de mutações comuns e exclusivas de cada tecido. Adicionalmente, são mostrados o número de mutações não-sinônimas e em heteroplasma (Mutações não sinônimas/Mutações heteroplásmicas).

4.5.1. Análise das mutações do tipo substituição

As mutações do tipo substituição são classificadas em transição e transversão. As mutações do tipo transição são caracterizadas pela troca de bases entre as purinas (G:A) e entre as pirimidinas (T:C), enquanto que as do tipo transversão são caracterizadas pela troca de bases entre as purinas e pirimidinas. A maior prevalência de transições ou transversões permite predizer o mecanismo endógeno ou exógeno que leva a instabilidade genômica de uma dada célula ou tecido (LARMAN *et al.*, 2012). Baseado nisso, foi calculado a frequência de substituições nas amostras de sangue periférico, adenoma e adenocarcinoma colorretal.

Das 233 mutações encontradas, 220 foram do tipo substituições de nucleotídeos. Como já esperado, as mutações do tipo transições foram mais frequentes em todos os tecidos (Tabela 6). Analisando individualmente cada tipo de troca (Tabela 7), foi visto que o tipo de troca mais frequente foi a substituição de T>C nas amostras de sangue (44,4%) e de adenoma (50,0%), enquanto que nas amostras de adenocarcinoma, a troca mais comum foi a G>A (53,8%). Essas substituições são frequentes no espectro de mutações causadas por danos oxidativos, que podem surgir a partir do acúmulo de ROS na mitocôndria (CADET *et al.*, 2003; RALPH *et al.*, 2010).

Tabela 6. Frequência do tipo de mutações

Amostras	Transição	Transversão
Sangue	77,8	22,2
Adenoma	90,0	10,0
Adenocarcinoma	92,3	7,7
Total	90,0	10,0

Tabela 7. Frequência da troca de nucleotídeos

Substituição	Total (220)	Sangue (9)	Adenoma (10)	Adenocarcinoma (26)
A>C	1,4			
A>G	23,2	33,3	10,0	3,8
A>T	1,4	11,1		3,8
C>T	15,5			11,5
C>A	1,8			3,8
C>G	0,5			0,0
G>A	24,5		30,0	53,8
G>C	3,2	11,1		
G>T	1,4		10,0	
T>A	0,5			
T>C	26,8	44,4	50,0	23,1

4.5.2. Avaliação das mutações do tipo Inserção e Deleção

O número de mutações do tipo inserção ou deleção (InDel) também auxiliam no cálculo do grau de instabilidade do genoma mitocondrial. O presente estudo, analisou o número absoluto dessas alterações entre os diferentes tecidos (Figura 19). As amostras de adenocarcinoma obtiveram 11 mutações InDel, enquanto que as amostras de adenoma e sangue foi identificado 4 e 5 mutações, respectivamente (Figura 19A). Olhando apenas para as mutações InDels, que ocorreram nas regiões codificadoras, 3 mutações foram identificadas nas amostras de adenocarcinoma, uma nas amostras de adenoma e nenhuma nas amostras de sangue periférico (Figura 19B). Mais uma vez, os resultados sugerem que o genoma mitocondrial das amostras de adenocarcinoma são mais instáveis, o que pode levar a disfunções bioquímica. Recentemente, LARMAN *et al.* (2012) registraram 89% de mutações do tipo InDels nas regiões codificadoras do genoma mitocondrial em CCR. O trabalho avaliou também outros tipos de tumores como o glioblastoma e leucemia mieloide aguda. Talvez a união de vários tumores com fisiopatologia distintas possa explicar essa heterogeneidade.

Figura 19. Mutações do tipo InDel observadas nos tecidos. A: Número de mutações InDel total encontrada nos tecidos. B: Número de mutações InDel localizadas nas regiões codificantes encontrada nos tecidos.

4.5.3. Análise de heteroplasmia

Heteroplasmia indica a presença de mitocôndrias com genomas diferentes coexistindo numa mesma célula (ZHANG *et al.*, 2012) (Figura 18B) (Figura 20). Para a análise de heteroplasmia, foram retiradas as amostras provenientes do paciente 1, que foram sequenciadas pelo método de Sanger. A sensibilidade deste método não permite avaliar a taxa de heteroplasmia com segurança, uma vez que, em estudos que utilizaram essa tecnologia (POLYAK *et al.*, 1998; LIEVRE *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2011), a maioria das mutações somáticas encontradas foram em homoplasia, enquanto HE *et al.* (2010), utilizando sequenciadores de *Next Generation Sequencing*, encontraram a maioria das mutações eram heteroplasmicas.

As amostras de adenocarcinoma foram as que mais apresentaram mutações em heteroplasmias com 7% das mutações identificadas, enquanto que no adenoma apenas 3% das mutações estavam em heteroplasmia. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,04$, teste de Mann Whitney). Ao avaliar as mutações comuns entre os tecidos, 3,5% delas estavam em heteroplasmia. Houve diferença estatisticamente significativa entre a percentagem de mutações em heteroplasmia encontradas entre as amostras de adenocarcinoma e em comun entre os tecidos ($p= 0,03$, teste t de Student) (Figura 20A). Essa diferença já havia sido observado em trabalhos que sequenciaram o genoma mitocondrial pela mesma abordagem (HE *et al.*, 2010; LARMAN *et al.*, 2012). A alta frequência de heteroplasmia observada em todos os tecidos, inclusive os normais,

confirma a ideia de que a heteroplasma é um mecanismo comum que pode indicar instabilidade mitocondrial (HE *et al.*, 2010).

O sequenciamento do genoma mitocondrial no PGM permitiu a análise da taxa de heteroplasma pela contagem do número de *reads* contendo a base mutada dividida pelo número total de *reads* que mapearam aquela região. A taxa em que uma determinada mutação em heteroplasma se encontra na célula pode determinar se o fenótipo mutante vai se expressar (WALLACE *et al.*, 1997).

A taxa média de heteroplasma presente nas amostras de adenocarcinoma foi de aproximadamente 70% (Figura 20B), seguida dos adenomas, que apresentaram média de 50%. Quando analisamos as mutações comuns entre os três tecidos, a taxa média heteroplasma foi de 45%. Houve diferença estatística quanto a taxa de heteroplasma nos três tecidos avaliados ($p=0,01$, teste de Kruskal-Wallis), e entre as mutações comuns e o adenocarcinoma ($p=0,02$, teste de Mann Whitney).

ZHANG *et al.* (2012), em experimentos com híbridos que apresentavam mutações heteroplasmáticas no mtDNA com taxas variadas, observaram que taxas mais elevadas (50% e 100%) estavam associadas com disfunção mitocondrial. Como as taxas de heteroplasma estão mais elevadas nos adenocarcinomas é possível que nessas amostras o fenótipo mutante esteja se manifestando, o que não ocorreria com as mutações comuns entre os tecidos, onde a taxa de heteroplasma é menor que 50%. A manifestação do fenótipo mutante pode ser evidenciada pela alteração de vias metabólicas importantes para o funcionamento mitocondrial.

Considerando que a taxa média de heteroplasma nas amostras de adenoma é de 50%, podemos sugerir que o fenótipo mutante se manifesta de forma intermediária, em analogia a herança mendeliana do tipo codominante, no entanto, são necessários estudos para testar essa hipótese.

Figura 20. Mutações em heteroplasma encontradas nos diferentes tecidos analisados. A, frequência das mutações em heteroplasma nos três tecidos. B: Taxa de mutação em heteroplasma.

4.5.4. Avaliação da patogenicidade das mutações não-sinônimas

A patogenicidade das mutações não sinônimas foi medida no software MutPred, que fornece para cada mutação um valor de patogenicidade gerado a partir da informação do efeito da mutação na estrutura da proteína, da substituição de resíduos funcionais e da sua interação com resíduos vizinhos (LI *et al.*, 2009) (Figura 21). O MutPred gera um valor de patogenicidade que varia de 0 a 1, sendo 1 o valor máximo de patogenicidade. Assim, foi comparado os valores de patogenicidade das mutações não-sinônimas comuns a todos os tecidos (sangue periférico, adenoma e adenocarcinoma), contras as exclusivas de adenoma, e adenocarcinoma (Figura 18B).

As mutações não-sinônimas encontradas exclusivas de adenoma apresentaram uma média de patogenicidade maior que as mutações não-sinônimas comuns aos tecidos ($p=0,002$, teste de Mann Whitney) (Figura 21A). O mesmo foi observado nas exclusivas de adenocarcinoma ($p= 0,006$, teste de Mann Whitney) (Figura 21B).

Estudos que avaliaram a patogenicidade das mutações não-sinônimas em tecido tumorais obtiveram o mesmo resultado (LARMAN *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2012). Esses resultados indicam que taxa de patogenicidade pode ser usada como um índice para medir o efeito da instabilidade genômica na fisiopatologia da célula tumoral.

Figura 21. Patogenicidade média das mutações não sinônimas medida através do software MutPred. A) Patogênica média das mutações não sinônimas encontradas em adenomas e das mutações em comum entre os tecidos. B) Patogênica média das mutações não-sinônimas encontradas exclusivamente em adenocarcinoma e das mutações em comum entre os tecidos.

4.5.5. Topologia das mutações no genoma mitocondrial

Nesta análise foram usadas apenas as mutações específicas de cada tecido analisado. Sendo assim, foram analisadas 11 mutações exclusivas de adenoma (Tabela 8) (Figura 22), 28 exclusivas de adenocarcinoma (Tabela 9) (Figura 23), e apenas duas mutações comuns a ambos.

