UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

LUIZA FERREIRA DE ARAÚJO

ESTUDO DO METABOLISMO ENERGÉTICO COM BASE NA
INSTABILIDADE DO GENOMA MITOCONDRIAL NO MELANOMA

Ribeirão Preto
2017

LUIZA FERREIRA DE ARAÚJO

Estudo do metabolismo energético com base na instabilidade do
genoma mitocondrial no melanoma

Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de doutor em
Ciências Biológicas (Genética)

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que
aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Ribeirão Preto

2017

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.

Estudo do metabolismo energético com base na instabilidade do genoma mitocondrial no melanoma.

Ribeirão Preto, 2017.

175f.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Genética

Orientador: Silva Jr, Wilson Araújo

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luiza Ferreira de Araújo

Estudo do metabolismo energético com base na instabilidade do
genoma mitocondrial no melanoma.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas (Genética)
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: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por toda a dedicação, amor e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior, meu orientador, agradeço pelo aprendizado e confiança depositados em mim durante toda a minha formação acadêmica. Sem dúvida, o prof. Wilson é um dos principais responsáveis pelo meu crescimento e amadurecimento profissional.

Aos meus pais pelo amor incondicional, carinho, apoio e compreensão. Todas as minhas conquistas devo a eles, que sempre me ensinaram que o céu é o limite.

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. E a minha prima querida Ana Lygia, por todo apoio e companheirismo de sempre.

Às minhas amigas da vida, Manoela, Marjory, Marília, Talita, Natália, Ana Rosa, Isa, Renata e Carol, que mesmo com a distância, tornam os dias mais fáceis. Obrigada pelo companheirismo, cumplicidade, apoio, incentivo e carinho de todos esses anos.

Aos amigos de laboratório, Bruna, Isabela, Ádamo, Simone, Dani, Diana, Andrés, Thaís, Jéssica e Anelisa pela convivência diária e, em especial, pela amizade, que vai muito além do laboratório. Um agradecimento especial a Greice, que além da amizade, foi também uma mentora durante toda a pós-graduação. Vocês tornaram todos os dias de trabalho mais leves! Serei eternamente grata aos meus amigos do baixo clero.

À Kamilla, Anemari e Adriana por todo o auxílio nas técnicas utilizadas e pela amizade durante esses anos.

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

À todos da Hemofamily, em especial Aline, Marcela, Everton, Luiza, Amanda e vários outros pela convivência e amizade ao longo desses anos.

Aos meus companheiros de Rep Lilian e Djalma, que além dividirem o teto, foram fundamentais e sempre estiveram presentes durante todo o meu período em Ribeirão Preto. Aos meus da vida Aline, Hudson e Igor, por todo o companheirismo e amizade de todos os anos. Um agradecimento especial para Milena e Patrícia, que embora já tenham deixado Ribeirão, estão sempre presentes de coração. A todos vocês, muito obrigada por serem a minha família ribeirão-pretana.

Aos meus companheiros de mestrado, doutorado e BEPE, Ildercilio Lima e Fernanda Bueno, por dividir comigo todos os momentos de diversão e angústia no decorrer dos cursos, compartilhando as emoções da pós-graduação.

Ao Prof. Dr. A. Phillip West e Dr. Laura West pela orientação e todo o aprendizado durante o período do Texas. Um agradecimento especial Abby Lei, minha companheira de laboratório no Texas.

Aos amigos “texanos” Maísa, Matheus, Beraba, Adrian, Johan, Chico e Allison pela convivência e amizade durante meu período no Texas.

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

À Dra. Enilza Espreafico pela co-orientação e Dra. Andréia Leopoldino por todo o auxílio dado durante o doutorado. Um agradecimento especial a Dra. Josane Freitas pelo apoio científico desde a qualificação.

Ao departamento de Genética e ao programa de pós-graduação em Genética pela oportunidade.

À Susie, secretária do departamento de genética, por todo o auxílio e disponibilidade durante toda a pós-graduação.

Agradeço à Fundação de apoio à pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelo fomento ao projeto de doutorado concluído (processo número 2013/25119-0) e ao estágio de pesquisa no exterior (2015/21940-7).

À CNPQ e à CAPES 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. **Estudo do metabolismo energético com base na instabilidade do genoma mitocondrial no melanoma**. 2017. 169f. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Estudos recentes relataram oncogenes induzindo a reprogramação metabólica no câncer. Essa reprogramação é fundamental para que as células cancerosas tenham nutrientes e biomoléculas suficiente para manter sua alta taxa proliferativa. A mitocôndria tem um papel central no metabolismo energético da célula e alterações no seu genoma, tanto em relação a mutações como em número de cópias, já foram bastante observados em vários tipos tumorais. Além disso, deficiência no fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), fundamental para a transcrição e estabilidade do mtDNA, já foi associada com o crescimento tumoral. Diante disso, nosso estudo teve como objetivo avaliar o papel da instabilidade do genoma mitocondrial no metabolismo energético e crescimento do melanoma. Para isso, nós medimos a instabilidade do mtDNA utilizando como parâmetros: o acúmulo de mutações no mtDNA, alterações no mtDNAcn e a expressão do TFAM. O impacto da instabilidade do mtDNA foi avaliado em três modelos diferentes de melanoma: um modelo *in vitro* de linhagens celulares, dados de expressão gênica de tumores de melanoma metastático proveniente do TCGA e um modelo murino induzível de melanoma (*Braf*^{V600E}/*Pten*^{null}), adicionado a um *background* alternativo de deficiência para o TFAM/mtDNAcn. Esse modelo murino também nos permitiu avaliar a deficiência do TFAM limitada a células tumorais (*Tfam*^{fllox}) e tanto em células tumorais, como no seu microambiente (*Tfam*^{+/-}). Nas análises *in vitro*, nós observamos correlações positivas entre o mtDNAcn e a expressão do TFAM com a taxa de consumo de glicose e produção de ATP, indicando um impacto desses parâmetros na bioenergética celular. Análises de expressão gênica, utilizando tanto as linhagens de melanoma como tumores de melanoma metastático, nos sugeriram que o TFAM regula genes indutores de angiogênese, a resposta imunológica humoral e vias metabólicas de aminoácidos. Nas análises *in vivo*, nós observamos um aumento dos tumores em camundongos *Tfam*^{+/-}, indicando que a deficiência de TFAM/mtDNAcn em células tumorais e no seu microambiente induz a tumorigênese, o que confirma os dados de expressão gênica encontrados com linhagens e tecido de melanoma. Além disso, análises de metabolômica e transcriptômica combinadas nos sugeriram que as células de melanoma com deficiência no TFAM/mtDNAcn são mais dependentes do metabolismo de glutamina. Diante disso, nós concluímos que a deficiência do TFAM/mtDNAcn tem um papel importante no crescimento do melanoma, induzindo a expressão de genes pro-tumorigênicos e aumentando o consumo da glutamina para suprir as necessidades proliferativas das células cancerosas. Esses dados são relevantes e podem nos ajudar a entender melhor o papel da mitocondrial na progressão do melanoma.

Palavras-chave: Genoma mitocondrial, Reprogramação metabólica, TFAM, Instabilidade, Melanoma.

ABSTRACT

ARAÚJO, LF. **Energetic metabolism analysis based on the instability of the mitochondrial genome in melanoma.** 2017. 169f. Doctoral thesis. Ribeirão Preto Medical School- University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Recent studies have shown many oncogenes triggering metabolic reprogramming in cancer. The metabolic switch in cancer cells is necessary to supply the high demand for nutrients and biomolecules for proliferative cells. In this context, mitochondria play a central role in the energetic metabolism of the cell and changes in its genome, such as an increased load of mutations and alterations in mtDNA content, have been reported in several cancers. In addition, deficiency in the Mitochondrial Transcription Factor A (TFAM), responsible for transcription and maintenance of mtDNA stability, was previously associated with tumor growth. Based on that, our goal was to evaluate the impact of the mitochondrial genome instability in the energetic metabolism and melanoma growth. mtDNA instability was inferred measuring mtDNA mutations load and content, as well as TFAM expression. Its impact was evaluated in three different melanoma models: an *in vitro* model using melanoma cell lines, gene expression data from metastatic melanoma tumors, publicly available at TCGA, and an inducible murine model of melanoma ($BRAF^{V600E}/PTEN^{null}$), crossed onto different TFAM-deficient backgrounds. The murine model also provides us a tractable model to examine the consequences of mtDNA instability limited to cancer cells ($Tfam^{fllox}$) and in both cancer cells and tumor microenvironment ($Tfam^{+/-}$). *In vitro* analysis showed us a positive correlation between mtDNA copy number (mtDNAcn) and TFAM expression with glucose consumption and ATP production, pointing an impact of these parameters in cellular bioenergetics. Further gene expression analysis, using both cell lines and metastatic melanoma data, suggested that TFAM could regulate the expression of angiogenesis genes, humoral immunity and amino acid metabolism. *In vivo* analysis confirmed the gene expression data, and revealed a higher melanoma growth in $Tfam^{+/-}$. Also, combined metabolomics and transcriptomics data suggested that TFAM/mtDNAcn deficient melanoma cells rely mostly on glutamine metabolism to supply their energetic requirements. In conclusion, these data indicate that TFAM/mtDNAcn influences melanoma growth by triggering pro-tumorigenic signals and inducing metabolic reprogramming towards glutamine metabolism. These results are relevant and might help us understand how mitochondria affect melanoma progression.

Keywords: Mitochondrial genome, Metabolic reprogramming, TFAM, Instability, Melanoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Progressão do melanoma.	17
Figura 2: Vias de sinalização MAPK no melanoma.	19
Figura 3: Bioenergética mitocondrial.	21
Figura 4: Oncogenes regulando o metabolismo celular.	23
Figura 5: Metabolismo da glutamina.	24
Figura 6: Genoma mitocondrial e a cadeia respiratória.	26
Figura 7: MtDNAcn em diferentes tipos tumorais.	27
Figura 8: Tfam e o empacotamento do mtDNA.	28
Figura 9: Linhagens de melanoma.	31
Figura 10: Modelo murino induzível de melanoma.	38
Figura 11: Estratégia experimental para avaliar as consequências da depleção do mtDNA no crescimento do melanoma.	39
Figura 12: Workflow da indução localizada do melanoma.	41
Figura 13: Qualidade do sequenciamento	44
Figura 14: Estatísticas do sequenciamento do genoma mitocondrial.	46
Figura 15: Circos plot representando o mtDNA.	47
Figura 16: Análise do número de mutações por fase do melanoma.	49
Figura 17: Análises do número de cópias do mtDNA nas fases do melanoma	49
Figura 18: Quantificação dos níveis de peróxido de hidrogênio nas linhagens de melanoma.	51
Figura 19: Quantificação dos níveis de ATP nas linhagens de melanoma.	53
Figura 20: Quantificação do consumo de Glicose nas linhagens de melanoma.	55
Figura 21: Quantificação da produção de Lactato nas linhagens de melanoma	55
Figura 22: Calculo da produção de lactato a partir da glicose.	56
Figura 23: Análises de correlação entre o número de mutações em genes metabólicos e com papel na biologia mitocondrial que são codificados no genoma nuclear.	59
Figura 24: Análises de correlação entre a expressão de TFAM nas linhagens de melanoma com mtDNAcn e os dados de bioenergética.	61

Figura 25: Correlação do mtDNAcn com o TFAM e sua expressão nas linhagens de melanoma.....	63
Figura 26: Análise de vias linhagens de melanoma.....	64
Figura 27: Expressão diferencial linhagens de melanoma.....	64
Figura 28: Vias metabólicas com enzimas alteradas nas análises com as linhagens de melanoma.....	67
Figura 29: Amostras de melanoma metastático proveniente do TCGA.....	68
Figura 30: Análises de via e de expressão diferencial em tumores de melanoma metastático.....	70
Figura 31: Análises de via e de expressão diferencial de enzimas metastáticas em tumores de melanoma metastático.....	72
Figura 32: Via de resposta ao estresse oxidativo	73
Figura 33: Via metabólica mostrando as principais enzimas diferencialmente expressas entre os grupos alto e baixo TFAM no melanoma metastático.....	73
Figura 34: Avaliação do crescimento tumoral.....	76
Figura 35: Expressões gênicas e proteicas do TFAM entre os grupos de camundongos.....	77
Figura 36: Correlações tamanho e massa tumoral com mtDNAcn.....	78
Figura 37: Controle de qualidade do RNA-seq dos tumores dos camundongos.....	80
Figura 38: Expressão diferencial dos tumores murinos.....	81
Figura 39: Volcano plot das análises pareadas entre os camundongos.....	82
Figura 40: Análise dos metabólitos diferencialmente expressos entre os grupos de camundongos com depleção no mtDNAcn/TFAM.....	84
Figura 41: Via metabólica da metionina mostrando os metabólitos diferencialmente abundantes entre os grupos de camundongos deficientes pra TFAM.....	85
Figura 42: Via metabólica da valina e da arginina com os metabólitos diferencialmente abundantes entre os grupos de camundongos deficientes pra TFAM.....	86
Figura 43: Via do metabolismo da glutamina.....	88
Figura 44: Integração das vias metabólicas que vimos alteradas nas análises com depleção no mtDNAcn/TFAM nas linhagens, tecidos de melanoma metastático e no modelo murinho de melanoma.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: <i>Primers</i> usados para a quantificação do número de cópias de mtDNA.	34
Tabela 2: Sequencia dos primers utilizados na genotipagem dos camundongos	40
Tabela 3: Sequência dos <i>primers</i> utilizados na qPCR	42
Tabela 4: Estatísticas do sequenciamento do exoma.....	45
Tabela 5: Integração dos dados de expressão gênica entre linhagens de melanoma e tumores de melanoma metastático	75
Tabela 6: Grupo de camundongos que foram analisados por metabolômica e transcriptômica	79
Tabela 7: Genes em comum up-regulados entre os camundongos com diferentes backgrounds de instabilidade no mtDNA.	82
Tabela 8: Tabela com os metabólitos diferentemente abundantes entre os grupos TFAM ^{+/-} e TFAM ^{+/+}	84

LISTAS DE SIGLAS

RGP	do inglês, <i>Radial Growth Phase</i>
VGP	do inglês <i>Vertical Growth Phase</i>
MET	Melanoma Metastático
UV	Luz ultravioleta
RTKs	Receptores de Tirosina Quinase
ATP	Adenosina Trifosfato
ADP	Adenosina Difosfato
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
FADH2	Flavina-adenina dinucleótido
OXPPOS	Fosforilação oxidativa
HIF1	Fator induzível de hipóxia 1
ROS	do inglês, <i>Reactive oxygen species</i>
mtDNA	DNA mitocondria
rRNA	RNA ribossômico
tRNA	RNA transportadores
OH	Origem da fita pesada
OL	Origem da fita leve
mtDNAcn	Número de cópias do genoma mitocondrial
HMG-box	do inglês, <i>High mobility group</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
GAllx	Illumina Genome Analyzer Iix
SBS	do inglês, <i>Sequencing-by-Synthesis</i>
VEP	do inglês, <i>Variant Effect Predictor</i>
Ct	do inglês, <i>Cycle threshold</i>
Pb	Pares de bases
qGlc	Taxa de consumo de glicose
qLac	Taxa de produção de lactato
DEG	do inglês, <i>Differentially expressed genes</i>
FDR	do inglês, <i>False Discovery Rate</i>
FC	do inglês, <i>Fold Change</i>
Ig	Imunoglobulina

LISTAS DE SÍMBOLOS

%	Porcento
cm ³	Centímetros cúbicos
kb	Kilobase
M	Molar
Mb	Megabase
mg	Miligramas
mL	Mililitro
ng	Nanogramas
°C	Grau Celsius
RPM	Rotações por minuto
μl	Microlitro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Melanoma.....	16
1.2 Metabolismo tumoral	20
1.3 Genoma mitocondrial	25
 2 JUSTIFICATIVA.....	 29
 3 OBJETIVOS	 30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
 4 MATERIAL E MÉTODOS	 31
4.1 Material.....	31
4.2 Metodologia	32
4.2.1 Cultivo das linhagens celulares.....	32
4.2.2 Extração de DNA e RNA	32
4.2.3 Exoma	32
4.2.4 Análise do Exoma	33
4.2.5 Análise do genoma mitocondrial	34
4.2.6 Análise do número de cópias do mtDNA	34
4.2.7 Quantificação de peróxido de hidrogênio.....	35
4.2.8 Quantificação de ATP	35
4.2.9 Quantificação de Glicose, Lactato e cálculo de eficiência metabólica	36
4.2.10 RNA-seq	36
4.2.11 Análise do RNA-seq	37
4.2.12 Análise de bioinformática dos dados públicos	37
4.2.13 Modelo murino de melanoma com depleção no mtDNA/TFAM	38
4.2.14 Análises estatísticas	43
 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	 44
5.1 Resultados do sequenciamento	44
5.2 Instabilidade do genoma mitocondrial por fase do melanoma	48
5.3 Avaliação do impacto da instabilidade do mtDNA no metabolismo energético em linhagens de melanoma	50
5.3.1 Quantificação de peróxido de hidrogênio.....	51

5.3.2 Quantificação de ATP	52
5.3.3 Quantificação de glicose, lactato e eficiência metabólica	54
5.3.4 Avaliação do efeito de mutações em genes nucleares com papel na função mitocondrial no metabolismo energético das linhagens de melanoma	58
5.4 Análise de vias gênicas nucleares em linhagens de melanoma reguladas pelo TFAM.....	60
5.5 Análises de vias gênicas nucleares em tumores de melanoma metastático reguladas pelo TFAM.....	67
5.5.1 Análises de vias metabólicas reguladas pelo TFAM em tumores de melanoma metastático	70
5.6 Integração das vias gênicas reguladas pelo TFAM nas linhagens de melanoma e em tumores de melanoma metastático	74
5.7 Avaliação in vivo do crescimento tumoral desencadeada por depleção no mtDNA/TFAM em modelo murino de melanoma	75
5.8 Análise de vias gênicas e metabólicas em modelo murino de melanoma com depleção no mtDNA/TFAM	79
5.9 Considerações finais	89
 6 CONCLUSÃO	 92
 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 93
 8 APÊNDICES	 103
 9 ANEXOS	 143

1 INTRODUÇÃO

1.1 Melanoma

O melanoma cutâneo é um câncer que acomete os melanócitos, responsáveis pela produção da melanina em células de origem neuroectoderma, como por exemplo pele, íris e reto. Embora represente apenas 3% dos cânceres de pele, o melanoma cutâneo é o mais agressivo deles, devido a sua alta capacidade de evolução para metástase (INCA, 2017). Os principais fatores de risco associados com essa doença são: alta exposição a luz ultravioleta, histórico familiar de melanoma e numerosa presença de nevos (CHANG et al., 2009). Apesar da atual taxa de mortalidade está estável, provavelmente devido ao diagnóstico precoce, sua incidência tem aumentado progressivamente durante os anos (ZHANG et al., 2016a). Inclusive, os estágios mais avançados do melanoma são os mais associados com altas taxas de mortalidade: quando detectado em estágios iniciais, o percentual de sobrevida em 5 anos é de 98,5% dos pacientes, já quando detectado com metástase distante, a sobrevida cai para 19,9% (ZHANG et al., 2016a).

No Brasil, o melanoma é o câncer de pele que mais leva a óbito. Em relatório publicado recentemente pelo INCA, 1.547 pessoas morreram dessa neoplasia no ano de 2013, e a estimativa de novos casos, para o ano de 2016, foi de 5.670 (3000 homens e 2.670 mulheres). Nos Estados Unidos, estima-se 87.110 novos casos e 9.730 mortes, em 2017 (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). Em todo o mundo, populações caucasianas tem maior risco de desenvolver o melanoma (ZHANG et al., 2016a) inclusive, na Austrália, o melanoma é o terceiro câncer mais frequente entre homens e mulheres, provavelmente devido a alta exposição solar e pele clara da sua população. Nesse contexto, a região Sul do Brasil, na qual a população tem o tom de pele mais claro quando comparada com outras regiões do país, é a mais afetada pelo melanoma, estimando-se 1.950 novos casos em 2016 (INCA, 2017).

O objeto do nosso estudo é o melanoma cutâneo, cujo as lesões são bem características e de, relativamente, fácil identificação. As lesões na pele são geralmente assimétricas, tanto em cor como em forma, apresentam bordas irregulares, diâmetros grandes e evolução, podendo alterar sua cor, forma ou relevo.

Essa displasia pode ser subdividida em algumas categorias: melanoma extensivo superficial, melanoma lentigo maligno, melanoma lentiginoso acral e melanoma nodular. As três primeiras categorias se iniciam como melanomas *in situ*, isto é, ocupam apenas as camadas mais superficiais da pele, se tornando mais invasiva ao longo do tempo. Já o melanoma nodular, é a forma mais agressiva e com alta mortalidade, apresentando uma lesão em relevo de coloração escura com rápido crescimento. Esse tipo de melanoma não tem fase de crescimento radial e corresponde a cerca de 15 a 30% dos casos. A forma mais frequente é o melanoma extensivo superficial, correspondendo a mais de 70% dos casos e comumente

encontrada no dorso e membros inferiores. Pode possuir várias cores e nem sempre apresenta relevo. O melanoma lentiginoso acral é o mais frequente em não brancos (35 a 60%) e é comumente encontrado nas regiões palmoplantares, mas também pode ser encontrado na mucosa. E por último, temos o melanoma lentigo, menos frequente (aproximadamente 5% dos casos) e com progressão mais lenta (FERNANDES et al., 2005).

Existem ainda outras categorias de melanomas com origem em outros tipos celulares, como por exemplo o melanoma mucosal, que se origina nas mucosas, e o melanoma ocular, que acomete os olhos. No geral, os melanomas extracutâneos são bem mais raros, correspondendo a 4 a 5% de todos os melanomas (HUSSEIN, 2008).

As etapas de progressão do melanoma cutâneo são histologicamente bem conhecidas: Geralmente, o melanoma evolui a partir de nevos benignos, uma população de melanócitos com proliferação aumentada que não progride devido ao controle do ciclo celular. Quando o controle é rompido, o nevo passa a exibir displasia e progride para a fase de crescimento radial (RGP, *Radial Growth Phase*), que se restringe a epiderme e tem baixo potencial invasivo. Em seguida, essas células adquirem o potencial de invadir a derme, característica da fase de crescimento vertical (VGP, *Vertical Growth Phase*), com alto poder metastático. Por fim, as células cancerosas invadem outros tecidos, caracterizando o melanoma metastático (MET) (ZAIDI; DAY; MERLINO, 2008) (Fig. 1). No entanto, essas fases de progressão nem sempre predizem sobrevida ou resposta a terapia, os processos moleculares que desencadeiam essa doença também devem ser levados em consideração.

Figura 1: Progressão do melanoma. Descrição das fases de progressão do melanoma. Adaptada de (VULTUR; HERLYN, 2013)

Como já comentado, exposição à luz UV é um dos maiores fatores de risco ao melanoma cutâneo, inclusive análises genômicas com sequenciamento de maior profundidade mostraram que os melanomas têm a maior carga de mutações, quando comparados com outros tumores, com um marcante padrão de assinatura UV, enriquecida com transições C>T ou G>T (CHIN et al., 2012a). Esse estudo também demonstrou o papel

mutagênico da radiação UV, não apenas no aumento de mutações *passengers*, mas também em várias mutações *drivers*, que conferem vantagens à célula cancerosa (CHIN et al., 2012b). Além disso, recentemente Hayward *et al.* sequenciaram o genoma completo de diferentes tipos de melanoma e identificaram, novamente, uma forte assinatura mutacional de UV nos melanomas cutâneos, no entanto ao avaliar melanoma acral e mucosal, ao invés de um padrão mutacional similar ao do melanoma cutâneo, eles observaram uma série de variantes estruturais, coerente com o fato desses melanomas acometerem regiões com pouca ou nenhuma exposição a luz UV (HAYWARD et al., 2017).

Além da exposição à luz UV, 8% dos melanomas ocorrem em pacientes com histórico familiar e, destes, 40% possuem mutação no gene CDKN2A. Esse gene codifica dois supressores tumorais, a p16INK4A e a p14ARF, onde a p16INK4A mantém o funcionamento do ciclo celular impedindo a inativação da RB, pelas quinases CDK4 e CDK6. Por um outro mecanismo, a p14ARF medeia a ubiquinização da MDM2, mantendo a p53 ativa. Dessa forma, mutações no CDKN2A inativam dois importantes reguladores do ciclo celular (SCHADENDORF et al., 2015).

Recentemente, Tomasetti *et al.* investigaram a influência de fatores hereditários, ambientais e ao acaso, proveniente de erros de replicação no DNA na geração de mutações *drivers* e concluíram que dois terços das mutações causadoras de câncer eram provenientes dos erros de replicação, enfatizando que o processo tumorigênico é, na maioria das vezes, iniciado ao acaso (TOMASETTI; LI; VOGELSTEIN, 2017). Esse achado é consistente com os dados mutacionais do melanoma, onde o gene mais afetado é o BRAF, alterado em cerca de 50% dos melanomas e que não apresenta assinatura mutacional de UV nem está presente nos casos de melanomas hereditários.

O BRAF tem um papel importante na via da MAP quinase/ERK, uma via de sinalização canônica composta por GTPase RAS (HRAS, KRAS e NRAS), RAF quinases (ARAF, BRAF e CRAF), MAP/ERK quinases (MEK1 e MEK2) e MAPK (MAPK1 ou MAPK3), que transferem sinais mitogênicos de fatores de crescimento para o núcleo, regulando o ciclo celular (SCHADENDORF et al., 2015). Além do BRAF, o gene NRAS também está altamente mutado em amostras de melanoma, onde cerca de 25% dos tumores apresentam mutações nesse gene. As mutações em ambos os genes levam a uma ativação contínua na via da MAPK, desencadeando vantagens proliferativas às células (NETWORK et al., 2015). As mutações mais comuns nesses genes são nos códons V600E do gene BRAF e no códon Q61 do NRAS, resultando na ativação constitutiva das respectivas proteínas (DHILLON et al., 2007) (Fig. 2).

Em experimentos com camundongos, Dankort *et al.* observaram que quando possuíam apenas a mutação BRAF^{V600E}, os camundongos apresentavam hiperplasia nos melanócitos, no entanto essa hiperplasia não evoluía para melanoma. Somente quando houve a combinação da proteína mutada do Braf com a deleção no PTEN que houve o

desenvolvimento do melanoma, sugerindo que esses defeitos genéticos agem juntos no desencadeamento do melanoma (DANKORT et al., 2009). PTEN é uma fosfatase que antagoniza a via do PI3K/AKT, regulando processos celulares chave como crescimento, sobrevivência e mobilidade celular. Essa via pode ser ativada por múltiplos fatores, inclusive por RAS e receptores de tirosina quinase (RTKs), ambos membros da MAPK. A combinação do BRAF mutado com a deleção no PTEN é observado em 40% dos melanomas metastáticos e em várias linhagens celulares, já a combinação do PTEN com o NRAS é menos frequente. Uma das hipóteses é que o NRAS pode ativar a via do PI3K/AKT independente de inativação do PTEN (SCHADENDORF et al., 2015).

Figura 2: Vias de sinalização MAPK no melanoma. (A) Em condições normais, os fatores de crescimento se ligam aos receptores RTK, desencadeando uma série de resposta que culmina na ativação de fatores de transcrição. Ao mesmo tempo, via PI3K/AKT regula o crescimento celular, em um balanceado controle das funções celulares básicas. (B) No melanoma, as alterações destacadas levam a ativação constitutiva das vias (setas grossas) e perda da homeostase celular. As mutações no BRAF e no NRAS levam a ativação contínua dessas proteínas e da via MAPK, enquanto a deleção do PTEN inativa o controle da via PI3K/AKT. Alternativamente, mutações no CDKN2A, inativam as proteínas supressoras tumorais p16 e p14. Retirada de (SCHADENDORF et al., 2015)

A fim de gerar um panorama mutacional do melanoma, o consórcio TCGA avaliou alterações genômicas através do sequenciamento de DNA e RNA de 333 amostras de melanoma e propôs que o melanoma cutâneo pode ser dividido em 4 subtipos baseado em suas mutações: BRAF, RAS (englobando o NRAS, KRAS ou KRAS), NF1 e sem mutações em nenhum desses genes (Triplo WT) (NETWORK et al., 2015). Como já estabelecido, o subtipo mais frequente era o mutado no BRAF, seguido do mutado nos genes RAS. Uma das novidades, foi a inclusão do gene NF1, como sendo o terceiro subtipo mais frequente e anti-correlacionado com o subtipo do BRAF, isto é, quando uma amostra não tinha mutação no BRAF, a probabilidade de ter no NF1 era alta. O NF1 codifica uma proteína GTPase que diminui a atividade RAS, então mutações que levam a perda de função da proteína Nf1 são uma forma alternativa de ativar a via de sinalização MAPK.

Por último e menos frequente, o subtipo Triplo WT foi o mais heterogêneo e não apresentou nenhum gene comumente mutado (NETWORK et al., 2015).

Os subtipos mais frequentes, BRAF, RAS e NF1, apresentaram alterações na via MAPK, reafirmando a importância dessa via para o contexto do melanoma. Desde que o BRAF havia sido relatado como altamente mutado nos melanomas, foram despertados interesses de um potencial alvo terapêutico nessa via. Desta forma, foi desenvolvida uma droga que tem como alvo o alelo BRAF^{V600E}, inibindo a ação da proteína mutada (TSAI et al., 2008). O vemurafenib, cujo o nome deriva de “V600E mutation Raf inhibition”, atua na proteína mutada inibindo também a ativação constitutiva da via MAPK, e levando à parada do ciclo celular e apoptose. Essa droga passou por uma série de ensaios clínicos e melhorou a taxas de sobrevivência de pacientes com melanoma portadores do alelo BRAF^{V600E} (CHAPMAN et al., 2011; SOSMAN et al., 2012). Inclusive, devido a sua especificidade ao alelo BRAF^{V600E}, vários estudos passaram a investigar outras vias alteradas especificamente por essa mutação.

Nesse contexto, Haq *et al.* observaram que o BRAF mutado também regula metabolismo energético do melanoma via a expressão do PGC- α , um regulador de biogênese mitocondrial, e do MITF, um fator de transcrição associado a melanogênese. A ativação desse oncogene estava associada com a diminuição das enzimas oxidativas, da função mitocondrial e do número de mitocôndrias, além de aumentar a produção de lactato. Todas essas alterações foram revertidas quando as células foram tratadas com vemurafenib, sugerindo que o alelo BRAF^{V600E} também regula o metabolismo energético no melanoma (HAQ et al., 2013).

1.2 Metabolismo tumoral

Em 2010, Hanahan e Weinberg propuseram seis características que seriam adquiridas pelas células durante a tumorigênese. Essas características eram: manutenção dos sinais proliferativos, evasão de supressores de crescimento, ativação da invasão e da metástase, capacidade de replicação, indução da angiogênese e resistência à morte celular (HANAHAN; WEINBERG, 2016). Adicionalmente, após uma década de estudos sobre o câncer, Hanahan e Weinberg propuseram a adição de mais quatro características: instabilidade genômica e mutação, tumores promovendo inflamação, evasão da resposta imune e desregulação do metabolismo energético (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Para que haja uma alta proliferação das células cancerosas, é necessário um ajuste do metabolismo celular para que estejam disponíveis nutrientes e energia suficiente para o rápido crescimento e divisão celular. Nas células saudáveis e diferenciadas, a produção de ATP (Adenosina Trifosfato) ocorre por meio da fosforilação oxidativa (OXPHOS), um eficiente sistema para a produção de energia (MITCHELL, 1961) (WARD; THOMPSON, 2012) (Fig. 3).

Nessas células, em condições normais de oxigênio, ocorre a metabolização da glicose em piruvato e em seguida a oxidação deste em CO_2 , por meio do ciclo de Krebs (Ciclo do ácido tricarboxílico), que ocorre dentro da mitocôndria. Durante a oxidação do piruvato, a energia química das moléculas intermediárias é armazenada por carreadores de elétrons NAD^+ e FAD em suas formas reduzidas (NADH e FADH_2). Os produtos do Ciclo de Krebs seguem para a OXPHOS, onde os elétrons são transportados pela cadeia respiratória, gerando um gradiente de prótons que promove a fosforilação de ADP (Adenosina Difosfato), tendo ao fim, 36 mols de ATP por mol de glicose. Nesse sistema, o aceptor final de elétrons é o O_2 , justificando a necessidade de condições normais de oxigênio (KREBS; JOHNSON, 2001; WARD; THOMPSON, 2012). Por outro lado, em baixas condições de oxigênio, ocorre uma mudança no metabolismo da glicose onde o piruvato, proveniente da metabolização da glicose, é convertido em lactato por um mecanismo conhecido como glicólise anaeróbica. Esse sistema é bem menos eficiente que a OXPHOS para a produção de ATP, gerando apenas 2 mols de ATP por mol de glicose (CORI; CORI, 1938).

Nature Reviews | Cancer

Figura 3: Bioenergética mitocondrial. O piruvato entra na mitocôndria através do carreador mitocondrial do piruvato (MPC), onde é convertido em acetil-CoA pela piruvato desidrogenase (PDH). O acetil-CoA entra então no ciclo de Krebs pela citrato sintase, quando é transformada em citrato. Em uma série de reações sucessivas nesse ciclo, moléculas carreadoras de elétrons são reduzidas em NADH e FADH_2 . Esses carreadores de elétrons seguem para a cadeia respiratória, onde são transferidos pelos complexos I, III e IV resultando em um gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$). O complexo V usa esse gradiente para fosforilar a ADP, gerando ATP. A troca de ATP por ADP pela membrana interna é mediada pelo transportador de nucleotídeos de adenina (ANT). Além do piruvato, alguns aminoácidos, como a glutamina, podem suprir o Ciclo de Krebs, por meio da conversão em α -cetoglutarato. Figura retirada de (CORAZAO-ROZAS et al., 2013).

Em 1930, Otto Warburg descreveu que as células cancerosas, independente das condições de oxigênio, desviam seu metabolismo da glicose em favor da glicólise, fenômeno conhecido como glicólise aeróbica ou efeito Warburg (WARBURG, 1925; 1956;

WARD; THOMPSON, 2012). Dessa forma, ao reprogramar o seu metabolismo, as células cancerosas utilizam um mecanismo menos eficiente pra produção de ATP, no qual são produzidos 4 mols de ATP por mol de glicose (VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009). Para compensar essa baixa eficiência, as células cancerosas aumentam a expressão de transportadores de glicose, como o GLUT1 e o GLUT3. O alto consumo de glicose é observado em vários tipos de câncer e é utilizado como um mecanismo não invasivo para a detecção de tumores, por meio da tomografia por emissão de pósitrons (*Positron Emission Tomography*- PET) com um análogo da glicose marcado para a detecção (SWEET, 1955).

Diante dessa alteração metabólica recorrente, vários estudos passaram a investigar a reprogramação metabólica desencadeada por oncogenes e observaram que vários deles, inclusive vias conhecidamente alteradas no câncer, como a via da MAPK e do PI3K/AKT, podem desregular o metabolismo energético da célula (Fig. 4). Por exemplo, o Ras mutado já foi associado com aumento na expressão do GLUT1, desvio da glicose para vias anabólicas e aumento no metabolismo de glutamina, amplificações no MYC foram associadas com biogênese mitocondrial e metabolismo de glutamina (BOROUGHES; DEBERARDINIS, 2015) e o BRAF mutado foi relatado regulando o metabolismo oxidativo do melanoma através da diminuição da biogênese mitocondrial (HAQ et al., 2013). Ainda, mutações nos genes TP53, Succinato desidrogenase (SDH) e Fumarato hidratase (FH) foram associados com a estabilização do HIF1 α , um dos principais fatores de transcrição responsáveis pela modulação da expressão gênica na resposta celular à hipóxia (SELAK et al., 2005; KING; SELAK; GOTTLIEB, 2006; MATOBA et al., 2006).

O HIF1 α é uma subunidade do HIF1 (fator induzível de hipóxia 1) e, uma vez ativado, induz a transcrição de genes transportadores de glicose e enzimas glicolíticas, como a piruvato desidrogenase quinase (PDK), inibindo o complexo piruvato desidrogenase e diminuindo a entrada de elétrons na cadeia respiratória (KIM et al., 2006). Além disso, induz a transcrição de inúmeros genes com papel conhecido na tumorigênese, como o VEGF e o LOX (ERLER et al., 2006).

cancerosas, pois ele funciona como um *hub* no metabolismo, uma vez que seus intermediários são precursores de várias vias de biossíntese como de lipídios, proteínas e nucleotídeos (MULLEN et al., 2014).