Nos adenomas, 38% das mutações estavam localizadas nas regiões D-loop, nos tRNA e rRNA; 23% no Complexo III, 23% em genes do complexo I, e 8% em genes dos complexos IV e V (Figura 22A).

Figura 22. Topologia das mutações no genoma mitocondrial em adenoma. A) Percentagem de mutações de acordo com a região do genoma mitocondrial. B) Percentagem das mutações nas regiões codificadoras do genoma mitocondrial. C) Número de mutações por gene. D) Frequências de mutações por pares de bases (pb) em cada Complexo mitocondrial.

Tabela 8. mutações exclusivas das amostras de adenoma.

Paciente	Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Ploidia	Descrita ¹
6	D-loop	66	G>T	RNC	HT	Sim
4	D-loop	308*	INS	RNC	HM	Sim
7	D-loop	567	INS	RNC	HM	Sim
1	rRNA	827	A>G	RNC	HM	Sim
1	COIII	9545*	DEL	<i>Frameshift</i>	HT	Não
4	ND2	4977	T>C	Sinônima	HM	Sim
2	ATP6	8911	T>C	Sinônima	HT	Não
6	ND4	11435	G>A	A676T	HM	Não
4	ND5	13597	G>A	G1261A	HM	Não
3	CYB	15062	T>C	S316P	HT	Não
3	CYB	15282	T>C	F536S	HT	Não
3	CYB	15762	G>A	G1016E	HT	Sim
1	D-loop	16468	T>C	RNC	HT	Sim

NS= Mutação do tipo inserção. RNC= Região não codificante de proteína. HT= Mutação em heteroplasma. HM= Mutação em homoplasia. ¹= descrita no banco de dados do Mitomap. *= mutação em comum entre adenoma e adenocarcinoma.

Na região do D-loop foram encontradas as mutações G66A e uma inserção de um trato policitosina na posição 567 (Tabela 8). Essas mutações já foram relatadas em pacientes com oftalmoplegia externa crônica progressiva, doença frequentemente associada com mutações no gene codificador da DNA polimerase mitocondrial Y (POLG) (DEL BO *et al.*, 2003; WANROOIJ *et al.*, 2004).

Ainda na região D-loop, foram encontradas outras mutações, uma mutação em comum entre adenomas (Tabela 8) e adenocarcinomas (Tabela 9), m.308, C₅T₁, e outra exclusiva de adenocarcinoma, m.309, C₅T₁. Todas elas ocorrendo na sequência D310 (policitosina). Mutações no D310 já foram encontradas em adenomas e em cerca de 40% em adenocarcinomas colorretais (LEGRAS *et al.*, 2008). No entanto nenhum estudo relatou associação entre as mutações no D310 com progressão tumoral (GULENG *et al.*, 2005; LIEVRE *et al.*, 2005).

Estudos indicam que as mutações situadas na região reguladora podem ser geradas pela infidelidade da incorporação de bases durante a replicação do mtDNA. Essa infidelidade pode ser causada pela deficiência da POLG (DEL BO *et al.*, 2003), que em alguns casos é resultado de mutações no gene TP53. Este por sua vez, está frequentemente mutado na progressão do CCR (FEARON e VOGELSTEIN, 1990).

O sequenciamento do gene TP53 nessas amostras revelou que 50% das amostras de adenoma e adenocarcinoma estavam mutadas. Esse dado é parte do doutorado da aluna Aline Simoneti Fonseca.

A proteína p53 interage fisicamente com o POLG e aumenta a sua função replicativa. Outro estudo reportou que a atividade preenchedora de espaço o POLG é menos eficiente em camundongos *knockout* para o gene TP53. No entanto, a sua atividade é recuperada quando é adicionado p53 recombinante (DE SOUZA-PINTO *et al.*, 2004). Diante disso, as alterações no gene TP53 encontradas nas amostras de adenoma e adenocarcinoma contribuem para a disfunção o POLG.

Das mutações identificadas nas regiões codificantes, 71% foram do tipo não-sinônimas e a maioria delas (43%) ocorreu no único gene do complexo III, o CYB (Figura 22B e 22C). Ainda, 29% das mutações não-sinônimas ocorreram no complexo I, especificamente nos genes ND4 e ND5. As mutações sinônimas ocorreram nos genes ND2 (Complexo I) e ATP6 (Complexo V). Quando analisadas as frequências de mutações por pares de base, o CYB continua sendo o gene mais afetado (Figura 22D). MEHRABI *et al.* (2010) sequenciaram aproximadamente 6kb do genoma mitocondrial das amostras de adenoma e observaram que o gene CYB foi um dos mais afetados. De todas as mutações não-sinônimas encontradas somente uma é descrita (Tabela 8). A mutação G15762A leva a uma troca de Glicina para Acido glutâmico na posição 1016 do gene CYB. Essa mutação foi também encontrada em heteroplasmia por ANDREU *et al.* (1998) em um paciente com miopatia que sofria com deficiência no complexo III no musculo esquelético. Esse dado sugere que a mutação G15762A pode levar a disfunção no complexo III nessas amostras de adenoma.

Nas amostras de adenocarcinoma foram encontradas um total de 28 mutações exclusivas deste tecido (Tabela 9) (Figura 23). Parte delas, 40%, estavam localizadas nas regiões D-loop e tRNA, enquanto 33% estavam localizadas em genes que compõem o complexo I, 20% em genes que formam o complexo IV e 7% no gene no complexo III (Figura 23A). Quando avaliado somente as mutações localizadas nas regiões codificantes, 25% de mutações eram do tipo sinônima e 75% do tipo não-sinônimas (Figura 23B). Assim como já visto em outros estudos, onde a maioria das mutações em gene codificantes foram não-sinônimas em amostras de adenocarcinoma (POLYAK *et al.*, 1998; LIEVRE *et al.*, 2005; HE *et al.*, 2010; LARMAN *et al.*, 2012).

Aproximadamente 62% das não-sinônimas nas amostras de adenocarcinoma estão sendo reportadas pela primeira vez no presente estudo. Dentre as variações descritas na tabela 9, as mutações sinônimas C2789T (tRNA), e C7256T (COI), foram também encontradas em pacientes com CCR num estudo anterior (WEBB *et al.*, 2008). Esta última, foi associada com risco aumentado de CCR (WEBB *et al.*, 2008).

Das mutações não-sinônimas situadas nas regiões codificantes, 50% estavam situadas em genes do complexo I, 19% em genes do complexo IV e apenas 6% no gene do complexo III. Um outro estudo já havia reportado os genes do complexo I mais afetados em tumores (PORCELLI *et al.*, 2010).

A análise do número de mutações totais e não-sinônimas por gene (Figura 23C) revelou que a maioria delas ocorreram no gene ND5, seguido do gene COI. Já as mutações não-sinônimas ocorreram em sua grande maioria também no gene ND5. Adicionalmente, os genes ND2, ND6, COI, COII, COIII e CYB tiveram o mesmo número de mutações não sinônimas nessas amostras. Quando foram analisadas a frequência de mutações por pares de base nos adenocarcinomas (Figura 23D), foi possível notar que o complexo III passou a ser o mais afetado por mutações totais. No entanto, o complexo I continuou sendo o mais afetado por mutações não-sinônimas. O segundo complexo mais afetado foi o IV, seguido do complexo III.

Mutações no Complexo I foram reportada em vários tipos de tumores e associadas com o crescimento tumoral (IOMMARINI *et al.*, 2013), como por exemplo, na indução de fatores responsáveis pela substituição da fosforilação oxidativa pela glicólise aeróbica (Efeito Warburg) (MORENO-SANCHEZ *et al.*, 2007). Além disso, algumas mutações encontradas nesse complexo estão associadas com o aumento da estabilização do HIF α , uma vez que o complexo I é responsável pela produção de ROS (IOMMARINI *et al.*, 2013).

Nesse trabalho foram encontradas duas mutações em adenocarcinoma, já descritas em genes do complexo I, que estavam associadas com a disfunção mitocondrial (Tabela 9). A mutação não-sinônima G13042A, que leva a troca da Alanina para Treonina na posição 236 do ND5, foi identificadas em pacientes com doenças mitocondriais e com deficiência grave do complexo I (NAINI *et al.*, 2005; BLOK *et al.*, 2007).

Uma outra mutação, a G4831A, que troca de uma Glicina por um ácido aspártico na posição 121 do gene ND2, foi estudada por ZHOU *et al.* (2007) em linhagens celulares recombinantes que continham essa alteração. Foi observado que houve um aumento no crescimento independente das linhagens tumorais, acompanhado de um aumento na produção de ROS, alteração do metabolismo para glicólise aeróbica e indução do HIF α . Além disso, linhagens tumorais com essa mutação aumentaram a proliferação dependente de ancoragem, uma característica da transformação oncogênica, útil para a proliferação de células cancerígenas longe do seu tecido de origem (ZHOU *et al.*, 2007; DANOVI *et al.*, 2010).

ZHOU *et al.* (2007) também demonstraram uma correlação positiva entre mutações no mtDNA e no gene TP53. Foi sugerido então que a proteína p53 pode participar da progressão tumoral através da regulação da integridade do genoma mitocondrial, uma vez que, a p53 está envolvida na manutenção do reparo por excisão de base e estabilidade genética (DE SOUZA-PINTO *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2006). Diante disso, como algumas das amostras de adenocarcinoma estudadas possuem mutações no TP53, a instabilidade mitocondrial das células tumorais pode ter alguma relação com mutações neste gene.

Tabela 9. mutações exclusivas das amostras de adenocarcinoma.

Paciente	Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de AA	Ploidia	Descrita ¹
2	D-loop	308*	INS	RNC	HM	Sim
5	D-loop	309	INS	RNC	HM	Sim
1	D-loop	499	G>A	RNC	HM	Sim
7	tRNA	2128	G>A	RNC	HT	Não
4	tRNA	2332	C>A	RNC	HT	Não
5	tRNA	2571	G>A	RNC	HT	Não
5	tRNA	2789	C>T	RNC	HT	Sim
5	ND1	3594	C>T	Sinônima	HM	Sim
5	tRNA	4314	DEL	RNC	HM	Não
1	ND2	4831	G>A	G121D	HM	Sim
6	ND2	4868	A>G	Sinônima	HT	Sim
1	tRNA	5669	G>A	RNC	HT	Não
4	tRNA	5692	T>C	RNC	HT	Sim
1	COI	6816	INS	Frameshift	HM	Não
7	COI	6817	T>C	F305S	HM	Não
5	COI	7256	C>T	Sinônima	HM	Sim
4	COII	7910	G>A	E109K	HT	Não
6	COIII	9545*	DEL	Frameshift	HT	Não
3	COIII	9973	T>C	I256T	HT	Não
3	tRNA	10406	G>A	RNC	HT	Sim
8	ND4	10570	A>T	E34K	HT	Não
4	ND4	11651	G>A	V298M	HM	Não
9	ND5	12667	G>A	D111N	HT	Não
9	ND5	12773	G>A	G146D	HM	Sim
3	ND5	13042	G>A	A236T	HM	Sim
3	ND5	13985	T>C	L550P	HT	Não
9	ND6	14318	T>C	N119S	HM	Sim
5	CYB	14971	T>C	Sinônima	HT	Sim
1	CYB	15276	G>A	R177Q	HT	Não
5	D-loop	16153	G>A	RNC	HM	Sim

INS= Mutação do tipo inserção. DEL= Mutação do tipo deleção. RNC= Região não codificante. HT= Mutação em heteroplasmia. HM= Mutação em homoplasmia. ¹= descrita no Mitomap. *= mutação em comum entre adenoma e adenocarcinoma.

Figura 23. Topologia das mutações no genoma mitocondrial em adenocarcinoma. A) Percentagem de mutações de acordo com a região do genoma mitocondrial. B) Percentagem das mutações em regiões codificadoras do genoma mitocondrial. C) Número de mutações por gene. D) Frequências de mutações por pares de bases (pb) em cada Complexo mitocondrial.

4.6. Análise do número de cópias relativas do mtDNA

Inicialmente foi calculado o número de cópias relativas de mtDNA entre adenomas e tecidos adjacentes (Figura 24A). As amostras de adenoma apresentaram número de cópias do mtDNA inferior quando comparado com tecido adjacente. Porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,11$, teste de Mann Whitney). Em seguida, foi avaliado o número de cópias entre as amostras de adenocarcinoma e tecidos adjacentes. Nesse caso, as amostras de adenocarcinoma apresentaram número de cópias também inferior, mas estatisticamente significativa ($p=0,01$, teste de Mann Whitney) (Figura 24B).

Por fim, foi comparado o número de cópias de mtDNA entre as amostras de adenoma e adenocarcinoma. O resultado dessa comparação revelou que as amostras de adenocarcinoma apresentavam número de cópias de mtDNA inferiores às amostras de adenoma ($p=0,04$, teste t de Student) (Figura 24C).

Nesta análise, amostras de tecidos adjacentes ao adenocarcinoma, foram utilizada como referência do padrão normal, em função da quantidade limitada de amostras de sangue periférico. Mesmo com risco de contaminação por células

tumorais, obteve-se resultados significativos nessa análise. Com base nesses resultados, sugerimos que o número de cópias de mtDNA diminui de acordo o grau de transformação celular.

Estudos anteriores que avaliaram o número de cópias relativas do mtDNA em células tumorais colorretais observaram um aumento do número de cópias em células cancerígenas (FENG *et al.*, 2011; YU, 2011; ERICSON *et al.*, 2012). No entanto, a diminuição do conteúdo mitocondrial nas células tumorais já foi relatada anteriormente em outros tumores de mama e renal (YU, 2011). Além disso, essas alterações foram associadas com a ocorrência de mutações somáticas na sequência D310 (YU *et al.*, 2010), como as encontradas nas amostras de adenoma e adenocarcinoma deste trabalho. A redução no número de cópias do conteúdo mitocondrial tem relação com a deficiências na p53 (ACHANTA *et al.*, 2005). Fato que já foi em vários tipo tumorais com mutações nesse gene (CHANG *et al.*, 2009).

Como já comentado, foram observadas mutações no gene TP53 em 50% das amostras de adenoma e adenocarcinoma desse estudo. Essas mutações talvez afetem o conteúdo mitocondrial nas células tumorais aumentando a instabilidade genética na sequência D310 e em toda a região D-loop.

Figura 24. Número de cópia relativas do genoma mitocondrial nos tecidos estudados. A) Comparação do número de cópias do mtDNA entre o adenoma e tecidos adjacentes (Margem). B) Comparação do número de cópias do mtDNA entre adenocarcinoma e tecidos adjacentes (Margem). C) Comparação do número de cópias do mtDNA entre adenoma e adenocarcinoma.

Conclusão

5. CONCLUSÃO

O CCR é considerado um modelo para o estudo da tumorigênese devido sua progressão ser histologicamente bem definida (CUNNINGHAM *et al.*, 2010). Os mecanismos genéticos que iniciam e conduzem a progressão tumoral afetam tanto a atividade do genoma nuclear quanto a do genoma mitocondrial. Este, muitas vezes, tem sua atividade profundamente alterada (KULAWIEC, OWENS, *et al.*, 2009). Diante disto, o presente trabalho avaliou pela primeira vez a instabilidade do genoma mitocondrial em três tipos de tecidos em pacientes com CCR. A seguir estão descritas as principais conclusões do estudo:

1. Demostramos que a instabilidade do genoma mitocondrial aumenta durante a progressão do CCR. Descrevemos pela primeira vez a análise de instabilidade do genoma mitocondrial em três diferentes tecidos de um mesmo paciente com CCR: da margem normal, do adenoma e do adenocarcinoma;
2. As mutações do tipo *InDels* podem ser a principal causa da perda de função das mitocôndrias por ocorrerem principalmente nas regiões codificadoras;
3. Sugerimos que o gene TP53 pode ter um papel importante no aumento da instabilidade do genoma mitocondrial durante a progressão do CCR;
4. Inferimos que taxas de heteroplasmia elevadas (70%), como observada nas amostras de adenocarcinoma, podem dar à mitocôndria um papel importante na fisiopatologia do tumor. Além disso, considerando que a taxa média de heteroplasmia nas amostras de adenoma é de 50%, sugerimos que nesse caso o fenótipo mutante se manifesta de forma intermediária, em analogia a herança mendeliana do tipo codominante;
5. Sugerimos que taxa de patogenicidade das mutações pode ser usada como índice para medir o efeito da instabilidade genômica na fisiopatologia da célula tumoral;
6. Demonstramos que o número de cópias do genoma mitocondrial é inversamente proporcional à progressão do CCR e que essa diminuição ser causada por mutações na região D-loop, em especial, na sequência D310.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHANTA, G.; SASAKI, R.; FENG, L.; CAREW, J. S.; LU, W.; PELICANO, H., . . . HUANG, P. Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma. **EMBO J**, v. 24, n. 19, p. 3482-92, Oct 5 2005.

ALVES-SILVA, J.; DA SILVA SANTOS, M.; GUIMARAES, P. E.; FERREIRA, A. C.; BANDELT, H. J.; PENA, S. D.; PRADO, V. F. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am J Hum Genet**, v. 67, n. 2, p. 444-61, Aug 2000.

ANDERSON, S.; BANKIER, A. T.; BARRELL, B. G.; DE BRUIJN, M. H.; COULSON, A. R.; DROUIN, J., . . . YOUNG, I. G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v. 290, n. 5806, p. 457-65, Apr 9 1981.

ANDREU, A. L.; BRUNO, C.; SHANSKE, S.; SHTILBANS, A.; HIRANO, M.; KRISHNA, S., . . . DIMAURO, S. Missense mutation in the mtDNA cytochrome b gene in a patient with myopathy. **Neurology**, v. 51, n. 5, p. 1444-7, Nov 1998.

ATTARDI, G.; CHOMYN, A.; MONTOYA, J.; OJALA, D. Identification and mapping of human mitochondrial genes. **Cytogenet Cell Genet**, v. 32, n. 1-4, p. 85-98, 1982.

ATTARDI, G.; MONTOYA, J. Analysis of human mitochondrial RNA. **Methods Enzymol**, v. 97, p. 435-69, 1983.

BAMSHAD, M.; WOODING, S.; SALISBURY, B. A.; STEPHENS, J. C. Deconstructing the relationship between genetics and race. **Nat Rev Genet**, v. 5, n. 8, p. 598-609, Aug 2004.

BEHAR, D. M.; VILLEMS, R.; SOODYALL, H.; BLUE-SMITH, J.; PEREIRA, L.; METSPALU, E., . . . ROSSET, S. The dawn of human matrilineal diversity. **Am J Hum Genet**, v. 82, n. 5, p. 1130-40, May 2008.

BELL, E. L.; EMERLING, B. M.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial regulation of oxygen sensing. **Mitochondrion**, v. 5, n. 5, p. 322-32, Oct 2005.