Nature Reviews | Cancer

Figura 5: Metabolismo da glutamina. A glutamina entra na célula por transportadores, como o SLC1A5 e pode seguir para diversas vias metabólicas, como biossíntese de nucleotídeos, glicoproteínas (UDP-GlcNAc) ou ser convertida em glutamato por glutaminases (GLS ou GLS2). O glutamato, por sua vez, pode ser convertido em glutathione, fundamental para a resposta ao estresse oxidativo, ou pode entrar no ciclo de Krebs via o α-cetoglutarato, sendo convertido pela glutamato desidrogenase (GLUD). Uma vez no ciclo de Krebs, o α-cetoglutarato pode ser transformado em citrato, por um processo chamado carboxilação redutiva (RC) (ALTMAN; STINE; DANG, 2016).

Em complementação ao efeito Warburg e também levando em consideração a importância do microambiente tumoral, Pavlides *et al.* propuseram um novo modelo onde células cancerosas induziriam o efeito Warburg em células do microambiente tumoral, e receberiam delas metabólitos energéticos, como lactato e piruvato, aumentando assim sua produção de ATP e funcionamento do ciclo de Krebs. Esse modelo de reprogramação metabólica induzido no microambiente tumoral foi denominado efeito Warburg reverso (PAVLIDES et al., 2014). Adicionalmente, Balliet *et al.* relataram que aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species*, ROS) e de lactato no microambiente tumoral promoveu o crescimento de tumores de mama (BALLIET et al., 2011). Nesse estudo, o estresse oxidativo foi induzido pelo silenciamento do gene TFAM, o fator de transcrição mitocondrial A responsável pela transcrição e manutenção do conteúdo do DNA mitocondrial (mtDNA), sugerindo que o número de cópias do mtDNA e função mitocondrial no microambiente tumoral tem um papel importante na modulação da tumorigênese (BALLIET et al., 2011).

1.3 Genoma mitocondrial

Como visto anteriormente, a mitocôndria tem um papel central na maioria das vias metabólicas: ela produz grande parte do ATP celular pela OXPHOS, que ocorre em sua membrana interna, e é o local de várias vias importantes, como glutaminólise e ciclo de Krebs. Além do papel no metabolismo, a mitocôndria também regula o estado redox celular e pode iniciar a apoptose, mediante a liberação do citocromo C para o citosol (WALLACE, 2012).

A mitocôndria é uma organela citoplasmática, na qual acredita-se que foi englobada por uma célula eucariota primitiva a mais de 1,45 bilhões de anos atrás, em uma relação simbiótica. Essa teoria é corroborada pelo fato da mitocôndria possuir seu próprio genoma e código genético, muito embora esse genoma tenha diminuído consideravelmente com os anos, o que gerou uma grande dependência do genoma nuclear (EMBLEY; MARTIN, 2006).

O genoma mitocondrial humano é uma molécula de DNA circular com aproximadamente 16.569 pares de bases, com duas fitas: uma fita leve, rica em citosina (L, do inglês *Light strand*) e uma fita pesada, rica em guanina (H, *Heavy strand*) (CLAYTON; VINOGRAD, 1967). Ele possui 13 genes codificantes de proteínas, todos membros dos complexos mitocondriais que compõem a cadeia transportadora de elétrons, 16 genes codificantes de RNA ribossômico 16S (rRNA) e 22 genes de RNA transportadores (tRNA), que são usados para a síntese protéica mitocondrial (Fig. 6).

Adicionalmente, o genoma mitocondrial possui várias cópias por células, ocasionando a ocorrência de heteroplasmia, que consiste na coexistência de diferentes genomas mitocondriais num tipo de célula (HUANG, 2011). Inclusive, He *et al.* demonstraram que a heteroplasmia é frequente nas células de indivíduos saudáveis e na maioria dos casos, fenótipos associados às mutações no mtDNA só são expressos quando as proporções de mtDNA mutantes são superiores aos mtDNA sem a mutação (HE et al., 2010).

A replicação desse genoma é mediada por um replissomo que contém diversas proteínas como a polimerase γ (POLG), que contém uma subunidade com função exonuclease e polimerase (POLGA) e uma subunidade acessória (POLGB), uma helicase TWINKLE e proteínas de ligação em fita única (SSBP). O replissomo se liga primeiramente no ponto de origem da fita pesada (OH), iniciando assim sua replicação, então, quando cerca de 75% da fita pesada foi replicada, a origem da fita leve (OL) é exposta e assim iniciada sua replicação (TAYLOR; TURNBULL, 2005). Diferentemente da replicação, a transcrição do mtDNA pode ocorrer em ambas as fitas. A transcrição é conduzida pela RNA polimerase mitocondrial (POLRMT), que requer alguns fatores de transcrição como TFAM e os fatores de transcrição B1 (TFB1M) e B2 (TFB2M). Esse complexo sintetiza um RNA policistrônico que posteriormente será processado em moléculas individuais de RNA (TAYLOR; TURNBULL,

2005). Falhas nesses dois sistemas são responsáveis por gerar mutações no mtDNA e grandes variações no número de cópias do genoma mitocondrial (mtDNAcn).

Figura 6: Genoma mitocondrial e a cadeia respiratória. (A) Representação gráfica do genoma mitocondrial, mostrando a fita leve (círculo interno) e a fita pesada (círculo externo), com os genes em suas respectivas fitas. Como já falado anteriormente, 13 genes codificam subunidades dos complexos mitocondriais da cadeia respiratória e estão representados abaixo (B). Além dos genes mitocondriais, cerca de 77 subunidades dos complexos mitocondriais são codificadas no núcleo (tabela abaixo). Figura retirada de (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012).

Devido à importância da mitocôndria no metabolismo energético, vários estudos passaram a investigar o grau de instabilidade no mtDNA, por meio de mutações no seu genoma, e demonstraram um aumento da instabilidade em diferentes tipos de cânceres (CHATTERJEE; MAMBO; SIDRANSKY, 2006; DE ARAUJO; SILVA, 2015). Inclusive, algumas mutações no mtDNA foram associadas com o desenvolvimento de metástase via produção de ROS. Ishikawa e Hayashi propuseram que em algumas situações o potencial metastático das células neoplásicas pode ser regulado por sequestradores de ROS, como NAC e Ebselen (ISHIKAWA; HAYASHI, 2010). Por outro lado, Imanishi *et al.* demonstraram que mutações em genes do complexo I podem elevar a produção de lactato, gerando um efeito similar ao de Warburg, sem alterar a produção de ROS em linhagens de osteosarcoma (IMANISHI *et al.*, 2011). Resultados semelhantes foram encontrados em estudos utilizando linhagem de carcinoma de pulmão em camundongos (ISHIKAWA *et al.*, 2008), sugerindo que a regulação mediada por ROS pode variar bastante entre os tumores. Adicionalmente, Ghelli *et al.* demonstraram que uma mutação no gene CYB desencadeou uma deficiência do complexo III mitocondrial, mas não afetou o funcionamento da OXPHOS ou a montagem dos complexos respiratórios I e III (GHELLI *et al.*, 2013). Ainda

nesse contexto, porém avaliado progressão tumoral utilizando adenomas e adenocarcinomas colorretal proveniente do mesmo paciente, um trabalho publicado pelo nosso grupo relatou um aumento de mutações no mtDNA e depleção no mtDNAcn em fases mais avançadas desse câncer (DE ARAUJO et al., 2015).

Além de mutações no genoma mitocondrial, o número de cópias do mtDNA também é bastante alterado em neoplasias, indicando que alterações no conteúdo do mtDNA pode ter um papel importante na tumorigênese (YU, 2011). Recentemente, Reznik *et al.* utilizaram os dados genômicos do TCGA provenientes de 22 tipos de câncer e observaram que alguns tumores tinham um menor número de cópias do mtDNA quando comparado com seu respectivo tecido normal (Fig. 7). Além disso, em alguns cânceres o conteúdo do mtDNA estava correlacionado com a expressão de genes codificante de membros das cadeia respiratória e anti-correlacionado com a expressão de genes de resposta imune e do ciclo celular (REZNIK et al., 2016). Nesse contexto, Jeng *et al.* relataram a diminuição do mtDNAcn compromete a função mitocondrial e, subsequente crescimento e morfologia celular (JENG et al., 2008). Para induzir a depleção no mtDNA, Jeng *et al.* silenciaram o TFAM, fator de transcrição tumoral com papel na replicação e transcrição mitocondrial, já relatado anteriormente (TAYLOR; TURNBULL, 2005).

Figura 7: MtDNAcn em diferentes tipos tumorais. Vários tipos de câncer apresentam uma depleção no conteúdo mitocondrial quando comparado com o seu respectivo tecido normal. Figura retirada de (REZNIK et al., 2016).

O silenciamento do TFAM para induzir a diminuição no mtDNAcn já foi utilizado em alguns trabalhos anteriores (BALLIET et al., 2011; THOMAS et al., 2011a; MEI et al., 2015). Além de regular a transcrição e replicação do mtDNA, o TFAM é fundamental para a manutenção, função e biogênese mitocondrial (LARSSON et al., 1998). Camundongo com os dois alelos desse gene deletado, apresentaram grande depleção no mtDNA, nenhum funcionamento na OXPHOS e morreram no décimo dia do desenvolvimento embrionário. Já os camundongos heterozigotos, também apresentaram uma redução no mtDNAcn, porém em menor escala, e um mau funcionamento da OXPHOS no tecido cardíaco.

O Tfam é uma proteína com duas funções, necessária tanto para a transcrição e replicação como para o empacotamento do mtDNA em nucleóides, unidades estáveis que se acredita serem fundamentais para a transmissão e herdabilidade. Ela foi inicialmente descoberta como um fator que estimula a transcrição nos promotores das duas fitas (FISHER; CLAYTON, 1985). A sua versatilidade é devido a dois grupamentos de alta mobilidade (HMG-box, *High mobility group*), o que a permite se ligar, enrolar e dobrar o DNA sem nenhuma sequencia específica. O Tfam organiza o mtDNA pela introdução de repetidas voltas em forma de U, levando assim a compactação (Fig. 8). Utilizando fibroblastos embrionários murinos deficientes para o TFAM, West *et al.* observaram que houve um aumento no tamanho dos nucleóides e ativação de uma resposta imunológica antiviral, que é desencadeada pela presença de DNA livre no citosol, sugerindo que o silenciamento do TFAM induziu um estresse no mtDNA (WEST et al., 2015).

Figura 8: Tfam e o empacotamento do mtDNA. O Tfam possui duas subunidades HMG, tornando-o capaz de exercer suas funções na transcrição e empacotamento do mtDNA. Acima, o Tfam interagindo com a RNA polimerase mitocondrial (POLRMT) e com o fator de transcrição mitocondrial B2 (TFB2M) na transcrição do mtDNA. E abaixo temos o Tfam introduzindo repetições em U para compactar o genoma mitocondrial (HALLBERG; LARSSON, 2011).

Estudos anteriores também avaliaram o papel do TFAM em alguns tipos de câncer. Woo *et al.* utilizaram um modelo murino de tumorigênese intestinal adicionado a um background TFAM^{+/-} e observaram um aumento na produção de ROS e no número e tamanho dos pólipos intestinais (WOO et al., 2012). Por outro lado, em um estudo com carcinoma de

pulmão de células não-pequenas, Xie *et al.* observaram que o silenciamento do TFAM também aumentou a produção de ROS, no entanto induziu uma parada no ciclo celular, inibindo o crescimento e migração das células cancerosas (XIE et al., 2016). Por fim, em um estudo utilizando fibroblastos do microambiente tumoral deficientes para o TFAM, Balliet *et al.* observaram que os fibroblastos sofreram uma reprogramação metabólica em direção a glicólise aeróbica e promoveram o crescimento tumoral em um modelo xenográfico de câncer de mama (BALLIET et al., 2011). Em conjunto, esses demonstram que o TFAM pode ter um papel importante na tumorigênese.

2 JUSTIFICATIVA

Muito embora vários estudos já tenham avaliado a instabilidade do genoma, por meio da identificação de mutações e avaliação do conteúdo do mtDNA em diversos tipos tumorais, poucos avaliaram seu papel no melanoma. Mithani *et al.*, estudando mutações no mtDNA em tecidos de melanoma e linhagens celular, observaram que genes do complexo I eram preferencialmente mutados (MITHANI et al., 2008). Em um outro estudo, Hyland *et al.* avaliaram o mtDNAcn no sangue periférico de pacientes com melanoma e não encontraram diferenças quando comparado com indivíduos saudáveis. No entanto, houve um aumento do mtDNAcn em pacientes que possuíam mutação no gene CDKN2A, indicando uma regulação do conteúdo mitocondrial por esse oncogene (HYLAND et al., 2014).

Estudos anteriores já haviam relatado oncogenes regulando a função mitocondrial. Nesse sentido, Haq *et al.* demonstraram que a mutação BRAF^{V600E}, a mais frequentemente encontrada nos tumores de melanoma, induz uma reprogramação metabólica, diminuindo a atividade da OXPHOS e a expressão do PGC-alpha, um indutor da biogênese mitocondrial (HAQ et al., 2013). Além disso, recentemente Zhang *et al.* demonstraram que células de melanoma portadoras da mutação BRAF^{V600E} e resistentes à inibidores de MAPK, ativaram vias de biogênese mitocondrial e a expressão de genes da OXPHOS para sobreviver. Essas células resistentes dependiam principalmente do TRAP1, que regula o dobramento de proteínas mitocondriais, e do TFAM, que é positivamente correlacionado com o mtDNAcn, com estresse mitocondrial e com angiogênese (ZHANG et al., 2016b).

Dessa forma, mediante as evidências da influência do genoma mitocondrial na reprogramação metabólica e tumorigênese, nosso estudo pretendeu avaliar o papel a instabilidade do genoma mitocondrial, medida pelo acúmulo de mutações no mtDNA, variação no mtDNAcn e pela expressão do fator de transcrição TFAM, no metabolismo energético e crescimento do melanoma. Para isso, nós utilizamos um modelo *in vitro* de linhagens celulares de melanoma, dados de expressão gênica de tumores de melanoma metastático e um modelo murino induzível de melanoma.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da instabilidade e da depleção do genoma mitocondrial no metabolismo energético, regulação da expressão gênica e tumorigênese do melanoma.

3.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar o efeito da instabilidade do genoma mitocondrial e depleção no mtDNA no metabolismo energético de linhagens de melanoma.
- II. Avaliar vias gênicas associadas com a expressão diferencial do *TFAM* em linhagens de melanoma e tumores humanos de melanoma metastático.
- III. Avaliação *in vivo* da alteração metabólica e tumorigênese desencadeada por depleção no mtDNA/TFAM.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A maior parte do trabalho foi desenvolvido no laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Departamento de Genética da FMRP/USP, locado nas dependências do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto. O projeto foi aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP/USP, parecer número 402.629, aprovado em 19/07/2013 (Anexo I).

Os experimentos com o modelo murino de melanoma foram realizados na Texas A&M University, sob a orientação do Dr. A. Phillip West, durante um período de nove meses de estágio de pesquisa no exterior (BEPE). Todos os experimentos em camundongo foram conduzidos de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Texas A&M University.

4.1 Material

Foram utilizados um grupo de linhagens celulares que representam as três principais fases de progressão do melanoma: As linhagens WM35, WM1552 e WM1789, correspondentes a Fase de Crescimento Radial, as linhagens WM278, WM793 e WM902, da Fase de Crescimento Vertical; e as linhagens metastáticas de melanoma WM9, WM1617 e 1205Lu. Os pares WM278/WM1617 e WM793/1205Lu são provenientes do mesmo paciente. Foi também utilizada uma cultura primária de melanócito para fins comparativos (FM308), extraída de prepúcio de neonato sem displasia. Todas as células foram cedidas pela Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico, do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioreagentes Patogênicos da FMRP/USP, co-orientadora do estudo (Fig. 9).

Figura 9: Linhagens de melanoma. Representação esquemática das fases de progressão do melanoma, com as linhagens em suas respectivas fases. Os pares WM793/1205LU e WM278/WM1617 são provenientes do mesmo paciente.

4.2 Metodologia

4.2.1 Cultivo das linhagens celulares

As linhagens de melanoma foram cultivadas em meio TU 2% (MCDB-153 80%, Leibovitz's L-15 20%, Insulina 5µg/mL e CaCl₂ 1.6mM) suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino (SFB), em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. O melanócito FM308 foi cultivado em meio 254CF, suplementado com 1% de *Human Melanocyte Growth Supplement* (HMGS) (Invitrogen).

4.2.2 Extração de DNA e RNA

Para a investigação de mutações e análise de expressão gênica, nós extraímos DNA e RNA das linhagens de melanoma. A extração do DNA e RNA foi realizada com Kit AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal (Qiagen), seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante, e quantificadas em espectrofotômetro *nanovue*.

4.2.3 Exoma

Para a investigação de mutações em genes nucleares envolvidos com o metabolismo e no genoma mitocondrial, nós realizamos um exoma nas linhagens de melanoma. O exoma permite o sequenciamento de todos os exons, regiões codificantes de proteínas, além de sequenciar o genoma mitocondrial completo. Para o enriquecimento do exoma, foi preparada uma biblioteca de DNA com o kit Nextera Exome Enrichment (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). O DNA genômico foi quantificado por um método fluorimétrico (Qubit). Para a fragmentação química (tagmentação), foi utilizado 50ng de DNA, seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, foi feita a captura e enriquecimento do exoma com um conjunto de sondas altamente otimizadas, para que fosse obtida uma cobertura abrangente de todo o exoma. Sondas de 95pb são responsáveis pela captura de 62Mb de sequências exônicas, compreendendo 20794 genes. A primeira etapa desse enriquecimento consiste na mistura da biblioteca de DNA com sondas de captura das regiões-alvo. Depois da hibridação com as sondas, utilizamos esferas de estreptavidina para capturar as sondas contendo as regiões de interesse. Em seguida, foram feitas três lavagens para remover ligações não-específicas. Após as lavagens, a biblioteca foi eluída e submetida a uma segunda hibridação, que aumenta o enriquecimento.

O passo seguinte foi amplificar por PCR a biblioteca com as regiões enriquecidas. Para a quantificação dos fragmentos formados na biblioteca utilizamos, além da quantificação por

fluorímetro, uma quantificação absoluta por PCR em tempo real, utilizando-se o kit comercial *kapa sybr fast* (KAPA Biosystems), que contém uma curva-padrão e todos os demais reagentes para a PCR. Com base nessa quantificação, as bibliotecas foram diluídas e foram utilizados 8 a 10pM para desnaturação e posterior clusterização. A clusterização tem as seguintes etapas: amplificação dos clusters, linearização, bloqueio e hibridação dos *primers*. A geração dos clusters foi feita dentro de uma estação de clusterização, um dispositivo fluídico chamado cBot. As bibliotecas foram clusterizadas em uma *flowcell*, que é o suporte sólido da reação, com os reagentes do TruSeq PE Cluster Generation Kit v5 (Illumina Inc. San Diego, CA, USA). Durante a geração dos clusters, cada fragmento de DNA da biblioteca foi incorporado à superfície da *flowcell*, que é coberta com oligonucleotídeos. Esses oligos são usados para amplificar o DNA de forma isotérmica, dando origem aos clusters, ou seja, grupos ou colônias de fragmentos ligados ao suporte sólido. Depois da amplificação dos clusters, foi feita a sua linearização, bloqueio e hibridação de *primers*, onde a linearização é a reação que retira os dois adaptadores para assegurar que a hibridação e o sequenciamento ocorram somente em uma das fitas de cada cluster, já o bloqueio refere-se ao bloqueio das hidroxilas presentes nas extremidades 3' dos clusters linearizados, para evitar a adição de substratos de fluoróforos a qualquer outro segmento que não seja o *primer* de sequenciamento. A desnaturação garante a formação de *templates* de fita simples, que são hibridados aos *primers* de sequenciamento.

Após a clusterização, a biblioteca está pronta para o sequenciamento, que foi realizado com o TruSeq SBS kit v5 (Illumina Inc.), *paired-end* (2x55 ciclos) no equipamento Illumina Genome Analyzer IIx (GAIIx), que utiliza a tecnologia Solexa ou SBS (“Sequencing-by-Synthesis”). Essa tecnologia permite a leitura massiva e paralela (simultânea) da sequência de nucleotídeos de milhões de fragmentos de DNA. A tecnologia SBS baseia-se na terminação da síntese da cadeia de DNA, após a detecção do sinal fluorescente. Por terminação, entende-se a clivagem do nucleotídeo marcado já detectado que possibilita a adição do próximo nucleotídeo. Os eventos de incorporação e clivagem do nucleotídeo marcado e modificado ocorrem sucessivas vezes, dentro da *flowcell*, permitindo, desta forma, a leitura base a base e, ao mesmo tempo, elimina possíveis erros em sequências com repetições da mesma base (regiões homopoliméricas).

4.2.4 Análise do Exoma

Após o sequenciamento, a chamada de bases gera os arquivos “.bcl” que, em seguida, são convertidos para .fastq com o software casava. Os arquivos “.fastq” tiveram sua qualidade verificada com o software Fastqc (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc>). Em seguida, os dados foram processados utilizando a ferramenta Exome Variant Tool (EVT), desenvolvida pelo nosso grupo. Essa ferramenta utiliza algoritmos já descritos como o BWA-

MEM (LI; DURBIN, 2009), SamTools (LI, 2011) e Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>) para mapeamento, conversão de “.SAM” para “.BAM”, ordenar as sequências, remover duplicatas e adicionar informações das amostras nos arquivos.

Em uma próxima etapa, o arquivo alinhado “.BAM” foi utilizado para a chamada de variantes com o software GATK (MCKENNA et al., 2010), seguido de anotação utilizando o *Variant Effect Predictor* (VEP) (MCLAREN et al., 2016). Os arquivos “.vcf” anotados com o VEP foram convertidos para *Mutation Annotation Format* (“.maf”) e analisados no Maftools (MAYAKONDA; KOEFFLER, 2016), disponível no Bioconductor, plataforma que fornece ferramentas para análise de dados genômicos (GENTLEMAN et al., 2004). A tabela de mutações foi utilizada para identificar mutações nos genes nucleares envolvidos no metabolismo.

4.2.5 Análise do genoma mitocondrial

Para a análise do genoma mitocondrial, utilizamos o arquivo BAM gerado pelo sequenciamento do exoma, e empregamos um software chamado Mitoseek (GUO et al., 2013) que extrai do arquivo “.BAM” as reads que foram mapeadas no genoma mitocondrial. Esse software faz um novo alinhamento das *reads* mitocondriais com a sequência de referência rCRS (ANDREWS et al., 1999), verifica a qualidade do mapeamento, detecta heteroplasmia, variações somáticas e número de cópias do genoma mitocondrial.

Para a chamada de variações somáticas e heteroplasmias foram utilizadas um mínimo de 20 *reads* de cobertura. Ainda, foram consideradas as variantes que tiverem um número mínimo de 9 *reads*, conforme descrito em (GRIFFIN et al., 2014).

4.2.6 Análise do número de cópias do mtDNA

Para quantificar o número de cópias do genoma mitocondrial nós utilizamos PCR quantitativa. Foram realizados cálculos utilizando valores de Ct (Cycle threshold) do genoma mitocondrial em relação ao genoma nuclear. Para tal, foram empregamos *primers* específicos de DNA mitocondrial e de DNA nuclear (TUBB) (Tabela 1). Todas as reações foram realizadas utilizando Power SYBER Green Master Mix, no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Life Technologies). As análises dos Cts foram feitas conforme descrito por (VENEGAS et al., 2011).

Tabela 1: *Primers* usados para a quantificação do número de cópias de mtDNA.

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

4.2.7 Quantificação de peróxido de hidrogênio

Para estimar a produção de ROS, nós quantificamos os níveis de peróxido de hidrogênio das linhagens, utilizando o Amplex Red Hydrogen Peroxide kit (Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, foi preparada uma solução Krebs-Ringer-fosfato com glicose (KRP: 145 mM de NaCl, 5,7 mM de fosfato de sódio, 4,86 mM de KCl, 0,54 mM de CaCl₂, 1,22 mM de MgSO₄, 5,5 mM de glicose, com pH de 7,35) contendo ainda 50µM de Amplex Red e 0,1 U/mL de Peróxido de hidrogênio oxirredutase. À esta solução foi adicionada 1x10⁵ células ressuspendidas previamente em KRP. A reação foi incubada por 10 minutos a 37°C e, em seguida, a fluorescência foi quantificada. Nessas análises, utilizamos 2 condições diferentes: células sem tratamento e células tratadas com 250µM de t-butyl (agente pró-oxidante) por 30 min, como controle do experimento, para nos certificar que estávamos realmente quantificando peróxido de hidrogênio. Adicionalmente, fizemos uma curva padrão com uma solução estoque de peróxido de hidrogênio com as concentrações variando entre 0.01µM à 10µM, para obter os valores absolutos dessa molécula nas linhagens de melanoma. Todas essas análises foram feitas em triplicatas e a fluorescência foi quantificada por 60min, utilizando o leitor de microplaca FLUOstar Omega (BMG Labtech).

4.2.8 Quantificação de ATP

Para inferência dos níveis de ATP intracelular foi utilizado o kit Celltiter Glow Assay (Promega), segundo recomendações do fabricante. As células lisadas emitem um sinal luminescente proporcional a quantidade de ATP e os reagentes detectam esse sinal por meio de uma luciferase termoestável. No dia anterior ao experimento, foram plaqueadas 5x10³ células por poço em triplicata, em uma placa de 96 poços *half area*. No dia seguinte, adicionamos em cada poço 50µl do reagente do CellTiter-Glo, lisamos as células agitando a placa por 2 minutos a 700rpm, incubamos a placa em temperatura ambiente por 10 minutos

e, por fim, medimos a luminescência no leitor de microplaca FLUOstar Omega (BMG Labtech), com 25 segundos de integração. Além disso, fizemos uma curva padrão com concentrações conhecidas de ATP, variando entre 0.01 μ M à 10 μ M, para obtermos concentrações absolutas dos níveis de ATP das linhagens de melanoma. Os níveis de ATP foram também verificados após tratamento das células com 10 μ M de oligomicina (bloqueador da ATP sintase) por 30 minutos, como controle do experimento, para nos certificar que estávamos realmente quantificando ATP.

4.2.9 Quantificação de Glicose, Lactato e cálculo de eficiência metabólica

Para verificar os níveis de glicose e L-lactado nas células, utilizamos o equipamento YSI 2700 Select Biochemistry analyzer que emprega uma membrana enzimática e quantifica os níveis de substrato (glicose) e produto (produto). Nesse ensaio, medimos as concentrações desses metabólitos ao longo de 6 dias. A princípio, foram plaqueadas 1×10^5 células em triplicata por dia. Ao final de cada dia, os sobrenadantes foram coletados e contadas o número de células por poço. Após os seis dias, os níveis de L-lactato e glicose dos sobrenadantes foram quantificados no equipamento.

Os cálculos de consumo de glicose (q_{Glc}), produção de lactato (q_{Lac}) e eficiência metabólica, isto é, produção de lactato a partir da glicose ($\gamma_{lac/glc}$) foram feitos conforme descrito em (SCHOP et al., 2009). Em resumo, calculamos o consumo ou produção de cada metabólito por célula por dia, durante a fase de crescimento exponencial de cada linhagem. Valores de q negativos indicam consumo e valores positivos indicam produção dos metabólitos. Os valores de $\gamma_{lac/glc}$ foram gerados pela razão do q_{Lac}/q_{Glc} . Valores de $\gamma_{lac/glc} > 2$, indicam uma maior parte da glicose esta sendo convertida em lactato, uma vez que uma molécula de glicose pode dar origem a duas de lactato, sugerindo menor dependência da fosforilação oxidativa.

4.2.10 RNA-seq

Para a análise de expressão gênica foram utilizados dados de RNA-seq das linhagens de melanoma haviam sido gerados anteriormente pelo nosso grupo. Em resumo, as amostras de RNA total extraídas das linhagens de melanoma foram quantificadas pelo sistema RNA QuantiFluor (Promega Corporation) e tiveram sua integridade verificada através do equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Em seguida, foi utilizado 300ng de RNA para o preparo da biblioteca com o kit TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep com o RiboZero (Illumina Inc.), que remove todo o RNA ribossômico. O RNA

purificado foi então fragmentado em segmentos de 200 a 500pb, convertido para cDNA e ligado a adaptadores. Os produtos foram purificados, utilizando o kit AMPure XP beads (Beckman Coulter), e amplificados por PCR para a geração da biblioteca final de cDNA. A quantificação, clusterização e sequenciamento da biblioteca ocorreram como já descrito anteriormente no tópico do Exoma.

4.2.11 Análise do RNA-seq

Após o sequenciamento, os arquivos brutos (".bcl") foram convertidos em ".fastq" e tiveram sua qualidade verificada com o software FastQC, da mesma forma que os dados do Exoma (Tópico 4.2.4). As reads foram então mapeadas contra o genoma de referência GRCh38 (Gencode), contadas e anotadas com o software STAR (DOBIN et al., 2013). A normalização dos dados e as análises de expressão diferencial foram feitas no R com o *package* edgeR (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010). Os *volcanos plot* e *Heatmaps* foram feitos com *packages* limma (RITCHIE et al., 2015) e ComplexHeatmap, respectivamente (GU; EILS; SCHLESNER, 2016). Os *packages* edgeR, limma e ComplexHeatmap estão disponíveis no Bioconductor.

4.2.12 Análise de bioinformática dos dados públicos

Para expandir nossas análises em linhagens de melanoma, nós fizemos o *download* de dados de expressão gênica proveniente do trabalho (PAWLIKOWSKI et al., 2013) e depositados no repositório público *Gene Expression Omnibus* (GEO), sob o código GSE46818. Os dados consistem no RNA-seq de um melanócito (EBRAF-MC) e sete linhagens de melanoma (A375, A2058, c32, MalMe3M, SKMEL28, SKMEL5, WM2664), também sequenciadas no Illumina GALIX. Os dados foram disponibilizados no formato ".sra", que foram em seguida convertidos em ".fastq" com a ferramenta SRA Toolkit (LEINONEN et al., 2010). Uma vez em ".fastq", esses dados foram analisados juntamente com as linhagens de melanoma sequenciados previamente pelo nosso grupo, conforme descrito no tópico Análise do RNA-seq.

As análises de expressão diferencial em tumores humanos de melanoma metastático foram feitas com dados públicos do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), um repositório de dados genômicos de tumorais e de tecido normal. Dados normalizados de RNA-seq de amostras de melanoma metastático foram baixados pelo Broad GDAC Firehose (<https://gdac.broadinstitute.org/>) e outras informações, como dados clínicos e de mutações nos genes BRAF, NRAS, KRAS e NF1 foram obtidas no *cBioPortal for Cancer Genomics* (<http://www.cbioportal.org/>). Os dados foram compilados no R e as análises de expressão

diferencial e geração de gráficos foram feitas conforme descrito no tópico de Análise do RNA-seq. As análises de enriquecimento de vias foram feitas na plataforma online DAVID (<https://david.ncicrf.gov/summary.jsp>).

4.2.13 Modelo murino de melanoma com depleção no mtDNA/TFAM

Para avaliar melhor o papel da instabilidade do genoma mitocondrial em melanoma, nós partimos para uma abordagem *in vivo* onde utilizamos um modelo murino, previamente estabelecido por (DANKORT et al., 2009), adicionado a um background deficiente no Fator de transcrição A mitocondrial (TFAM).

Esse modelo murino recapitula aspectos fisiopatológicos chaves do melanoma, permitindo um controle temporal e local da iniciação do melanoma. Para tal, esse modelo utiliza um sistema de knockout condicional com vetor ERCre em um promotor da Tirosinase, que é expresso especificamente em melanócitos. A administração tópica de Tamoxifeno permite que a proteína fusionada Cre-ER entre no núcleo e interaja com os genes alvos, flanqueados pelas inserções loxP (floxed). No caso do gene *Braf*, o camundongo possui um alelo *Braf*^{CA} (Cre-activated) que expressa a proteína BRAF selvagem se não for ativado pelo tamoxifeno. Uma vez ativado, a Cre medeia a recombinação na qual o alelo *Braf*^{V600E} passa a ser expresso em níveis fisiológicos normais (DANKORT et al., 2007). No caso do *Pten*, o tamoxifeno desencadeia a deleção dos exons 4 e 5 em ambos alelos, comprometendo assim o funcionamento da proteína e desencadeado o início do melanoma (*BRAF*^{V600E}/*PTEN*^{null}/*TyrERCre* (DANKORT et al., 2009) (Fig. 10)

Figura 10: Modelo murino induzível de melanoma. Modelo murino de melanoma onde a ativação da Cre recombinase por tamoxifeno leva a conversão do *Braf*^{wt} (*Braf*^{CA}-Cre-activated) em *Braf*^{V600E} e deleção dos éxons 4 e 5 nos dois alelos do *Pten* (*Pten*^{flox/flox}) em melanócitos.

A adição do *background* de estresse no mtDNA ao modelo murino de melanoma foi feito por Dr. A. Phillip West, docente da Texas A&M University. Neste modelo, além das alterações nos genes *Braf* e *Pten* sob o vetor ERCre, foi adicionada uma alteração no gene *Tfam*. Entramos em contato com Dr. West e solicitamos uma Bolsa Estágio de Pesquisa no

Exterior (BEPE) com duração de 9 meses, onde propusemos avaliar se o estresse no mtDNA limitada às células tumorais (*Tfam*^{fl^{ox}}) e tanto em células tumorais como no microambiente tumoral (*Tfam*^{+/-}), modifica o crescimento no melanoma, utilizando o modelo murino induzível de *BRAF*^{V600E}/*PTEN*^{null}/*TyrERCre*.

Para testar diferentes condições de estresse mitocondrial em melanoma, nós utilizamos quatro *backgrounds* diferentes modificando a expressão do TFAM: *Tfam*^{+/-} com instabilidade mitocondrial gerada pela ausência de um alelo do gene *Tfam* em todos os tecidos (Fig. 11, camundongo cinza); *Tfam*^{fl/+}, com uma cópia do *Tfam* *floxed*, o que induz a deleção de apenas um alelo *Tfam* nos melanócitos; *Tfam*^{fl/fl}, homozigoto para o *Tfam* *floxed*, deletando ambas as cópias desse gene nos melanócitos (Fig. 11, camundongo azul); e *Tfam*^{+/+} que foi utilizado como controle, sem nenhuma alteração no TFAM e, por consequência, sem depleção no mtDNA (Fig. 11, camundongo amarelo).

Figura 11: Estratégia experimental para avaliar as consequências da depleção do mtDNA no crescimento do melanoma.

Genotipagem dos camundongos

Como nossos camundongos tinham várias modificações genéticas, sete dias após o nascimento todos os camundongos eram identificados e genotipados para os alelos *Tfam*, *Pten*, *Braf* e Tirosinase Cre ER (*TyrCre*). As condições da PCR eram: 94C por 3 min, seguido por 34 ciclos de 94C por 30 seg, 59C por 30 seg, 72C por 1 min e uma extensão final de 72C por 10 min. Todos os *primers* podem ser encontrados na tabela 2.

Tabela 2: Sequencia dos primers utilizados na genotipagem dos camundongos

Gene	Sequencia dos primers
TFAM- A	5'-TGGCTTTTCTGCAAGGTGCC - 3'
TFAM- B	5'- AGGCCACTTTCCATCCCTTG- 3'
TFAM- C	5'- AGATTAGGAGGGTCTCGCACT- 3'
PTEN-A	5'- TGTCTGGCAATGCTGTAGTAATA- 3'
PTEN-B	5'- GCATACATTATACGAAGTTATGGC- 3'
PTEN-D	5'- AAGATAATCCCAGTGTAAGAAAA- 3'
BRAF-A	5'- TGAGTATTTTGTGGCAACTGC- 3'
BRAF-B	5'- CTCTGCTGGGAAAGCGGC- 3'
TyrCre-1	5'- CAATGGTAGGCTCACTCTGGGAGATG 3'
TyrCre-2	5'- AACACACACTGGCAGGACTGGCTAGG- 3'
TyrCre-3	5'- CAGGGTGTTATAAGCAATCCC- 3'
TyrCre-4	5'-CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG- 3'

Indução do melanoma

Os tumores eram induzidos após 21 dias do nascimento dos camundongos. No dia anterior a indução, nós removíamos os pelos dorsais dos camundongos com o creme depilatório Veet, e no dia seguinte, aplicávamos topicamente 1µl de uma solução de 25mM de 4-hidroxitamoxifeno (4OHT), dissolvido previamente em etanol. Após a indução, os camundongos eram monitorados diariamente, para verificar o surgimento do tumor, e eram eutanasiados oito semanas após a aplicação de 4OHT, ou antes dos tumores chegarem a 1cm³ (Fig. 12).

Após a eutanásia, os tumores eram medidos, pesados e congelados em nitrogênio líquido para serem usados em análises posteriores. Os volumes dos tumores foram calculados multiplicando comprimento, largura e altura.

Figura 12: Workflow da indução localizada do melanoma.

Análise de metabolômica

As análises de metabolômica foram feitas na Metabolomics Facility da Children's Medical Center Research Institute at UT Southwestern, em colaboração com Dr. Ralph DeBerardinis. Para as análises de metabolômica, nós homogenizamos uma amostra tumoral de 50mg em metanol 80% gelado, usando beads de 2,0mm de zircônia no equipamento Mini-BeadBeater-16 (Biospect). Após a homogeneização, nós transferimos 200µl do líquido para um novo tubo que continha 800µl de metanol 80% gelado. As amostras foram misturadas vigorosamente por 1 minuto e centrifugadas a 14.000 rpm por 15min a 4C. O sobrenadante contendo os metabólitos foi transferido para um novo tubo e submetido a análise de metabolômica.

A identificação e quantificação relativa dos metabólitos foi feita no equipamento QTRAP 5500 LC-MS/MS (AB Sciex), utilizando o método *Selected Reaction Monitoring* (SRM), seguido de uma análise de integração da área do pico com o software MultiQuant 2.0 (YUAN et al., 2012). Em cada amostra, a área de pico de cada metabólito identificado foi normalizada contra o Total Ion Count (TIC) de todos os metabólitos identificados, a fim de corrigir qualquer variação. Em seguida, os dados normalizados foram usados para análises estatísticas e de enriquecimento de vias no software MetaboAnalyst 3.0 (XIA; WISHART, 2002).

Análise de expressão gênica

Para a análise de expressão gênica, nós maceramos amostras tumorais com cerca de 15-20mg e extraímos o RNA com o kit Direct-zol RNA MiniPrep Kit (Zymo Research). O RNA teve sua integridade checada e foi utilizado para a preparação da biblioteca com o kit TruSeq Stranded mRNA Library Prep (Illumina), seguido de sequenciamento no HiSeq 4000 (Illumina) pelo serviço de Genômica e Bioinformática da Texas A&M University.

Os dados brutos foram tratados conforme descrito anteriormente em Análise do Exoma, tendo por fim sua qualidade checada com o software FastQC. No entanto, a análise do RNA-seq foi feito de uma maneira diferente com o software CLC Genomics Workbench 8 (Version 8.0.1). Nesse software, os arquivos “.fastq” foram mapeados contra a sequência de referência do *Mus musculus* (GRCm38). Rodamos então a ferramenta de análise de RNA-seq com as opções “Genome annotated with Genes and transcripts” e “Map to gene regions only”, que leva em consideração genes e transcritos anotados anteriormente e ignora todas as regiões intergênicas na referência. A análise de expressão diferencial foi feita com a ferramenta “Empirical Analysis of DGE”, colocando o grupo *Tfam*^{+/+} como controle. Essa ferramenta é baseada no edgeR, *package* que utilizamos nas outras análises de RNA-seq. Análises de via, enriquecimento, reguladores *upstream* e integração de dados com o perfil metabólico foram feitos no *Ingenuity Pathway Analysis* (Qiagen).

qRT-PCR

O RNA extraído anteriormente foi também utilizado para a síntese de cDNA (RT) usando o kit qScript XLT cDNA SuperMix (Quanta Bio). Com o cDNA nós realizamos a PCR quantitativa com o SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) no equipamento CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). As expressões gênicas foram determinadas utilizando o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando o gene GAPDH como normalizador. A sequência dos *primers* usados para a validação da qPCR podem ser encontrados na tabela 3.

Tabela 3: Sequência dos *primers* utilizados na qPCR

Gene	Sequencia dos <i>primers</i>
Gapdh- F	5'- GACTTCAACAGCAACTCCCAC- 3'
Gapdh - R	5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTA- 3'
Tfam- F	5'- AAGGATGATTGGCTCAGG- 3'
Tfam- R	5'- GGCTTTGAGACCTAACTGG- 3'
MadCam1- F	5'- GGGCAGGTGACCAATCTGTA- 3'
MadCam1- R	5'- ATAGGACGACGGTGGAGGA- 3'
Glud1- F	5'- GACGACCCCAACTTCTTCAA- 3'
Glud1- R	5'- CAGCTTGTCCTCTACGATGCT- 3'
Gls- F	5'- GCACAGACATGGTTGGGATA- 3'
Gls - R	5'- TTCACATGTCACTTCAATAGAGCA- 3'

Western blot

Para a obtenção de proteínas, nós homogeneizamos amostras tumorais com cerca de 30mg em tampão RIPA contendo inibidores de proteinase, utilizando *beads* de zircônia de 2,0mm no Mini-Bead-Beater-16 (Biospect). Os lisados foram quantificados com o kit Pierce BCA Protein Assay.

Após a quantificação, 25-30µg do lisado foi misturada com 6x SDS e aquecida a 95°C por 5 minutos. Foi utilizado o sistema vertical de eletroforese Mini-PROTEAN Tetra cell (BioRad), conforme instruções do fabricante. À cuba de eletroforese foi adicionado o tampão de corrida (Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 1%), com 100V constante. As proteínas foram eletrotransferidas para membranas de PVDF (Hybond-P, GE Life Sciences, EUA), utilizando o sistema Mini Trans-Blot (BioRad) com tampão de transferência gelado (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) por aproximadamente 1 hora a 100 V. Após a transferência, a membrana foi lavada com água destilada e embebida em metanol. Em seguida, foi colocada em por 30min em uma incubadora a 37C para secar.

Uma vez seca, foi adicionado o anticorpo primário e deixado *overnight* a 4C em uma baixa rotação (11rpm). Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada cinco vezes, por 5min com PBS 1x. Em seguida a membrana foi incubada por 1 hora, em temperatura ambiente, com o anticorpo secundário previamente diluído na proporção de 1:20.000 em tampão de bloqueio. Após a incubação, a membrana foi lavada 10 vezes por 5min com PBS 1x. Após a lavagem, a membrana foi incubada por 3 minutos com o substrato ECL-Plus (GE Life Sciences, EUA) e, então, levada a sala escura onde foram reveladas. O anticorpo anti- HSP60 foi usado como controle de carregamento de proteínas no gel e para normalização da quantidade de proteína de interesse.

4.2.14 Análises estatísticas

Os testes estatísticas e gráficos foram feitas no R utilizando o package R Commander (FOX, 2005) e no GraphPad Prism 6, com um nível de significância estabelecida em $p < 0,05$. Os testes estatísticos aplicados estão descritos em cada um dos resultados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados do sequenciamento

Para avaliar a instabilidade do genoma mitocondrial, nós sequenciamos o exoma das linhagens de melanoma. Optamos por essa metodologia, ao invés do sequenciamento apenas do genoma mitocondrial, pois o sequenciamento do exoma nos dá a possibilidade de avaliar também alguns genes nucleares que tem papel importante na função mitocondrial.

No sequenciamento, foram gerados um total de 379,36 milhões de *reads*. Destes, 86% passaram os filtros iniciais pré-estabelecidos pela Illumina. Embora a maioria das *reads* tenham apresentado uma boa qualidade ($Q > 28$), as *reads* das *lanes* 7 e 8 tiveram uma qualidade abaixo das demais. Então, utilizamos o software Prinseq para retirar as sequências com a qualidade média inferior a 20 ($Q < 20$) e com pelo menos uma base com qualidade menor que 20. Após o filtro, checamos novamente a qualidade no software Fastqc (Fig. 13), e prosseguimos para o mapeamento com um total de 245,33 milhões de sequências filtradas. Os dados de números de sequências filtradas, mapeadas, média de cobertura e qualidade das sequências mapeadas por amostras encontram-se na tabela 4.

Valores de qualidade por base antes (A) e após aplicação de filtros (B).

Figura 13: Qualidade do sequenciamento O Gráfico mostra o valor de qualidade Phred (eixo Y) em cada posição de um *read* de 55pb (eixo X). Os box plots em amarelo demonstram a qualidade em cada posição do *read*. Ainda, a linha vermelha e a linha azul representam os valores de mediana e média das qualidades, respectivamente, para cada posição. As figuras mostram a qualidade do sequenciamento antes (A) e após (B) a aplicação do filtro de qualidade.

Tabela 4: Estatísticas do sequenciamento do exoma.

Parâmetro/Linhagem	FM308	WM35	WM1789	WM1552	WM902	WM278	WM793	1205LU	WM1617	WM9
Número total de sequências iniciais	26165058	32995264	30847393	28238056	36022280	32256708	34361476	17024506	29540635	38205254
Boas sequências (pares)	4949616	14261134	9044362	8391188	18333575	12577804	17680559	7058322	12604848	18533413
Boas sequências (singletons)	14324050	12253496	13915776	12793966	11509240	14457136	11014807	6716570	11362915	13557034
Sequências retiradas após filtros	6891392	6480634	7887255	7052902	6179465	5221768	5666110	3249614	5572872	6114807
Sequências mapeadas	20.458.41 8 / 56,98%	18.021.81 3 / 54,05%	16.780.87 4 / 55,1%	20.020.31 7 / 55,68%	19.240.26 2 / 54,83%	19.920.59 5 / 54,71%	16.441.78 9 / 54,54%	9.927.636 / 55,34%	16.102.53 7 / 52,98%	18.520.58 4 / 56,19%
Taxa de duplicação	38,59%	36,44%	36,02%	37,88%	37,61%	38,55%	35,43%	29,06%	34,47%	38,07%
Média de cobertura	16,24	14,29	13,31	15,87	15,28	15,8	13,05	7,88	12,78	14,72
Média da qualidade do mapeamento	52,96	52,55	52,93	52,5	52,82	52,59	52,91	52,89	52,58	52,85

A princípio avaliamos somente o genoma mitocondrial das linhagens. O exoma foi capaz de cobrir 100% do genoma mitocondrial da maioria delas. A amostra que teve uma menor cobertura horizontal foi o melanócito, com 99,6% do mtDNA coberto (Fig. 14A). Quanto a cobertura vertical, obtivemos uma média de 55x, no entanto a cobertura média de cada linhagem variou bastante (Fig. 14B e Fig. 15). A amostra que obteve uma menor cobertura foi o melanócito (14,75x), porém, como a qualidade das sequências estava alta, prosseguimos com as análises de mutação.

Foram encontradas 86 mutações ao longo de todo o genoma mitocondrial (Fig. 15). Destas, 47% (40/86) eram não-codificantes, 34% (29/86) eram sinônimas e 19% (17/86) não-sinônimas (Fig. 14C). Todas as mutações encontradas estão no apêndice A.

Das mutações em regiões não-codificantes de proteínas, 72,5% (29/40) estavam na região do DLOOP. A alta taxa de mutação nessa região já havia sido demonstrado em um estudo com tecidos e duas linhagens de melanoma metastático, sugerindo que o DLOOP é preferencialmente mutado no mtDNA (MITHANI et al., 2008). No entanto, um outro estudo que avaliou somente a região não-codificante de amostras de melanoma, não estabeleceu nenhuma correlação entre mutações somáticas nessa região e características clínico-patológicas (TAKEUCHI; FUJIMOTO; HOON, 2004).

Figura 14: Estatísticas do sequenciamento do genoma mitocondrial. (A) Cobertura horizontal do genoma mitocondrial demonstrando que obtivemos uma alta cobertura em todas as linhagens. (B) Média da cobertura vertical do genoma mitocondrial. Houve uma grande variação da cobertura média entre as linhagens. (C) Gráfico de pizza representando a porcentagem de mutações em regiões não-codificantes, Sinônimas e Não-sinônimas. As mutações não-sinônimas foram sub-categorizadas por genes. (D) O diagrama de Venn mostra o número de mutações encontradas em cada fase de progressão do melanoma e no melanócito.

Além disso podemos observar que, dentre as mutações não-sinônimas, os genes do Complexo I aparecem mais mutados quando comparado com os genes de outros complexos (Fig. 14C). Esse dado já havia sido observado anteriormente em tecidos de melanoma (MITHANI et al., 2008) e mutações nos genes do Complexo I foram previamente associados com alterações no potencial metastático, consequente do aumento de produção de ROS e reprogramação metabólica (ZHOU et al., 2007).

Figura 15: Circos plot representando o mtDNA. Todas as 86 mutações encontradas e a cobertura média de cada linhagem de melanoma. Pontos externos representam mutações encontradas respectivamente nos genes do circos plot. Entre os pontos, cada cor representa as mutações encontradas em cada estágio do melanoma: verde na RGP; amarelo na VGP; vermelho em linhagens de melanoma metastático (MET); azul no melanócito, magenta mutações comuns ao RGP e MET, laranja comuns a VGP e MET. Círculos internos representam a cobertura de sequenciamento na seguinte ordem, de dentro para fora: FM308, WM35, WM1552, WM1789, WM278, WM793, WM902, 1205Lu, WM1617 e WM9.

Adicionalmente, nos encontramos apenas quatro mutações em heteroplasmia (apêndice A). Uma mutação na região D-LOOP e três mutações não sinônimas, duas no gene ND4 e uma no gene CO3, todas com alto potencial patogênico. Algumas hipóteses podem ser levantadas acerca do baixo número de heteroplasmias. Ambas se baseiam no simples modelo de herança, onde os genomas mitocondriais são passados ao acaso para cada célula-filha, seguida da divisão mitocondrial, após a mitose. Em uma primeira hipótese, ao longo das passagens das linhagens celulares os alelos menos frequentes se perderiam (deriva genética), já em uma segunda hipótese, os genomas mitocondriais que conferem alguma vantagem às células seriam selecionados. Nos dois casos ocorre uma inclinação ao aumento da frequência de um genoma sobre do outro, levando a homoplasia (COLLER et al., 2001).

No entanto, Jayaprakash *et al.* observaram a presença de cerca de 5 a 21 mutações em heteroplasmia em linhagens celulares (JAYAPRAKASH et al., 2015). Os dados contrastantes podem ser explicados devido a diferenças na cobertura vertical resultante do

sequenciamento dos estudos. Enquanto o nosso estudo teve uma cobertura vertical média de 55x, o estudo de Jayaprakash *et al.* teve uma cobertura média de 3000x, tornando-o mais eficaz para detecção de heteroplasma.

Vinte e três mutações que foram encontradas no nosso estudo haviam sido previamente associadas com câncer. Ainda, 7 mutações foram encontradas somente no melanócito, 30 mutações somente em linhagens da RGP, 13 mutações em linhagens da VGP e 9 mutações em linhagens metastáticas (Fig. 14D). Utilizamos esses dados de mutações por fase para análises posteriores.

5.2 Instabilidade do genoma mitocondrial por fase do melanoma

Em seguida analisamos o grau de instabilidade mitocondrial, quantificando o número total de mutações e número de cópias mitocondriais por fase do melanoma, a fim de verificar se há um aumento da instabilidade ou alteração no número de cópias do mtDNA em fases mais avançadas, já relatada anteriormente para outros tipos tumorais (DE ARAUJO *et al.*, 2015).

Primeiramente, nós avaliamos o número total de mutações por fase do melanoma e vimos que não houve diferença entre as fases ($p=0,6969$, Teste de Kruskal-Wallis) (Fig. 16A). Quando analisamos cada linhagem separadamente, pudemos observar que o número de mutações variou bastante entre elas (Fig. 16B). Diante disto, fizemos uma clusterização hierárquica, utilizando as frequências de mutações em cada gene mitocondrial codificante de proteína, para analisar se as linhagens se agrupariam baseada apenas na frequência de mutação no mtDNA. Como resultado, observamos a formação de dois clusters, um altamente mutado e outro pouco mutado, onde as linhagens se agruparam independente de fases de progressão (Fig. 16C).

Em seguida, avaliamos o número de cópias do mtDNA por fase do melanoma e, novamente, não conseguimos estabelecer uma correlação ($p=0,6024$, Teste de Kruskal-Wallis) (Fig. 17A). Assim como ocorreu com o número de mutações, o conteúdo mitocondrial variou bastante entre as linhagens (Fig. 17B).

Figura 16: Análise do número de mutações por fase do melanoma. (A) Não houve associação entre o número de mutações encontradas nas linhagens e os estágios do melanoma ($p=0,6969$, teste de Kruskal-Wallis); (B) Número de mutações por linhagem, mostrando que os números variaram muito independente de estágio; (C) Clusterização hierárquica utilizando as frequências de mutações dos genes mitocondriais codificantes de proteínas. A clusterização indica a formação de dois clusters distintos: um cluster altamente mutado (barra laranja) e um menos mutado (barra vermelha).

Figura 17: Análises do número de cópias do mtDNA nas fases do melanoma. (A) Não houve associação entre o número de cópias relativas do mtDNA ($p=0,6024$, teste de Kruskal-Wallis) com os fases do melanoma. (B) Conteúdo do mtDNA por linhagem, mostrando que os números variaram muito independente de fase.

Em um estudo anterior do nosso grupo, nós observamos um aumento no número de mutações e de cópias no mtDNA em fases mais avançadas de câncer colorretal quando comparadas com fases iniciais, utilizando amostras do mesmo paciente (DE ARAUJO et al., 2015). No entanto, nesse estudo não conseguimos estabelecer uma correlação entre instabilidade no genoma mitocondrial com as fases do melanoma.

Estudos anteriores que avaliaram diferentes aspectos genéticos observaram algumas diferenças entre as fases de progressão do melanoma (HAQQ et al., 2005; GREENE et al., 2009). Greene *et al.* avaliando mutações nos oncogenes NRAS e BRAF, observaram um

aumento das taxas de mutações ao longo da progressão desse câncer (GREENE et al., 2009). Resultados similares foram relatados por Demunter *et al.*, onde mutações no gene NRAS, que ocorrem em fases iniciais do melanoma, tendem a continuar em fases mais avançadas, provando a relação clonal entre fases sucessivas (DEMUNTER et al., 2001). Esse trabalho também relatou alguns casos onde houve aumento no número de mutações em fases mais avançadas do melanoma.

Tanto o estudo de Greene *et al.* como de Demunter *et al.* utilizaram amostras de tumores iniciais e avançados do mesmo paciente. No nosso estudo, as linhagens das diferentes fases de progressão foram estabelecidas de pacientes diferentes, com exceção do par WM793/1205LU e WM278/WM1617. Em ambos os casos, o número de mutações no mtDNA se manteve nas linhagens metastáticas quando comparadas com a VGP, como já observado anteriormente (DEMUNTER et al., 2001). No entanto, quando avaliamos o conteúdo do mtDNA, observamos um aumento deste na WM1617 (MET) quando comparada com a WM278 (VGP).

Acreditamos que o fato da maioria das linhagens de melanoma utilizadas nesse estudo serem de pacientes diferentes, pode ter interferido na nossa hipótese inicial de estabelecer uma correlação entre as fases de melanoma com um aumento da instabilidade mitocondrial. Diante disso, alteramos nossa abordagem e prosseguimos com as análises para avaliar se a instabilidade mitocondrial interfere em alguns aspectos metabólicos das células, independente da fase do melanoma.

5.3 Avaliação do impacto da instabilidade do mtDNA no metabolismo energético em linhagens de melanoma

Para investigar os efeitos da instabilidade do mtDNA no metabolismo energético das linhagens de melanoma, nós realizamos ensaios de quantificação de peróxido de hidrogênio e de ATP, medições de consumo de glicose e produção de lactato, seguido de cálculo de eficiência metabólica, a fim de estabelecer alguma correlação entre o acúmulo de mutações e variações no número de cópias do mtDNA com o metabolismo das células de melanoma.

Para cada um dos ensaios, nós comparamos os *clusters* de linhagens diferencialmente mutados (Fig. 16C), além de realizar correlações com o número de cópias do mtDNA. Os resultados referentes a cada um desses ensaios e suas respectivas discussões serão mostrados abaixo.

5.3.1 Quantificação de peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio é uma das espécies reativas de oxigênio com maior significância fisiológica (BIRBEN et al., 2012), e a OXPHOS, situada na membrana mitocondrial interna, é a principal fonte de ROS da célula. Diante disso, analisamos se as variações no mtDNA estão associadas com a produção de ROS nas linhagens de melanoma.

Os ensaios de quantificação de peróxido de hidrogênio mostraram que os níveis dessa molécula variaram bastante entre as linhagens, independentemente de fase do melanoma (Fig. 18A). As linhagens da RGP, WM35 e a WM1789 foram as que mais produziram H_2O_2 basalmente, e a WM1552, também pertencente a RGP, foi a que menos produziu peróxido de hidrogênio. Adicionalmente, não houve nenhuma associação entre os níveis de H_2O_2 com os clusters diferencialmente mutados (Fig. 18B) ($p=0.66$, teste t de Student) e com o conteúdo do mtDNA nas linhagens de melanoma (Fig. 18C) ($r=0,0734$, $p=0.57$, correlação de Pearson).

Figura 18: Quantificação dos níveis de peróxido de hidrogênio nas linhagens de melanoma. (A) Quantificação absoluta dos níveis de peróxido de hidrogênio nas linhagens de melanoma, mostrando que os níveis variaram bastante entre as linhagens. O tratamento com t-butyl foi usado como controle positivo do experimento. Não houve associação entre a produção de peróxido de hidrogênio com os clusters diferencialmente mutados no mtDNA ($p=0.66$, teste t de Student) (B) ou com o conteúdo de mtDNA ($p=0.57$, correlação de Pearson) (C).

Anteriormente, alguns estudos já haviam relatado mutações e alterações no número de cópias do mtDNA aumentando a produção de ROS (ISHIKAWA et al., 2008; CAIRNS;

HARRIS; MAK, 2011; MEI et al., 2015). Por outro lado, Tan *et al.* utilizaram uma abordagem em que o genoma mitocondrial de células tumorais foi depletado e não observaram diferença nos níveis de peróxido de hidrogênio em células sem mtDNA (TAN et al., 2015). Adicionalmente, Imanishi *et al.*, demonstraram em estudo *in vitro*, que mutações em genes do complexo I do mtDNA podem elevar a produção de lactato, gerando um efeito similar ao de Warburg, sem alterar a produção de ROS (IMANISHI et al., 2011).

O papel dos ROS na tumorigênese é bastante controverso. Ao mesmo tempo que essas moléculas promovem a iniciação tumoral, por ser um agente mutagênico e ativando algumas vias proliferação e invasão, o excesso delas pode limitar a iniciação e progressão do câncer, devido a morte celular consequente do estresse oxidativo (GILL; PISKOUNOVA; MORRISON, 2017). Recentemente, Luo *et al.* descreveram que o PGC1- α , regulador da biogênese mitocondrial que também protege contra o estresse oxidativo, tem uma expressão bastante heterogênea no melanoma (LUO et al., 2016), sugerindo que cada célula tumoral tem mecanismos diferentes para lidar com ROS.

Diante disso, mesmo observando que os fenótipos oxidativos das linhagens de melanoma foram independentes da instabilidade do genoma mitocondrial, nós prosseguimos com as análises de bioenergética.

5.3.2 Quantificação de ATP

A OXPHOS é a via metabólica mais eficiente para a produção de ATP nas células eucariotas (WARD; THOMPSON, 2012), no entanto, sabe-se que as células cancerosas também utilizam de vias metabólicas alternativas menos eficientes. Visto disso, nós analisamos se as variações no mtDNA estão associadas com variações na produção de ATP.

Figura 19: Quantificação dos níveis de ATP nas linhagens de melanoma. (A) Quantificação absoluta dos níveis ATP basalmente e após tratamento com 10μM de oligomicina por 30 minutos. O tratamento com oligomicina foi usado como controle do experimento. (B) Não houve associação entre a produção ATP com o os clusters diferentemente mutados no mtDNA ($p=0.06$, teste t de Student). (C) Obtivemos uma correlação positiva entre os níveis de ATP e o número de cópias do mtDNA nas linhagens ($r=0,86$, $p=0,002$, correlação de Pearson).

Os resultados mostram que as linhagens WM35 (RPG), 1205Lu (MET) e WM9 (MET) foram as que mais produziram ATP basalmente (Fig. 19A). Não foi observada nenhuma correlação entre os níveis de ATP e os grupos de linhagens diferencialmente mutados ($p=0.06$, Teste t de student) (Fig. 19B), no entanto, nós vimos uma correlação positiva entre o número de cópias do mtDNA e os níveis de ATP ($r=0,86$, $p=0,002$, correlação de Pearson) (Fig. 19C).

Em um estudo anterior, onde foi adicionado o Fator de Transcrição A mitocondrial (TFAM) recombinante em células de neuroblastoma, Thomas *et al.* observaram que as células aumentaram o número de cópias do mtDNA e a produção de ATP (THOMAS *et al.*, 2011b). Além disso, Tan *et al.* também observaram uma diminuição nos níveis de ATP em células sem mtDNA. Ambos os trabalhos corroboram com os dados encontrado no nosso estudo, confirmando a correlação positiva entre mtDNAcn e ATP (TAN *et al.*, 2015). Como já mencionado anteriormente, a OXPHOS é o principal produtor de ATP da célula, uma diminuição na função mitocondrial desencadeado por alterações no número de cópias do mtDNA, pode ter como consequência a diminuição dos níveis basais de ATP.

5.3.3 Quantificação de glicose, lactato e eficiência metabólica

Já é bem descrito que as células tumorais desviam o metabolismo de glicose da OXPHOS em favor da glicólise aeróbica (Efeito Warburg) (KULAWIEC; OWENS; SINGH, 2009; GENTRIC; MIEULET; MECHTA-GRIGORIOU, 2017), aumentando assim a produção de lactato e o consumo de glicose. Diante disso, nós avaliamos os efeitos da instabilidade mitocondrial nas taxas de consumo e produção desses metabólitos, além de calcular a eficiência metabólica das linhagens, conforme descrito em Schop *et al.* (SCHOP *et al.*, 2009).

Em resumo, a taxa de consumo de glicose (qGlc) e de produção de lactato (qLac) representam quantos pmols de metabólito foi consumido (valores negativos) ou produzidos (valores positivos) por célula por dia. Os valores de qGlc e qLac foram posteriormente usados para calcular a eficiência metabólica ($\gamma_{lac/glc}$) das linhagens, valor que representa o quanto de glicose está sendo convertida em lactato.

A análise de quantificação de glicose demonstrou que as taxas de consumo deste metabólito variaram bastante entre as linhagens (Fig. 20A) e, além disso, não houve associação entre qGlc e algum cluster diferencialmente mutado ($p=0,8670$, teste t de student) (Fig.20B). No entanto, observamos uma associação positiva entre a taxa de consumo de glicose e mtDNAcn, indicando que quanto maior o número de cópias do mtDNA, maior o consumo de glicose ($r=0,68$, $p=0,0436$, correlação de Pearson) (Fig.20C). Já nas análises de quantificação do lactato (Fig.21A), não observamos nenhuma correlação entre as taxas de produção de lactato com os clusters diferencialmente mutados ($p=0,3343$, teste t de student) (Fig.21B) ou com o mtDNAcn ($r=0,0078$, $p=0,4933$, correlação de Pearson) (Fig.21C).

Figura 20: Quantificação do consumo de Glicose nas linhagens de melanoma. (A) Média da taxa de consumo de glicose por linhagem de melanoma. Não houve associação entre taxa de consumo de glicose com variações no número de mutações no mtDNA ($p=0,8670$, teste t de student) (B), no entanto, pudemos observar uma correlação positiva entre depleção no mtDNA e taxa de consumo de glicose ($r=0,68$, $p=0,0436$, correlação de Pearson) (C). No gráfico de correlação foram colocados os valores absolutos dos qGlc.

Figura 21: Quantificação da produção de Lactato nas linhagens de melanoma. (A) Média da taxa de produção de Lactato por linhagem de melanoma. Não houve associação entre taxa de consumo de glicose com variações no número de mutações no mtDNA ($p=0,3343$, teste t de student) (B) ou com o número de cópias do mtDNA ($r=0,0078$, $p=0,4933$, correlação de Pearson) (C).

Por outro lado, quando calculamos a eficiência metabólica das linhagens de melanoma (Fig. 22A), observamos uma correlação negativa entre os valores de $\gamma_{lac/glc}$ e o conteúdo de mtDNA ($r=0,0078$, $p=0,041$, correlação de Pearson) (Fig. 22C). Valores de $\gamma_{lac/glc} > 2$ sugerem uma menor utilização da OXPHOS, indicando que linhagens de melanoma com menor mtDNAcn estariam dependendo mais da glicólise aeróbica que linhagens com maiores mtDNAcn. Não houve diferença entre os valores de $\gamma_{lac/glc}$ entre os clusters com diferentes quantidades de mutações no mtDNA ($p=0,3370$, teste t de student) (Fig. 22B).

Figura 22: Cálculo da produção de lactato a partir da glicose.

(A) $\gamma_{lac/glc}$ mede a produção de lactato por mol de glicose. $\gamma > 2$ indica que uma maior parte da glicose está sendo convertida para lactato. Podemos ver que as linhagens WM1552 e WM1789 tiveram um $\gamma > 2$, indicando um metabolismo mais glicolítico. (B) Não houve diferença no $\gamma_{lac/glc}$ entre os clusters diferentemente mutados ($p=0,3370$). No entanto, observamos uma correlação negativa entre conteúdo do mtDNA e o $\gamma_{lac/glc}$ ($r=-0,69$, $p=0,0410$, correlação de Pearson) (C).

A reprogramação metabólica já é bem descrita em vários cânceres, especialmente no melanoma. Inclusive, como já mencionado anteriormente, Haq *et al.* observaram que a mutação BRAF^{V600E} promove a reprogramação metabólica, suprimindo a OXPHOS pela regulação da biogênese mitocondrial. O estudo também relatou que houve uma reversão do fenótipo metabólico após tratamento vemurafenib, inibidor de BRAF mutado (HAQ et al., 2013). Investigamos então as mutações nas nossas linhagens

de melanoma e todas elas tinham mutação no gene BRAF: a maioria delas possuem a variante V600E, enquanto a WM1789 possui a mutação K601E, que ocorre em cerca de 5% dos pacientes com melanoma.

Estudos pré-clínicos mostraram que a variante BRAF^{K601E} tem uma menor resposta ao vemurafenib quando comparado com portadores de BRAF^{V600E}, indicando mecanismos pro-oncogênicos diferente dessa variante (DAHLMAN et al., 2012). Nossos dados mostraram que a WM1789 é a linhagem que mais parece depender da glicólise aeróbica (efeito warburg), mediante ao alto valor de produção de lactato (qLac= 11.94) e de $\gamma_{lac/glc}$ (2,9) (Fig. 22A).

Adicionalmente, o estudo de Tan *et al.*, relatou um aumento no consumo de glicose e de produção de lactato em células com mtDNA depletado (TAN et al., 2015). Esse dado não foi observado no nosso trabalho quando avaliamos os valores de consumo de glicose e produção de lactato separadamente, no entanto, ao calcular a eficiência metabólica observamos uma correlação entre maior dependência da glicose aeróbica com menor mtDNAcn (Fig. 22C), similar ao observado por Tan *et al.*

Curiosamente, quando avaliamos somente o consumo de glicose e eficiência metabólica, nós vimos uma correlação inversa do já descrito na literatura (Fig. 20C), onde as células com menor mtDNAcn e menos dependente de OXPHOS, estavam consumindo menos glicose que células com maiores mtDNAcn. Como já se sabe, células sob o efeito Warburg consomem mais glicose (WARD; THOMPSON, 2012), pois a eficiência na produção de ATP via a glicólise aeróbica é bem menor que via a OXPHOS.

Buscando na literatura, nós observamos que outras vias alternativas podem estar ativas nessas linhagens com menor mtDNAcn, como por exemplo a via metabólica da glutamina, que alimenta o ciclo de Krebs via o α -cetoglutarato, mantendo seus intermediários ativos, bem como também gerando ATP para a célula (DEBERARDINIS et al., 2007; ALTMAN; STINE; DANG, 2016). Inclusive, já foi relatado anteriormente que células com disfunção mitocondrial utilizam o α -cetoglutarato pra suprir algumas necessidades bioenergéticas (MULLEN et al., 2014), acreditamos que as linhagens do nosso trabalho com menor mtDNAcn estejam também utilizando a via metabólica do glutamato. Estudos posteriores de metabolômica e fluxo metabólico poderiam nos confirmar essa hipótese.

5.3.4 Avaliação do efeito de mutações em genes nucleares com papel na função mitocondrial no metabolismo energético das linhagens de melanoma

A mitocôndria é uma organela central no metabolismo da célula, e embora ela possua genoma próprio, milhares de genes codificados no genoma nuclear codificam proteínas que são enviadas para dentro da mitocôndria. Como nós sequenciamos o exoma das linhagens de melanoma, avaliamos também mutações em um grupo de genes que atuam em vias metabólicas e na biologia mitocondrial.

Nessa análise, utilizamos apenas mutações não-silenciosas, ou seja, que tem algum efeito imediato sobre a proteína como, por exemplo, as mutações não-sinônimas, *frameshifts*, entre outras (Fig. 23). Uma vez determinado o número de mutações por linhagem, fizemos testes de correlações (Teste de Pearson) entre o número de mutações no grupo de genes nucleares com as análises de bioenergética discutidas anteriormente. A lista contendo 2858 genes foi adaptada de uma previamente publicada por Possemato *et al.* e segue no apêndice E (POSSEMATO *et al.*, 2011).

Não encontramos nenhuma correlação entre o número de mutações nos genes nucleares (Fig. 23A) com os níveis de peróxido de hidrogênio ($p=0.6723$) (Fig. 23B), os níveis de ATP ($p=0.1205$) (Fig. 23C), taxa de consumo de glicose ($p=0.437$) (Fig. 23D), taxa de produção de lactato ($p=0.4997$) (Fig. 23E) ou com eficiência metabólica ($p=0.3828$) (Fig. 23F). Sugerindo que o acúmulo de mutações em genes metabólicos não interferiu no metabolismo energético nas linhagens de melanoma.

Figura 23: Análises de correlação entre o número de mutações em genes metabólicos e com papel na biologia mitocondrial que são codificados no genoma nuclear. (A) Número total de mutações não silenciosas por amostrass. Análise de correlação entre o número de mutações com os níveis de peróxido de hidrogênio ($r=0.17$, $p=0.6723$, correlação de Pearson) (B), níveis de ATP ($r=0.59$, $p=0.61205$, correlação de Pearson) (C), taxas de consumo de glicose ($r=-0.0743$, $p=0.4371$, correlação de Pearson) (D), taxas de produção de lactato ($r=0.0003$, $p=0.4997$, correlação de Pearson) (E) e eficiência metabólica ($r=0.1393$, $p=0.3828$, correlação de Pearson) (F).

Em resumo, na avaliação do impacto da instabilidade do mtDNA no metabolismo energético, nós observamos correlação significativa entre o número de cópias do mtDNA com alguns fenótipos bioenergéticos como, níveis de ATP, consumo de glicose e eficiência metabólica, indicando uma maior associação entre o número de cópias do mtDNA com fenótipos metabólicos em linhagens de melanoma. Não estabelecemos nenhuma correlação com as análises dos clusters diferencialmente mutados no mtDNA ou de número de mutações em genes mitocondriais codificados no núcleo, sugerindo que mtDNAcn pode ter maiores consequências no metabolismo energético do melanoma que os outros parâmetros avaliados.