BENSAAD, K.; TSURUTA, A.; SELAK, M. A.; VIDAL, M. N.; NAKANO, K.; BARTRONS, R., . . . VOUSDEN, K. H. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. **Cell**, v. 126, n. 1, p. 107-20, Jul 14 2006.

BERTOUT, J. A.; PATEL, S. A.; SIMON, M. C. The impact of O₂ availability on human cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 12, p. 967-75, Dec 2008.

BIANCHI, N. O.; BIANCHI, M. S.; RICHARD, S. M. Mitochondrial genome instability in human cancers. **Mutat Res**, v. 488, n. 1, p. 9-23, Mar 2001.

BLOK, M. J.; SPRUIJT, L.; DE COO, I. F.; SCHOONDERWOERD, K.; HENDRICKX, A.; SMEETS, H. J. Mutations in the ND5 subunit of complex I of the mitochondrial DNA are a frequent cause of oxidative phosphorylation disease. **J Med Genet**, v. 44, n. 4, p. e74, Apr 2007.

BOGENHAGEN, D. F. Repair of mtDNA in vertebrates. **Am J Hum Genet**, v. 64, n. 5, p. 1276-81, May 1999.

BOLAND, C. R.; SATO, J.; APPELMAN, H. D.; BRESALIER, R. S.; FEINBERG, A. P. Microallelotyping defines the sequence and tempo of allelic losses at tumour suppressor gene loci during colorectal cancer progression. **Nat Med**, v. 1, n. 9, p. 902-9, Sep 1995.

BOS, J. L. ras oncogenes in human cancer: a review. **Cancer Res**, v. 49, n. 17, p. 4682-9, Sep 1 1989.

CADET, J.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; RAVANAT, J. L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. **Mutat Res**, v. 531, n. 1-2, p. 5-23, Oct 29 2003.

CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85-95, Feb 2011.

CAREW, J. S.; HUANG, P. Mitochondrial defects in cancer. **Mol Cancer**, v. 1, p. 9, Dec 9 2002.

CARON DE FROMENTEL, C.; SOUSSI, T. TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 4, n. 1, p. 1-15, Jan 1992.

CENTER, M. M.; JEMAL, A.; WARD, E. International trends in colorectal cancer incidence rates. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 18, n. 6, p. 1688-94, Jun 2009.

CHANDRA, D.; SINGH, K. K. Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1807, n. 6, p. 620-5, Jun 2011.

CHANG, S. C.; LIN, P. C.; YANG, S. H.; WANG, H. S.; LIANG, W. Y.; LIN, J. K. Mitochondrial D-loop mutation is a common event in colorectal cancers with p53 mutations. **Int J Colorectal Dis**, v. 24, n. 6, p. 623-8, Jun 2009.

CHATTERJEE, A.; MAMBO, E.; SIDRANSKY, D. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4663-74, Aug 7 2006.

CHEN, D.; YU, Z.; ZHU, Z.; LOPEZ, C. D. The p53 pathway promotes efficient mitochondrial DNA base excision repair in colorectal cancer cells. **Cancer Res**, v. 66, n. 7, p. 3485-94, Apr 1 2006.

CLAYTON, D. A. Replication of animal mitochondrial DNA. **Cell**, v. 28, n. 4, p. 693-705, Apr 1982.

CLAYTON, D. A. Transcription of the mammalian mitochondrial genome. **Annu Rev Biochem**, v. 53, p. 573-94, 1984.

CUNNINGHAM, D.; ATKIN, W.; LENZ, H. J.; LYNCH, H. T.; MINSKY, B.; NORDLINGER, B.; STARLING, N. Colorectal cancer. **Lancet**, v. 375, n. 9719, p. 1030-47, Mar 20 2010.

DAKUBO, G. D.; JAKUPCIAK, J. P.; BIRCH-MACHIN, M. A.; PARR, R. L. Clinical implications and utility of field cancerization. **Cancer Cell Int**, v. 7, p. 2, 2007.

DANOVI, D.; CREMONA, C. A.; MACHADO-DA-SILVA, G.; BASU, S.; NOON, L. A.; PARRINELLO, S.; LLOYD, A. C. A genetic screen for anchorage-independent proliferation in mammalian cells identifies a membrane-bound neuregulin. **PLoS One**, v. 5, n. 7, p. e11774, 2010.

DAVIES, R. J.; MILLER, R.; COLEMAN, N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 3, p. 199-209, Mar 2005.

DE LA CHAPELLE, A. Genetic predisposition to colorectal cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 10, p. 769-80, Oct 2004.

DE SOUZA-PINTO, N. C.; HARRIS, C. C.; BOHR, V. A. p53 functions in the incorporation step in DNA base excision repair in mouse liver mitochondria. **Oncogene**, v. 23, n. 39, p. 6559-68, Aug 26 2004.

DEL BO, R.; BORDONI, A.; SCIACCO, M.; DI FONZO, A.; GALBIATI, S.; CRIMI, M., . . . COMI, G. P. Remarkable infidelity of polymerase gammaA associated with mutations in POLG1 exonuclease domain. **Neurology**, v. 61, n. 7, p. 903-8, Oct 14 2003.

ERICSON, N. G.; KULAWIEC, M.; VERMULST, M.; SHEAHAN, K.; O'SULLIVAN, J.; SALK, J. J.; BIELAS, J. H. Decreased mitochondrial DNA mutagenesis in human colorectal cancer. **PLoS Genet**, v. 8, n. 6, p. e1002689, 2012.

FAZELI, A.; DICKINSON, S. L.; HERMISTON, M. L.; TIGHE, R. V.; STEEN, R. G.; SMALL, C. G., . . . WEINBERG, R. A. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. **Nature**, v. 386, n. 6627, p. 796-804, Apr 24 1997.

FEARON, E. R.; CHO, K. R.; NIGRO, J. M.; KERN, S. E.; SIMONS, J. W.; RUPPERT, J. M., . . . ET AL. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. **Science**, v. 247, n. 4938, p. 49-56, Jan 5 1990.

FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, n. 5, p. 759-67, Jun 1 1990.

FENG, S.; XIONG, L.; JI, Z.; CHENG, W.; YANG, H. Correlation between increased copy number of mitochondrial DNA and clinicopathological stage in colorectal cancer. **Oncol Lett**, v. 2, n. 5, p. 899-903, Sep 1 2011.

GARRIDO, C.; GALLUZZI, L.; BRUNET, M.; PUIG, P. E.; DIDELOT, C.; KROEMER, G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. **Cell Death Differ**, v. 13, n. 9, p. 1423-33, Sep 2006.

GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 11, p. 891-9, Nov 2004.

GERALD, D.; BERRA, E.; FRAPART, Y. M.; CHAN, D. A.; GIACCIA, A. J.; MANSUY, D., . . . MECHTA-GRIGORIOU, F. JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. **Cell**, v. 118, n. 6, p. 781-94, Sep 17 2004.

GIANNONI, E.; BURICCHI, F.; RAUGEI, G.; RAMPONI, G.; CHIARUGI, P. Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 15, p. 6391-403, Aug 2005.

GOELZ, S. E.; VOGELSTEIN, B.; HAMILTON, S. R.; FEINBERG, A. P. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. **Science**, v. 228, n. 4696, p. 187-90, Apr 12 1985.

GOTTLIEB, E.; TOMLINSON, I. P. Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 11, p. 857-66, Nov 2005.

GULENG, G.; LOVIG, T.; MELING, G. I.; ANDERSEN, S. N.; ROGNUM, T. O. Mitochondrial microsatellite instability in colorectal carcinomas--frequency and association with nuclear microsatellite instability. **Cancer Lett**, v. 219, n. 1, p. 97-103, Feb 28 2005.

HAMANAKA, R. B.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. **Curr Opin Cell Biol**, v. 21, n. 6, p. 894-9, Dec 2009.

HAYASHI, J.; OHTA, S.; KIKUCHI, A.; TAKEMITSU, M.; GOTO, Y.; NONAKA, I. Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 23, p. 10614-8, Dec 1 1991.

HAYNE, D.; BROWN, R. S.; MCCORMACK, M.; QUINN, M. J.; PAYNE, H. A.; BABB, P. Current trends in colorectal cancer: site, incidence, mortality and survival in England and Wales. **Clin Oncol (R Coll Radiol)**, v. 13, n. 6, p. 448-52, 2001.

HE, Y.; WU, J.; DRESSMAN, D. C.; IACOBUZIO-DONAHUE, C.; MARKOWITZ, S. D.; VELCULESCU, V. E., . . . PAPADOPOULOS, N. Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 610-4, Mar 25 2010.

HELDIN, C. H.; MIYAZONO, K.; TEN DIJKE, P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. **Nature**, v. 390, n. 6659, p. 465-71, Dec 4 1997.

HOFF, G. Colorectal polyps. Clinical implications: screening and cancer prevention. **Scand J Gastroenterol**, v. 22, n. 7, p. 769-75, Sep 1987.

HOPPELER, H.; VOGT, M.; WEIBEL, E. R.; FLUCK, M. Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia. **Exp Physiol**, v. 88, n. 1, p. 109-19, Jan 2003.

HOWLADER, N.; NOONE, A.; KRAPCHO, M.; NEYMAN, N., .; AMINOU, R.; WALDRON, W., . . . CRONIN, K. SEER Cancer Statistics Review. **National Cancer Institute**, 2012.

HUANG, D. P.; NG, M. H.; LO, K. W.; LEE, J. C. Molecular basis of cancer. **Hong Kong Med J**, v. 3, n. 2, p. 186-194, Jun 1997.

HUANG, T. Next generation sequencing to characterize mitochondrial genomic DNA heteroplasmy. **Curr Protoc Hum Genet**, v. Chapter 19, p. Unit19 8, Oct 2011.