O número de cópias do mtDNA já foi descrito como necessário para a manutenção mitocondrial (JENG et al., 2008) e a alteração no conteúdo do mtDNA é comum em vários tipos de câncer (REZNIK et al., 2016). O mtDNAcn é principalmente regulado pelo TFAM, responsável pela transcrição e pelo empacotamento do mtDNA (HALLBERG; LARSSON, 2011) (DANKORT et al., 2009), e diversos estudos já relataram uma forte correlação positiva entre a expressão desse gene com o conteúdo mitocondrial (TAN et al., 2015; WEST et al., 2015; REZNIK et al., 2016).

5.4 Análise de vias gênicas nucleares em linhagens de melanoma reguladas pelo TFAM

Como na avaliação do metabolismo energético nas linhagens de melanoma nós vimos que o número de cópias mitocôndrias parece ter impacto maior na bioenergética celular, nós prosseguimos nossas análises avaliando esse parâmetro por meio da expressão do gene TFAM, o principal regulador do número de cópias mitocôndrias e que tem sua expressão associada com o mtDNAcn (TAN et al., 2015; WEST et al., 2015; REZNIK et al., 2016).

Primeiramente, nós correlacionamos a expressão do TFAM nas linhagens de melanoma com o mtDNAcn e os dados de bioenergéticas. Obtivemos correlações positivas com mtDNAcn ($r=0,676$, $p=0,032$, correlação de Pearson) (Fig. 24A), taxa de consumo de glicose ($r=0,937$, $p=0,002$) (Fig. 24D) e valores próximos ao significativo com os níveis de ATP ($r=0,666$, $p=0,050$) (Fig. 24C). Não encontramos nenhuma correlação entre a expressão do TFAM com os níveis de peróxido de hidrogênio ($r=0,431$, $p=0,167$) (Fig. 24B), taxa de produção de lactato ($r=0,250$, $p=0,3164$) (Fig. 24E) ou com eficiência metabólica ($r=-0,589$, $p=0,8907$) (Fig. 24F).

Figura 24: Análises de correlação entre a expressão de TFAM nas linhagens de melanoma com mtDNAcn e os dados de bioenergética.

Embora não tenhamos encontrado correlação entre a expressão do TFAM e a eficiência metabólica, como havíamos encontrado nas análises de mtDNAcn, observamos correlações entre a expressão do TFAM com o consumo de glicose e uma tendência com os níveis basais de ATP, o que nos sugere que a expressão desse gene pode ser importante para o metabolismo do melanoma. Além disso, o silenciamento do TFAM já foi previamente associado com disfunção mitocondrial e mediando alterações metabólicas em outros tipos de câncer (LARSSON et al., 1998; BALLIET et al., 2011; XIE et al., 2016).

Diante disso, nós prosseguimos com as análises para investigar vias gênicas reguladas pelo TFAM. Os dados de RNA-seq das linhagens de melanoma haviam sido gerados anteriormente nosso grupo. Utilizando esses dados nós avaliamos separadamente a expressão de TFAM (Fig. 25A). Como resultado, nós observamos que as linhagens tinham a expressão bem homogênea, com exceção da WM35. Optamos então por expandir o painel de linhagens utilizando dados públicos, proveniente do trabalho de Pawlikowski *et al.* (PAWLIKOWSKI et al., 2013). Ao final, nosso painel de linhagens possuía as oito linhagens que havíamos analisado anteriormente (FM308, WM35, WM1552, WM1789, WM793, WM278, 1205LU, WM1617), somadas a oito linhagens proveniente dos dados públicos (EBRAF-MC, A375, A2058, c32, MalMe3M, SKMEL28, SKMEL5, WM2664). Novamente, nós avaliamos as expressões desse gene no painel de linhagens expandido e observamos que as expressões eram bem diferentes entre elas (Fig. 25B). Então, selecionamos células com expressões distintas, dividindo assim em dois grupos: baixa e alta expressão de TFAM (Fig. 25B). Para comprovar que as células selecionadas tinham realmente expressões distintas, comparamos estatisticamente os grupos e comprovamos a diferença ($p=0,0001383$, teste t de student) (Fig. 25C). Nessa etapa, nós optamos por excluir os melanócitos, mantendo apenas as linhagens de melanoma para evitar viés nas análises. Além disso, todas as linhagens selecionadas possuíam a mutação BRAF^{V600E}, já descrita como reguladora do metabolismo oxidativo (HAQ et al., 2013). Prosseguimos então com as análises de expressão diferencial utilizando esses dois grupos de linhagens. Acreditamos que utilizando linhagens com expressões bem diferentes do TFAM, podemos identificar melhor vias gênicas moduladas por ele.

Figura 25: Correlação do mtDNAcn com o TFAM e sua expressão nas linhagens de melanoma. (A) Expressão do TFAM nas linhagens de melanoma. (B) Variação na expressão do TFAM no painel de linhagens de melanoma adicionado aos dados públicos. (C) Expressão diferencial do TFAM entre os grupos com alta e baixa expressão desse gene, confirmando a diferença estatística entre os grupos ($p= 0,0001383$, teste t de student).

Nas análises de expressão diferencial entre os grupos, encontramos 295 genes diferencialmente expressos ($FDR < 0,05$), destes 131 *down* e 164 *up* regulados no grupo com baixa expressão de TFAM. Esses genes podem ser encontrados no apêndice B, com seus respectivos Ensembl ID, *fold change* e valores de p ajustados (FDR). Utilizamos esses genes diferencialmente expressos (*Differential expressed gene*, DEG) para identificar vias gênicas enriquecidas utilizando a plataforma DAVID. Como resultado, obtivemos algumas vias associadas a angiogênese, ao sistema nervoso e processos celulares, como migração e adesão celular, sugerindo que o TFAM pode regular diversos processos biológicos (Fig. 26). Interessantemente, a via de resposta a peróxido de hidrogênio também estava enriquecida, indicando que vias de respostas antioxidantes estão sendo reguladas por variações no TFAM/mtDNAcn, como havíamos sugerido anteriormente após as quantificações de peróxido de hidrogênio.

Figura 26: Análise de vias linhagens de melanoma. Principais vias gênicas enriquecidas pelos 295 genes diferencialmente expressos as linhagens de melanoma com diferente expressão de TFAM.

Investigando detalhadamente os DEGs mais diferentes entre os grupos, observamos dois alvos do HIF1- α com expressão aumentada em linhagens com baixa expressão de TFAM (Baixo TFAM), o LOX e o VEGFC (Fig. 27A). A Lisil Oxidase (LOX) é uma das principais enzimas responsáveis pela propriedade invasiva das células cancerosa em hipóxia, agindo em mecanismos de adesão celular (ERLER et al., 2006). Já o VEGFC foi descrito como atuando na linfangiogênese (CARMELIET, 2005), e também foi associado anteriormente com alguns tipos de câncer (SU et al., 2007; DUFIES et al., 2017).

Figura 27: Expressão diferencial linhagens de melanoma. Análise de expressão diferencial entre as linhagens de melanoma com diferente expressão do TFAM (A) *Volcano plot* mostrando os principais genes diferencialmente expressos entre as linhagens de melanoma. (B) *Heatmap* com o padrão de expressão dos genes alvos do HIF-alpha nas linhagens de melanoma e os dois clusters com expressão distinta entre os grupos.

Outros genes interessantes para o contexto tumoral também apareceram diferencialmente expressos, como o gene da 3-fosfoglicerato desidrogenase (PHGDH). Esse gene codifica a primeira enzima da via da serina, um intermediário importante em diversas vias de biossíntese, como a de nucleotídeos. O PHGDH já foi descrito como amplificado em melanoma e estudos indicam que esse gene confere vantagens de crescimento às células tumorais (MULLARKY et al., 2011; RATNIKOV et al., 2016), inclusive, o silenciamento desse gene em células com alta expressão dele, resultaram na diminuição da biossíntese de serina e da proliferação celular.

A PHGDH age na primeira etapa de biossíntese da serina a partir do 3-fosfoglicerato, que é formado a partir da quebra da glicose (Fig. 28). Como nas linhagens com menor expressão de TFAM/mtDNAcn nós observamos um menor consumo de glicose, a baixa expressão dessa enzima pode ser consequência de uma baixa concentração da 3-fostoglicerato. Análises de metabolômica e fluxo metabólico seriam necessárias para confirmar essa hipótese.

Além disso, interessante alguns genes relacionados ao sistema imune, como o ALCAM e o EMB, ambos membros de famílias de receptores de imunoglobulina (FAGERBERG et al., 2014), apareceram *down* regulados no grupo com baixa expressão do TFAM, sugerindo uma modulação da resposta imune por esse gene (Fig. 27A). Esse dado corrobora com a análise de vias, onde a via de resposta a citocina estava enriquecida (Fig. 26).

Como dito anteriormente, dois alvos do HIF1- α apareceram *up* regulados em linhagens de melanoma com menor expressão do TFAM. A estabilização do HIF1- α é o principal mecanismo ativado em situações de hipóxia celular e é muito descrita no contexto do câncer, pois induz a expressão de vários genes de angiogênese, proliferação, reprogramação metabólica e adesão celular que conferem vantagens à célula cancerosa. Inclusive, nas análises com os DEGs, observamos vias de angiogênese e adesão celular enriquecidas (Fig. 26).

Diante de sua importância na tumorigênese, avaliamos se outros alvos do HIF- α estavam sendo regulados pelo TFAM, investigando somente as suas expressões nas linhagens de melanoma (Fig. 27B). Primeiramente, observamos que as linhagens foram agrupadas de acordo com a alta ou baixa expressão do TFAM, indicando que esse gene pode ter um papel importante na modulação da resposta do HIF1alpha. Além disso, observamos a formação de *clusters* de genes com padrões distintos de expressões. Nos interessamos especificamente por dois clusters que estavam bem discrepantes: um *cluster* com a expressão mais elevada em linhagens com baixa expressão do TFAM (Fig. 27B-Cluster I), e outro com menor expressão (Fig. 27B-Cluster II).

A fim de investigar se havia prevalência de alguma propriedade nos *clusters*, categorizamos os genes quanto as suas principais funções na tumorigênese. Como resultado, nós vimos que os genes com uma maior expressão no grupo baixo-TFAM eram em sua maioria relacionados a angiogênese e invasão, corroborando com as análises de vias enriquecidas, o que sugere que a baixa expressão do TFAM pode induzir esses processos. Por outro lado, o *Cluster II* possuía apenas genes relacionados a metabolismo.

Ao investigar o papel dos genes do Cluster II, observamos que o ENO1, HK2 e LDHA codificam enzimas que participam da quebra da glicose em piruvato (Fig. 28). A hexoquinase (HK2) é a primeira enzima da glicólise, sendo responsável pela conversão de glicose em glicose-6-fosfato. A alpha-enolase (ENO1) age na mesma via, convertendo 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato e por fim, a lactato desidrogenase (LDHA) que converte piruvato em lactato, que tem a expressão bem característica da reprogramação metabólica (STRICKAERT et al., 2017).

Assim como sugerido anteriormente, como as linhagens de melanoma com menor mtDNAcn/TFAM consumiram menos glicose, acreditamos que essa diminuição na expressão das enzimas do metabolismo e quebra da glicose pode ser consequência do menor consumo deste metabólito. Como já descrito, o metabolismo tumoral é bastante heterogêneo e as células cancerosas podem depender de outras vias alternativas como fonte de carbono, como por exemplo a via do glutamato (RATNIKOV et al., 2016; STRICKAERT et al., 2017). Ainda, vale a pena salientar que nossas análises de expressão gênica utilizaram apenas 8 linhagens celulares de melanoma, um número amostral bastante limitado. Além disso, embora sejam bastante utilizadas, as linhagens celulares foram retiradas do microambiente tumoral há um certo tempo, o que pode desencadear padrões de expressões gênicas e epigenéticas diferentes das células tumorais originais (VAN STAVEREN et al., 2009). Então, para investigar melhor as vias gênicas pelas quais o TFAM pode regular os mecanismos celulares e metabólicos no melanoma, nós expandimos nossas análises para tecido humano, utilizando dados públicos depositados no TCGA.

Figura 28: Vias metabólicas com enzimas alteradas nas análises com as linhagens de melanoma. Glicólise e via de biossíntese da serina, destacando as enzimas metabólicas que estavam diferencialmente reguladas na análise de expressão gênica entre os grupos de alto e baixo TFAM. Enzimas em verde foram encontradas *down*-reguladas no grupo baixo TFAM. Figura modificada de (LUO, 2011; STRICKAERT et al., 2017).

5.5 Análises de vias gênicas nucleares em tumores de melanoma metastático reguladas pelo TFAM

Como comentado anteriormente, para expandir as análises das vias gênicas nucleares reguladas por TFAM, nós utilizamos dados de tecido tumoral humano proveniente do TCGA. Estavam disponíveis dados de RNA-seq de um total de 472 amostras de melanoma. Destas, selecionamos apenas as amostras que tinham a mutação no códon 600 do BRAF, uma vez que esse códon estava mutado nas linhagens de melanoma que foram avaliadas anteriormente e está associado com alteração do metabolismo oxidativo da célula (HAQ et al., 2013) (Fig. 29A). Com isso, iniciamos nossas análises com dados normalizados provenientes de 127 amostras de melanoma metastático.

Assim como fizemos com as linhagens de melanoma, primeiramente nós separamos as amostras baseados na expressão do TFAM. Para isso utilizamos percentis, medidas de estatística descritiva que ordenam e dividem a amostra em 100 partes iguais. Nós empregamos então o 25º e 75º percentis, para selecionar 25% das amostras com menor expressão do TFAM (Baixo TFAM) e os 25% das amostras com maior expressão do TFAM

(Alto TFAM) (Fig. 29B). Em seguida, prosseguimos com análise de expressão diferencial entre os dois grupos, cada um com 32 amostras.

Figura 29: Amostras de melanoma metastático proveniente do TCGA. (A) Lollipop de mutações no gene BRAF, mostrando as variantes encontradas nesse gene e o número de amostras de melanoma mutadas em cada região. (B) Gráfico quantil-quantil com a expressão do gene TFAM nas amostras, separando em grupos Alto e Baixo TFAM baseado nos percentis.

Nas análises de expressão diferencial, encontramos 796 genes diferencialmente expressos ($FDR < 0,05$), destes 385 *up*-regulados e 411 *down*-regulados no grupo baixo TFAM. Utilizamos esses genes para as análises de vias enriquecidas, como feito anteriormente, e interessante várias vias relacionadas a reparo de DNA e ciclo celular apareceram enriquecidas (Fig. 30A).

O TFAM foi primeiramente descrito como fundamental para a manutenção do mtDNA (LARSSON et al., 1998), e por mediar o empacotamento deste em nucleóides (HALLBERG; LARSSON, 2011). Inclusive, West *et al.* observaram que células *knockdown* para TFAM, apresentavam nucleóides em menor quantidade e mais extensos, indicando uma menor compactação do mtDNA, com posterior liberação do mtDNA para o citosol (WEST et al., 2015). As vias relacionadas a reparo de DNA enriquecidas com os DEGs, podem ser explicadas por uma resposta da célula à instabilidade decorrente do dano e liberação de DNA dupla-fita ao citosol, consequente da menor expressão do TFAM.

Quanto as vias de ciclo celular enriquecidas, Xie *et al.* relataram que a diminuição da expressão do TFAM em carcinoma de pulmão de células não pequenas, levou a suspensão do ciclo celular, e consequente bloqueio da proliferação e migração (XIE et al., 2016), com isso, acreditamos o TFAM também pode interferir em mecanismos do ciclo celular.

A fim de identificar melhor os padrões de expressão regulados por TFAM, nós analisamos os 70 genes que estavam mais diferencialmente expressos dentro da lista de 796 genes (Fig. 30B). Adicionamos também as informações de mutações nos principais genes associados com o melanoma BRAF, RAS e NF1, uma vez que já foi descrito que esses genes desencadeiam padrões de expressões gênicas distintos (NETWORK et al., 2015). Ao visualizar o *heatmap*, podemos observar que houve uma certa separação entre amostras com diferente expressão de TFAM e que essa separação foi independente de mutações nos genes RAS e NF1.

Ao investigar os genes que estavam mais diferencialmente expressos entre os grupos (Fig. 30B), vimos que não houve a formação de *clusters* bem delimitados, como observado anteriormente (Fig. 27B). No entanto, um dado que nos chamou atenção nessa análise foi que, assim como visto nas análises de expressão diferencial nas linhagens de melanoma, vários genes envolvidos na resposta imune apareceram, como o PTCRA e genes das cadeias de imunoglobulina, sugerindo uma modulação da resposta imune pelo TFAM.

Ainda, realizamos uma análise procurando reguladores *upstream* que estariam ativados ou inibidos, baseado nos genes diferencialmente expressos entre os grupos com diferente expressão do TFAM. Interessantemente, o VEGF estava predito como ativado (*Activation score* 3,838, $p=7,71E^{-10}$) nas amostras baixo TFAM, indicando que vários dos seus alvos estavam entre as DEGs (Fig. 30C). Esse dado reforça o achado anterior com as linhagens de melanoma, onde vimos vários genes de angiogênese, inclusive o VEGFC, *up-regulados* em amostras baixo TFAM. Diante disso, sugerimos que a depleção do TFAM pode induzir mecanismos pro-tumorigênicos no melanoma, corroborando com estudos em outros tipos tumorais onde o silenciamento desse gene levou a um aumento tumoral (BALLIET et al., 2011; WOO et al., 2012).

Curiosamente, diferente do que vimos nas análises de expressão gênica com as linhagens de melanoma, poucos genes relacionados com metabolismo apareceram. Como a disfunção mitocondrial e variação na expressão do TFAM tem consequências diretas sobre o metabolismo da célula, nós direcionamos as análises de expressão gênica para genes codificantes de enzimas e proteínas com papel no metabolismo.

Figura 30: Análises de via e de expressão diferencial em tumores de melanoma metastático. (A) Principais vias gênicas enriquecidas pelos 796 genes diferencialmente expressos nas amostras de melanoma metastático com diferente expressão de TFAM. (B) *Heatmap* com o padrão de expressão dos 70 genes mais diferencialmente expressos entre os grupos alto e baixo TFAM e as informações de mutações nos genes BRAF, RAS e NF1 para cada amostra.

5.5.1 Análises de vias metabólicas reguladas pelo TFAM em tumores de melanoma metastático

Como falado anteriormente, para avaliar melhor as vias metabólicas que podem ser reguladas pelo TFAM, fizemos uma seleção de enzimas metabólicas e genes com função mitocondrial na lista inicial de DEGs (FDR<0,05). Para a seleção, nós empregamos a lista contendo 2858 genes que havíamos usado anteriormente nas análises de exoma (Apêndice E) (POSSEMATO et al., 2011). Como resultado, encontramos 100 genes diferencialmente expressos, destes 68 genes *up*-regulados e 32 down-regulados no grupo baixo TFAM (Apêndice D). Análises de vias com esses genes nos mostrou uma série de vias de transporte de moléculas enriquecidas, como transporte de aminoácidos, glutamina e íon potássio. Ainda, também estavam enriquecidas vias de metabolismo de nucleosídeos, processos de oxidação e resposta ao estresse oxidativo (Fig. 31A).

Ao analisarmos os padrões de expressão dos 70 genes metabólicos mais diferencialmente expressos entre os grupos (Fig. 31B), podemos ver que houve uma melhor clusterização entre as amostras pertencentes aos grupos alto e baixo TFAM que na análise

anterior com todos os genes (Fig. 30B), nos permitindo apontar alguns resultados interessantes.

Entre os genes *up*-regulados nas amostras baixo TFAM, estão os genes GPX1, GSTP1 e SOD3 (Fig. 31B e apêndice C), todos envolvidos na via de resposta ao estresse oxidativo (Fig. 32). A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima que catalisa a conversão de superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, sendo a SOD3 conhecida pelo seu papel extracelular. Um estudo com um modelo de carcinogênese de pele demonstrou que camundongos deficientes pra *Sod3* não formam tumores e a alta expressão desse gene reduziu a formação tumoral (KIM et al., 2005).

Além da SOD3, outras enzimas *up*-reguladas também envolvidas com estresse oxidativo foram a Glutational peroxidase (GPX1) e a Glutational S-transferase P1-1 (GSTP1), ambas com papel importante na conversão do peróxido de hidrogênio em água, gerando glutational oxidada (GSSG) a partir de glutational reduzida (GSH) durante a conversão (GILL; PISKOUNOVA; MORRISON, 2017). Balliet *et al.* haviam demonstrado anteriormente que fibroblastos deficientes para o TFAM produziam mais peróxido de hidrogênio (BALLIET et al., 2011). No entanto, nossos dados diferiram dos de *Balliet et al.* nas análises de quantificação de peróxido de hidrogênio, onde utilizando as linhagens de melanoma não vimos associação entre os níveis basais dessa molécula com o TFAM/mtDNAcn. Acreditamos que o fato de não termos encontrado associação entre TFAM/mtDNAcn e peróxido de hidrogênio, pode ter sido devido ao limitado número linhagens de melanoma avaliados, de forma que, a relação do TFAM com o estresse oxidativo foi observada quando avaliamos um maior número de amostras, nas análises com os tumores.

A **B**

Figura 31: Análises de via e de expressão diferencial de enzimas metastáticas em tumores de melanoma metastático. (A) Principais vias gênicas enriquecidas pelos 100 genes diferencialmente expressos nas amostras de melanoma metastático com diferente expressão de TFAM. (B) *Heatmap* com o padrão de expressão dos 70 genes mais diferencialmente expressos entre os grupos alto e baixo TFAM e as informações de mutações nos genes BRAF, RAS e NF1 para cada amostra.

Figura 32: Via de resposta ao estresse oxidativo O ânion superóxido (O_2^-) é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela SOD, e em seguida convertido em H_2O pela GPX1 e GSTP1, transformando glutatona reduzida (GSH) em oxidada (GSSG) durante a conversão. Enzimas em vermelho foram encontradas *up*-reguladas no grupo baixo TFAM.

Adicionalmente, outras enzimas interessantes estavam diferencialmente expressas entre os grupos TFAM: G6PD, FBP1, TKTL1 e GNPAT1. A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) converte a Glicose-6-fosfato em 6-fosfogluconato- δ -lactona, etapa limitante da via das pentoses-fosfato. Essa enzima, juntamente com a FBP1 (Frutose 1,6 bifosfatase) que converte Frutose-6-fosfato em Glicose-6-fosfato, estavam *up*-reguladas em melanomas com baixo TFAM. Além disso, foram encontradas *down*-reguladas as enzimas TKTL1 e GNPAT1. A Transquelotase (TKTL1) participa da interconversão entre a Ribose-5-fosfato e Sedoheptulose-7-fosfato, já a Glucosamina 6-Fosfato N-Acetiltransferase (GNPAT1) converte a Glucosamina-6-fosfato em N-acetilglucosamina 6-fosfato (Fig. 33). Ao visualizar essas enzimas na via metabólica, acreditamos que a baixa expressão do TFAM pode estar desencadeando um desvio da glicólise em favorecimento da via das pentoses-fosfato, por meio da conversão da Frutose-6-fosfato em Glicose-6-fosfato e posteriormente em 6-fosfogluconato-lactona.

A via das pentose-fosfato é extremamente importante para as células tumorais pois, além de gerar pentose fosfato necessárias para a taxa de biossíntese de ácido nucleicos, também gera NADPH, que é necessária para a síntese de ácidos graxos e sobrevivência sob estresse celular (PATRA; HAY, 2014).

Figura 33: Via metabólica mostrando as principais enzimas diferencialmente expressas entre os grupos alto e baixo TFAM no melanoma metastático. Enzimas em vermelho foram encontradas *up*-reguladas e em verde *down*-reguladas no grupo baixo TFAM.

Ainda, foram encontradas *up*-reguladas no grupo baixo TFAM os genes SLC1A4, SLC1A5 e ATP6A01, todos com papel importante no metabolismo de aminoácidos. A SLC1A4 já foi descrita como transportadora preferencialmente da serina, e a SLC15A controla influxo de glutamina, inclusive sua expressão já foi associada com o crescimento tumoral em câncer de mama (YAMAMOTO et al., 2004; VAN GELDERMALSEN et al., 2016). Ambas as vias metabólicas da serina e da glutamina já foram bastante estudadas no contexto tumoral e estão bastante ativas nas células cancerosas, uma vez que as células necessitam de outras fontes de carbono para a síntese de moléculas essenciais (DEBERARDINIS et al., 2007; LUO, 2011; ALTMAN; STINE; DANG, 2016). Inclusive, a alta expressão do ATP6A01 reforça a ideia que amostras baixo TFAM aumentam o metabolismo de aminoácidos, uma vez que essa proteína é uma sub-unidade do complexo V-ATPase, responsável pela detecção celular de aminoácidos e posterior ativação do mTORC1, um dos controladores da síntese proteica (OKOSUN et al., 2016). Mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese, no entanto, baseado nos nossos dados acreditamos que o TFAM pode estar regulando também as vias da glutamina e da serina.

5.6 Integração das vias gênicas reguladas pelo TFAM nas linhagens de melanoma e em tumores de melanoma metastático

Integrando as vias gênicas nucleares que encontramos reguladas por TFAM nas análises com as linhagens de melanoma e com tumores de melanoma metastático, podemos apontar algumas alterações interessantes (Tabela 5).

Comparando as duas análises, podemos ver que há diferenças especialmente nos aspectos metabólicos onde, nos tumores metastáticos, nós vimos indução do metabolismo de Serina, Glutamina e Via das pentose-fosfato, enquanto não houve nenhuma alteração em enzimas metabólicas que atuam na glicólise. Em contrapartida, nas linhagens de melanoma não observamos alterações nas vias da Glutamina e das pentose-fosfato, mas vimos uma diminuição em enzimas metabólicas que atuam no metabolismo da Serina e da Glicose.

Quando examinamos as vias que não estavam envolvidas em metabolismo, observamos uma correspondência maior entre as análises, onde as vias de resposta ao estresse oxidativo, mecanismos pro-tumorigênicos e modulação do sistema imune estavam aparentemente induzidas nos dois modelos de melanoma que estudamos. A única discrepância foram as vias de reparo de DNA, onde encontramos genes de reparo *up*-regulados em tumores e nenhuma alteração nas linhagens de melanoma.

Tabela 5: Integração dos dados de expressão gênica entre linhagens de melanoma e tumores de melanoma metastático

Vias enriquecidas com baixa expressão do TFAM	Linhagens de melanoma	Tumores de melanoma metastático (TCGA)
Resposta ao estresse oxidativo	+	+
Metabolismo de Serina	-	+
Metabolismo de Glutamato	0	+
Via das pentose-fosfato	0	+
Metabolismo de Glicose	-	0
Vias de reparo do DNA	0	+
Mecanismos pro-tumorigênicos	+	+
Modulação do sistema imune	+	+

As células em verde representam indução, em amarelo que não houve alteração e em vermelho que houve diminuição das respectivas vias no grupo baixo TFAM.

Um outro ponto que vale a pena ser investigado é o fato de ambas as análises terem sugerido uma indução de vias pro-tumorigênicas, especificamente da angiogênese. Nas linhagens de melanoma, nós observamos a *up*-regulação de genes diretamente relacionados com a angiogênese e invasão, como VEGF e LOX, enquanto nos tumores, análises de reguladores *upstream* nos mostraram que diversos alvos do Vegf estavam diferencialmente expressos, sugerindo uma regulação deste pelo TFAM.

Como já discutido anteriormente, embora sejam representativas de tumores, as linhagens celulares estão em um microambiente bem diferente da sua origem, sem as restrições de nutrientes características do microambiente tumoral. Além disso, com as passagens das células, ocorre uma seleção clonal onde as células mais adaptadas vão surgindo e dando origem a mais células (VAN STAVEREN et al., 2009). Nesse contexto, acreditamos que as diferenças encontradas entre as análises se dão devido as diferenças nos microambientes inerentes as linhagens de melanoma e os tumores de melanoma metastático.

No geral, apesar das diferenças entre os modelos de estudo, acreditamos que houve uma correspondência entre as análises, onde aparentemente observamos que o TFAM regula vias metabólicas, imunes e tumorigênicas. Diante disso, nós expandimos nosso estudo para um modelo murino de melanoma com deficiência na expressão do TFAM, que nos permite avaliar melhor o papel da diminuição do TFAM na fisiopatologia do melanoma.

5.7 Avaliação in vivo do crescimento tumoral desencadeada por depleção no mtDNA/TFAM em modelo murino de melanoma

Para a avaliação do papel do TFAM no crescimento do melanoma utilizamos um modelo murino de melanoma induzível (*BRAF*^{V600E}/*PTEN*^{null}/*TyrERCre*), previamente estabelecido por

Dankort *et al.*, adicionado a um background deficiente para TFAM (DANKORT *et al.*, 2009). O modelo nos permitiu também avaliar a deficiência do TFAM limitada a células tumorais (*Tfam*^{fl^{ox}}) e tanto em células tumorais como nas células associadas ao tumor (*Tfam*^{+/-}), nos dando uma ideia do papel da disfunção mitocondrial no microambiente tumoral.

Como já descrito nos materiais e métodos, induzimos o melanoma aplicando o tamoxifeno, que ativa a proteína fusionada Cre-ER induzindo as alterações genéticas *BRAF*^{V600E}/*PTEN*^{null} e, por fim, desencadeado o melanoma. Como a aplicação do tamoxifeno ocorria topicamente, havia a formação de um tumor único no local de aplicação.

Nas análises de monitoramento de crescimento tumoral, não vimos diferença no tamanho dos tumores desenvolvidos nos grupos *TFAM*^{fl/+}, *TFAM*^{fl/fl} e *TFAM*^{+/-}. Já os camundongos *TFAM*^{+/-}, exibiram um tumor maior que o *TFAM*^{+/+} (Fig. 34A), dado que foi confirmado quando medimos o tamanho e peso tumoral (Fig. 34B e C).

Figura 34: Avaliação do crescimento tumoral. (A) Tamanho dos tumores entre os grupos de camundongos com estresse no mtDNA. Camundongos com o *background* *TFAM*^{+/-} apresentaram tumores maiores quando comparados com o *TFAM*^{+/+} tanto em relação a massa (B), como volume (C).

Em seguida, nós dissecamos os tumores e realizamos algumas análises para verificar a expressão do TFAM e o mtDNAcn nos camundongos (Fig. 35). Como esperado, foi observada uma menor expressão gênica do TFAM em camundongos TFAM^{+/-} ($p=0,03$) quando comparado com o TFAM^{+/+}, no entanto não encontramos nenhuma diferença quando comparamos o TFAM^{fllox} com o TFAM^{+/+} (Fig. 35A). Encontramos um resultado similar tanto para expressão proteica (Fig. 35B), quanto para número de cópias mitocondriais ($p=0,007$) (Fig. 35C), confirmando uma menor expressão do TFAM nos camundongos heterozigotos, que só possuem uma cópia desse gene em todos os tecidos.

O fato de não termos observado diferenças entre os camundongos TFAM^{fllox} e TFAM^{+/+} pode ser explicado pela heterogeneidade da massa tumoral, que não é formada só por células cancerosas, mas também por outros tipos celulares, como células do sistema imune e fibroblastos, que formam o microambiente tumoral. As proporções do microambiente na massa tumoral variam bastante, podendo chegar até 80% (HUIJBERS et al., 2013), o que mascararia a diminuição da expressão de TFAM nos nosso modelo TFAM^{fllox}, que possuem expressão normal desse gene nas células do microambiente tumoral.

Figura 35: Expressões gênicas e proteicas do TFAM entre os grupos de camundongos. (A) RT-qPCR e Western Blot (B) confirmaram uma diminuição da expressão do TFAM nos camundongos heterozigotos ($p=0,03$). Nós também observamos uma diminuição no número de cópias mitocondriais em TFAM^{+/-} quando comparado com o selvagem ($p=0,007$).

Ainda, como não obtivemos significância estatística devido ao pequeno número amostral de camundongos heterozigotos (Fig. 34), fizemos uma análise entre mtDNAcn e tumores para investigar melhor o papel de depleção de mtDNAcn, mediado por TFAM, no crescimento do melanoma. Como esperado, observamos uma correlação negativa entre o mtDNAcn com o tamanho ($r=-0,4655$, $p=0,0298$, correlação de Pearson) e massa tumoral ($r=-$

0,5387, $p=0,0128$, correlação de Pearson) (Fig. 36). Já os camundongos TFAM^{+/-} exibiram um tumor maior que o TFAM^{+/+} confirmando os resultados anteriores que mostram que a diminuição no mtDNAcn/TFAM induzem o crescimento do melanoma.

Figura 36: Correlações tamanho e massa tumoral com mtDNAcn. Correlação negativa entre mtDNAcn e tamanho (A) e massa tumoral (B).

Estudos anteriores que avaliaram o papel do TFAM no crescimento tumoral relataram resultados contraditórios. Utilizando linhagens celulares de carcinoma de células pulmonares não-pequenas com o TFAM silenciado, Xie *et al.* observaram uma diminuição da proliferação celular e migração, devido a indução da via de sinalização da MAPK por ROS (XIE *et al.*, 2016). Por outro lado, utilizando um modelo murino de tumorigênese intestinal, Woo e colaboradores obtiveram resultados semelhantes ao nosso, onde relataram um aumento no número e no tamanho de pólipos no intestino delgado de camundongos TFAM^{+/-} (WOO *et al.*, 2012), indicando que o papel do TFAM na tumorigênese varia entre tipos tumorais. Ainda, Balliet *et al.* demonstraram que fibroblastos associados a células tumorais deficientes pro TFAM induziram crescimento tumoral em um modelo de camundongo xenográfico (BALLIET *et al.*, 2011). Esse resultado complementa o nosso com TFAM^{fllox}, que não apresentou nenhuma alteração no crescimento tumoral, sugerindo que a deficiência do TFAM limitada as células cancerosas não é suficiente para induzir crescimento tumoral, e que talvez a disfunção mitocondrial no microambiente tumoral seja mais vantajosa para o tumor em alguns tipos de câncer.

5.8 Análise de vias gênicas e metabólicas em modelo murino de melanoma com depleção no mtDNA/TFAM

Em seguida, nós empregamos as técnicas de RNA-seq e metabolômica para investigar os mecanismos que podem estar induzindo as diferenças no crescimento tumoral entre os grupos deficientes pra TFAM. Para essas análises, nós utilizamos uma coorte de 14 camundongos (Tabela 6).

Tabela 6: Grupo de camundongos que foram analisados por metabolômica e transcriptômica

ID	MET ID	RNA-seq	Gênero	TFAM	Tamanho tumoral (mm ³)	Massa (mg)	Semanas após a indução
1	1	S1	F	+/-	1640.17	880.8	7.9
2	2	S2	F	+/-	2027.61	1412	7.4
3	3	S3	F	+/+	377.28	223.6	7.9
4	4	S4	F	+/+	746.84	508	7.4
5	5	--	M	fl/+	446.55	368.2	8.9
6	6	--	M	+/+	348.52	121.1	7.4
7	7	S5	M	fl/fl	898.68	461.75	7.4
8	8	S6	F	fl/+	1108.06	634.8	6.1
10	9	S7	M	fl/fl	603.77	348.5	6.1
11	10	S8	F	fl/fl	799.27	622.8	7.1
12	11	S9	F	fl/+	1366.67	725.1	7.1
14	12	--	M	fl/+	624.91	483.3	7.1
16	--	S10	F	+/+	589.18	195	8
17	--	S11	F	fl/+	781.81	452.15	8

As amostras numeradas na coluna MET ID foram submetidas às análises de metabolômica; o mesmo se aplica à coluna RNA-seq e as análises de transcriptômica.

Nós realizamos RNA-seq em 11 amostras tumorais para investigar vias gênicas que podem estar ligadas a estresse no mtDNA (tabela 6). O RNA-seq gerou um total de 378,6 milhões de reads, uma média de 34,4 milhões de sequencias por amostra. Análises no Fastqc e de normalização, nos mostraram que os dados tinham uma boa qualidade (Fig. 37), o que nos permitiu prosseguir com as análises de expressão diferencial.

Figura 37: Controle de qualidade do RNA-seq dos tumores dos camundongos. (A) O Gráfico mostra o valor de qualidade Phred em cada posição de um *read* de 50pb. A linha vermelha e a linha azul representam os valores de mediana e média das qualidades, respectivamente. (B) *Boxplot* mostrando a expressão normalizada de todas as amostras.