IBGE. **Pesquisas de orçamentos familiares 2008-2009**. 2010.

INCA. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. 2013.

IOMMARINI, L.; CALVARUSO, M. A.; KURELAC, I.; GASPARRE, G.; PORCELLI, A. M. Complex I impairment in mitochondrial diseases and cancer: parallel roads leading to different outcomes. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 45, n. 1, p. 47-63, Jan 2013.

IRWIN, J. A.; SAUNIER, J. L.; NIEDERSTATTER, H.; STROUSS, K. M.; STURK, K. A.; DIEGOLI, T. M., . . . PARSONS, T. J. Investigation of heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region: a synthesis of observations from more than 5000 global population samples. **J Mol Evol**, v. 68, n. 5, p. 516-27, May 2009.

ISHIKAWA, K.; HAYASHI, J. A novel function of mtDNA: its involvement in metastasis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1201, p. 40-3, Jul 2010.

ISHIKAWA, K.; KOSHIKAWA, N.; TAKENAGA, K.; NAKADA, K.; HAYASHI, J. Reversible regulation of metastasis by ROS-generating mtDNA mutations. **Mitochondrion**, v. 8, n. 4, p. 339-44, Sep 2008.

ISHIKAWA, K.; TAKENAGA, K.; AKIMOTO, M.; KOSHIKAWA, N.; YAMAGUCHI, A.; IMANISHI, H., . . . HAYASHI, J. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. **Science**, v. 320, n. 5876, p. 661-4, May 2 2008.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 61, n. 2, p. 69-90, Mar-Apr 2011.

JIANG, P.; DU, W.; WANG, X.; MANCUSO, A.; GAO, X.; WU, M.; YANG, X. p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Nat Cell Biol**, v. 13, n. 3, p. 310-6, Mar 2011.

JORGENSEN, O. D.; KRONBORG, O.; FENGER, C. The Funen Adenoma Follow-Up Study. Characteristics of patients and initial adenomas in relation to severe dysplasia. **Scand J Gastroenterol**, v. 28, n. 3, p. 239-43, Mar 1993.

KING, A.; SELAK, M. A.; GOTTLIEB, E. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4675-82, Aug 7 2006.

KLOSS-BRANDSTATTER, A.; PACHER, D.; SCHONHERR, S.; WEISSENSTEINER, H.; BINNA, R.; SPECHT, G.; KRONENBERG, F. HaploGrep: a fast and reliable algorithm for automatic classification of mitochondrial DNA haplogroups. **Hum Mutat**, v. 32, n. 1, p. 25-32, Jan 2011.

KULAWIEC, M.; AYYASAMY, V.; SINGH, K. K. p53 regulates mtDNA copy number and mitochekpoint pathway. **J Carcinog**, v. 8, p. 8, 2009.

KULAWIEC, M.; OWENS, K. M.; SINGH, K. K. Cancer cell mitochondria confer apoptosis resistance and promote metastasis. **Cancer Biol Ther**, v. 8, n. 14, p. 1378-85, Jul 2009.

LANE, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. **Nature**, v. 358, n. 6381, p. 15-6, Jul 2 1992.

LARMAN, T. C.; DEPALMA, S. R.; HADJIPANAYIS, A. G.; PROTOPOPOV, A.; ZHANG, J.; GABRIEL, S. B., . . . SEIDMAN, J. G. Spectrum of somatic mitochondrial mutations in five cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 35, p. 14087-91, Aug 28 2012.

LEBEDEVA, M. A.; EATON, J. S.; SHADEL, G. S. Loss of p53 causes mitochondrial DNA depletion and altered mitochondrial reactive oxygen species homeostasis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1787, n. 5, p. 328-34, May 2009.

LEGRAS, A.; LIEVRE, A.; BONAÏTI-PELLIE, C.; COTTET, V.; PARIENTE, A.; NALET, B., . . . LAURENT-PUIG, P. Mitochondrial D310 mutations in colorectal adenomas: an early but not causative genetic event during colorectal carcinogenesis. **Int J Cancer**, v. 122, n. 10, p. 2242-8, May 15 2008.

LENGAUER, C.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature**, v. 396, n. 6712, p. 643-9, Dec 17 1998.

LESLIE, A.; CAREY, F. A.; PRATT, N. R.; STEELE, R. J. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. **Br J Surg**, v. 89, n. 7, p. 845-60, Jul 2002.

LI, B.; KRISHNAN, V. G.; MORT, M. E.; XIN, F.; KAMATI, K. K.; COOPER, D. N., . . . RADIVOJAC, P. Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. **Bioinformatics**, v. 25, n. 21, p. 2744-50, Nov 1 2009.

LIEVRE, A.; CHAPUSOT, C.; BOUVIER, A. M.; ZINZINDOHOUE, F.; PIARD, F.; ROIGNOT, P., . . . LAURENT-PUIG, P. Clinical value of mitochondrial mutations in colorectal cancer. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 15, p. 3517-25, May 20 2005.

MATHUPALA, S. P.; HEESE, C.; PEDERSEN, P. L. Glucose catabolism in cancer cells. The type II hexokinase promoter contains functionally active response elements for the tumor suppressor p53. **J Biol Chem**, v. 272, n. 36, p. 22776-80, Sep 5 1997.

MATOKA, S.; KANG, J. G.; PATINO, W. D.; WRAGG, A.; BOEHM, M.; GAVRILOVA, O., . . . HWANG, P. M. p53 regulates mitochondrial respiration. **Science**, v. 312, n. 5780, p. 1650-3, Jun 16 2006.

MEHRABI, S.; AKWE, J. A.; ADAMS, G., JR.; GRIZZLE, W.; YAO, X.; AIKHIONBARE, F. O. Analysis of mtDNA sequence variants in colorectal adenomatous polyps. **Diagn Pathol**, v. 5, p. 66, 2010.

MODICA-NAPOLITANO, J. S.; KULAWIEC, M.; SINGH, K. K. Mitochondria and human cancer. **Curr Mol Med**, v. 7, n. 1, p. 121-31, Feb 2007.

MORENO-SANCHEZ, R.; RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S.; MARIN-HERNANDEZ, A.; SAAVEDRA, E. Energy metabolism in tumor cells. **FEBS J**, v. 274, n. 6, p. 1393-418, Mar 2007.

NAINI, A. B.; LU, J.; KAUFMANN, P.; BERNSTEIN, R. A.; MANCUSO, M.; BONILLA, E., . . . DIMAURO, S. Novel mitochondrial DNA ND5 mutation in a patient with clinical features of MELAS and MERRF. **Arch Neurol**, v. 62, n. 3, p. 473-6, Mar 2005.

NECKELMANN, N.; LI, K.; WADE, R. P.; SHUSTER, R.; WALLACE, D. C. cDNA sequence of a human skeletal muscle ADP/ATP translocator: lack of a leader peptide, divergence from a fibroblast translocator cDNA, and coevolution with mitochondrial DNA genes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 21, p. 7580-4, Nov 1987.

OZAWA, T. Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1271, n. 1, p. 177-89, May 24 1995.

PATTEN, D. A.; LAFLEUR, V. N.; ROBITAILLE, G. A.; CHAN, D. A.; GIACCIA, A. J.; RICHARD, D. E. Hypoxia-inducible factor-1 activation in nonhypoxic conditions: the essential role of mitochondrial-derived reactive oxygen species. **Mol Biol Cell**, v. 21, n. 18, p. 3247-57, Sep 15 2010.

PEREIRA, L.; SOARES, P.; MAXIMO, V.; SAMUELS, D. C. Somatic mitochondrial DNA mutations in cancer escape purifying selection and high pathogenicity mutations lead to the oncocytic phenotype: pathogenicity analysis of reported somatic mtDNA mutations in tumors. **BMC Cancer**, v. 12, p. 53, 2012.

PIETKA, G.; KUKWA, W.; BARTNIK, E.; SCINSKA, A.; CZARNECKA, A. M. [Mitochondrial DNA mutations in the pathogenesis in the head and neck squamous cell carcinoma]. **Otolaryngol Pol**, v. 62, n. 2, p. 158-64, 2008.

PLAK, K.; KUKWA, W.; BARTNIK, E.; GOLIK, P.; SCINSKA, A.; KRAWCZYK, T.; CZARNECKA, A. M. [The impact of mtDNA mutations on proteins structure in selected types of cancer]. **Postepy Biochem**, v. 54, n. 2, p. 151-60, 2008.

POLYAK, K.; LI, Y.; ZHU, H.; LENGAUER, C.; WILLSON, J. K.; MARKOWITZ, S. D., . . . VOGELSTEIN, B. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. **Nat Genet**, v. 20, n. 3, p. 291-3, Nov 1998.

PORCELLI, A. M.; GHELLI, A.; CECCARELLI, C.; LANG, M.; CENACCHI, G.; CAPRISTO, M., . . . GASPARRE, G. The genetic and metabolic signature of oncocyctic transformation implicates HIF1alpha destabilization. **Hum Mol Genet**, v. 19, n. 6, p. 1019-32, Mar 15 2010.

POYTON, R. O.; MCEWEN, J. E. Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. **Annu Rev Biochem**, v. 65, p. 563-607, 1996.

RACKER, E. History of the Pasteur effect and its pathobiology. **Mol Cell Biochem**, v. 5, n. 1-2, p. 17-23, Nov 15 1974.

RAHIMI, N. The ubiquitin-proteasome system meets angiogenesis. **Mol Cancer Ther**, v. 11, n. 3, p. 538-48, Mar 2012.