Primeiramente, avaliamos os 70 genes diferencialmente expressos entre todos os grupos (Fig. 38). Mesmo com o pequeno número amostral, os camundongos que tinham o mesmo background para gene TFAM clusterizaram juntos em ambas as análises. Também foi possível observar diferentes cluster gênicos *up* e *down*-regulados entre os grupos de camundongos.

Para investigar melhor os genes de cada grupo, realizamos análises de expressão diferencial comparando cada um dos grupos com o controle. Encontramos apenas 10 genes diferencialmente expressos nas análises entre *Tfam*^{+/-} vs. *Tfam*^{+/+}, 6 genes entre *Tfam*^{fl/+} vs. *Tfam*^{+/+} e 40 genes entre *Tfam*^{fl/fl} vs. *Tfam*^{+/+} (FDR<0,05) (Apêndices F, G e H, respectivamente). Acreditamos que esse baixo número de DEGs encontrados ocorreu devido ao pequeno tamanho amostral, com exceção das análises *Tfam*^{fl/fl} vs. *Tfam*^{+/+}, onde a maioria dos camundongos TFAM^{fl/fl} eram machos e o grupo controle TFAM^{+/+} era composto por fêmeas, o que pode explicar o grande número de genes diferencialmente expresso quando comparado com as outras análises.

Figura 38: Expressão diferencial dos tumores murinos. Amostras tumorais que tem o mesmo background do TFAM clusterizaram juntos. Além disso, possível observar cluster gênicos com expressões bem distintas, especificamente nos camundongos heterozigotos.

Embora poucos genes tenham passado o *threshold* ($FDR < 0,05$), nos notamos que em todas as análises o gene *Madcam1* e vários genes de imunoglobulinas (Ig) estavam *up-regulados* nos camundongos com depleção no TFAM/mtDNA (Fig. 39) e, além disso, vários desses genes eram comuns entre os grupos (Tabela 7).

Tabela 7: Genes em comum up-regulados entre os camundongos com diferentes backgrounds de instabilidade no mtDNA.

Gene	<i>Tfam</i> ^{+/-} vs. <i>Tfam</i> ^{+/+} FC	<i>Tfam</i> ^{fl/+} vs. <i>Tfam</i> ^{+/+} FC	<i>Tfam</i> ^{fl/fl} vs. <i>Tfam</i> ^{+/+} FC
<i>Madcam1</i>	26.05	23.1	52.04
<i>Ighv1-15</i>	69.54	275.55	212.41
<i>Ighv1-22</i>	55.67	33.3	74.93
<i>Igkv6-23</i>	22.49	126.53	245.04
<i>Igkv12-44</i>	20.57	27.22	20.19
<i>Ighv1-53</i>	10.94	7.53	13.31
<i>Jchain</i>	6.19	4.57	6.92
<i>Igha</i>	4.86	4.54	7.22

Todos os genes obtiveram um FDR<0,05. FC: Fold Change.

Figura 39: Volcano plot das análises pareadas entre os camundongos. Análises do *TFAM*^{+/-} (A), *TFAM*^{fl/+} (B) e *TFAM*^{fl/fl} (C) com os camundongos controles *TFAM*^{+/+}. Validação por RT-qPCR do gene *MadCam1* (D). Genes em vermelho obtiveram o FDR<0,05.

Genes da região variável da cadeia pesada de imunoglobulina (IGHV), Região variável kappa da imunoglobulina (IGKV), região constante alfa da cadeia pesada (IGHA) e Jchain (*Joining Chain of Multimeric IgA And IgM*) são genes envolvidos na produção de imunoglobulina (Ig), moléculas das células B que reconhecem os antígenos. A expressão desses genes é associada com a maturação desse tipo de célula (PELANDA; TORRES, 2012). Estudos demonstrando a infiltração de células B em melanoma em outros tipos tumorais estão cada vez mais frequentes (CHIARUTTINI et al., 2017). Infiltração de células B tem uma associação com células T ativadas, o que potencializaria a resposta imunológica antitumoral. Inclusive, a porcentagem de células B, tanto intra-tumoral como peritumoral, já foi correlacionada positivamente com a sobrevida dos pacientes de melanoma (LADÁNYI et al., 2011).

Adicionalmente, Madcam1 é uma molécula de adesão que foi previamente associada com a regulação da resposta imunológica e transmigração leucocitária via sinalização do TNF- α (LEUNG et al., 2003). Além disso, Schioppa *et al.* relataram que o TNF- α medeia o crescimento tumoral via células B regulatórias, reprimindo a resposta anti-tumoral do hospedeiro (SCHIOPPA et al., 2011).

Achados semelhantes foram relatados nas análises com linhagens de melanoma e com tumores de melanoma metastático, onde vimos que a baixa expressão do TFAM estava modulando a resposta imune. Inclusive nas análises com os tumores de melanoma, que são melhores representantes das respostas imunológicas quando comparados com linhagens celulares, observamos também uma série de genes das cadeias de imunoglobulina *up*-regulados nas amostras com baixa expressão do TFAM. Diante disso, nos sugerimos que depleção no mtDNAcn/TFAM podem desencadear no melanoma uma resposta imunológica via célula B. No entanto, essa resposta imunológica não afetaria o crescimento tumoral, uma vez que não encontramos diferenças entre os camundongos TFAM^{fllox} e os controles (Fig. 34).

Para a análise de metabolômica foi realizada uma cromatografia líquida com espectrômetro de massa (LC-MS/MS) em 12 amostras tumorais (Tabela 6), que nos permitiu medir a abundância relativa de 149 metabólitos. Como resultado, tivemos 28 metabólitos diferentemente abundante entre os grupos ($p < 0,05$, teste ANOVA), novamente um número menor que do que esperávamos devido ao pequeno numero amostral de cada grupo (Apêndice I).

A análise de clusterização hierárquica revelou uma alta similaridade metabólica entre camundongos com o mesmo genótipo, com exceção para o camundongo macho TFAM^{+/-}, que ficou em um *cluster* separado (Fig. 40). Além disso, essa análise revelou *clusters* de metabólitos com a abundância relativa altamente distinta entre os camundongos heterozigotos e os outros grupos. Já as análises de vias metabólicas enriquecidas nos mostraram alguns resultados interessantes, como o enriquecimento do TCA, da cadeia transportadora de elétrons e metabolismo do Nicotinado e Nicotinamida, via metabólica responsável pela produção de NAD e extremamente importante para a manutenção dos processos celulares (CHIARUGI et al., 2012).

Figura 40: Análise dos metabólitos diferencialmente expressos entre os grupos de camundongos com depleção no mtDNAcn/TFAM. (A) Heatmap mostrando a abundância relativa dos metabólitos. As cores refletem a escala de Log2. (B) Análise de enriquecimento de vias metabólicas utilizando os 35 metabólitos mais diferencialmente abundantes.

Como as diferenças no tamanho dos tumores foram maiores entre os grupos TFAM^{+/-} e TFAM^{+/+}, nós focamos nossas análises entre esses dois grupos, buscando vias metabólicas e genes que pudesse explicar a diferença no crescimento tumoral. Como resultado, nós encontramos 17 metabólitos diferencialmente abundantes entre eles (Tabela 8). Em seguida, iremos discutir separadamente cada uma das vias que nos chamaram mais atenção, também integrando dados de expressão gênica.

Tabela 8: Tabela com os metabólitos diferencialmente abundantes entre os grupos TFAM^{+/-} e TFAM^{+/+}.

Metabólito	HMDB ID	P-valor	Fold Change	Via metabólica
Putrescina	HMDB01414	0.0021	1.28	Metabolismo da metionina
O-acetilserine	HMDB03011	0.0045	1.33	Metabolismo da Metionina e Cisteína
S-adenosil-metionina	HMDB01185	0.0164	0.63	Metabolismo da metionina
Nicotinamida	HMDB01406	0.0207	1.34	Metabolismo do Nicotinado e Nicotinamida
Glutamato	HMDB03339	0.0223	0.69	Metabolismo do Glutamato
Acetilcolina	HMDB00044	0.0253	1.40	Metabolismo da Betaína
N-acetilornitina	HMDB03357	0.0284	1.45	Biossíntese da arginina
Alpha-isopropil malato	HMDB00402	0.0310	0.79	Biossíntese da Valina, Leucina e Isoleucina
Xantosina 5-monofosfato	HMDB01554	0.0355	0.68	Metabolismo da Purina
Valina	HMDB00883	0.0356	0.75	Biossíntese da Valina, Leucina e Isoleucina
Ácido Guanidoacético	HMDB00128	0.0425	0.83	Metabolismo da Arginina e Prolina
S-adenosil-homocisteína	HMDB00939	0.0427	0.71	Metabolismo da metionina
Hidroxiprolina	HMDB06055	0.0435	0.80	Metabolismo da Arginina e Prolina
Adenina	HMDB00034	0.0460	1.16	Metabolismo da Purina
ácido D-Aspártico	HMDB00812	0.0465	0.61	Metabolismo da Alanina, Aspartato e Glutamato
Succinato	HMDB00254	0.0467	1.13	TCA
Glucosamina 6-fosfato	HMDB01254	0.0497	1.24	Metabolismo do Glutamato

Dentre a lista dos metabólitos diferencialmente abundantes, quatro deles atuavam na via da metionina. A putrescina e a O-acetilserina estavam mais abundantes, e a S-adenosil-metionina e S-adenosil-homocisteína estavam depletadas nos tumores dos camundongos TFAM^{+/-}. Além disso, observamos que a N-acetilornitina, precursora da putrescina, também estava abundante nos tumores TFAM^{+/-} (Fig. 41). Visualizando a via da metionina com esses metabólitos em destaque sugerimos que a S-adenosil-metionina está sendo convertida em S-adenosil-homocisteína, ao invés de se converter em S-adenosil-metionamina, uma vez que está havendo o acúmulo de putrescina e N-acetilornitina, metabólitos necessários para a conversão da S-adenosil-metionina em S-adenosil-metionamina. Esse dado nos sugere que o ciclo da metionina está sendo regulado pela depleção no mtDNAcn/TFAM.

O ciclo da metionina é extremamente importante para a célula cancerosa pois fornece unidades metil para uma série de reações como metilação de proteínas, DNA, RNA e lipídios (BAUERLE; SCHWALM; BOOKER, 2015; MADDOCKS et al., 2016). Além disso, dois trabalhos anteriores demonstraram que altos níveis de putrescina são importantes para o desenvolvimento de tumores de pele (GILMOUR, 2007; PEGG; FEITH, 2007). Ainda, Shi et al. mostraram que uma maior expressão da S-adenosilmetionina descarboxilase reduz os níveis de putrescina e reprime o crescimento tumoral (SHI et al., 2012), sugerindo que o acúmulo de putrescina pode desencadear sinais pro-tumorigênicos.

Figura 41: Via metabólica da metionina mostrando os metabólitos diferencialmente abundantes entre os grupos de camundongos deficientes pra TFAM. Os metabólitos em vermelho foram encontrados abundantes e em verde depletados nos tumores dos camundongos TFAM^{+/-}. Em azul, estão destacados os aminoácidos.

Além da via da metionina, nossos dados apontam também outras vias metabólicas de aminoácidos alteradas entre os grupos, como a via da Serina, Cisteína, Ornitina, Valina e Arginina (Fig. 41), sugerindo uma alteração do metabolismo de aminoácidos pela depleção no mtDNAcn/TFAM (Fig. 42).

Figura 42: Via metabólica da valina e da arginina com os metabólitos diferencialmente abundantes entre os grupos de camundongos deficientes pra TFAM. Os metabólitos em vermelho foram encontrados abundantes e em verde depletados nos tumores dos camundongos TFAM^{+/-}. Em azul, estão destacados os aminoácidos.

Os aminoácidos são classificados de acordo com a capacidade de produção deles no organismo. Os aminoácidos que não são sintetizados e precisam ser consumidos são chamados de essenciais, já os que tem o consumo dispensável são chamados de não essenciais. Nos nossos dados, dentre as vias de aminoácidos alteradas a Metionina, Valina, Ornitina e Leucina são classificados como essenciais, e a Serina, Cisteína, Arginina e Glutamato são considerados não essenciais (NELSON; LEHNINGER; COX, 2008).

A via da Serina e da Cisteína estão conectadas pela O-acetilserina, que vimos em uma maior quantidade nos tumores TFAM^{+/-}. Possemato *et al.* já haviam relatado que tumores de câncer de mama HER2-positivo eram dependentes da via de biossíntese da Serina (POSSEMATO *et al.*, 2011). Adicionalmente, a via metabólica da Cisteína também vem sendo bastante estudada em câncer devido a geração de GSH, que regula as respostas ao estresse oxidativo no tumor. Inclusive, Zhang *et al.* relataram que o microambiente tumoral foi responsável pela transferência da cisteínas para as células tumorais, onde foi gerada a síntese de GSH, auxiliando na sobrevivência da célula cancerosa (ZHANG *et al.*, 2012).

O enriquecimento de vias associadas ao estresse oxidativo já haviam sido relatadas anteriormente nas análises de expressão gênica com linhagens e tumores de melanoma, sugerindo uma maior resposta ao estresse oxidativo em células com deficiência no TFAM. Inclusive, nas análises com os tumores de melanoma metastático a SLC1A4, transportadora

preferencialmente da serina, estava *up*-regulada. Por outro lado, análises com as linhagens de melanoma apresentaram a PHGDH *down*-regulada, uma das precursoras da Serina a partir da glicose. Como já discutido anteriormente, as linhagens celulares estão em um microambiente bem diferente do seu microambiente tumoral de origem, diante disso, mesmo com resultados contrastantes, nós sugerimos que a diminuição na expressão do TFAM está aumentando o metabolismo de Serina e Cisteína, que pode estar auxiliando na resposta ao estresse oxidativo.

A valina e a leucina são aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) que, ao serem metabolizados, fornecem uma boa parte do nitrogênio necessário para a síntese de aminoácidos não essenciais (LIETH et al., 2001). Esse nitrogênio é transferido por intermédio de grupamentos amina, para a síntese de aminoácidos e bases nitrogenadas (NELSON; LEHNINGER; COX, 2008). Inclusive, um dos primeiros passos do catabolismo dos BCAA é a transferência de grupamentos amina para o α -cetoglutarato por enzimas BCAT, gerando assim glutamato e α -cetoácidos (ICHIHARA; KOYAMA, 1966). Trazendo para o contexto tumoral, Tonjes *et al.* demonstraram em modelos *in vitro* e *in vivo* de glioblastoma, que a supressão do catabolismo de BCAA via o silenciamento da BCAT1 diminuiu a proliferação celular (TÖNJES et al., 2013). No entanto, no nosso estudo nós vimos uma depleção da valina e da α -isopropilmalato, um intermediário da síntese da leucina. Além disso, nas análises com tumores de melanoma metastático, o gene BCAT1 (FC=-2,08, FDR=0,009) estava *down*-regulado, sugerindo que a diminuição no TFAM pode estar regulando o metabolismo dos BCAA, resultado conflitante com a literatura já descrita, uma vez que a diminuição no TFAM também induziu o crescimento tumoral (Apêndice D).

Uma outra via metabólica alterada foi a da glutamina e glutamato. Como já relatado, o glutamato tem papel central no metabolismo de aminoácidos, uma vez que ele fornece grupamento amina para a biossíntese de vários aminoácidos não essenciais (NELSON; LEHNINGER; COX, 2008). Inclusive, nos nossos dados, o glutamato e a glucosamina 6-fosfato estavam diferencialmente abundantes entre os grupos de camundongos com depleção no mtDNAcn/TFAM. Investigando melhor essa via, nós vimos na tabela inicial de metabólitos diferencialmente abundantes que o α -cetoglutarato estava também mais abundante no TFAM^{+/-}. Além disso, nos dados de expressão gênica, vimos uma *up*-regulação dos genes *Gls* e *Glud1*, responsáveis pela conversão da glutamina em glutamato e pela conversão do glutamato em α -cetoglutarato, respectivamente (Fig. 43) (ALTMAN; STINE; DANG, 2016). Além disso, o gene SLC1A5, também responsável pelo influxo de glutamina na célula, estava *up*-regulado em tumores de melanoma com baixa expressão do TFAM (Apêndice D).

A conversão do glutamato em Glucosamina 6-fosfato é um passo importante pra síntese de proteínas glicosiladas e lipídios (NELSON; LEHNINGER; COX, 2008), e a depleção deste metabólito nos camundongos TFAM^{+/-}, aponta que o glutamato não está

sendo utilizado por essa via. Nossos dados sugerem que o glutamato está sendo preferencialmente utilizado pelo Ciclo de Krebs, uma vez que observamos o aumento na expressão da enzima *Glud1*, do α -cetoglutarato e de componentes do ciclo de Krebs, como Succinato e Isocitrato, nos camundongos TFAM^{+/-}.

O metabolismo do glutamato alimentando o ciclo de Krebs, por intermédio do α -Cetoglutarato já havia sido associado com tumorigênese (DEBERARDINIS et al., 2007; ALTMAN; STINE; DANG, 2016). Inclusive, Mullen *et al.* relataram que células cancerosas com disfunção mitocondrial, ativam uma via de carboxilação redutiva do α -Cetoglutarato, para manter a produção de intermediários do ciclo de Krebs, necessários para o crescimento celular, uma vez que eles podem alimentar diversas vias de biossíntese de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, fundamentais para o funcionamento da célula tumoral (MULLEN et al., 2014).

Figura 43: Via do metabolismo da glutamina. (A) Via do metabolismo do glutamato e as mudanças que foram observadas. Os metabólitos em vermelho foram encontrados abundantes e em verde depletados nos tumores dos camundongos TFAM^{+/-}. Os metabólitos em laranja não estavam significativamente diferente entre os grupos TFAM^{+/-} vs. TFAM^{+/+}, mas estavam entre os 35 metabólitos mais diferencialmente abundantes entre todos os grupos. Em azul destacamos os aminoácidos. (B) RT-qPCR dos genes *GLUD1* e *GLS* mostrando um aumento na expressão destes nos camundongos TFAM^{+/-}.

Por fim, nós podemos concluir com as análises *in vivo* que a depleção do mtDNAcn/TFAM, tanto em células cancerosas como no estroma (TFAM^{+/-}), teve um papel protumorigênico, afetando diretamente o crescimento do melanoma, uma vez que os tumores desses camundongos foram maiores que nos camundongos sem instabilidade mitocondrial (TFAM^{+/+}). Embora esses resultados sejam interessantes, esses dados são baseados em análises de número pequeno de camundongos, nosso grupo de TFAM^{+/-}, por exemplo, só tem três representantes. Essas análises serão continuadas em uma coorte maior de camundongos, para termos resultados mais conclusivos.

Nas análises de vias gênicas e metabólicas, nós observamos uma *up*-regulação de vários genes de imunoglobulinas, sugerindo ativação da resposta imunológica adaptativa, no entanto, acreditamos que essa resposta não tenha interferido no crescimento tumoral, uma vez que camundongos TFAM^{flox} também a apresentaram e não tiveram um aumento tumoral.

Além disso, análises das vias metabólicas nos indicaram que houve uma grande alteração no metabolismo de aminoácidos, especialmente no metabolismo de glutamina, sugerindo que esse aminoácido pode estar sendo utilizado para a manutenção dos processos metabólicos celulares em tumores com depleção no mtDNAcn/TFAM. No entanto, vale a pena ressaltar que as análises de metabolômicas consistem na medição relativa dos metabólitos e, no entanto, sabemos que ocorre uma conversão contínua entre as moléculas. Deste modo, somente análises de fluxo metabólicos poderiam nos confirmar realmente se um metabólico está sendo convertido em outro. Ainda, nossas análises foram feitas tratando a massa tumoral como homogênea, sendo que já é bem descrito o quanto a massa tumoral é heterogênea, tanto genética como metabolicamente (HENSLEY et al., 2016). Análises de células únicas poderiam nos esclarecer melhor os aspectos genéticos e metabólicos no nosso modelo de melanoma com depleção no mtDNAcn/TFAM.

5.9 Considerações finais

Em resumo, nosso estudo avaliou o papel a instabilidade do genoma mitocondrial, medida pelo acúmulo de mutações no mtDNA, variação no mtDNAcn e pela expressão do fator de transcrição TFAM, no metabolismo energético e crescimento do melanoma, utilizando linhagens celulares de melanoma, dados de expressão gênica de tumores de melanoma metastático e um modelo murino induzível de melanoma.

A princípio, não vimos correlações entre instabilidade do mtDNA com fases mais avançadas do melanoma, como havíamos visto em um trabalho anterior do nosso grupo com câncer colorretal (DE ARAUJO et al., 2015). Acreditamos que o fato das linhagens de melanoma serem de origens diferentes, pode ter interferido nas correlações. No entanto, na avaliação do impacto da instabilidade do mtDNA no metabolismo energético, nós observamos

correlações significativas entre o número de cópias do mtDNA e a expressão do TFAM com alguns fenótipos bioenergéticos como consumo de glicose e produção de ATP. Adicionalmente, não estabelecemos nenhuma correlação nas análises de bioenergética com os *clusters* diferencialmente mutados no mtDNA ou com o número de mutações em genes mitocondriais codificados no núcleo, indicando uma maior associação entre o conteúdo do mtDNA e do seu principal regulador TFAM, com fenótipos metabólicos em linhagens de melanoma.

Utilizando dados de expressão gênica, estabelecemos grupos com diferentes níveis de expressão do TFAM para identificar vias gênicas que estejam reguladas por esse gene. Essas análises foram feitas em um painel de linhagem de melanoma e expandidas com dados de tecido de melanoma metastático, proveniente do TCGA. Como principal resultado, em ambas as análises vimos a expressão de alguns genes indutores da angiogênese, moduladores da resposta imunológica humoral e vias de resposta ao estresse oxidativo, além de algumas alterações em vias metabólicas, como da glicose, glutamato (Tabela 5).

Para investigar melhor os resultados das vias gênicas reguladas pelo TFAM, nós utilizamos um modelo murino com deficiência no TFAM limitada as células tumorais (TFAM^{fllox}) e com deficiência tanto em células tumorais como em seu microambiente (TFAM^{+/-}). Nós observamos um maior crescimento tumoral em tumores TFAM^{+/-}, indicando um papel pro-tumorigênico da deficiência do TFAM em células tumorais e no seu microambiente, que já havia sido previsto nas análises com linhagens e tumores de melanoma. Análises de vias gênicas nesses tumores nos revelaram um padrão de expressão gênica indicativo da resposta imune humoral, colaborando com os achados anteriores com as linhagens e os tumores de melanoma. No entanto, esse padrão de expressão também foi visto em tumores TFAM^{fllox}, que não tiveram diferença no crescimento tumoral quando comparado com os controles TFAM^{+/+}, sugerindo que o crescimento tumoral foi independente dessa resposta imunológica.

As análises de vias metabólicas nos mostraram um aumento do metabolismo do glutamato nos tumores TFAM^{+/-}, sugerindo que esse metabólito está sendo convertido em α -Cetoglutarato e auxiliando assim na anaplerose, isto é, processo de reposição de intermediários do ciclo Krebs, que podem ser usados para alimentar diversas vias biossíntese de aminoácidos, lipídios e nucleotídeos. Ainda, vimos algumas alterações importantes na via da Serina e Cisteína, que ao juntarmos com os dados de expressão dos melanomas metastáticos, nos sugerem um aumento na resposta ao estresse oxidativo (Fig. 44).

Diante disso, acreditamos que a deficiência no TFAM em células tumorais e no seu microambiente, com consequente depleção no número de cópias do mtDNA, induzem o crescimento do melanoma. Nossos dados indicam que o VEGF pode ser um intermediador desse crescimento tumoral. No entanto, mais estudos com uma coorte maior de camundongos se fazem necessários para confirmar as vias gênicas pro-tumorigênicas reguladas pelo TFAM.

Além disso, observamos que esses tumores dependem do metabolismo do glutamato, convertendo-o em α -Cetoglutarato para manter o funcionamento do ciclo de Krebs e a síntese das biomoléculas fundamentais para o crescimento celular. A restrição da utilização do glutamato, pelas células deficientes no mtDNAcn/TFAM, pode ser uma forma de diminuir o crescimento tumoral observado nesses tumores.

A variação do número de cópias do mtDNA, já é bem relatada em vários tipos de câncer (REZNIK et al., 2016), no entanto as consequências dessas variações para o crescimento tumoral ainda é pouco estudado. Acreditamos que os resultados desse estudo são relevantes e abrem novas possibilidades sobre o papel da disfunção mitocondrial na tumorigênese do melanoma. A descoberta de vias pro-tumorigênicas desencadeadas pela depleção no mtDNAcn, abre a possibilidade de novos alvos terapêuticos, onde a simples avaliação do número de cópias mitocondriais no tumor do paciente pode ser utilizada como biomarcador.

Figura 44: Integração das vias metabólicas que vimos alteradas nas análises com depleção no mtDNAcn/TFAM nas linhagens, tecidos de melanoma metastático e no modelo murinho de melanoma. Em resumo, os dados apontaram uma conversão do glutamato em α -Cetoglutarato, mantendo os níveis intermediários dos componentes do Ciclo de Krebs. Esses dados são confirmados pelo aumento de expressão nas enzimas GLUD1 e SLC1A5. Além disso, vimos um aumento no metabolismo da Serina e Cisteína nas análises *in vivo*. Esses dados são complementares com os encontrados nos tumores de melanoma metastático, onde observamos um aumento na expressão das enzimas SOD, GPX1 e GTP1, que estariam aumentando a resposta ao estresse oxidativo em células de melanoma com menor expressão do TFAM.

6 CONCLUSÃO

Nesse estudo, nós investigamos o efeito da instabilidade do genoma mitocondrial no metabolismo energético, modulação da expressão gênica e tumorigênese do melanoma, avaliando diferentes parâmetros como acúmulo de mutações, variações no número de cópias do mtDNA e expressão do regulador de transcrição mitocondrial TFAM.

Nós observamos que alterações no número de cópias do genoma mitocondrial e níveis de expressão do TFAM parecem ter um maior impacto na bioenergética celular, uma vez que houve correlação desses parâmetros com taxa de consumo de glicose e produção de ATP. Adicionalmente, análises de expressão gênica de linhagens celulares de melanoma e tecidos de melanoma metastático nos sugeriram que o TFAM regula a expressão de genes indutores de angiogênese, como VEGF, resposta imunológica humoral e diversas vias metabólicas de aminoácidos, especialmente do glutamato.

As análises *in vivo* nos revelaram um maior crescimento tumoral em camundongos TFAM^{+/-}, indicando um papel pro-tumorigênico da deficiência do TFAM/mtDNAcn em células tumorais e no seu microambiente. Análise de expressão gênica nesses tumores nos confirmaram que a menor expressão do TFAM pode modular resposta imune humoral, colaborando com os achados anteriores com as linhagens e os tumores de melanoma. Além disso, as análises de metabolômica nos revelaram um aumento do metabolismo do glutamato nos tumores TFAM^{+/-}, sugerindo que esse metabólito está sendo convertido em α -Cetoglutarato e auxiliando na reposição de intermediários do ciclo Krebs, podendo assim alimentar diversas vias biossíntese de aminoácidos, lipídios e nucleotídeos, fundamentais para o crescimento tumoral.

Em conclusão, o conjunto dos resultados sugerem que a deficiência do TFAM/mtDNAcn gera uma dependência do metabolismo de glutamina, para manter seus processos biológicos, e também confere vantagem proliferativa nas células de melanoma.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKBANI, R. et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. **Cell**, v. 161, n. 7, p. 1681–1696, jun. 2015.

ALTMAN, B. J. et al. From Krebs to Clinic: Glutamine Metabolism to Cancer Therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 10, p. 619–634, out. 2016.

ANDREWS, R. M. et al. Reanalysis and Revision of the Cambridge Reference Sequence for Human Mitochondrial DNA. **Nature Genetics**, v. 23, n. 2, p. 147–147, out. 1999.

BALLIET, R. M. et al. Mitochondrial Oxidative Stress in Cancer-Associated Fibroblasts Drives Lactate Production, Promoting Breast Cancer Tumor Growth: Understanding the Aging and Cancer Connection. **Cell Cycle**, v. 10, n. 23, p. 4065–4073, 1 dez. 2011.

BAUERLE, M. R. et al. Mechanistic Diversity of Radical S-Adenosylmethionine (SAM)-Dependent Methylation. **The Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 7, p. 3995–4002, 13 fev. 2015.

BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **The World Allergy Organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, jan. 2012.

BISWAS, G. et al. Mitochondria-to-Nucleus Stress Signaling in Mammalian Cells: Nature of Nuclear Gene Targets, Transcription Regulation, and Induced Resistance to Apoptosis. **Gene**, v. 354, p. 132–139, 18 jul. 2005.

BOROUGHES, L. K. et al. Metabolic Pathways Promoting Cancer Cell Survival and Growth. **Nature cell biology**, v. 17, n. 4, p. 351–359, abr. 2015.

CAIRNS, R. A. et al. Regulation of Cancer Cell Metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85–95, 1 fev. 2011.

CARMELET, P. VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. **Oncology**, v. 69 Suppl 3, n. 3, p. 4–10, 2005.

CERAMI, E. et al. The cBio Cancer Genomics Portal: an Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 5, p. 401–404, maio 2012.

CHANG, Y. et al. Sun Exposure and Melanoma Risk at Different Latitudes: a Pooled Analysis of 5700 Cases and 7216 Controls. **International journal of ...**, 2009.

CHAPMAN, P. B. et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. **The New England journal of medicine**, v. 364, n. 26, p. 2507–2516, 30 jun. 2011.

CHATTERJEE, A. et al. Mitochondrial DNA Mutations in Human Cancer. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4663–4674, 7 ago. 2006.

CHIARUGI, A. et al. The NAD Metabolome--a Key Determinant of Cancer Cell Biology. **Nature Publishing Group**, v. 12, n. 11, p. 741–752, nov. 2012.

CHIARUTTINI, G. et al. B Cells and the Humoral Response in Melanoma: the Overlooked Players of the Tumor Microenvironment. **Onc Immunology**, v. 6, n. 4, p. e1294296, 3 mar. 2017.

- CHIN, E. H. I. W. G. K. S. A. M. I. J.-P. T. E. N. D. A. L. L. C. P. D. D. A. R. M. L. K. C. A. S. D. V. G. S. N. S. R. O. W. W. K. A. N. W. J. W. K. C. D. M. K. S.-H. G. C. M. N. M. M. J. L. M. D. J. G. S. W. D. B. H. D. S. E. L. S. G. G. G. L. G. L. et al. A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 251–263, 20 jul. 2012a.
- CHIN, E. H. I. W. G. K. S. A. M. I. J.-P. T. E. N. D. A. L. L. C. P. D. D. A. R. M. L. K. C. A. S. D. V. G. S. N. S. R. O. W. W. K. A. N. W. J. W. K. C. D. M. K. S.-H. G. C. M. N. M. M. J. L. M. D. J. G. S. W. D. B. H. D. S. E. L. S. G. G. G. L. G. L. et al. A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 251–263, 20 jul. 2012b.
- CLAYTON, D. A. et al. Circular Dimer and Catenate Forms of Mitochondrial DNA in Human Leukaemic Leucocytes. **Nature**, v. 216, n. 5116, p. 652–657, 18 nov. 1967.
- COLLER, H. A. et al. High Frequency of Homoplasmic Mitochondrial DNA Mutations in Human Tumors Can Be Explained Without Selection. **Nature Genetics**, v. 28, n. 2, p. 147–150, jun. 2001.
- CORAZAO-ROZAS, P. et al. Mitochondrial Oxidative Stress Is the Achille's Heel of Melanoma Cells Resistant to Braf-Mutant Inhibitor. **Oncotarget**, v. 4, n. 11, p. 1986–1998, nov. 2013.
- CORI, G. T. et al. Enzymatic Breakdown of Glycogen in Liver Extracts. **Experimental Biology and Medicine**, v. 39, n. 2, p. 337–338, 1 nov. 1938.
- DAHLMAN, K. B. et al. BRAF(L597) Mutations in Melanoma Are Associated with Sensitivity to MEK Inhibitors. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 9, p. 791–797, set. 2012.
- DANKORT, D. et al. A New Mouse Model to Explore the Initiation, Progression, and Therapy of BRAFV600E-Induced Lung Tumors. **Genes & Development**, v. 21, n. 4, p. 379–384, 15 fev. 2007.
- DANKORT, D. et al. BrafV600E Cooperates with Pten Loss to Induce Metastatic Melanoma. **Nature Genetics**, v. 41, n. 5, p. 544–552, 12 mar. 2009.
- DE ARAUJO, L. F. et al. Understanding the Role of mtDNA in Tumor Progression. **Precision Medicine**, v. 1, n. 0, 15 out. 2015.
- DE ARAUJO, L. F. et al. Mitochondrial Genome Instability in Colorectal Adenoma and Adenocarcinoma. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 36, n. 11, p. 8869–8879, nov. 2015.
- DEBERARDINIS, R. J. et al. Beyond Aerobic Glycolysis: Transformed Cells Can Engage in Glutamine Metabolism That Exceeds the Requirement for Protein and Nucleotide Synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 49, p. 19345–19350, 4 dez. 2007.
- DEMUNTER, A. et al. Analysis of N- and K-Ras Mutations in the Distinctive Tumor Progression Phases of Melanoma. **The Journal of investigative dermatology**, v. 117, n. 6, p. 1483–1489, dez. 2001.
- DHILLON, A. S. et al. MAP Kinase Signalling Pathways in Cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3279–3290, 14 maio 2007.
- DOBIN, A. et al. STAR: Ultrafast Universal RNA-Seq Aligner. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 29, n. 1, p. 15–21, 1 jan. 2013.

- DUFIES, M. et al. Sunitinib Stimulates Expression of VEGFC by Tumor Cells and Promotes Lymphangiogenesis in Clear Cell Renal Cell Carcinomas. **Cancer Research**, v. 77, n. 5, p. 1212–1226, 1 mar. 2017.
- EMBLEY, T. M. et al. Eukaryotic Evolution, Changes and Challenges. **Nature**, v. 440, n. 7084, p. 623–630, 30 mar. 2006.
- ERLER, J. T. et al. Lysyl Oxidase Is Essential for Hypoxia-Induced Metastasis. **Nature**, v. 440, n. 7088, p. 1222–1226, 27 abr. 2006.
- FAGERBERG, L. et al. Analysis of the Human Tissue-Specific Expression by Genome-Wide Integration of Transcriptomics and Antibody-Based Proteomics. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 13, n. 2, p. 397–406, fev. 2014.
- FERNANDES, N. C. et al. Melanoma Cutâneo: Estudo Prospectivo De 65 Casos Cutaneous Melanoma: Prospective Study of 65 Cases. **An bras ...**, 2005.
- FISHER, R. P. et al. A Transcription Factor Required for Promoter Recognition by Human Mitochondrial RNA Polymerase. Accurate Initiation at the Heavy- and Light-Strand Promoters Dissected and Reconstituted in Vitro. **The Journal of biological chemistry**, v. 260, n. 20, p. 11330–11338, 15 set. 1985.
- FOX, J. The RCommander: a Basic-Statistics Graphical User Interface to R. **Journal of Statistical Software**, v. 14, n. 9, p. 1–42, 2005.
- GENTLEMAN, R. C. et al. Bioconductor: Open Software Development for Computational Biology and Bioinformatics. **Genome biology**, v. 5, n. 10, p. R80, 2004.
- GENTRIC, G. et al. Heterogeneity in Cancer Metabolism: New Concepts in an Old Field. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 26, n. 9, p. 462–485, 20 mar. 2017.
- GHELLI, A. et al. The Cytochrome B P.278Y>C Mutation Causative of a Multisystem Disorder Enhances Superoxide Production and Alters Supramolecular Interactions of Respiratory Chain Complexes. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 11, p. 2141–2151, 13 maio 2013.
- GILL, J. G. et al. Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, p. 030791–13, 12 jan. 2017.
- GILMOUR, S. K. Polyamines and Nonmelanoma Skin Cancer. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 224, n. 3, p. 249–256, 1 nov. 2007.
- GREENE, V. R. et al. Frequencies of NRAS and BRAF Mutations Increase From the Radial to the Vertical Growth Phase in Cutaneous Melanoma. **The Journal of investigative dermatology**, v. 129, n. 6, p. 1483–1488, jun. 2009.
- GRIFFIN, H. R. et al. Accurate Mitochondrial DNA Sequencing Using Off-Target Reads Provides a Single Test to Identify Pathogenic Point Mutations. **Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics**, v. 16, n. 12, p. 962–971, dez. 2014.
- GU, Z. et al. Complex Heatmaps Reveal Patterns and Correlations in Multidimensional Genomic Data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 32, n. 18, p. 2847–2849, 15 set. 2016.
- GUHA, M. et al. Mitochondrial Retrograde Signaling at the Crossroads of Tumor Bioenergetics, Genetics and Epigenetics. **MITOCH**, v. 13, n. 6, p. 577–591, 1 nov. 2013.