RALPH, S. J.; RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S.; NEUZIL, J.; SAAVEDRA, E.; MORENO-SANCHEZ, R. The causes of cancer revisited: "mitochondrial malignancy" and ROS-induced oncogenic transformation - why mitochondria are targets for cancer therapy. **Mol Aspects Med**, v. 31, n. 2, p. 145-70, Apr 2010.

RAMSEY, M. R.; SHARPLESS, N. E. ROS as a tumour suppressor? **Nat Cell Biol**, v. 8, n. 11, p. 1213-5, Nov 2006.

RANDO, J. C.; PINTO, F.; GONZALEZ, A. M.; HERNANDEZ, M.; LARRUGA, J. M.; CABRERA, V. M.; BANDELT, H. J. Mitochondrial DNA analysis of northwest African populations reveals genetic exchanges with European, near-eastern, and sub-Saharan populations. **Ann Hum Genet**, v. 62, n. Pt 6, p. 531-50, Nov 1998.

SCHOEN, R. E.; PINSKY, P. F.; WEISSFELD, J. L.; YOKOCHI, L. A.; CHURCH, T.; LAIYEMO, A. O., . . . BERG, C. D. Colorectal-cancer incidence and mortality with screening flexible sigmoidoscopy. **N Engl J Med**, v. 366, n. 25, p. 2345-57, Jun 21 2012.

SCHON, E. A.; DIMAURO, S.; HIRANO, M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. **Nat Rev Genet**, v. 13, n. 12, p. 878-90, Dec 2012.

SCHULZE, A.; HARRIS, A. L. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. **Nature**, v. 491, n. 7424, p. 364-73, Nov 15 2012.

SELAKE, M. A.; ARMOUR, S. M.; MACKENZIE, E. D.; BOULAHBEL, H.; WATSON, D. G.; MANSFIELD, K. D., . . . GOTTLIEB, E. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. **Cancer Cell**, v. 7, n. 1, p. 77-85, Jan 2005.

SEMENZA, G. L. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. **Curr Opin Genet Dev**, v. 20, n. 1, p. 51-6, Feb 2010.

SEMENZA, G. L.; ARTEMOV, D.; BEDI, A.; BHUJWALLA, Z.; CHILES, K.; FELDSER, D., . . . ZHONG, H. 'The metabolism of tumours': 70 years later. **Novartis Found Symp**, v. 240, p. 251-60; discussion 260-4, 2001.

SEOANE, M.; MOSQUERA-MIGUEL, A.; GONZALEZ, T.; FRAGA, M.; SALAS, A.; COSTOYA, J. A. The mitochondrial genome is a "genetic sanctuary" during the oncogenic process. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23327, 2011.

SHADEL, G. S. Expression and maintenance of mitochondrial DNA: new insights into human disease pathology. **Am J Pathol**, v. 172, n. 6, p. 1445-56, Jun 2008.

SHOFFNER, J. M.; WALLACE, D. C. Mitochondrial genetics: principles and practice. **Am J Hum Genet**, v. 51, n. 6, p. 1179-86, Dec 1992.

SIMONETTI, S.; CHEN, X.; DIMAURO, S.; SCHON, E. A. Accumulation of deletions in human mitochondrial DNA during normal aging: analysis by quantitative PCR. **Biochim Biophys Acta**, v. 1180, n. 2, p. 113-22, Dec 10 1992.

SINGH, K. K.; RUSSELL, J.; SIGALA, B.; ZHANG, Y.; WILLIAMS, J.; KESHAV, K. F. Mitochondrial DNA determines the cellular response to cancer therapeutic agents. **Oncogene**, v. 18, n. 48, p. 6641-6, Nov 18 1999.

SKONIECZNA, K.; MALYARCHUK, B. A.; GRZYBOWSKI, T. The landscape of mitochondrial DNA variation in human colorectal cancer on the background of phylogenetic knowledge. **Biochim Biophys Acta**, v. 1825, n. 2, p. 153-9, Apr 2012.

SMIRAGLIA, D. J.; KULAWIEC, M.; BISTULFI, G. L.; GUPTA, S. G.; SINGH, K. K. A novel role for mitochondria in regulating epigenetic modification in the nucleus. **Cancer Biol Ther**, v. 7, n. 8, p. 1182-90, Aug 2008.

STOTHARD, P.; WISHART, D. S. Circular genome visualization and exploration using CGView. **Bioinformatics**, v. 21, n. 4, p. 537-9, Feb 15 2005.

TAANMAN, J. W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. **Biochim Biophys Acta**, v. 1410, n. 2, p. 103-23, Feb 9 1999.

TANNAPFEL, A.; NEID, M.; AUST, D.; BARETTON, G. The origins of colorectal carcinoma: specific nomenclature for different pathways and precursor lesions. **Dtsch Arztebl Int**, v. 107, n. 43, p. 760-6, Oct 2010.

TAYLOR, R. W.; TAYLOR, G. A.; DURHAM, S. E.; TURNBULL, D. M. The determination of complete human mitochondrial DNA sequences in single cells: implications for the study of somatic mitochondrial DNA point mutations. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 15, p. E74-4, Aug 1 2001.

TROUNCE, I.; BYRNE, E.; MARZUKI, S. Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing. **Lancet**, v. 1, n. 8639, p. 637-9, Mar 25 1989.

VAN OVEN, M.; KAYSER, M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. **Hum Mutat**, v. 30, n. 2, p. E386-94, Feb 2009.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029-33, May 22 2009.

VENEGAS, V.; WANG, J.; DIMMOCK, D.; WONG, L. J. Real-time quantitative PCR analysis of mitochondrial DNA content. **Curr Protoc Hum Genet**, v. Chapter 19, p. Unit 19 7, Jan 2011.

WALLACE, D. C. Structure and evolution of organelle genomes. **Microbiol Rev**, v. 46, n. 2, p. 208-40, Jun 1982.

WALLACE, D. C. Mitochondrial DNA mutations in diseases of energy metabolism. **J Bioenerg Biomembr**, v. 26, n. 3, p. 241-50, Jun 1994.

WALLACE, D. C. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. **Annu Rev Biochem**, v. 76, p. 781-821, 2007.

WALLACE, D. C.; SHOFFNER, J. M.; WATTS, R. L.; JUNCOS, J. L.; TORRONI, A. Mitochondrial oxidative phosphorylation defects in Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v. 32, n. 1, p. 113-4, Jul 1992.

WALLACE, D. C.; STUGARD, C.; MURDOCK, D.; SCHURR, T.; BROWN, M. D. Ancient mtDNA sequences in the human nuclear genome: a potential source of errors in identifying pathogenic mutations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 26, p. 14900-5, Dec 23 1997.

WANG, C. Y.; LI, H.; HAO, X. D.; LIU, J.; WANG, J. X.; WANG, W. Z., . . . ZHANG, Y. P. Uncovering the profile of somatic mtDNA mutations in Chinese colorectal cancer patients. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e21613, 2011.

WANROOIJ, S.; LUOMA, P.; VAN GOETHEM, G.; VAN BROECKHOVEN, C.; SUOMALAINEN, A.; SPELBRINK, J. N. Twinkle and POLG defects enhance age-dependent accumulation of mutations in the control region of mtDNA. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. 10, p. 3053-64, 2004.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309-14, Feb 24 1956.

WEBB, E.; BRODERICK, P.; CHANDLER, I.; LUBBE, S.; PENEGAR, S.; TOMLINSON, I. P.; HOULSTON, R. S. Comprehensive analysis of common mitochondrial DNA variants and colorectal cancer risk. **Br J Cancer**, v. 99, n. 12, p. 2088-93, Dec 16 2008.

YU, M. Generation, function and diagnostic value of mitochondrial DNA copy number alterations in human cancers. **Life Sci**, v. 89, n. 3-4, p. 65-71, Jul 18 2011.

YU, M.; SHI, Y.; WEI, X.; YANG, Y.; ZANG, F.; NIU, R. Mitochondrial DNA depletion promotes impaired oxidative status and adaptive resistance to apoptosis in T47D breast cancer cells. **Eur J Cancer Prev**, v. 18, n. 6, p. 445-57, Nov 2009.

YU, M.; WAN, Y.; ZOU, Q. Decreased copy number of mitochondrial DNA in Ewing's sarcoma. **Clin Chim Acta**, v. 411, n. 9-10, p. 679-83, May 2 2010.

ZEVIANI, M.; TIRANTI, V.; PIANTADOSI, C. Mitochondrial disorders. **Medicine (Baltimore)**, v. 77, n. 1, p. 59-72, Jan 1998.

ZHANG, C.; HUANG, V. H.; SIMON, M.; SHARMA, L. K.; FAN, W.; HAAS, R., . . . HUANG, T. Heteroplasmic mutations of the mitochondrial genome cause paradoxical effects on mitochondrial functions. **FASEB J**, v. 26, n. 12, p. 4914-24, Dec 2012.

ZHOU, S.; KACHHAP, S.; SUN, W.; WU, G.; CHUANG, A.; POETA, L., . . . CALIFANO, J. A. Frequency and phenotypic implications of mitochondrial DNA mutations in human squamous cell cancers of the head and neck. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 18, p. 7540-5, May 1 2007.

Apêndices

Apêndice A. *Primers* para segunda etapa de amplificação.