- GUO, Y. et al. MitoSeek: Extracting Mitochondria Information and Performing High-Throughput Mitochondria Sequencing Analysis. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 29, n. 9, p. 1210–1211, 1 maio 2013.
- HALLBERG, B. M. et al. TFAM Forces mtDNA to Make a U-Turn. **Nature structural & molecular biology**, v. 18, n. 11, p. 1179–1181, nov. 2011.
- HANAHAN, D. et al. Hallmarks of Cancer: the Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.
- HANAHAN, D. et al. **The hallmarks of cancer**. Tradução. [s.l.] Oxford University Press, 2016. v. 1
- HAQ, R. et al. Oncogenic BRAF Regulates Oxidative Metabolism via PGC1 α and MITF. **Cancer Cell**, v. 23, n. 3, p. 302–315, mar. 2013.
- HAQQ, C. et al. The Gene Expression Signatures of Melanoma Progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 17, p. 6092–6097, 26 abr. 2005.
- HAYWARD, N. K. et al. Whole-Genome Landscapes of Major Melanoma Subtypes. **Nature**, p. 1–18, 3 maio 2017.
- HE, Y. et al. Heteroplasmic Mitochondrial DNA Mutations in Normal and Tumour Cells. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 610–614, 25 mar. 2010.
- HENSLEY, C. T. et al. Metabolic Heterogeneity in Human Lung Tumors. **Cell**, v. 164, n. 4, p. 681–694, 11 fev. 2016.
- HOSIOS, A. M. et al. Amino Acids Rather Than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells. **Developmental cell**, v. 36, n. 5, p. 540–549, 7 mar. 2016.
- HUANG, T. **Next Generation Sequencing to Characterize Mitochondrial Genomic DNA Heteroplasmy**. Tradução. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2011. v. 2319.8.1–19.8.12 p.
- HUIJBERS, A. et al. The Proportion of Tumor-Stroma as a Strong Prognosticator for Stage II and III Colon Cancer Patients: Validation in the VICTOR Trial. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 24, n. 1, p. 179–185, jan. 2013.
- HUSSEIN, M. R. Extracutaneous Malignant Melanomas. **Cancer investigation**, v. 26, n. 5, p. 516–534, jun. 2008.
- HYLAND, P. L. et al. Constitutive Mitochondrial DNA Copy Number in Peripheral Blood of Melanoma Families with and Without CDKN2A Mutations. **Journal of carcinogenesis & mutagenesis**, v. 2014, n. Suppl 4, 2014.
- ICHIHARA, A. et al. Transaminase of Branched Chain Amino Acids. I. Branched Chain Amino Acids-Alpha-Ketoglutarate Transaminase. **Journal of biochemistry**, v. 59, n. 2, p. 160–169, fev. 1966.
- IMANISHI, H. et al. Mitochondrial DNA Mutations Regulate Metastasis of Human Breast Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e23401, 2011.
- INCA. **Estimativas de Câncer 2016**. Acesso em: 6 jun. 2017.

ISHIKAWA, K. et al. ROS-Generating Mitochondrial DNA Mutations Can Regulate Tumor Cell Metastasis. **Science**, v. 320, n. 5876, p. 661–664, 2 maio 2008.

ISHIKAWA, K. et al. A Novel Function of mtDNA: Its Involvement in Metastasis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1201, n. 1, p. 40–43, 1 jul. 2010.

JAYAPRAKASH, A. D. et al. Stable Heteroplasmy at the Single-Cell Level Is Facilitated by Intercellular Exchange of mtDNA. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 4, p. 2177–2187, 27 fev. 2015.

JENG, J.-Y. et al. Maintenance of Mitochondrial DNA Copy Number and Expression Are Essential for Preservation of Mitochondrial Function and Cell Growth. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 103, n. 2, p. 347–357, 2008.

KIM, J.-W. et al. HIF-1-Mediated Expression of Pyruvate Dehydrogenase Kinase: a Metabolic Switch Required for Cellular Adaptation to Hypoxia. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 3, p. 177–185, mar. 2006.

KIM, S.-H. et al. Overexpression of Extracellular Superoxide Dismutase (EC-SOD) in Mouse Skin Plays a Protective Role in DMBA/TPA-Induced Tumor Formation. 2005.

KING, A. et al. Succinate Dehydrogenase and Fumarate Hydratase: Linking Mitochondrial Dysfunction and Cancer. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4675–4682, 7 ago. 2006.

KREBS, H. A. et al. The Role of Citric Acid in Intermediate Metabolism in Animal Tissues. **FEBS Letters**, v. 117, n. S1, p. K2–K10, 14 nov. 2001.

KULAWIEC, M. et al. Cancer Cell Mitochondria Confer Apoptosis Resistance and Promote Metastasis. **Cancer biology & therapy**, v. 8, n. 14, p. 1378–1385, jul. 2009.

LADÁNYI, A. et al. Prognostic Impact of B-Cell Density in Cutaneous Melanoma. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, v. 60, n. 12, p. 1729–1738, dez. 2011.

LARSSON, N.-G. et al. Mitochondrial Transcription Factor a Is Necessary for mtDNA Maintenance and Embryogenesis in Mice. **Nature Genetics**, v. 18, n. 3, p. 231–236, 1 mar. 1998.

LEINONEN, R. et al. The Sequence Read Archive. **Nucleic acids research**, v. 39, n. Database, p. D19–D21, 22 dez. 2010.

LEUNG, E. et al. Mucosal Vascular Addressin Cell Adhesion Molecule-1 Is Expressed Outside the Endothelial Lineage on Fibroblasts and Melanoma Cells. **Immunology and cell biology**, v. 81, n. 4, p. 320–327, ago. 2003.

LI, H. A Statistical Framework for SNP Calling, Mutation Discovery, Association Mapping and Population Genetical Parameter Estimation From Sequencing Data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 27, n. 21, p. 2987–2993, 1 nov. 2011.

LI, H. et al. Fast and Accurate Short Read Alignment with Burrows-Wheeler Transform. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 25, n. 14, p. 1754–1760, 15 jul. 2009.

LIETH, E. et al. Nitrogen Shuttling Between Neurons and Glial Cells During Glutamate Synthesis. **Journal of neurochemistry**, v. 76, n. 6, p. 1712–1723, mar. 2001.

LUO, C. et al. A PGC1 α -Mediated Transcriptional Axis Suppresses Melanoma Metastasis. **Nature**, v. 537, n. 7620, p. 422–426, 31 ago. 2016.

- LUO, J. Cancer's Sweet Tooth for Serine. **Breast cancer research : BCR**, v. 13, n. 6, p. 317, 2011.
- MADDOCKS, O. D. K. et al. Serine Metabolism Supports the Methionine Cycle and DNA/RNA Methylation Through De Novo ATP Synthesis in Cancer Cells. **Molecular cell**, v. 61, n. 2, p. 210–221, 21 jan. 2016.
- MATOBA, S. et al. P53 Regulates Mitochondrial Respiration. **Science**, v. 312, n. 5780, p. 1650–1653, 16 jun. 2006.
- MAYAKONDA, A. et al. Maftools: Efficient Analysis, Visualization and Summarization of MAF Files From Large-Scale Cohort Based Cancer Studies. 2016.
- MCKENNA, A. et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce Framework for Analyzing Next-Generation DNA Sequencing Data. **Genome research**, v. 20, n. 9, p. 1297–1303, set. 2010.
- MCLAREN, W. et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. **Genome biology**, v. 17, n. 1, p. 122, 6 jun. 2016.
- MEI, H. et al. Reduced mtDNA Copy Number Increases the Sensitivity of Tumor Cells to Chemotherapeutic Drugs. **Cell death & disease**, v. 6, n. 4, p. e1710, 2 abr. 2015.
- MITCHELL, P. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic Type of Mechanism. **Nature**, v. 191, n. 4784, p. 144–148, 8 jul. 1961.
- MITHANI, S. K. et al. Nonsynonymous Somatic Mitochondrial Mutations Occur in the Majority of Cutaneous Melanomas. **Melanoma research**, v. 18, n. 3, p. 214–219, jun. 2008.
- MOREADITH, R. W. et al. The Pathways of Glutamate and Glutamine Oxidation by Tumor Cell Mitochondria. Role of Mitochondrial NAD(P)⁺-Dependent Malic Enzyme. **The Journal of biological chemistry**, v. 259, n. 10, p. 6215–6221, 25 maio 1984.
- MULLARKY, E. et al. PHGDH Amplification and Altered Glucose Metabolism in Human Melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 24, n. 6, p. 1112–1115, dez. 2011.
- MULLEN, A. R. et al. Oxidation of Alpha-Ketoglutarate Is Required for Reductive Carboxylation in Cancer Cells with Mitochondrial Defects. **CellReports**, v. 7, n. 5, p. 1679–1690, 12 jun. 2014.
- NELSON, D. L. et al. **Lehninger principles of biochemistry**. Tradução. [s.l.: s.n.]
- NETWORK, T. C. G. A. et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. **Cell**, v. 161, n. 7, p. 1681–1696, 18 jun. 2015.
- OKOSUN, J. et al. Recurrent mTORC1-Activating RRAGC Mutations in Follicular Lymphoma. **Nature Genetics**, v. 48, n. 2, p. 183–188, fev. 2016.
- PATRA, K. C. et al. The Pentose Phosphate Pathway and Cancer. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 8, p. 347–354, ago. 2014.
- PAVLIDES, S. et al. The Reverse Warburg Effect: Aerobic Glycolysis in Cancer Associated Fibroblasts and the Tumor Stroma. **Cell Cycle**, v. 8, n. 23, p. 3984–4001, 28 out. 2014.
- PAWLIKOWSKI, J. S. et al. Wnt Signaling Potentiates Nevogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 40, p. 16009–

16014, 1 out. 2013.

PEGG, A. E. et al. Polyamines and Neoplastic Growth. **Biochemical Society transactions**, v. 35, n. Pt 2, p. 295–299, abr. 2007.

PELANDA, R. et al. Central B-Cell Tolerance: Where Selection Begins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 4, p. a007146, 1 abr. 2012.

POSSEMATO, R. et al. Functional Genomics Reveal That the Serine Synthesis Pathway Is Essential in Breast Cancer. **Nature**, v. 476, n. 7360, p. 346–350, 18 ago. 2011.

RATNIKOV, B. I. et al. Metabolic Rewiring in Melanoma. v. 36, n. 2, p. 171–181, 6 jun. 2016.

REZNIK, E. et al. Mitochondrial DNA Copy Number Variation Across Human Cancers. **eLife**, v. 5, p. e10769, 22 fev. 2016.

RITCHIE, M. E. et al. Limma Powers Differential Expression Analyses for RNA-Sequencing and Microarray Studies. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 7, p. e47–e47, 20 abr. 2015.

ROBINSON, M. D. et al. edgeR: a Bioconductor Package for Differential Expression Analysis of Digital Gene Expression Data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 1 jan. 2010.

RYAN, M. T. et al. Mitochondrial-Nuclear Communications. **dx.doi.org**, v. 76, n. 1, p. 701–722, 19 jun. 2007.

SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 15003, 23 abr. 2015.

SCHIOPPA, T. et al. B Regulatory Cells and the Tumor-Promoting Actions of TNF- α During Squamous Carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 26, p. 10662–10667, 28 jun. 2011.

SCHON, E. A. et al. Human Mitochondrial DNA: Roles of Inherited and Somatic Mutations. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 12, p. 878–890, 16 nov. 2012.

SCHOP, D. et al. Growth, Metabolism, and Growth Inhibitors of Mesenchymal Stem Cells. ... **Engineering Part A**, v. 15, n. 8, p. 1877–1886, ago. 2009.

SELAK, M. A. et al. Succinate Links TCA Cycle Dysfunction to Oncogenesis by Inhibiting HIF- α Prolyl Hydroxylase. **Cancer Cell**, v. 7, n. 1, p. 77–85, jan. 2005.

SHI, C. et al. S-Adenosylmethionine Decarboxylase Overexpression Inhibits Mouse Skin Tumor Promotion. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 7, p. 1310–1318, 1 jul. 2012.

SIEGEL, R. L. et al. Cancer Statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7–30, 1 jan. 2017.

SOSMAN, J. A. et al. Survival in BRAF V600-Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. **The New England journal of medicine**, v. 366, n. 8, p. 707–714, 23 fev. 2012.

SOUSA, J. F. et al. Suppression Subtractive Hybridization Profiles of Radial Growth Phase and Metastatic Melanoma Cell Lines Reveal Novel Potential Targets. **BMC Cancer**, v. 8, n. 1, p. 3, 22 jan. 2008.

- SOUSA, J. F. et al. Novel Primate-Specific Genes, RMEL 1, 2 and 3, with Highly Restricted Expression in Melanoma, Assessed by New Data Mining Tool. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, p. e13510, 2010.
- STRICKAERT, A. et al. Cancer Heterogeneity Is Not Compatible with One Unique Cancer Cell Metabolic Map. **Oncogene**, v. 36, n. 19, p. 2637–2642, 11 maio 2017.
- SU, J. L. et al. The Role of the VEGF-C/VEGFR-3 Axis in Cancer Progression. **British Journal of Cancer**, v. 96, n. 4, p. 541–545, 26 fev. 2007.
- SWEET, W. H. Localization of Intracranial Lesions by Scanning with Positron-Emitting Arsenic. **Journal of the American Medical Association**, v. 157, n. 14, p. 1183, 2 abr. 1955.
- TAKEUCHI, H. et al. Detection of Mitochondrial DNA Alterations in Plasma of Malignant Melanoma Patients. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1022, n. 1, p. 50–54, jun. 2004.
- TAN, A. S. et al. Mitochondrial Genome Acquisition Restores Respiratory Function and Tumorigenic Potential of Cancer Cells Without Mitochondrial DNA. **Cell Metabolism**, v. 21, n. 1, p. 81–94, 6 jan. 2015.
- TAYLOR, R. W. et al. Mitochondrial DNA Mutations in Human Disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 5, p. 389–402, 1 maio 2005.
- THOMAS, R. R. et al. Recombinant Human Mitochondrial Transcription Factor a Stimulates Mitochondrial Biogenesis and ATP Synthesis, Improves Motor Function After MPTP, Reduces Oxidative Stress and Increases Survival After Endotoxin. **Mitochondrion**, v. 11, n. 1, p. 108–118, jan. 2011a.
- THOMAS, R. R. et al. Recombinant Human Mitochondrial Transcription Factor a Stimulates Mitochondrial Biogenesis and ATP Synthesis, Improves Motor Function After MPTP, Reduces Oxidative Stress and Increases Survival After Endotoxin. **Mitochondrion**, v. 11, n. 1, p. 108–118, jan. 2011b.
- TOMASETTI, C. et al. Stem Cell Divisions, Somatic Mutations, Cancer Etiology, and Cancer Prevention. **Science**, v. 355, n. 6331, p. 1330–1334, 24 mar. 2017.
- TÖNJES, M. et al. BCAT1 Promotes Cell Proliferation Through Amino Acid Catabolism in Gliomas Carrying Wild-Type IDH1. **Nature Medicine**, v. 19, n. 7, p. 901–908, jul. 2013.
- TSAI, J. et al. Discovery of a Selective Inhibitor of Oncogenic B-Raf Kinase with Potent Antimelanoma Activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 8, p. 3041–3046, 26 fev. 2008.
- VAN GELDERMALSEN, M. et al. ASCT2/SLC1A5 Controls Glutamine Uptake and Tumour Growth in Triple-Negative Basal-Like Breast Cancer. **Oncogene**, v. 35, n. 24, p. 3201–3208, 16 jun. 2016.
- VAN STAVEREN, W. C. G. et al. Human Cancer Cell Lines: Experimental Models for Cancer Cells in Situ? for Cancer Stem Cells? **Biochimica et biophysica acta**, v. 1795, n. 2, p. 92–103, abr. 2009.
- VANDER HEIDEN, M. G. et al. Understanding the Warburg Effect: the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 22 maio 2009.
- VENEGAS, V. et al. **Real-Time Quantitative PCR Analysis of Mitochondrial DNA**

Content. Tradução. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc, 2011. 19.7.1–19.7.12 p.

VULTUR, A. et al. SnapShot: Melanoma. **Cancer Cell**, v. 23, n. 5, p. 706–706.e1, 13 maio 2013.

WALLACE, D. C. Mitochondria and Cancer. p. 1–14, 1 out. 2012.

WARBURG, O. The Metabolism of Carcinoma Cells. **The Journal of Cancer Research**, v. 9, n. 1, p. 148–163, 1 mar. 1925.

WARBURG, O. On the Origin of Cancer Cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309–314, 24 fev. 1956.

WARD, P. S. et al. Metabolic Reprogramming: a Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 297–308, mar. 2012.

WEST, A. P. et al. Mitochondrial DNA Stress Primes the Antiviral Innate Immune Response. **Nature**, v. 520, n. 7548, p. 553–557, 2 fev. 2015.

WOO, D. K. et al. Mitochondrial Genome Instability and ROS Enhance Intestinal Tumorigenesis in APCMin/+ Mice. **The American Journal of Pathology**, v. 180, n. 1, p. 24–31, 1 jan. 2012.

XIA, J. et al. **Metabolomic Data Processing, Analysis, and Interpretation Using MetaboAnalyst**. Tradução. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2002. 1–48 p.

XIE, D. et al. Downregulation of TFAM Inhibits the Tumorigenesis of Non-Small Cell Lung Cancer by Activating ROS-Mediated JNK/p38MAPK Signaling and Reducing Cellular Bioenergetics. **Oncotarget**, v. 7, n. 10, p. 11609–11624, 8 mar. 2016.

YAMAMOTO, T. et al. Functional Identification of ASCT1 Neutral Amino Acid Transporter as the Predominant System for the Uptake of L-Serine in Rat Neurons in Primary Culture. **Neuroscience research**, v. 49, n. 1, p. 101–111, maio 2004.

YU, G. et al. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. **Omics : a journal of integrative biology**, v. 16, n. 5, p. 284–287, maio 2012.

YU, M. Generation, Function and Diagnostic Value of Mitochondrial DNA Copy Number Alterations in Human Cancers. **Life Sciences**, v. 89, n. 3-4, p. 65–71, jul. 2011.

YUAN, M. et al. A Positive/Negative Ion&Ndash;Switching, Targeted Mass Spectrometry&Ndash;Based Metabolomics Platform for Bodily Fluids, Cells, and Fresh and Fixed Tissue. **Nature Protocols**, v. 7, n. 5, p. 872–881, 12 abr. 2012.

ZAIDI, M. R. et al. From UVs to Metastases: Modeling Melanoma Initiation and Progression in the Mouse. **The Journal of investigative dermatology**, v. 128, n. 10, p. 2381–2391, out. 2008.

ZHANG, G. et al. Targeting Mitochondrial Biogenesis to Overcome Drug Resistance to MAPK Inhibitors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 5, p. 1834–1856, 2 maio 2016a.

ZHANG, G. et al. Targeting Mitochondrial Biogenesis to Overcome Drug Resistance to MAPK Inhibitors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 5, p. 1834–1856, 2 maio 2016b.

ZHANG, W. et al. Stromal Control of Cystine Metabolism Promotes Cancer Cell Survival in Chronic Lymphocytic Leukaemia. **Nature cell biology**, v. 14, n. 3, p. 276–286, 19 fev. 2012.

ZHOU, S. et al. Frequency and Phenotypic Implications of Mitochondrial DNA Mutations in Human Squamous Cell Cancers of the Head and Neck. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 18, p. 7540–7545, 1 maio 2007.

8 APÊNDICES

Apêndice A: Mutações mitocondriais encontradas nas linhagens de melanoma.

Gene	Troca de nucleotídeo	Efeito no aminoácido	Fase de progressão	Ocorrência	Heteroplasmia	Patogenicidade Mutpred	Patogenicidade Polyphen
DLOOP	m.64C>T	NC	MET		HM	-	-
DLOOP	m.73A>G*	NC	ALL	4	HM	-	-
DLOOP	m.152T>C*	NC	RGP_MET	2	HM	-	-
DLOOP	m.185G>A*	NC	RGP		HM	-	-
DLOOP	m.199T>C*	NC	VGP_MET	3	HM	-	-
DLOOP	m.204T>C*	NC	VGP_MET	2	HM	-	-
DLOOP	m.207G>A*	NC	VGP_MET	2	HM	-	-
DLOOP	m.222C>T	NC	RGP		HM	-	-
DLOOP	m.239T>C*	NC	VGP_MET_Pareada	2	HM	-	-
DLOOP	m.250T>C	NC	VGP		HM	-	-
DLOOP	m.462C>T*	NC	RGP		HM	-	-
DLOOP	m.489T>C*	NC	RGP		HM	-	-
MT-RNR1	m.722C>T	NC	RGP		HM	-	-
MT-RNR1	m.896A>G	NC	MET		HM	-	-
MT-RNR1	m.1290C>T	NC	MET		HM	-	-
MT-RNR2	m.1719G>A	NC	VGP_MET	3	HM	-	-
MT-RNR2	m.2581A>G	NC	MET		HM	-	-
MT-RNR2	m.2702G>A	NC	VGP_MET	2	HM	-	-
MT-RNR2	m.2706A>G	NC	Melanócito	5	HM	-	-
MT-RNR2	m.3010G>A	NC	RGP		HM	-	-
MT-RNR2	m.3120C>T	NC	RGP		HM	-	-
MT-ND1	m.3336T>C	I10L	VGP_MET	2	HM	0.617	0.074
MT-ND1	m.3447A>G	SYN:Q-Q	VGP		HM	-	-
MT-ND1	m.3540T>C	SYN:A-A	Melanócito		HM	-	-
MT-ND1	m.3745G>A	A147T	MET		HM	0.701	0.043
MT-ND1	m.3915G>A	SYN:G-G	VGP_MET_Pareada	2	HM	-	-
MT-ND1	m.3990C>T	SYN:Y-Y	VGP		HM	-	-
MT-ND1	m.4216T>C*	Y304H	RGP		HM	0.502	0.006
MT-ND2	m.4529A>T	SYN:T-T	VGP		HM	-	-
MT-ND2	m.4793A>G	SYN:M-M	RGP		HM	-	-
MT-ND2	m.5315A>G	SYN:M-M	VGP_MET	2	HM	-	-
MT-ND2	m.5324C>T	SYN:I-I	VGP_MET	2	HM	-	-
MT-ND2	m.5348C>T	SYN:Y-Y	RGP		HM	-	-
MT-CO1	m.6734G>A	SYN:M-M	VGP		HM	-	-
MT-CO1	m.6776T>C*	SYN:H-H	MET		HM	-	-
MT-CO2	m.8251G>A	SYN:G-G	VGP		HM	-	-
MT-ATP8	m.8485G>A	K40N	VGP_MET	2	HM	0.48	0.355
MT-ATP6	m.8616G>T	L30F	VGP		HM	0.629	0.997
MT-ATP6	m.8901A>G	SYN:L-L	VGP_MET	2	HM	-	-
MT-CO3	m.9746G>A*	SYN:E-E	VGP_MET_Pareada	2	HM	-	-
MT-CO3	m.9906G>A	G234R	Melanócito_VGF		0.54	0.83	1
MT-CO3	m.9947G>A	SYN:V-V	RGP		HM	-	-
MT-TRNG	m.10034T>C	NC	RGP		HM	-	-
MT-ND3	m.10084T>C	I9T	Melanócito		HM	0.454	0
MT-ND3	m.10238T>C	SYN:I-I	VGP_MET	3	HM	-	-
MT-ND3	m.10398A>G*	T114A	ALL	4	HM	0.071	0
MT-ND4L	m.10685G>A	SYN:A-A	RGP		HM	-	-
MT-ND4	m.10832A>G	I25V	MET		0.35	0.631	0.885
MT-ND4	m.10915T>C	SYN:C-C	VGP		HM	-	-
MT-ND4	m.11251A>G	SYN:L-L	RGP		HM	-	-
MT-ND4	m.11253T>C	I165T	VGP_MET_Pareada	2	HM	0.407	0.001
MT-ND4	m.11299T>C	SYN:T-T	RGP		HM	-	-
MT-ND4	m.11711G>A	A318T	VGP		0.27	0.747	0.995
MT-ND4	m.11719G>A	SYN:G-G	ALL	4	HM	-	-
MT-ND4	m.11914G>A	SYN:T-T	MET		HM	-	-
MT-ND5	m.12612A>G	SYN:V-V	RGP		HM	-	-
MT-ND5	m.12864T>C	SYN:R-R	VGP		HM	-	-
MT-ND5	m.13281T>C	SYN:V-V	RGP		HM	-	-

Gene	Troca de nucleotídeo	Efeito no aminoácido	Fase de progressão	Ocorrência	Heteroplasmia	Patogenicidade Mutpred	Patogenicidade Polyphen
MT-ND5	m.13434A>G	SYN:T-T	RGP		HM	-	-
MT-ND5	m.13708G>A*	A458T	RGP		HM	0.389	0
MT-ND5	m.13780A>G	I482L	VGP_MET	4	HM	0.421	0.028
MT-ND5	m.13933A>G	T533A	RGP		HM	0.397	0.056
MT-ND6	m.14569G>A	SYN:S-S	Melanócito		HM	-	-
MT-CYB	m.14766C>T	T7S	ALL	4	HM	0.22	-
MT-CYB	m.14798T>C*	F18L	RGP		HM	0	0
MT-CYB	m.15043G>A	SYN:G-G	VGP_MET	3	HM	-	-
MT-CYB	m.15452C>A	L236I	RGP		HM	0.244	0.244
MT-CYB	m.15883G>A	SYN:W-W	Melanócito		HM	-	-
MT-TRNT	m.15924A>G	NC	VGP		HM	-	-
DLOOP	m.16069C>T	NC	RGP		HM	-	-
DLOOP	m.16086T>C	NC	VGP_MET	2	HM	-	-
DLOOP	m.16111C>T*	NC	Melanócito		HM	-	-
DLOOP	m.16126T>C*	NC	RGP		HM	-	-
DLOOP	m.16129G>A	NC	VGP		HM	-	-
DLOOP	m.16147C>A	NC	VGP_MET	2	HM	-	-
DLOOP	m.16172T>C*	NC	RGP		HM	-	-
DLOOP	m.16239C>G	NC	RGP		HM	-	-
DLOOP	m.16256C>T	NC	MET		HM	-	-
DLOOP	m.16293A>G*	NC	RGP		0.82	-	-
DLOOP	m.16294C>T	NC	RGP		HM	-	-
DLOOP	m.16298T>C*	NC	Melanócito		HM	-	-
DLOOP	m.16304T>C*	NC	RGP		HM	-	-
DLOOP	m.16311T>C*	NC	VGP		HM	-	-
DLOOP	m.16320C>T	NC	VGP_MET	2	HM	-	-
DLOOP	m.16391G>A	NC	RGP		HM	-	-
DLOOP	m.16519T>C*	NC	ALL	6	HM	-	-

As mutações com negrito não haviam sido descritas no Mitomap; Mutações com * foram previamente associadas com câncer; HM: Mutações em homoplasia; NC: mutações em regiões não codificantes.; Ocorrência indica em quantas linhagens cada variante apareceu, células em branco indicam que a variante surgiu em apenas uma linhagem.

Apêndice B. Lista dos genes diferencialmente expressos entre as os grupos de linhages de melanoma com diferente expressão do TFAM.

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
F2RL1	ENSG00000164251	15.95613121	1.77E-05
ME1	ENSG00000065833	15.58207221	1.45E-09
FENDRR	ENSG00000268388	15.49945659	0.001407413
THBD	ENSG00000178726	14.91878082	7.66E-05
VGLL3	ENSG00000206538	14.77473934	0.02107472
MIR143	ENSG00000249669	14.1492782	0.028561563
SLFN12	ENSG00000172123	13.67629254	9.79E-08
BEX1	ENSG00000133169	13.66460325	0.00121908
HSPB3	ENSG00000169271	13.62087443	0.001128362
SNX7	ENSG00000162627	13.52327165	2.94E-08
KRTAP1-5	ENSG00000221852	13.43328117	0.002595684
CXCL10	ENSG00000169245	13.09631898	0.019299258
ZNF385D	ENSG00000151789	12.95272389	0.049859725
FAM155A	ENSG00000204442	12.88911181	0.024951283
TP73-AS1	ENSG00000227372	12.78180113	0.013365378
CCDC144B	ENSG00000154874	12.71480606	0.00081231
THBS1	ENSG00000137801	12.69741427	0.001531463
ZNF229	ENSG00000278318	12.41649783	0.008150065
SUCNR1	ENSG00000198829	12.41056799	0.028271768
CSMD1	ENSG00000183117	12.37446784	0.002762311
COL3A1	ENSG00000168542	12.35684422	0.003917745
MIR3606	ENSG00000168542	12.35684422	0.003917745
MUSK	ENSG00000030304	12.29139435	0.015314606
COLEC12	ENSG00000158270	12.25180762	3.00E-09
PTGER3	ENSG00000050628	12.18598981	0.024951283
IGFBP4	ENSG00000141753	12.18002775	2.48E-06
WISP1	ENSG00000104415	12.15262831	0.010626385
CFH	ENSG00000000971	12.12396712	0.004384892
PID1	ENSG00000153823	12.07789629	0.023260468
ZNF607	ENSG00000198182	11.87322252	0.015751516
PTPRO	ENSG00000151490	11.84271944	0.021656217
ZNF287	ENSG00000141040	11.80930564	0.000298709
MGLL	ENSG00000074416	11.75105078	0.033750676
LINC00221	ENSG00000270816	11.57491133	1.72E-05
DCN	ENSG00000011465	11.46262715	0.046740185
COL12A1	ENSG00000111799	11.44415509	0.006659593
AMIGO2	ENSG00000139211	11.36145335	0.041256564
ZNF583	ENSG00000198440	11.35789	0.004176708
COL1A1	ENSG00000108821	11.34803077	0.000311011
FGFR2	ENSG00000066468	11.15649265	0.030092281
CDH6	ENSG00000113361	11.13980073	0.002204948
SCG5	ENSG00000166922	11.0845055	0.003151082
MYH13	ENSG00000006788	11.08383008	0.021378414
BTBD11	ENSG00000151136	11.0073128	0.030092281
PRSS35	ENSG00000146250	11.0073128	0.048892653
AOX1	ENSG00000138356	10.99888043	0.027400488
ATP8B4	ENSG00000104043	10.94303571	0.025595816
SLPI	ENSG00000124107	10.84531188	0.036850352
TNFAIP8L3	ENSG00000183578	10.82316237	0.013366722

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
COL5A1	ENSG00000130635	10.80021056	0.003917745
TDO2	ENSG00000151790	10.74048445	0.005248987
STC2	ENSG00000113739	10.68218164	0.046571832
MAOA	ENSG00000189221	10.67311313	0.009034057
F3	ENSG00000117525	10.42658588	0.000773015
HHIPL2	ENSG00000143512	10.42494963	0.002622521
PDGFRB	ENSG00000113721	10.23417976	0.03290699
KYNU	ENSG00000115919	10.15029979	2.92E-05
EDIL3	ENSG00000164176	10.10973168	2.33E-05
CYTIP	ENSG00000115165	10.09732341	0.010232495
LIMCH1	ENSG00000064042	9.907496514	0.002661837
ZNF582	ENSG00000018869	9.854856551	0.034838305
RAB3B	ENSG00000169213	9.843428828	0.015689313
SERPINE1	ENSG00000106366	9.832206355	0.010166276
VEGFC	ENSG00000150630	9.823411847	6.07E-05
SLC8A1	ENSG00000183023	9.714101766	0.020958741
IGSF1	ENSG00000147255	9.706020766	0.039541422
CD33	ENSG00000105383	9.698166651	0.019427541
ST6GALNAC5	ENSG00000117069	9.698166651	0.020286862
SNORD3B-1	ENSG00000265185	9.533317904	0.024951283
GRIN2A	ENSG00000183454	9.352750823	0.037211256
EMB	ENSG00000170571	9.27116413	2.19E-07
TPRG1	ENSG00000188001	9.269821575	0.000417335
HECW2	ENSG00000138411	9.20988427	0.00393429
LINC01012	ENSG00000281706	9.203669865	0.010232495
BDKRB2	ENSG00000168398	9.15279135	0.048208428
FAM105A	ENSG00000145569	9.120258125	0.047255014
IRX1	ENSG00000170549	9.059537488	0.0243475
PTGS2	ENSG00000073756	9.040544973	0.005002938
PCDH17	ENSG00000118946	8.981685182	0.042224101
PDE7B	ENSG00000171408	8.792583347	0.028561563
C3orf80	ENSG00000180044	8.719221416	0.030092281
ZNF718	ENSG00000250312	8.719221416	0.041256564
GDF6	ENSG00000156466	8.619930233	0.041256564
COL11A1	ENSG00000060718	8.578217908	0.024745839
DPYSL3	ENSG00000113657	8.444519189	3.20E-05
GBP1	ENSG00000117228	8.351467413	0.034455363
TMEM246	ENSG00000165152	8.347760883	0.00670803
SEMA3A	ENSG00000075213	8.334900288	0.000550886
WNT5B	ENSG00000111186	8.327249704	0.024951283
SCG2	ENSG00000171951	8.253275514	3.43E-06
PLCH1	ENSG00000114805	8.241301502	0.001043147
PTGES	ENSG00000148344	7.939714946	0.037037586
ANKRD18B	ENSG00000230453	7.922038212	0.005575359
ADAMTS5	ENSG00000154736	7.862272318	0.015751516
CDK15	ENSG00000138395	7.85908888	0.041256564
LOC101927359	ENSG00000250241	7.815322981	0.045575115
SCARA5	ENSG00000168079	7.783598977	0.003510171
FLRT2	ENSG00000185070	7.763894516	0.029338474
SEMA3D	ENSG00000153993	7.705951047	0.045778711

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
SLITRK5	ENSG00000165300	7.670914161	0.001535335
MFAP4	ENSG00000166482	7.669020127	0.030092281
GRAMD1B	ENSG00000023171	7.643347057	6.12E-07
CRIM1	ENSG00000150938	7.640604418	0.029338474
ADAMTS6	ENSG00000049192	7.627990328	0.004284873
DMBT1	ENSG00000187908	7.612812329	0.026310362
DZIP1	ENSG00000134874	7.49084145	9.12E-08
LOC100128398	ENSG00000176593	7.466401112	0.023641732
HNMT	ENSG00000150540	7.350295081	0.00070275
PCDH18	ENSG00000189184	7.276096143	0.008544223
GALNT14	ENSG00000158089	7.151402227	0.024278474
CHRM3	ENSG00000133019	7.145217521	0.046883727
CEACAM19	ENSG00000186567	6.959740923	0.01903495
GAS6-AS2	ENSG00000272695	6.849023543	0.0243475
CNKSR2	ENSG00000149970	6.704311462	0.02996565
CHN1	ENSG00000128656	6.632391889	0.021378414
TRANK1	ENSG00000168016	6.559181138	0.005480333
LOX	ENSG00000113083	6.477516963	5.64E-07
ABCD2	ENSG00000173208	6.375430114	0.03435542
NR2F1	ENSG00000175745	6.366821534	0.015751516
SLC35G2	ENSG00000168917	6.340076408	0.002184077
GSPT2	ENSG00000189369	6.315021277	0.002622521
ABCG2	ENSG00000118777	6.260371997	0.007765532
MAGEA12	ENSG00000213401	6.225440219	1.58E-06
CLEC2B	ENSG00000110852	6.175433117	0.011047826
USP44	ENSG00000136014	6.030348293	0.02107472
LTBP1	ENSG00000049323	6.011247666	0.001128362
ZNF606	ENSG00000166704	5.899663752	0.015751516
PAPSS2	ENSG00000198682	5.8192114	0.000286233
PHLDB2	ENSG00000144824	5.724951798	0.006732385
ZNF141	ENSG00000131127	5.709407832	0.017133594
ALCAM	ENSG00000170017	5.622791695	2.56E-06
ANTXR2	ENSG00000163297	5.576146155	0.001043147
ZDHHC2	ENSG00000104219	5.500549145	0.000102404
ARSJ	ENSG00000180801	5.490339763	0.011757681
PDE5A	ENSG00000138735	5.360994901	0.010232495
E2F7	ENSG00000165891	5.269944584	0.0142991
STEAP2	ENSG00000157214	5.203787966	0.017634646
PYGL	ENSG00000100504	5.069661694	0.000143093
CSAG1	ENSG00000198930	5.04113756	0.00057276
P2RY1	ENSG00000169860	4.948389315	0.015689313
GPR176	ENSG00000166073	4.922560977	0.033431229
ZNF521	ENSG00000198795	4.884127122	0.005309083
RCN3	ENSG00000142552	4.849313506	0.046571832
HOXA1	ENSG00000105991	4.762756593	0.021990577
IL4R	ENSG00000077238	4.632835345	0.033750676
VEGFA	ENSG00000112715	4.621117574	0.005180398
ARRDC3	ENSG00000113369	4.553588393	0.041256564
GNG11	ENSG00000127920	4.546240199	0.001400635
OSMR	ENSG00000145623	4.536744861	0.037142082
NCAM2	ENSG00000154654	4.392912016	0.011047826

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
ANGPT1	ENSG00000154188	4.347709852	0.020958741
DOCK11	ENSG00000147251	4.254786262	0.006964331
ELL2	ENSG00000118985	4.068124334	0.007330468
SIPA1L1	ENSG00000197555	3.859972104	0.027400488
CEP152	ENSG00000103995	3.614711301	0.00501688
RDH10	ENSG00000121039	3.560878268	0.028008855
TSPAN9	ENSG00000011105	3.534366977	0.04373838
ARL4C	ENSG00000188042	3.505605583	0.021782692
SMURF2	ENSG00000108854	3.493532768	0.009763333
FUCA1	ENSG00000179163	3.396400153	0.03735343
SGCB	ENSG00000163069	3.325982587	0.042224101
GPCPD1	ENSG00000125772	3.305090539	0.039800906
RGL1	ENSG00000143344	3.236960735	0.009220234
HLA-C	ENSG00000204525	2.908851076	0.039541422
KCTD15	ENSG00000153885	-2.619520621	0.046740185
GTF3A	ENSG00000122034	-2.895058521	0.041256564
RAB31	ENSG00000168461	-3.0312638	0.044258209
FMNL2	ENSG00000157827	-3.087036912	0.041779141
POLR1D	ENSG00000186184	-3.14915748	0.012071265
PRMT3	ENSG00000185238	-3.162101975	0.012885149
AKAP1	ENSG00000121057	-3.173847861	0.012071265
FAM89A	ENSG00000182118	-3.254465369	0.046883727
MIR1182	ENSG00000182118	-3.254465369	0.046883727
GXYLT2	ENSG00000172986	-3.38289103	0.0142991
SFXN4	ENSG00000183605	-3.508555122	0.041256564
LRCH1	ENSG00000136141	-3.604550866	0.005480333
MIPEP	ENSG00000027001	-3.760845183	0.033750676
CYB561A3	ENSG00000162144	-3.768748407	0.003601691
LDLRAD3	ENSG00000179241	-3.774935592	0.008278995
PARP12	ENSG00000059378	-3.793437158	0.028598584
ARHGAP31	ENSG00000031081	-3.825566314	0.012071265
AP1S2	ENSG00000182287	-3.890672398	0.027400488
ST3GAL4	ENSG00000110080	-4.038362425	0.009525665
ARHGEF10L	ENSG00000074964	-4.092249764	0.024745839
RAP1GAP2	ENSG00000132359	-4.109357371	0.046331581
BACE2	ENSG00000182240	-4.116444394	0.043256427
UNC13B	ENSG00000198722	-4.341793278	0.000847108
RFTN2	ENSG00000162944	-4.41858759	0.008513788
ARHGEF37	ENSG00000183111	-4.421396391	0.021990577
PLEKHG1	ENSG00000120278	-4.521532818	0.024745839
ADPRH	ENSG00000144843	-4.533446934	0.01967586
LINC00511	ENSG00000227036	-4.688570455	0.013095804
INPP5F	ENSG00000198825	-4.69375131	0.019299258
TRIM9	ENSG00000100505	-4.712357491	0.036850352
NRCAM	ENSG00000091129	-4.754255019	0.030092281
LPAR6	ENSG00000139679	-4.812782853	0.048866692
SORBS2	ENSG00000154556	-4.856387374	0.021990577
AIF1L	ENSG00000126878	-4.875512878	0.037211256
LEF1	ENSG00000138795	-4.892292543	0.004627076
RGS10	ENSG00000148908	-4.971852523	6.07E-05
ITGB8	ENSG00000105855	-5.011437488	0.001407237

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
KANK1	ENSG00000107104	-5.033131915	0.001443753
MCAM	ENSG00000076706	-5.073693448	0.005718837
MIR6756	ENSG00000076706	-5.073693448	0.005718837
AIFM2	ENSG00000042286	-5.120649678	0.007160565
VLDLR	ENSG00000147852	-5.140058857	0.009488879
TRIM2	ENSG00000109654	-5.167015443	0.002622521
ATP10B	ENSG00000118322	-5.321462094	0.009060411
SHTN1	ENSG00000187164	-5.356993382	0.007160565
ST6GAL1	ENSG00000073849	-5.39313077	0.000506635
BCL2	ENSG00000171791	-5.396546346	0.0142991
MGST2	ENSG00000085871	-5.468388845	0.020286862
AFF3	ENSG00000144218	-5.607572543	0.031503899
ACSS1	ENSG00000154930	-5.626179533	0.004761407
GAS1	ENSG00000180447	-5.642920878	0.012362623
ZNF853	ENSG00000236609	-5.64999886	0.021782692
LMCD1	ENSG00000071282	-5.690645778	0.002455613
TNFRSF19	ENSG00000127863	-5.734753211	0.047851724
LINC00589	ENSG00000251191	-5.807014274	0.039536113
LINC00839	ENSG00000185904	-5.886533517	0.019427541
EXTL1	ENSG00000158008	-6.137687511	1.38E-05
ADGRG1	ENSG00000205336	-6.233454756	0.031485144
GNAZ	ENSG00000128266	-6.236085724	0.013249207
OLIG2	ENSG00000205927	-6.297712795	0.039541422
MPPED2	ENSG00000066382	-6.365106769	0.029299724
SMARCA1	ENSG00000102038	-6.372120034	0.000183514
PIR	ENSG00000087842	-6.401285726	0.023058852
LOC101929745	ENSG00000248461	-6.488791885	0.023822596
KIAA1549L	ENSG00000110427	-6.569107672	3.38E-06
KCNG1	ENSG00000026559	-6.672050484	0.009034057
ROPN1B	ENSG00000114547	-6.717456514	0.034974618
BCL2A1	ENSG00000140379	-6.861806133	0.003101159
SLC46A3	ENSG00000139508	-6.878441987	0.0142991
OSBPL10	ENSG00000144645	-6.891895103	8.34E-08
EDNRB	ENSG00000136160	-6.895200186	0.001350341
POLR2F	ENSG00000100142	-6.976612547	0.008928326
CRYAB	ENSG00000109846	-7.039145554	4.59E-05
NDN	ENSG00000182636	-7.255073714	0.013365378
CITED1	ENSG00000125931	-7.271678974	0.024369141
CSPG4	ENSG00000173546	-7.553914878	0.005888984
DIP2C	ENSG00000151240	-7.75928625	3.67E-05
SORBS1	ENSG00000095637	-7.878178907	5.48E-06
TM4SF1	ENSG00000169908	-7.967329104	1.70E-07
ERBB3	ENSG00000065361	-8.017705442	1.62E-07
ZNF704	ENSG00000164684	-8.034986711	0.013365378
FCGR2B	ENSG00000072694	-8.046879904	0.046427903
SGCD	ENSG00000170624	-8.071930553	0.046571832
ALDH7A1	ENSG00000164904	-8.121237492	1.21E-08
LARGE1	ENSG00000133424	-8.226393814	1.17E-05
RASEF	ENSG00000165105	-8.262651388	0.024369141
CXCL1	ENSG00000163739	-8.441850027	0.000665838
RIMKLB	ENSG00000166532	-8.497156051	1.82E-06

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
HIST1H2AE	ENSG00000277075	-8.694750881	0.039853617
PTPRZ1	ENSG00000106278	-8.718793383	5.57E-05
PLEKHB1	ENSG00000021300	-8.988157172	0.001350341
IL16	ENSG00000172349	-9.049167099	0.002595684
RXRG	ENSG00000143171	-9.086672683	0.002204948
LOC101927523	ENSG00000225768	-9.103534215	0.011742927
SHROOM4	ENSG00000158352	-9.156806845	0.000773015
SAMHD1	ENSG00000101347	-9.173236969	8.34E-08
LOC101930452	ENSG00000260423	-9.263783322	3.20E-05
PHGDH	ENSG00000092621	-9.279003232	8.72E-10
RNF130	ENSG00000113269	-9.443548181	2.40E-09
HIST1H4L	ENSG00000275126	-9.460115544	0.017685086
EMX2	ENSG00000170370	-9.509799144	0.030092281
RASGEF1C	ENSG00000146090	-9.627001479	0.002329462
C3orf70	ENSG00000187068	-9.713833002	4.47E-05
SERPINA3	ENSG00000196136	-9.992914491	0.01995409
AKR1E2	ENSG00000165568	-10.16559123	0.034252765
CELF2	ENSG00000048740	-10.39657532	0.006732385
FABP7	ENSG00000164434	-10.6379346	0.008867242
HIST1H3I	ENSG00000275379	-10.64844268	0.0003462
FOCAD	ENSG00000188352	-10.71290043	1.93E-12
APOD	ENSG00000189058	-10.78811049	0.045607489
SLC13A3	ENSG00000158296	-10.84329573	0.013199231
ARHGEF9	ENSG00000131089	-11.11767827	3.81E-06
TMEM51-AS1	ENSG00000175147	-11.12566747	0.042786826
TRIM51	ENSG00000124900	-11.13361268	0.002762311
SPP1	ENSG00000118785	-11.23444955	0.046740185
CDH19	ENSG00000071991	-11.38060446	7.63E-08
KLHL9	ENSG00000198642	-11.47369892	8.32E-14
HACD4	ENSG00000188921	-11.48676546	0.014342117
PLP1	ENSG00000123560	-11.52562529	0.000279046
C10orf90	ENSG00000154493	-11.60259513	4.47E-05
CPN1	ENSG00000120054	-11.76514167	0.010232495
LOC105369486	ENSG00000254416	-11.84473658	0.02107472
PI15	ENSG00000137558	-11.85176619	0.046074982
S100B	ENSG00000160307	-12.27949874	1.62E-07
RLBP1	ENSG00000140522	-12.69953413	0.00951649
MIA	ENSG00000261857	-12.74173038	6.86E-05
CHST11	ENSG00000171310	-13.13638694	1.30E-14
KCNA2	ENSG00000177301	-13.2510326	3.80E-05
DYNLT3	ENSG00000165169	-13.40994316	1.68E-07
MLLT3	ENSG00000171843	-13.60757195	2.06E-08
CD200	ENSG00000091972	-15.19767754	0.00279029

Apêndice C. Lista dos genes diferencialmente expressos entre as os grupos de melanoma metastático com diferente expressão do TFAM.

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
FGR	ENSG00000000938	-1.2495375	0.022433579
CFH	ENSG00000000971	-1.009599787	0.043325649
MAD1L1	ENSG00000002822	-1.095647415	0.000668483
TMEM176A	ENSG00000002933	-1.216780131	0.00351971
ARX	ENSG00000004848	-2.306081202	0.020518889
RHBDD2	ENSG00000005486	-1.101785122	1.06E-07
ALDH3B1	ENSG00000006534	-1.062284509	0.004897313
DBF4	ENSG00000006634	1.275397021	1.09E-06
PROM1	ENSG00000007062	4.667618589	0.005274251
MATK	ENSG00000007264	-1.54775005	0.04056618
TKTL1	ENSG00000007350	2.673365433	0.033315655
SYN1	ENSG00000008056	-1.480243279	0.036303344
MAPK8IP2	ENSG00000008735	-1.840918613	0.013695143
PRSS3	ENSG00000010438	5.973907481	0.045592266
MRC2	ENSG00000011028	-1.277641617	0.018443971
TYROBP	ENSG00000011600	-1.070938447	0.005521189
DEPDC1	ENSG00000024526	1.813455233	3.72E-06
FAS	ENSG00000026103	1.119842784	0.009089333
GRN	ENSG00000030582	-1.144503513	1.03E-05
DEPDC1B	ENSG00000035499	1.611188437	1.21E-05
CAPG	ENSG00000042493	-1.483354316	0.007781242
TG	ENSG00000042832	2.042526501	0.03564089
CNTLN	ENSG00000044459	1.244642891	0.020151585
SCML1	ENSG00000047634	1.421210945	0.020076186
KITLG	ENSG00000049130	1.26274309	0.049067359
LTBP1	ENSG00000049323	1.505548584	0.028351197
POLQ	ENSG00000051341	1.876113501	0.000942722
KCNQ1	ENSG000000282076	-1.131757913	0.01914215
PHPT1	ENSG00000054148	-1.119847854	4.64E-07
DCBLD2	ENSG00000057019	1.491385311	0.000680677
BCAT1	ENSG00000060982	2.088102518	0.009104322
CA11	ENSG00000063180	-1.170649346	0.000457369
CTSA	ENSG00000064601	-1.117704217	4.41E-07
EYA2	ENSG00000064655	-1.603902277	0.049952
HMG20B	ENSG00000064961	-1.190754759	5.65E-06
MCM10	ENSG00000065328	2.02858418	3.97E-07
SLK	ENSG00000065613	1.073329305	2.51E-05
ASPM	ENSG00000066279	1.564322599	6.36E-06
SPI1	ENSG00000066336	-1.116608276	0.003909101
LRRC40	ENSG00000066557	1.042418875	1.67E-05
PRKCZ	ENSG00000067606	-1.034404189	0.008947254
KCNAB2	ENSG00000069424	-1.481878907	0.010098748
WIPI1	ENSG00000070540	-1.176176752	0.000711801
TRIP13	ENSG00000071539	1.060819562	0.000475862
ATP6AP1	ENSG00000071553	-1.199535279	3.65E-11
HLTF	ENSG00000071794	1.076777878	0.000230201
HMMR	ENSG00000072571	1.389969504	2.37E-05

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
SCARB1	ENSG00000073060	-1.038515615	0.015952589
MBNL3	ENSG00000076770	1.152527532	0.012493052
NMRK2	ENSG00000077009	-2.961714483	0.046075999
FAM76B	ENSG00000077458	1.02141829	0.003087728
N4BP2	ENSG00000078177	1.178991988	0.005696854
TP53INP2	ENSG00000078804	-1.01431844	4.75E-05
CDC14A	ENSG00000079335	1.362483015	0.011184166
PTPRH	ENSG00000080031	-1.371092862	0.002146952
DCT	ENSG00000080166	1.831978136	0.045918552
RFX3	ENSG00000080298	1.674601898	0.023588623
RIF1	ENSG00000080345	1.049596744	1.99E-05
PUM3	ENSG00000080608	1.094551028	2.18E-06
NDC80	ENSG00000080986	1.061013314	0.000536724
MAGI3	ENSG00000081026	1.070604299	0.027223214
KCNK2	ENSG00000082482	1.77060894	0.010323158
GSTP1	ENSG00000084207	-1.012343465	0.009069972
PILRA	ENSG00000085514	-1.077060625	0.023426034
PPEF1	ENSG00000086717	2.217200175	0.032458231
FTL	ENSG00000087086	-1.361885004	3.24E-06
L2HGDH	ENSG00000087299	1.200638895	0.009557875
DNMT3B	ENSG00000088305	1.27673523	0.049643582
C3orf18	ENSG00000088543	-1.004452219	0.01187242
CFAP61	ENSG00000089101	-2.542745526	0.03991292
AC013461.1	-	1.131973168	0.009253273
ORC6	ENSG00000091651	1.009344475	0.002925067
G2E3	ENSG00000092140	1.149629081	0.003915302
CLSPN	ENSG00000092853	1.261459638	0.000121807
UNC13D	ENSG00000092929	-1.336911277	0.033600379
TBC1D2	ENSG00000095383	-1.111834639	0.002886773
IKZF5	ENSG00000095574	1.034583614	0.000555185
CYP26A1	ENSG00000095596	2.886089287	0.011181313
TREM2	ENSG00000095970	-1.843169543	2.56E-05
SRPK1	ENSG00000096063	1.077784114	1.66E-07
JAK2	ENSG00000096968	2.001533217	0.000110943
NRP1	ENSG00000099250	1.395853681	0.002524298
HSD3B7	ENSG00000099377	-1.088220738	0.007615826
MARCH2	ENSG00000099785	-1.167420121	3.27E-06
MTAP	ENSG00000099810	1.252240145	0.00717799
SLC7A4	ENSG00000099960	-2.940465669	0.031548761
GRK3	ENSG00000100077	1.67439295	0.000715536
TOM1	ENSG00000100284	-1.05735636	1.18E-05
HMOX1	ENSG00000100292	-1.354764224	0.000496508
MLC1	ENSG00000100427	-3.256783641	0.029968215
ABHD4	ENSG00000100439	-1.025823374	3.99E-05
POLE2	ENSG00000100479	1.578377559	5.55E-05
GNPNAT1	ENSG00000100522	1.02053523	0.000177198
PLEK2	ENSG00000100558	1.81518368	0.024871535
CEP128	ENSG00000100629	1.490061715	0.033600379
DHRS2	ENSG00000100867	2.037997659	0.039550672

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
GIN51	ENSG00000101003	1.254067936	3.27E-06
CTSZ	ENSG00000101160	-1.106934399	5.53E-06
NTSR1	ENSG00000101188	5.17372478	0.015694601
SNPH	ENSG00000101298	-1.02018364	0.021878381
CST3	ENSG00000101439	-1.088060681	2.17E-06
MAP1LC3A	ENSG00000101460	-1.168624373	0.000548674
CEP76	ENSG00000101624	1.134821387	0.04801785
ATP11C	ENSG00000101974	1.081834552	0.001341117
ABCD1	ENSG00000101986	-1.589613499	7.61E-05
BMX	ENSG00000102010	4.102972834	0.00472367
LUZP4	ENSG00000102021	3.386542437	0.030776449
RENBP	ENSG00000102032	-1.06861386	0.003749993
TIMP1	ENSG00000102265	-1.321153558	0.000749169
CENPI	ENSG00000102384	1.12774347	0.009089333
DGKH	ENSG00000102780	1.527008559	0.015467707
PARDA6A	ENSG00000102981	-1.05362579	0.013262858
WFDC1	ENSG00000103175	-3.515747708	0.036838695
LMF1	ENSG00000103227	-1.000519144	0.005699099
PYCARD	ENSG00000103490	-1.344045743	0.004634853
CCP110	ENSG00000103540	1.037900633	0.005646183
OCA2	ENSG00000277361	-3.04680205	0.017904725
CSPP1	ENSG00000104218	1.064026791	0.003219216
ZDHHC2	ENSG00000104219	1.339312582	0.036656417
NDRG1	ENSG00000104419	-1.434092399	0.004053411
NCALD	ENSG00000104490	-1.364566886	0.008540985
DHDH	ENSG00000104808	-2.414048636	0.000644894
PEX11G	ENSG00000104883	-1.343612412	0.000559312
OLFM2	ENSG00000105088	-1.472924688	0.035576543
SLC1A5	ENSG00000105281	-1.311872076	0.001591372
MEIS3	ENSG00000105419	-1.87309712	0.005320262
TMEM205	ENSG00000105518	-1.040081529	4.68E-08
RAB3A	ENSG00000105649	-1.19085055	0.000733947
UPK1A	ENSG00000105668	-1.811384494	0.023489041
MAG	ENSG00000105695	4.040900721	0.015163282
HAMP	ENSG00000105697	-2.36943841	0.009557875
MPP6	ENSG00000105926	1.030138847	0.04904621
DFNA5	ENSG00000105928	-1.317211294	0.00637167
LFNG	ENSG00000106003	-1.180775027	0.025816647
TMEM176B	ENSG00000106565	-1.021971395	0.009913496
PLGRKT	ENSG00000107020	1.270279808	0.00236386
DDX58	ENSG00000107201	1.188723681	0.001782723
PTGDS	ENSG00000107317	-1.766723252	0.027191044
CCNJ	ENSG00000107443	1.383557692	0.000295445
TRDMT1	ENSG00000107614	1.593636729	0.018658044
MAPK8	ENSG00000107643	1.069122504	0.007537823
TLX1	ENSG00000107807	-2.90967489	0.024406969
ANKRD26	ENSG00000107890	1.547482397	0.001792227
TFAM	ENSG00000108064	1.860987153	1.73E-23
CUL2	ENSG00000108094	1.014387999	9.36E-07

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
SEPT4	ENSG00000108387	-1.650340759	0.002470519
RASD1	ENSG00000108551	-1.420841456	0.024743728
FAM20A	ENSG00000108950	-1.583507982	0.003653983
AADAT	ENSG00000109576	1.124999822	0.017904725
SOD3	ENSG00000109610	-1.355428982	0.031581884
NEIL3	ENSG00000109674	1.137232005	0.016777743
NCAPG	ENSG00000109805	1.352945627	1.09E-06
CCDC34	ENSG00000109881	1.023024694	0.00447825
VWA5A	ENSG00000110002	-1.012545432	0.044183214
CHORDC1	ENSG00000110172	1.053351783	0.00112573
SLC15A3	ENSG00000110446	-1.015792294	0.03322015
SLC22A18	ENSG00000276130	-1.486283854	2.79E-06
SLC35F2	ENSG00000110660	1.823886423	0.003314242
SLC6A12	ENSG00000111181	-1.798160782	0.036911065
RAD51AP1	ENSG00000111247	1.489222347	2.49E-06
SLC38A1	ENSG00000111371	1.972273698	0.010300852
PAK1IP1	ENSG00000111845	1.079803516	4.11E-07
CEP85L	ENSG00000111860	1.006198142	0.027608942
ADTRP	ENSG00000111863	2.058256503	0.038162003
TTK	ENSG00000112742	1.196179509	0.000541948
LY86	ENSG00000112799	-1.128934106	0.01119501
GHR	ENSG00000112964	2.141118359	0.045575087
POLR3G	ENSG00000113356	1.015074333	0.004432807
SMC4	ENSG00000113810	1.282186369	1.50E-05
COL7A1	ENSG00000114270	2.954538122	0.049118439
ECT2	ENSG00000114346	1.577099654	1.53E-07
KCNIP3	ENSG00000115041	-1.539286214	0.007781242
FNDC4	ENSG00000115226	-1.030072463	0.037537551
ITGA4	ENSG00000115232	1.760507398	0.001248695
REEP6	ENSG00000115255	-2.226787354	6.44E-07
IFIH1	ENSG00000115267	1.000715156	0.01121712
KCNJ13	ENSG00000115474	1.939937114	0.047447469
TAF1B	ENSG00000115750	1.013262346	9.94E-05
SLC1A4	ENSG00000115902	-1.109391996	0.007152641
FBXO2	ENSG00000116661	-2.102025622	0.001009784
AGMAT	ENSG00000116771	1.154298374	0.029601802
OLFML3	ENSG00000116774	-1.314095559	0.020065304
ID3	ENSG00000117318	-1.133120317	0.028379933
NEK2	ENSG00000117650	1.118404372	0.000110943
CENPF	ENSG00000117724	1.095072855	6.47E-05
CTSD	ENSG00000117984	-1.918280008	2.92E-11
KIF14	ENSG00000118193	1.806770401	7.72E-07
CTGF	ENSG00000118523	-1.111081555	0.020113748
ZNF430	ENSG00000278780	1.183319524	0.036303344
SPP1	ENSG00000118785	-1.707506851	0.001704098
RARRES1	ENSG00000118849	-1.027195643	0.026109868
PIGZ	ENSG00000119227	-1.058334057	0.02425113
ZC2HC1C	ENSG00000119703	-3.213329678	0.012391939
IFIT3	ENSG00000119917	1.07828883	0.006826861

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
IFIT2	ENSG00000119922	1.026080631	0.00816213
HELLS	ENSG00000119969	1.487625713	0.000744173
RCL1	ENSG00000120158	1.613381897	0.00096054
KCNJ5	ENSG00000120457	-2.103128526	0.025836668
NUDCD1	ENSG00000120526	1.200249575	2.46E-07
TMPO	ENSG00000120802	1.04039262	9.36E-07
LYPLA1	ENSG00000120992	1.038664847	5.55E-05
NCAPH	ENSG00000121152	1.03425188	0.000253816
MND1	ENSG00000121211	1.062890062	0.000722336
PLBD1	ENSG00000121316	-1.318027088	0.015095066
KIF18A	ENSG00000121621	1.533862515	5.76E-05
FABP3	ENSG00000121769	-1.07127461	0.000551677
PAEP	ENSG00000122133	-5.297616605	0.000951628
HS3ST2	ENSG00000122254	-3.334120391	0.000642304
LDB3	ENSG00000122367	1.720136288	0.027000471
TRMT13	ENSG00000122435	1.109768742	0.000548464
ZNF644	ENSG00000122482	1.057835385	7.47E-06
CCDC18	ENSG00000122483	1.457976572	0.013982981
CENPK	ENSG00000123219	1.325164402	0.001490744
ATF1	ENSG00000123268	1.463693636	7.58E-05
STIL	ENSG00000123473	1.233086303	0.00120086
USP45	ENSG00000123552	1.404012454	0.011040836
XG	ENSG00000124343	1.905155163	0.014387018
ATP8A1	ENSG00000124406	2.027701587	0.006706627
TREM1	ENSG00000124731	-3.804210882	0.015694601
DEK	ENSG00000124795	1.180160335	2.90E-08
RAB17	ENSG00000124839	-1.094385015	0.00611347
EREG	ENSG00000124882	4.008177796	0.040745776
TRIM51	ENSG00000124900	1.51803756	0.003734002
SH3TC1	ENSG00000125089	-1.703403221	6.44E-07
MT2A	ENSG00000125148	-1.585830403	0.000840964
PCSK2	ENSG00000125851	-3.716536126	0.01007724
MCM8	ENSG00000125885	1.218306449	2.40E-05
CITED1	ENSG00000125931	-1.491749294	0.007478791
LRFN3	ENSG00000126243	-1.062378234	0.000376122
HCST	ENSG00000126264	-1.03520293	0.038704618
DLGAP5	ENSG00000126787	1.341004833	3.36E-06
HELB	ENSG00000127311	1.679184233	0.013002006
IL17B	ENSG00000127743	-3.236594457	0.039272816
PPAT	ENSG00000128059	1.118670662	1.32E-05
PODXL	ENSG00000128567	1.207139	0.031450542
HOXD13	ENSG00000128714	1.648420391	0.008331949
ALDH1A2	ENSG00000128918	-4.068417572	0.042944648
PUS7L	ENSG00000129317	1.312734188	0.012743462
MIS18BP1	ENSG00000129534	1.146802775	1.32E-05
SGO1	ENSG00000129810	1.703938401	2.68E-05
SHC2	ENSG00000129946	-1.290557455	0.033003075
TNNI3	ENSG00000129991	-1.828037928	0.04896737
CRACR2A	ENSG00000130038	2.00981983	0.001049793

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
GADD45G	ENSG00000130222	-1.555690714	0.019600599
DPP6	ENSG00000130226	-2.092985882	0.045071928
KIF1A	ENSG00000130294	-3.754851559	0.003847304
JUND	ENSG00000130522	-1.028974351	6.24E-05
OLFM1	ENSG00000130558	-2.292329545	0.016664614
LSP1	ENSG00000130592	-1.077991174	0.010947827
TNNI2	ENSG00000130598	-2.435176872	0.024800517
COL5A1	ENSG00000130635	-1.162034571	0.009614348
COX4I2	ENSG00000131055	-1.018484588	0.044325957
RAB11FIP4	ENSG00000131242	-1.000585842	0.043459214
LRRRC4B	ENSG00000131409	-2.180563839	0.020905175
ANO1	ENSG00000131620	1.430994527	0.048503315
FCRLA	ENSG00000132185	-1.587887122	0.011999475
EMILIN2	ENSG00000132205	-1.001213278	0.044694238
RAMP1	ENSG00000132329	-2.578037048	0.000714736
WBP2	ENSG00000132471	-1.157372776	2.11E-08
TRIM47	ENSG00000132481	-1.093985511	0.000246658
PCBD2	ENSG00000132570	1.404658712	0.025882674
ALDH3B2	ENSG00000132746	-3.562371412	0.013761425
CHI3L1	ENSG00000133048	-5.292858521	8.87E-08
CHIT1	ENSG00000133063	-3.643621064	0.010288328
RFC3	ENSG00000133119	1.107540475	9.28E-05
PRAM1	ENSG00000133246	-2.058672931	0.017403012
AGAP3	ENSG00000133612	-1.098071372	0.000105881
LRRCC1	ENSG00000133739	1.060666402	0.012483846
TEX15	ENSG00000133863	1.51672691	0.045359521
CNTN6	ENSG00000134115	-2.436742203	0.033640342
RSAD2	ENSG00000134321	1.45494339	0.024896527
MYCN	ENSG00000134323	-2.40585284	0.030992752
FST	ENSG00000134363	-2.17189765	0.023717943
SPOCD1	ENSG00000134668	2.939637674	0.037262622
RNF138	ENSG00000134758	1.046733912	5.79E-05
APLNR	ENSG00000134817	1.468308594	0.04639538
SLC37A2	ENSG00000134955	-1.131303357	0.005941549
SDS	ENSG00000135094	-1.702421607	0.001701571
DTX1	ENSG00000135144	-2.2783553	0.011147281
CD36	ENSG00000135218	1.175715775	0.046831521
ITGA7	ENSG00000135424	-1.30874847	0.016813439
KCNMB4	ENSG00000135643	-2.245849127	0.016032045
USP15	ENSG00000135655	1.093886088	0.001853328
KCNK1	ENSG00000135750	-2.457087677	0.019928658
USP37	ENSG00000135913	1.212969146	0.037257272
HTR2B	ENSG00000135914	3.301546698	0.00351971
CKAP2	ENSG00000136108	1.091750511	1.70E-05
BORA	ENSG00000136122	1.00755394	0.010307143
TTYH3	ENSG00000136295	-1.264718267	0.000263613
BRIP1	ENSG00000136492	1.220525349	0.010002975
SMC2	ENSG00000136824	1.014608482	0.000392385
DSCC1	ENSG00000136982	1.321417046	8.36E-05

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
NOV	ENSG00000136999	-2.194290555	0.009089333
THAP12	ENSG00000137492	1.032140385	2.06E-05
PI15	ENSG00000137558	2.47237633	0.002376301
DDX60	ENSG00000137628	1.477832959	0.000233225
FXYD6	ENSG00000137726	-1.840873086	0.001506441
ALKBH8	ENSG00000137760	1.277123669	0.00388841
ITGA11	ENSG00000137809	-2.333704148	0.001202802
KNL1	ENSG00000137812	1.218047204	0.007463169
PAQR5	ENSG00000137819	1.846290733	0.023733792
GCHFR	ENSG00000137880	-1.669889686	0.00208259
KIF11	ENSG00000138160	1.36197497	6.72E-07
CEP55	ENSG00000138180	1.355881922	2.60E-06
KIF20B	ENSG00000138182	1.967765115	7.32E-09
EXOC6	ENSG00000138190	1.349089854	1.81E-05
DNA2	ENSG00000138346	2.159503272	6.56E-05
BARD1	ENSG00000138376	1.011345383	0.018369399
CHRNA1	ENSG00000138435	-4.041644439	4.50E-05
HERC6	ENSG00000138642	1.36064529	0.009034472
CENPE	ENSG00000138778	1.722251131	1.02E-06
ALG10	ENSG00000139133	1.502009756	0.028388284
FAM60A	ENSG00000276371	1.170081056	4.98E-05
MARCH9	ENSG00000139266	-1.003033954	0.002358924
SLC46A3	ENSG00000139508	-1.037795363	0.022829031
BRCA2	ENSG00000139618	1.830672359	0.001427831
DIAPH3	ENSG00000139734	1.579523543	3.39E-05
RAB20	ENSG00000139832	-1.125691887	0.002856006
DISP2	ENSG00000140323	-1.379729221	0.024163347
DNAJA4	ENSG00000140403	-1.245362297	0.01660135
RLBP1	ENSG00000140522	1.496392374	0.029142529
ITGAX	ENSG00000140678	-1.002931364	0.027487596
OSGIN1	ENSG00000140961	-1.707142332	6.24E-05
ARSG	ENSG00000141337	-1.295531313	0.000894101
TAF4B	ENSG00000141384	1.357233813	0.000110128
PMAIP1	ENSG00000141682	1.147400814	0.023733792
TRPM2	ENSG00000142185	-1.018729586	0.018457089
PLK4	ENSG00000142731	1.36273098	0.000110215
FCN3	ENSG00000142748	-2.28428753	0.0227549
TINAGL1	ENSG00000142910	-1.440276922	0.01123514
MTF2	ENSG00000143033	1.101513748	3.38E-05
NUF2	ENSG00000143228	1.453157652	2.45E-05
CRABP2	ENSG00000143320	-1.498190762	0.005541283
RGS16	ENSG00000143333	1.03075903	0.034753633
ECM1	ENSG00000143369	-1.163513188	0.012256467
SLC27A3	ENSG00000263163	-2.633027923	3.40E-09
ITPKB	ENSG00000143772	-1.56586829	9.10E-05
EPHX1	ENSG00000143819	-1.793869179	1.77E-08
CHAC2	ENSG00000143942	1.783793949	1.39E-05
ZC3H8	ENSG00000144161	1.006197869	0.027608942
GPR17	ENSG00000144230	-4.677067019	0.035156218

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
CDCA7	ENSG00000144354	1.398930165	0.000650841
HES6	ENSG00000144485	-1.462207676	0.005828594
CNTN4	ENSG00000144619	-2.697878792	0.017564655
TAGLN3	ENSG00000144834	3.449713587	0.049521467
BOC	ENSG00000144857	-1.798739002	0.014204015
OCIAD2	ENSG00000145247	1.322476991	0.044088853
TRMT10A	ENSG00000145331	1.155546363	0.02473109
CCNA2	ENSG00000145386	1.222361197	4.56E-06
SKP2	ENSG00000145604	1.035164424	0.001009784
PAM	ENSG00000145730	-1.089112433	0.0496319
MTFR2	ENSG00000146410	1.290771241	0.007074167
GPC3	ENSG00000147257	-2.86681865	0.007761108
AK3	ENSG00000147853	1.41357313	0.000179674
UHRF2	ENSG00000147854	1.059961195	0.004028971
HAUS6	ENSG00000147874	1.125945868	0.001060306
UGCG	ENSG00000148154	1.072548526	0.002739962
GSN	ENSG00000148180	-1.119173228	4.79E-06
NR6A1	ENSG00000148200	1.625161784	0.031728483
TAF5	ENSG00000148835	1.376615736	0.001862181
ADM	ENSG00000148926	-1.278423283	0.0072618
ZC3H12C	ENSG00000149289	1.050842896	0.013761425
CCDC15	ENSG00000149548	1.409613937	0.026489344
CHEK1	ENSG00000149554	1.085650894	0.000763781
HMGAA2	ENSG00000149948	2.769023086	0.007751899
ITGB1	ENSG00000150093	1.002722875	0.002021918
IPMK	ENSG00000151151	1.795823587	0.000226309
GXYLT1	ENSG00000151233	1.206422377	0.006225487
SCLT1	ENSG00000151466	1.036413422	0.02204254
CENPU	ENSG00000151725	1.035136387	0.000358052
SACS	ENSG00000151835	1.135714564	0.002849015
AP1S3	ENSG00000152056	1.642371871	0.021167709
HSPB8	ENSG00000152137	-3.401947083	3.28E-08
SPC25	ENSG00000277909	1.010620122	0.003106359
PDK1	ENSG00000152256	1.011042643	0.007061888
SUV39H2	ENSG00000152455	1.229708285	2.21E-05
CCNO	ENSG00000152669	-1.613349114	0.001803449
GPR180	ENSG00000152749	1.039777066	0.000843113
UCHL1	ENSG00000154277	-2.016764842	0.045694583
FAM167A	ENSG00000154319	1.908182355	0.039794125
OTUD6B	ENSG00000155100	1.072161271	7.58E-05
C16orf87	ENSG00000155330	1.047542808	0.036494596
ALS2CR11	-	1.409062455	0.032722004
LSM11	ENSG00000155858	1.021647019	0.049780608
PCGF6	ENSG00000156374	1.458147126	5.19E-05
SFR1	ENSG00000156384	1.116723308	0.004336773
TBC1D31	ENSG00000156787	1.434184092	0.001886373
ATAD2	ENSG00000156802	1.181490541	6.72E-07
SASS6	ENSG00000156876	1.590346894	3.40E-05
COX6A2	ENSG00000156885	-1.66007709	0.039755598