Fragmento	Sequencia dos <i>primers</i>	Tamanho (pb)
1	F: CACACACACCGCTGCTAAC R: GATATGAAGCACCGCCAGG	675
2	F: GAACACTACGAGCCACAGC R: TCATCTTTCCCTTGCGGTAC	664
3	F: AATTGAAACCTGGCGCAATAG R: TGAGCATGCCTGTGTTGGG	689
4	F: ACCAACAAGTCATTATTACCC R: TGAAGTCAGATCACGTAGGAC	680
5	F: GGATCAGGACATCCCGATG R: AACGGCTAGGCTAGAGGTG	651
6	F: TAGCTCTCACCATCGCTC R: GATTGTAATGGGTATGGAGAC	704
7	F: TCCTACCACTCACCTAGC R: GTCATGTGAGAAGAAGCA	686
8	F: CACCCCTCTGACATCCGG R: AGTATTGCAACTTACTGAGG	739
9	F: AATACAGACCAAGAGCCTTC R: GGGAAACGCCATATCGGG	663
10	F: TACCCATCATAATCGGAGGC R: AATATATGGTGTGCTCACACG	667
11	F: CTATGATATCAATTGGCTTCC R: GGCATCCATATAGTCACTCC	669
12	F: CCTAATAGTAGAAGAACCCTC R: CTCGATTGTCAACGTCAAGG	661
13	F: ATTATTCCTAGAACCAGGCG R: TGATGAGATATTTGGAGGTGG	682
14	F: ACAATCCTAGGCCTACCCG R: GATAGGCATGTGATTGGTGG	669
15	F: AGCCTCTACCTGCACGAC R: GGATGAAGCAGATAGTGAGG	687
16	F: ACTTCACGTCATTATTGGCTC R: AGTGAGATGGTAAATGCTAG	696
17	F: ACAATCATGGCAAGCCAACG R: TTATGAGAATGACTGCGCCG	639

Continua.

Apêndice A. *Primers* para segunda etapa de amplificação.

Continuação.

18	F: AGCCACATAGCCCTCGTAG R: TGGTTATAGTAGTGTGCATGG	724
19	F: CTGAACCGAATTGGTATATAG R: TCGTGATAGTGGTTCACCTGG	729
20	F: CTATCCATTGGTCTTAGGC R: TTTGCCTGCTGCTGCTAGG	722
21	F: CGCTAATCCAAGCCTCACC R: TATTCGAGTGCTATAGGCGC	664
22	F: TTA CTCTCATCGCTACCTCC R: GGTTGATTCTGGGAGGATCC	709
23	F: CCCATAATCATACAAAGCCC R: GTTGAGGCGTCTGGTGAG	702
24	F: ACTACAAGAACACCAATGACC R: TGTA GTAAGGGTGGAAGGTG	688
25	F: TAGGAATCACCTCCCATTCC R: GTCAATACTTGGGTGGTACC	696
26	F: AATGGGCCTGTCCTTGTAG R: AACGTGTGGGCTATTTAGGC	667
27	F: CGACATCTGGTTCCTACTTC R: CTGGTTAGGCTGGTGTTAGG	446
28	F: CGCTTCTGGCCACAGCAC R: GGTGTGGCTAGGCTAAGC	489

Apêndice B. Tabela com mutações identificadas.

Gene	Posição	Troca de nucleotídeo	Troca de AA	Ploidia
D-loop	59	T>C	RNC	HM
D-loop	64	C>T	RNC	HM
D-loop	66	G>T	RNC	HT
D-loop	72	T>C	RNC	HM
D-loop	73	A>G	RNC	HM
D-loop	125	T>C	RNC	HM
D-loop	127	T>C	RNC	HM
D-loop	128	C>T	RNC	HM
D-loop	143	G>A	RNC	HM
D-loop	146	T>C	RNC	HM
D-loop	150	C>A	RNC	HM
D-loop	152	T>C	RNC	HM
D-loop	153	A>G	RNC	HM
D-loop	194	C>T	RNC	HM
D-loop	195	T>C	RNC	HM
D-loop	210	A>G	RNC	HM
D-loop	207	G>A	RNC	HM
D-loop	228	G>A	RNC	HM
D-loop	235	A>G	RNC	HM
D-loop	247	DEL	RNC	HM
D-loop	263	A>G	RNC	HM
D-loop	285	C>T	RNC	HM
D-loop	297	A>G	RNC	HM
D-loop	308	INS	Frameshift	HM
D-loop	309	INS	Frameshift	HM
D-loop	385	A>G	RNC	HM
D-loop	460	T>C	RNC	HM
D-loop	489	T>C	RNC	HM
D-loop	499	G>A	RNC	HM
D-loop	501	C>T	RNC	HM
D-loop	567	INS	Frameshift	HM
tRNA	663	A>G	RNC	HM
tRNA	750	A>G	RNC	HM
tRNA	756	C>T	RNC	HM
tRNA	769	G>A	RNC	HM
tRNA	827	A>G	RNC	HM
tRNA	1007	G>C	RNC	HT
tRNA	1018	G>A	RNC	HM
tRNA	1438	A>G	RNC	HM
tRNA	1736	A>G	RNC	HM

Continua.

Apêndice B. Tabela com mutações identificadas.

Continuação

tRNA	2065	A>G	RNC	HT
tRNA	2092	C>T	RNC	HM
tRNA	2128	G>A	RNC	HT
tRNA	2218	C>T	RNC	HM
tRNA	2332	C>A	RNC	HT
tRNA	2313	A>G	RNC	HT
tRNA	2416	T>C	RNC	HM
tRNA	2535	A>G	RNC	HT
tRNA	2571	G>A	RNC	HT
tRNA	2706	A>G	RNC	HM
tRNA	2789	C>T	RNC	HT
tRNA	3105	DEL	Frameshift	HM
tRNA	3107	DEL	RNC	HM
tRNA	3010	G>A	RNC	HM
tRNA	3105	DEL	Frameshift	HM
tRNA	3243	A>G	RNC	HT
ND1	3423	G>T	Sinônima	HM
ND1	3535	T>C	Sinônima	HM
ND1	3547	A>G	I >V	HM
ND1	3591	G>A	Sinônima	HM
ND1	3594	C>T	Sinônima	HM
ND1	3910	G>A	E202K	HM
ND1	3995	A>C	N230T	HM
ND1	4104	A>G	Sinônima	HM
ND1	4248	T>C	Sinônima	HT
tRNA	4314	DEL	Frameshift	HM
ND2	4715	A>G	Sinônima	HM
ND2	4769	A>G	Sinônima	HM
ND2	4793	A>G	Sinônima	HM
ND2	4820	G>A	Sinônima	HM
ND2	4824	A>G	T119A	HM
ND2	4831	G>A	G>D	HM
ND2	4868	A>G	Sinônima	HT
ND2	4883	C>T	Sinônima	HM
ND2	4977	T>A	Sinônima	HM
ND2	4977	T>C	Sinônima	HM
ND2	4985	G>A	Sinônima	HM
ND2	4991	G>A	Sinônima	HM
ND2	5147	G>A	RNC	HM
ND2	5178	C>A	L237M	HM
ND2	5249	T>C	Sinônima	HM
ND2	5480	A>G	Sinônima	HM

Continua

Apêndice B. Tabela com mutações identificadas.

Continuação.

tRNA	5669	G>A	RNC	HT
tRNA	5692	T>C	Sinônima	HT
tRNA	5768	G>A	Sinônima	HM
COX1	6026	G>A	Sinônima	HM
COX1	6095	A>G	Sinônima	HT
COX1	6473	C>T	Sinônima	HM
COX1	6779	A>G	Sinônima	HM
COX1	6816	INS	RNC	HM
COX1	6817	T>C	F>S	HM
COX1	7028	C>T	Sinônima	HM
COX1	7175	T>C	Sinônima	HM
COX1	7196	C>A	Sinônima	HM
COX1	7256	C>T	Sinônima	HM
COX1	7274	C>T	Sinônima	HM
tRNA	7521	G>A	RNC	HM
tRNA	7523	A>T	RNC	HM
tRNA	7581	T>C	Sinônima	HM
COX2	7697	G>A	V38A	HM
COX2	7771	A>G	Sinônima	HM
COX2	7910	G>A	E325K	HT
COX2	8027	G>A	A148T	HT
COX2	8206	G>A	Sinônima	HM
COX2	8222	T>C	Sinônima	HM
tRNA	8270	-10N	RNC	HT
tRNA	8281	-9N	RNC	HM
tRNA		C>G		HT
ATP8	8381	A>G	T6A	HM
ATP8	8414	C>T	L17F	HM
ATP6	8573	G>A	G87D	HM
ATP6	8584	G>A	A20T	HM
ATP6	8701	A>G	T59A	HM
ATP6	8860	A>G	T112A	HM
ATP6	8794	C>T	H90Y	HM
ATP6	8911	T>C	Sinônima	HT
COX3	9221	A>G	Sinônima	HM
COX3	9540	T>C	Sinônima	HM
COX3	9545	A>G	Sinônima	HT
COX3	9545	DEL	Frameshift	HT
COX3	9540	T>C	Sinônima	HM
COX3	9559	G>C	P118R	HM
COX3	9950	T>C	Sinônima	HM

Continua.

Apêndice B. Tabela com mutações identificadas.

Continuação

COX3	9973	T>C	I767T	HT
COX3	9698	T>C	Sinônima	HM
ND3	10115	T>C	Sinônima	HM
ND3	10398	A>G	T114A	HM
ND4	10400	C>T	Sinônima	HM
ND4	10406	G>A	Sinônima	HT
ND4	10570	A>T	E34K	HT
ND4	10873	T>C	Sinônima	HM
ND4	11150	G>A	A131T	HM
ND4	11177	C>T	P140S	HM
ND4	11260	T>C	Sinônima	HM
ND4	11335	T>C	Sinônima	HM
ND4	11435	G>A	A676T	HM
ND4	11651	G>A	V892M	HM
ND4	11719	G>A	Sinônima	HM
ND4	11914	G>A	Sinônima	HM
ND4	11944	T>C	Sinônima	HM
ND4	11992	T>C	Sinônima	HM
ND4	12007	G>A	Sinônima	HT
ND4	12308	A>G	Sinônima	HM
ND4	12372	G>A	Sinônima	HM
ND5	12618	G>A	Sinônima	HM
ND5	12667	G>A	D331N	HT
ND5	12693	A>G	Sinônima	HM
ND5	12705	C>T	Sinônima	HM
ND5	12773	G>A	G437D	HM
ND5	12843	T>C	Sinônima	HM
ND5	12879	T>C	Sinônima	HM
ND5	12880	T>C	F182L	HM
ND5	13042	G>A	A706T	HM
ND5	13104	A>G	Sinônima	HM
ND5	13153	A>G	I817V	HT
ND5	13263	A>G	Sinônima	HM
ND5	13422	A>G	Sinônima	HM
ND5	13590	G>C	Sinônima	HT
ND5	13593	A>G	Sinônima	HM
ND5	13597	G>A	G1261A	HM
ND5	13650	C>T	Sinônima	HM
ND5	13702	G>C	Sinônima	HM
ND5	13803	A>G	Sinônima	HM
ND5	13985	T>C	L1649P	HT

Continua

Apêndice B. Tabela com mutações identificadas

Continuação

ND5	14070	A>G	Sinônima	HM
ND5	14094	T>C	Sinônima	HM
ND5	14110	T>C	F592L	HT
ND6	14199	G>T	T>P	HM
ND6	14272	G>C	L>F	HM
ND6	14318	T>C	N356S	HM
ND6	14364	G>A	Sinônima	HM
ND6	14365	G>C	Sinônima	HM
ND6	14368	G>C	L>F	HM
ND6	14566	A>G	Sinônima	HM
ND6	14668	C>T	Sinônima	HM
CYB	14766	T>C	T7I	HM
CYB	14783	T>C	Sinônima	HM
CYB	14962	C>T	Sinônima	HM
CYB	14971	T>C	Sinônima	HT
CYB	15043	G>A	Sinônima	HM
CYB	15062	T>C	S316P	HT
CYB	15106	G>A	Sinônima	HM
CYB	15110	G>A	A122T	HM
CYB	15148	G>A	Sinônima	HM
CYB	15217	G>A	Sinônima	HM
CYB	15276	G>A	Sinônima	HT
CYB	15282	T>C	F536S	HT
CYB	15301	G>A	Sinônima	HM
CYB	15314	G>A	A190T	HM
CYB	15326	A>G	T194A	HM
CYB	15487	A>T	Sinônima	HM
CYB	15535	A>G	Sinônima	HM
CYB	15628	A>G	Sinônima	HM
CYB	15762	G>A	G1016E	HT
CYB	15784	T>C	Sinônima	HM
CYB	15843	T>C	M1097T	HT
D-loop	15826	A>G	RNC	HM
D-loop	15929	A>G	RNC	HM
D-loop	15930	G>A	RNC	HM
D-loop	15954	A>C	RNC	HM
D-loop	16051	A>G	RNC	HM
D-loop	16092	T>C	RNC	HM
D-loop	16093	T>C	RNC	HM
D-loop	16111	C<T	RNC	HM
D-loop	16126	T>C	RNC	HM
D-loop	16129	G>A	RNC	HM

Continua

Apêndice B. Tabela com mutações identificadas
Continuação

D-loop	16153	G>A	RNC	HM
D-loop	16169	C>T	RNC	HM
D-loop	16183	A>C	RNC	HM
D-loop	16189	T>C	RNC	HT
D-loop	16217	T>C	RNC	HM
D-loop	16223	C>T	RNC	HM
D-loop	16224	T>C	RNC	HM
D-loop	16234	C>T	RNC	HM
D-loop	16239	C>T	RNC	HM
D-loop	16243	T>C	RNC	HM
D-loop	16249	T>C	RNC	HM
D-loop	16278	C>T	RNC	HM
D-loop	16290	C>T	RNC	HM
D-loop	16292	C>T	RNC	HM
D-loop	16294	C>T	RNC	HM
D-loop	16298	T>C	RNC	HM
D-loop	16309	A>G	RNC	HM
D-loop	16311	T>C	RNC	HM
D-loop	16319	G>A	RNC	HM
D-loop	16325	T>C	RNC	HM
D-loop	16327	C>T	RNC	HM
D-loop	16355	C>T	RNC	HM
D-loop	16362	T>C	RNC	HM
D-loop	16390	G>A	RNC	HM
D-loop	16468	T>C	RNC	HT
D-loop	16518	GT>T	RNC	HT
D-loop	16519	T>C	RNC	HM

Anexos

ANEXO A. Aprovação do Comitê de ética em pesquisa.

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP - HCFMRP/USP

PROJETO DE PESQUISA

Título: Instabilidade do genoma mitocondrial em células tumorais

Área Temática:

Pesquisador: Luiza Ferreira de Araújo

Versão: 1

Instituição: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP - HCFMRP

CAAE: 05752412.0.0000.5440

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 72902

Data da Relatoria: 18/08/2012

Apresentação do Projeto:

A mitocôndria é uma organela citoplasmática de extrema importância responsável pela chamada respiração celular. Todo o sistema de produção energética da célula, a fosforilação oxidativa (OXPHOS), funciona na mitocôndria com o auxílio de diversas proteínas mitocondriais. A principal função da OXPHOS é transportar elétrons do NADH ou FADH2 para moléculas de oxigênio, gerando água como subproduto. O genoma mitocondrial possui uma alta taxa de mutação, provavelmente devido a sua proximidade com a membrana mitocondrial interna, onde espécies reativas de oxigênio (ROS) são gerados por sub-produtos da OXPHOS. Estudos sugerem que o sistema OXPHOS está severamente comprometido durante o câncer. Ainda, erros nesse sistema são descritos como um fenótipo comum, assim como o metabolismo de glicose alterado. Foi proposto que a up-regulação da glicólise durante condições normais de oxigênio, efeito Warburg, pode induzir defeitos na respiração mitocondrial e regular o fenótipo tumoral, como o potencial metastático, através da indução de vias pseudo-hipoxia durante a normóxia. Estudos recentes mostraram vários tumores contendo mutações somáticas no mtDNA que, provavelmente alteram o funcionamento da OXPHOS, levando a célula a aumentar a glicólise. Esse aumento energético, possivelmente, confere vantagens proliferativas, sendo um componente essencial do fenótipo maligno e um marcador de cânceres invasivos. Com isso, esse projeto busca analisar todo o genoma mitocondrial de tumores de adenocarcinoma colorretal e carcinoma de Cabeça e Pescoço, a fim de encontrar mutações que auxiliem a elucidar os mecanismos moleculares regulando as alterações mitocondriais no desenvolvimento tumoral.

Para o presente estudo serão utilizadas amostras de dez pacientes com adenocarcinoma colorretal e dez pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço, já coletadas e armazenadas em banco de amostras. As amostras de pacientes com adenocarcinoma colorretal encontram-se Banco de Tumores Proctológicos do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto (processo junto ao Comitê de Ética no 2374/2008). Já as amostras de carcinoma de cabeça e pescoço encontram-se no Banco de Amostras para pesquisas em marcadores moleculares no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (processo junto ao Comitê de ética no 9371/2003, aprovado em 15/03/2004).

Objetivo da Pesquisa:

O presente trabalho tem como principal objetivo analisar o genoma mitocondrial de tumores de adenocarcinoma colorretal e carcinoma de cabeça e pescoço, a fim de identificar mutações que expliquem o envolvimento da mitocôndria na tumorigênese.

Objetivo secundário:

Amplificação de todo o genoma mitocondrial de amostras tumorais e sanguíneas de indivíduos diagnosticados com adenocarcinoma colorretal e carcinoma de Cabeça e Pescoço,;

2. Sequenciamento dos amplicons para a busca por mutações.

3. Analisar e comparar os dados encontrados nos genomas mitocondriais do tumor e do sangue periférico dos pacientes, para associar se essas alterações estão ou não envolvidas com a formação ou progressão de tumores.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**Riscos:**

Uma vez que não serão feitas novas coletas para o presente estudo, pode-se afirmar que este não oferece nenhum risco.

Benefícios:

Como benefícios do presente estudo espera-se tentar esclarecer o papel das alterações genômicas mitocondriais no processo tumorigênico, através da procura por mutações específicas do tecido tumoral. A identificação de mutações específicas pode auxiliar na elucidação do mecanismo da tumorigênese que, uma vez esclarecidos, podem servir como base para novos estudos sobre prognósticos e tratamentos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo visa examinar a DNA mitocondrial de tumores em bancos de amostras. Não haverá interferência no tratamento de pacientes ou qualquer interação direto com pacientes. Há a possibilidade de benefícios relacionadas com um maior entendimento do papel de DNA mitocondrial no desenvolvimento de tumores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos adequados. Foi pedido dispensa do TCLE, que acho pertinente porque são tumores de pacientes que já assinaram TCLEs para uma pesquisa similar e que provavelmente seriam difíceis de contatar devido a gravidade do tipo de tumor. Estes tumores estão em bancos de amostras aprovados.

Recomendações:

Recomendo aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou sugestões.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

RIBEIRAO PRETO, 13 de Agosto de 2012

Assinado por:

Ricardo de Carvalho Cavalli