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
CDC25C	ENSG00000158402	1.036874078	0.015222194
FCER1G	ENSG00000158869	-2.161434014	0.000177039
CCDC24	ENSG00000159214	-1.112600194	0.00521235
MORC3	ENSG00000159256	1.019783763	2.18E-06
SPON2	ENSG00000159674	-1.496591613	0.004308761
ANKLE1	ENSG00000160117	1.689724608	0.048435857
G6PD	ENSG00000160211	-1.035290493	4.79E-06
CSTB	ENSG00000160213	-1.007464769	0.002136075
SLC2A6	ENSG00000160326	-1.137480523	0.026138265
ZNF714	ENSG00000160352	1.562375269	0.018389454
ZDHHC12	ENSG00000160446	-1.227632782	5.65E-06
MFS12	ENSG00000161091	-1.629819102	0.00013244
CYGB	ENSG00000161544	-1.179995889	0.012248519
CXCL16	ENSG00000161921	-1.196350302	0.000344357
CYB561A3	ENSG00000162144	-1.23601074	0.000556172
TPCN2	ENSG00000162341	-1.1415655	0.008622098
DHRS3	ENSG00000162496	-1.052954895	0.00505534
CADM3	ENSG00000162706	-1.993000489	0.049952
IGSF8	ENSG00000162729	-1.309267279	2.13E-05
MT2P1	ENSG00000278061	-1.611315597	0.003926543
CCDC138	ENSG00000163006	1.735255355	0.002963423
VSNL1	ENSG00000163032	2.495818412	0.021689031
NEURL3	ENSG00000163121	-1.637761444	0.008826406
FZD5	ENSG00000163251	1.055524318	0.016046752
FAM175A	ENSG00000163322	1.588939785	0.003909101
KIAA1524	ENSG00000163507	1.711879403	1.22E-06
SGO2	ENSG00000163535	1.495445053	0.000104735
KIF15	ENSG00000163808	1.139119469	0.001260588
WDR43	ENSG00000163811	1.022266631	1.03E-09
LRPAP1	ENSG00000163956	-1.055425265	0.000158871
MELTF	ENSG00000163975	-1.54513163	0.02087468
CAMP	ENSG00000164047	-3.382698701	0.004446887
MAD2L1	ENSG00000164109	1.355591457	3.93E-07
NAA15	ENSG00000164134	1.116405332	4.68E-08
F2RL1	ENSG00000164251	2.957054204	0.022798216
ESM1	ENSG00000164283	2.923283982	0.000204128
TERT	ENSG00000164362	1.615576074	0.024178317
DCBLD1	ENSG00000164465	1.035513406	0.047162975
STXBP5	ENSG00000164506	1.040432663	0.019763731
IL31RA	ENSG00000164509	2.748572352	0.026599467
STEAP1	ENSG00000164647	2.009361413	4.09E-05
USP49	ENSG00000164663	1.464156034	0.020440783
CTSB	ENSG00000164733	-1.150314543	0.002509838
CDK5	ENSG00000164885	-1.093294867	3.27E-06
FBP1	ENSG00000165140	-1.40390944	0.012799269
KIAA1958	ENSG00000165185	1.269822935	0.04265052
ASB11	ENSG00000165192	2.183965193	0.026292659
CARD19	ENSG00000165233	-1.130913819	0.000105881
AQP3	ENSG00000165272	-1.774974359	0.007813207

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
MELK	ENSG00000165304	1.231332258	3.78E-06
HECTD2	ENSG00000165338	1.857638638	0.00759431
INTS6L	ENSG00000165359	1.21612964	0.034875382
SKA3	ENSG00000165480	1.162744726	0.000658275
DDIAS	ENSG00000165490	2.060908731	6.11E-06
PDZD8	ENSG00000165650	1.008734567	0.000659743
FAM69B	ENSG00000165716	-1.044231256	0.021435872
DDX21	ENSG00000165732	1.438671932	2.17E-13
E2F7	ENSG00000165891	1.785024132	0.00237942
ARL5B	ENSG00000165997	1.161432617	0.000111909
AVPR1A	ENSG00000166148	1.811047546	0.040774538
CKB	ENSG00000166165	-1.334235166	0.029071143
SERPINB7	ENSG00000166396	4.67432868	0.010536316
BEAN1	ENSG00000166546	-2.457320759	0.005274251
SLC38A8	ENSG00000166558	-3.627425793	0.004638713
NNMT	ENSG00000166741	-1.219325192	0.014758038
KIAA0101	-	1.032147637	0.002305768
MESP1	ENSG00000166823	-1.479274691	0.013194015
ANPEP	ENSG00000166825	1.789759612	0.006936394
C18orf54	ENSG00000166845	1.641090599	0.00353164
EVA1C	ENSG00000166979	-1.049332753	0.025031651
NAT16	ENSG00000167011	-2.647311155	0.039672225
IGF2	ENSG00000167244	-3.537198967	0.000243204
FN3K	ENSG00000167363	-1.230264498	0.000745781
PSCA	ENSG00000167653	-2.372883419	0.011498667
KLK1	ENSG00000167748	-1.997753712	0.023644576
MGAT5B	ENSG00000167889	-2.981693305	2.89E-05
KIAA1586	ENSG00000168116	1.016309093	0.001019799
MFSD2A	ENSG00000168389	-1.050863245	0.030258748
LGI3	ENSG00000168481	-1.992953313	0.029943782
SERINC2	ENSG00000168528	-1.281889657	0.004488227
GFRA2	ENSG00000168546	-3.693017417	0.040283743
ATOH8	ENSG00000168874	-1.260133796	0.017458833
RAB3B	ENSG00000169213	2.719835726	0.007287605
NPR1	ENSG00000169418	-1.580364509	0.025059653
BUB1	ENSG00000169679	1.04959345	3.11E-05
AGPAT2	ENSG00000169692	-1.084269928	9.38E-05
DCXR	ENSG00000169738	-1.04951249	0.000304541
PCDH7	ENSG00000169851	1.439397227	0.004455831
CDK1	ENSG00000170312	1.578205611	1.44E-10
CST2	ENSG00000170369	4.409388268	0.01466537
MGMT	ENSG00000170430	-1.023526554	0.042056983
ELOVL6	ENSG00000170522	1.160977029	0.001913408
DPY19L2P2	ENSG00000282026	1.032125972	0.026036514
KIF5B	ENSG00000170759	1.008029708	3.13E-05
HAS2	ENSG00000170961	1.48487767	0.033356804
C9orf16	ENSG00000171159	-1.317758947	1.50E-06
TMEM37	ENSG00000171227	-1.29969573	0.005339039
ESCO2	ENSG00000171320	1.617158152	0.001391047

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
KRT27	ENSG00000171446	-2.614639	0.020760317
CDK5R2	ENSG00000171450	-1.937125442	0.036714617
MAP6	ENSG00000171533	-2.072753431	0.023675149
PTCRA	ENSG00000171611	-3.021105439	0.00077903
MLLT3	ENSG00000171843	1.092022215	0.030776449
DRC3	ENSG00000171962	-1.351479243	0.03295996
JMJD1C	ENSG00000171988	1.167904553	0.000102241
MTBP	ENSG00000172167	1.89548983	0.002469432
CEBPB	ENSG00000172216	-1.010298308	0.00011164
B3GALT1	ENSG00000172318	1.469067348	0.027426213
RSPH9	ENSG00000172426	-1.145223198	0.038960313
NAA16	ENSG00000172766	1.158990439	0.002011019
CYP7B1	ENSG00000172817	1.684259926	0.004711378
EGFL7	ENSG00000172889	-1.270098017	0.000715992
LCLAT1	ENSG00000172954	1.07557963	0.002331735
ZNF680	ENSG00000173041	1.092951994	0.043907875
NOC3L	ENSG00000173145	1.551303153	2.42E-13
CEP83	ENSG00000173588	1.046598746	0.023596199
NET1	ENSG00000173848	1.29780062	0.002745454
C1QTNF1	ENSG00000173918	-1.751745632	2.67E-06
TCAP	ENSG00000173991	-1.392830647	0.034315917
GNG5	ENSG00000174021	-1.012636464	0.003219209
PHLDA3	ENSG00000174307	-1.321671121	0.000415719
EXO1	ENSG00000174371	1.1928096	0.00018257
CEP135	ENSG00000174799	1.40398719	0.004557686
CCNE2	ENSG00000175305	1.579988681	0.010120424
SCUBE2	ENSG00000175356	-2.553625399	0.000390943
ALG10B	ENSG00000175548	1.092953269	0.043907875
A2M	ENSG00000175899	-1.123768369	0.002928509
DLEU1	ENSG00000176124	1.452521103	0.01055813
ATAD5	ENSG00000176208	1.864565532	0.000333341
GJC3	ENSG00000176402	3.391596973	0.000135861
ZNF575	ENSG00000176472	-1.19451313	0.032098109
PHLDB3	ENSG00000176531	-1.038778351	0.001940676
DPP7	ENSG00000176978	-1.251786592	4.87E-07
FMR1NB	ENSG00000176988	-4.376931436	0.048014804
B3GNT8	ENSG00000177191	-2.051308787	0.005344346
GSG2	ENSG00000177602	1.036581299	0.014765426
GBA	ENSG00000262446	-1.018554681	0.000104321
FAM20C	ENSG00000177706	-1.271210987	0.010342094
NECTIN3	ENSG00000177707	1.632245235	0.015055799
ZBTB41	ENSG00000177888	1.018469	0.000889661
SPINK6	ENSG00000178172	4.923364296	0.0338633
GEN1	ENSG00000178295	1.441223865	0.004512209
ALOX15B	ENSG00000179593	-2.334205964	0.028867874
GIPC3	ENSG00000179855	-1.140225023	0.026615908
NRIP1	ENSG00000180530	1.315464083	0.000169914
EIF2S3L	-	1.512307038	0.047985335
SHISA2	ENSG00000180730	1.978905744	0.007607614

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
SSR4	ENSG00000180879	-1.000210999	2.76E-06
NQO1	ENSG00000181019	-1.507573415	0.000664333
LRRC75A	ENSG00000181350	-1.446796517	0.004172605
DDX60L	ENSG00000181381	1.007165705	0.029760284
DDN	ENSG00000181418	1.800971788	0.023479047
FANCB	ENSG00000181544	1.368246237	0.020905175
FDCSP	ENSG00000181617	3.067736418	0.005674147
RTKN2	ENSG00000182010	1.910814789	0.003471123
MRPL41	ENSG00000182154	-1.058739816	6.36E-05
SYNM	ENSG00000182253	-1.449468782	0.013761253
AP1S2	ENSG00000182287	1.219447246	9.28E-05
TSPAN10	ENSG00000182612	-1.608343472	0.047447469
VMO1	ENSG00000182853	-1.335583208	0.011302474
GAS6	ENSG00000183087	-1.044785518	0.00712623
C19orf71	ENSG00000183397	-1.280217817	0.009114354
TANGO2	ENSG00000183597	-1.177777882	3.31E-05
DGCR6	ENSG00000183628	-1.781168993	0.007195571
UPP1	ENSG00000183696	-1.016367723	0.001683268
CHEK2	ENSG00000183765	1.01443341	0.000593879
LIN9	ENSG00000183814	1.364546942	0.000288371
PRKX	ENSG00000183943	1.07386724	0.014855645
DUSP8	ENSG00000278165	-1.822865267	0.014031236
APOBR	ENSG00000184730	-1.008066468	0.031116308
SOCS1	ENSG00000185338	-1.181972674	0.037141953
TCN2	ENSG00000185339	-1.124439922	0.002842307
PARPBP	ENSG00000185480	1.629251993	9.12E-05
DLK1	ENSG00000185559	-5.297683891	0.024392515
MYBL1	ENSG00000185697	1.059553713	0.031196806
NRG3	ENSG00000185737	2.405708088	0.00359398
IFIT1	ENSG00000185745	1.631288776	0.004495181
KCNQ5	ENSG00000185760	1.361906343	0.038787597
ADAMTSL5	ENSG00000185761	-1.191444722	0.030258748
PCYT2	ENSG00000185813	-1.262128746	3.36E-06
ZNF566	ENSG00000186017	1.060906129	0.039075078
ERCC6L	ENSG00000186871	1.653405131	0.001505061
TNFRSF18	ENSG00000186891	-1.280165482	0.043325649
FANCM	ENSG00000187790	1.404084236	0.03225378
WNT7B	ENSG00000188064	4.667141476	0.004483811
C19orf35	ENSG00000188305	-2.054518972	0.026837236
CERKL	ENSG00000188452	1.3780695	0.012621483
IER5L	ENSG00000188483	-1.248739833	9.10E-05
FAM111B	ENSG00000189057	1.196394772	0.001288227
GAGE2A	ENSG00000189064	3.697679455	0.01336471
PLAC9	ENSG00000189129	-1.429571411	0.007019249
LCOR	ENSG00000196233	1.63168923	0.002779343
ZNF107	ENSG00000196247	1.155545927	0.02473109
CACNA1H	ENSG00000196557	-2.473603183	0.045694583
XRCC2	ENSG00000196584	1.446962671	0.000438836
MMP1	ENSG00000196611	5.469061338	6.04E-06

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
FAM180B	ENSG00000196666	-1.777334862	0.018457089
S100A2	ENSG00000196754	1.78853298	0.048959465
ZNF239	ENSG00000196793	1.851857016	0.001703382
ARID5A	ENSG00000196843	-1.011214603	0.000254179
SIGLEC15	ENSG00000197046	3.063149	0.029320419
ZMYM1	ENSG00000197056	1.058586214	0.004512209
SLC6A17	ENSG00000197106	-1.757736996	0.02312986
CH17.340M24.3	-	-1.080237887	9.52E-05
SERPINA1	ENSG00000197249	-1.350538628	0.017268175
BLM	ENSG00000197299	1.080651996	0.00275386
CFD	ENSG00000197766	-1.720046074	0.000785085
S100A6	ENSG00000197956	-1.081416122	0.002004427
CD2AP	ENSG00000198087	1.063550243	1.20E-06
ZNF485	ENSG00000198298	1.930975818	0.002036745
MMP17	ENSG00000198598	-1.106523145	0.007619375
MTCO3P12	ENSG00000198744	1.989456639	0.00584852
ARHGAP11A	ENSG00000198826	1.140968661	0.001490744
SELENOM	ENSG00000198832	-1.029064357	0.042470437
LTN1	ENSG00000198862	1.256893271	3.09E-06
SHISA4	ENSG00000198892	-1.029522782	0.000259742
TGM2	ENSG00000198959	-1.208014658	0.004954872
MIR339	ENSG00000199023	-2.021213554	0.003869115
SNORA73B	ENSG00000200087	1.257042552	0.014801209
Y_RNA.109	-	1.031126982	0.033640342
SNORA71C	ENSG00000201512	1.556998462	0.006488055
X7SK	-	-1.047408335	0.008264923
SNORD6	ENSG00000202314	1.545923301	0.000644894
METTL10	-	1.137272695	0.011174801
LINC00963	ENSG00000204054	-1.052719425	1.52E-05
RUFY2	ENSG00000204130	1.172654194	0.018011375
ASAH2B	ENSG00000204147	1.404225612	0.025851579
TIMM23B	ENSG00000204152	1.095005822	0.013541307
CXorf65	ENSG00000204165	1.015226397	0.041345628
HSPA1B	ENSG00000232804	-1.023194543	0.020518889
CFI	ENSG00000205403	-1.358233964	0.026581896
GAGE1	ENSG00000205777	2.763791672	0.012413138
PLPP6	ENSG00000205808	1.075628118	0.018838105
SNORD60.1	-	1.610860527	0.030995505
RNU6.26P	-	1.807981699	0.044960117
SNORA66	ENSG00000207523	1.348094327	0.028235191
MIR635	ENSG00000207561	-1.416381651	5.72E-05
MIR590	ENSG00000207741	1.414463724	0.007364982
SNORD83A	ENSG00000209482	1.630478046	0.011698723
IGKV6.21	-	-4.797744379	0.027947805
IGLV4.60	-	-2.466022041	0.044507551
IGLV1.40	-	-2.48911592	0.007007702
IGLV3.19	-	-2.409717239	0.025827126
IGLV2.14	-	-2.173626456	0.015055799
IGHG4	ENSG00000277016	-2.038180024	0.012464203

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
IGHJ2	ENSG00000282342	-2.510074567	0.044771578
IGHD2.2	-	-5.252090077	0.005731306
IGHV4.34	-	-2.28964221	0.00264271
IGHV1.69	-	-2.264483585	0.046831521
SNORD17	ENSG00000212232	1.155971302	0.006332891
RP11.312J18.5	-	1.468126252	0.002921064
RP11.64B16.2	-	-2.808678144	0.000442777
AC093724.2	-	1.235730694	0.028940344
HNRNPA3P6	ENSG00000213300	1.256833224	0.014707905
CHUK	ENSG00000213341	1.023320006	0.000285147
FTH1P3	ENSG00000213453	-1.030626761	0.048633376
FIRRE	ENSG00000213468	1.403857331	0.025827742
RP11.252A24.2	-	1.403980425	0.025836668
RP11.726G1.1	-	-1.27624966	0.014531919
DDX12P	ENSG00000214826	1.362482249	0.011184166
FAM8A6P	ENSG00000218772	-5.482511717	0.019491489
RP11.420L9.2	-	-1.22043043	0.043771116
SNORA11.1	-	1.021645024	0.049780608
C19orf73	ENSG00000221916	-1.42015353	0.029024062
AC112721.1	-	4.056799954	0.043357566
SNORD12B	ENSG00000222365	2.093924595	0.000499226
RNU4.47P	-	-1.593763211	0.001367853
IGLV9.49	-	4.132003616	0.007685473
TINCR	ENSG00000223573	-3.694470067	0.00176488
RP11.467L13.5	-	3.727743349	0.018376652
ENTPD3.AS1	-	-1.196885012	0.044858178
RP11.98L5.4	-	-4.201554995	0.030579178
MIR3681HG	ENSG00000224184	1.970158299	0.018398863
LINC01272	-	-1.807981462	0.000187456
GAGE12J	ENSG00000224659	2.980705246	0.038704829
RP11.535M15.1	-	-1.538024942	0.032164834
SNORA71A	ENSG00000225091	1.633609343	0.007522313
RP11.429E11.2	-	-2.425251982	0.03081929
C2CD4D	ENSG00000225556	-1.244771059	0.023335752
MTND2P28	ENSG00000225630	-1.062231953	0.006125239
UPK1A.AS1	-	-1.923513061	0.028940344
FTLP3	ENSG00000226608	-1.338725469	0.000388681
RP11.279N8.1	-	-1.555875199	0.049428277
FNDC10	ENSG00000228594	-2.387762507	6.35E-06
CALM2P2	ENSG00000229097	1.838356928	0.005166308
RP4.580N22.2	-	-1.366208491	0.035240713
MTCO2P12	ENSG00000229344	-3.066900887	4.34E-06
KHSRPP1	ENSG00000229835	-2.2331324	0.023604649
YWHAZP3	ENSG00000229932	1.405587228	0.046784724
RPL10P6	ENSG00000230076	-3.208781727	0.00186741
ANKRD18B	ENSG00000230453	1.269730201	0.04265052
PSMG3.AS1	-	-1.085964763	0.020744397
DLEU2	ENSG00000231607	1.568794751	0.017469135
FTLP2	ENSG00000232368	-1.39267553	0.009121227

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
RP4.730K3.3	-	-1.375836701	0.023733792
SLCO4A1.AS1	-	-1.465197344	0.023851298
GPX1	ENSG00000233276	-1.03514387	2.49E-05
RP11.295G20.2	-	-1.09147258	0.007781242
ERVWE2	-	-4.235507442	0.049952
LINC01503	ENSG00000233901	-1.647829044	0.001922666
RPL10P9	ENSG00000233913	-2.35970593	0.000116234
LINC01505.1	-	-1.729266548	0.049403797
FOXP4.AS1	-	1.350271234	0.027000471
RP11.503C24.1	-	1.727698719	0.022955153
AC104667.3	-	-1.386811432	0.014412968
AC068580.6	-	-1.556553571	0.016070078
C19orf81	ENSG00000235034	-1.22131668	0.043795607
TECRP1	ENSG00000235043	-1.222101363	0.00192497
SNORA71B	ENSG00000235408	1.832404214	0.002358924
AC073046.25	-	1.508617241	0.019400962
MSC.AS1	-	1.146015731	0.048249417
NFAM1	ENSG00000235568	-1.116443353	0.04639538
NUS1P1	ENSG00000235636	1.23559942	0.029830835
AC009237.11	-	1.167956327	0.034315917
RP4.785G19.2	-	1.010312293	0.04639538
RP11.569G13.2	-	2.859515851	0.005979856
LINC01502	ENSG00000237339	-5.347587087	0.002080527
PRSS56	ENSG00000237412	-5.892618631	0.003151661
PYY2	ENSG00000237575	-3.618670762	0.019949691
TCONS_00029157	-	-1.271162543	0.011398562
RP11.305M3.2	-	-1.471982551	0.039969682
MID1IP1.AS1	-	1.137362834	0.011382522
AP001469.9	-	1.930115447	0.002609094
TNFSF12	ENSG00000239697	-1.15545754	2.99E-05
RP11.293A21.1	-	-1.99802131	0.011398562
LINC00973	ENSG00000240476	2.331386799	0.041674895
AQP1	ENSG00000240583	-1.608827579	0.002599322
RPL23AP64	ENSG00000240970	1.400900314	0.032458231
NSUN6	ENSG00000241058	1.227155712	0.001181111
MCRIP2P1	ENSG00000241418	1.502000648	0.029222404
RP11.381E24.1	-	1.832018718	0.009151425
SNHG3	ENSG00000242125	1.094182104	0.000257185
RP13.463N16.6	-	2.1829259	0.032458231
C4orf48	ENSG00000243449	-1.63163783	1.22E-06
IFITM10	ENSG00000281618	-2.062886196	3.42E-05
RP11.1398P2.1	-	-1.393241388	0.017458833
CEBPA	ENSG00000245848	-1.429867573	0.012300382
SNHG10	ENSG00000247092	1.084877126	0.045574145
CTD.2083E4.6	-	-1.436926023	0.042212338
RP11.279O9.4	-	-1.300987458	0.022927894
RP11.177C12.1	-	1.404024682	0.014707905
RP11.124N2.1	-	-1.66241538	0.044440793
MRPS31P4	ENSG00000250299	1.11239714	0.045907411

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
RP11.71E19.1	-	-1.229034979	0.044088853
RP11.113I22.1	-	2.938186969	0.040798619
RNU2.27P	-	1.189022615	0.008038208
IGHV1.67	-	-2.938282695	0.046584056
IGLV1.41	-	-3.673559512	0.035804477
IGHV3.19	-	5.159994599	0.037542859
IGHV3.63	-	4.453190859	0.034990288
IGHV1.12	-	-4.666067042	0.003653983
RP11.27G22.1	-	2.245006584	0.00473394
IGLL5	ENSG00000254709	-2.11401295	0.017904725
RP11.109L13.1	-	-2.243548219	0.000246658
AGAP2.AS1	-	-1.115683248	0.000636583
RP11.366L20.3	-	3.238545583	0.011103781
RP11.424C20.2	-	1.474648274	0.030995505
RP11.417L19.2	-	1.503082679	0.043499617
RP11.570L15.1	-	3.223415564	0.035892175
LINC00239	ENSG00000258512	-1.476657701	0.02484751
HNRNPCP1	ENSG00000258900	1.107805186	0.019433587
CTD.2128A3.2	-	2.417232242	0.030061755
RP11.529H20.3	-	1.331023788	0.045918552
RP11.417E7.2	-	-2.741945732	0.022409432
VPS9D1.AS1	-	1.1212612	0.028782334
TPBGL	ENSG00000261594	-2.908507576	0.000816534
CTB.31N19.3	-	2.369619557	0.030593737
MIA	ENSG00000261857	-1.413041597	0.004709137
EIF1P4	ENSG00000262154	1.710544529	0.024500219
AF001548.5	-	-1.355101868	0.002270314
RP13.650J16.1	-	-1.379726455	0.024163347
AC010761.8	-	1.483773034	0.004483811
CTD.2510F5.4	-	1.071441283	7.70E-05
MIR3176	ENSG00000266235	1.245410359	0.017141096
RP11.635N19.1	-	-1.22716662	0.008315223
AC007229.3	-	1.403672013	0.025813147
CTD.2619J13.16	-	1.48229093	0.03160727
AC006262.5	-	-2.630207829	0.041667511
RP11.34P13.15	-	-1.67915139	0.028310813
U62631.5	-	1.652106578	0.026080594
AC008982.2	-	2.388158402	0.011127439
RP11.589N15.2	-	-1.06542937	0.043325649
RP11.797A18.6	-	1.559507831	0.030143926
RP11.420L9.5	-	-1.134470325	0.000984261
RP11.359E10.1	-	-1.199518782	0.007306206
RP11.2E11.9	-	-1.826316143	0.023299973
MMP28	ENSG00000271447	-1.96186726	0.027906079
CTA.363E19.2	-	1.745261723	0.005823646
CTD.2376I4.2	-	-1.488575972	0.035716043
AP000569.9	-	-1.755451516	0.025420996
RP11.20I20.4	-	-1.630944948	0.018658044
RP11.107N15.1	-	-1.673269312	0.044088853

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
RP11.313P22.1	-	-1.640366169	0.016381121
AC144831.3	-	-1.765724603	0.00400155
NUDT18	ENSG00000275074	-1.028461039	0.000271317
CCL18	ENSG00000278006	-1.931572034	0.002069813
RP11.334C17.6	-	-1.245160528	0.017670754
UHRF1	ENSG00000276043	1.266096978	0.000168701
CTD.2012K14.8	-	-1.392691822	0.039540279
RP11.872J21.5	-	1.523237255	0.01267655
MIR6835	ENSG00000276404	1.954187021	0.002015355
RP11.164P12.5	-	-2.27280669	0.00533999
RP11.278J6.4	-	-1.221732877	0.043814548
RP5.1180D12.1	-	1.553916756	0.001784458
RP11.5O17.1	-	-1.604776568	0.021446992
AC087350.1	-	1.813849252	0.006531671

Apêndice D. Lista das enzimas metabólicas diferencialmente expressos entre as os grupos baixo e alto TFAM do TCGA.

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
CYP26A1	ENSG00000095596	-2.886089287	0.011181313
TKTL1	ENSG00000007350	-2.673365433	0.033315655
BCAT1	ENSG00000060982	-2.088102518	0.009104322
DHRS2	ENSG00000100867	-2.037997659	0.039550672
ATP8A1	ENSG00000124406	-2.027701587	0.006706627
SLC38A1	ENSG00000111371	-1.972273698	0.010300852
KCNJ13	ENSG00000115474	-1.939937114	0.047447469
DCT	ENSG00000080166	-1.831978136	0.045918552
SLC35F2	ENSG00000110660	-1.823886423	0.003314242
IPMK	ENSG00000151151	-1.795823587	0.000226309
KCNK2	ENSG00000082482	-1.77060894	0.010323158
CYP7B1	ENSG00000172817	-1.684259926	0.004711378
DGKH	ENSG00000102780	-1.527008559	0.015467707
ALG10	ENSG00000139133	-1.502009756	0.028388284
HAS2	ENSG00000170961	-1.48487767	0.033356804
B3GALT1	ENSG00000172318	-1.469067348	0.027426213
AK3	ENSG00000147853	-1.41357313	0.000179674
PCBD2	ENSG00000132570	-1.404658712	0.025882674
ASAH2B	ENSG00000204147	-1.404225612	0.025851579
CERKL	ENSG00000188452	-1.3780695	0.012621483
KCNQ5	ENSG00000185760	-1.361906343	0.038787597
MTAP	ENSG00000099810	-1.252240145	0.00717799
L2HGDH	ENSG00000087299	-1.200638895	0.009557875
ELOVL6	ENSG00000170522	-1.160977029	0.001913408
AGMAT	ENSG00000116771	-1.154298374	0.029601802
AADAT	ENSG00000109576	-1.124999822	0.017904725
PPAT	ENSG00000128059	-1.118670662	1.32E-05
ALG10B	ENSG00000175548	-1.092953269	0.043907875
ATP11C	ENSG00000101974	-1.081834552	0.001341117
UGCG	ENSG00000148154	-1.072548526	0.002739962
LYPLA1	ENSG00000120992	-1.038664847	5.55E-05
GNPNAT1	ENSG00000100522	-1.02053523	0.000177198
GSTP1	ENSG00000084207	1.012343465	0.009069972
SLC15A3	ENSG00000110446	1.015792294	0.03322015
UPP1	ENSG00000183696	1.016367723	0.001683268
COX4I2	ENSG00000131055	1.018484588	0.044325957
GBA	ENSG00000262446	1.018554681	0.000104321
TRPM2	ENSG00000142185	1.018729586	0.018457089
ABHD4	ENSG00000100439	1.025823374	3.99E-05
NUDT18	ENSG00000275074	1.028461039	0.000271317
GPX1	ENSG00000233276	1.03514387	2.49E-05

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
G6PD	ENSG00000160211	1.035290493	4.79E-06
SLC46A3	ENSG00000139508	1.037795363	0.022829031
DCXR	ENSG00000169738	1.04951249	0.000304541
DHRS3	ENSG00000162496	1.052954895	0.00505534
PIGZ	ENSG00000119227	1.058334057	0.02425113
ALDH3B1	ENSG00000006534	1.062284509	0.004897313
RENBP	ENSG00000102032	1.06861386	0.003749993
AGPAT2	ENSG00000169692	1.084269928	9.38E-05
HSD3B7	ENSG00000099377	1.088220738	0.007615826
PAM	ENSG00000145730	1.089112433	0.0496319
SLC1A4	ENSG00000115902	1.109391996	0.007152641
TCN2	ENSG00000185339	1.124439922	0.002842307
SLC37A2	ENSG00000134955	1.131303357	0.005941549
KCNQ1	ENSG00000282076	1.131757913	0.01914215
SLC2A6	ENSG00000160326	1.137480523	0.026138265
TPCN2	ENSG00000162341	1.1415655	0.008622098
CA11	ENSG00000063180	1.170649346	0.000457369
ATP6AP1	ENSG00000071553	1.199535279	3.65E-11
NNMT	ENSG00000166741	1.219325192	0.014758038
FN3K	ENSG00000167363	1.230264498	0.000745781
PCYT2	ENSG00000185813	1.262128746	3.36E-06
TTYH3	ENSG00000136295	1.264718267	0.000263613
ARSG	ENSG00000141337	1.295531313	0.000894101
SLC1A5	ENSG00000105281	1.311872076	0.001591372
CKB	ENSG00000166165	1.334235166	0.029071143
HMOX1	ENSG00000100292	1.354764224	0.000496508
SOD3	ENSG00000109610	1.355428982	0.031581884
FBP1	ENSG00000165140	1.40390944	0.012799269
KCNAB2	ENSG00000069424	1.481878907	0.010098748
SLC22A18	ENSG00000276130	1.486283854	2.79E-06
NQO1	ENSG00000181019	1.507573415	0.000664333
ITPKB	ENSG00000143772	1.56586829	9.10E-05
NPR1	ENSG00000169418	1.580364509	0.025059653
ABCD1	ENSG00000101986	1.589613499	7.61E-05
AQP1	ENSG00000240583	1.608827579	0.002599322
COX6A2	ENSG00000156885	1.66007709	0.039755598
SDS	ENSG00000135094	1.702421607	0.001701571
SLC6A17	ENSG00000197106	1.757736996	0.02312986
PTGDS	ENSG00000107317	1.766723252	0.027191044
AQP3	ENSG00000165272	1.774974359	0.007813207
EPHX1	ENSG00000143819	1.793869179	1.77E-08
SLC6A12	ENSG00000111181	1.798160782	0.036911065
B3GNT8	ENSG00000177191	2.051308787	0.005344346
KCNJ5	ENSG00000120457	2.103128526	0.025836668

Gene	Ensembl ID	logFC	FDR
KCNMB4	ENSG00000135643	2.245849127	0.016032045
ALOX15B	ENSG00000179593	2.334205964	0.028867874
DHDH	ENSG00000104808	2.414048636	0.000644894
KCNK1	ENSG00000135750	2.457087677	0.019928658
CACNA1H	ENSG00000196557	2.473603183	0.045694583
SLC27A3	ENSG00000263163	2.633027923	3.40E-09
SLC7A4	ENSG00000099960	2.940465669	0.031548761
MGAT5B	ENSG00000167889	2.981693305	2.89E-05
OCA2	ENSG00000277361	3.04680205	0.017904725
HS3ST2	ENSG00000122254	3.334120391	0.000642304
ALDH3B2	ENSG00000132746	3.562371412	0.013761425
CHIT1	ENSG00000133063	3.643621064	0.010288328
CHRNA1	ENSG00000138435	4.041644439	4.50E-05
ALDH1A2	ENSG00000128918	4.068417572	0.042944648
CHI3L1	ENSG00000133048	5.292858521	8.87E-08

Apêndice E- Tabela contendo os 2858 genes codificantes de enzimas metabólicas e de proteínas importantes na biologia mitocondrial.

A4GNT	BCL-X	BZRP	NOXA	P16INK4	TIMM10B	A1CF	A4GALT
AASDH	AADAC	AADACL1	AADACL2	AADACL3	AADACL4	AADAT	AANAT
ABCA2	AASDHPPT	AASS	ABAT	ABCA1	ABCA10	ABCA12	ABCA13
ABCB1	ABCA3	ABCA4	ABCA5	ABCA6	ABCA7	ABCA8	ABCA9
ABCB9	ABCB10	ABCB11	ABCB4	ABCB5	ABCB6	ABCB7	ABCB8
ABCC4	ABCC1	ABCC10	ABCC11	ABCC12	ABCC13	ABCC2	ABCC3
ABCD4	ABCC5	ABCC6	ABCC8	ABCC9	ABCD1	ABCD2	ABCD3
ABCG5	ABCE1	ABCF1	ABCF2	ABCF3	ABCG1	ABCG2	ABCG4
ABHD14A	ABCG8	ABHD1	ABHD10	ABHD11	ABHD12	ABHD12B	ABHD13
ABHD8	ABHD14B	ABHD2	ABHD3	ABHD4	ABHD5	ABHD6	ABHD7
ACAD10	ABHD9	ABO	ABP1	ACAA1	ACAA2	ACACA	ACACB
ACADVL	ACAD11	ACAD8	ACAD9	ACADL	ACADM	ACADS	ACADSB
ACCN1	ACAT1	ACAT2	ACBD3	ACBD4	ACBD5	ACBD6	ACBD7
ACER2	ACCN2	ACCN3	ACCN4	ACCN5	ACE	ACE2	ACER1
ACOT1	ACER3	ACHE	ACLY	ACMSD	ACN9	ACO1	ACO2
ACOT9	ACOT11	ACOT12	ACOT2	ACOT4	ACOT6	ACOT7	ACOT8
ACSF3	ACOX1	ACOX2	ACOX3	ACOXL	ACSBG1	ACSBG2	ACSF2
ACSM2B	ACSL1	ACSL3	ACSL4	ACSL5	ACSL6	ACSM1	ACSM2A
ACY1L	ACSM3	ACSM4	ACSM5	ACSS1	ACSS2	ACSS3	ACY1
ADC	ACY3	ACYP1	ACYP2	ADA	ADAD1	ADAD2	ADAL
ADCY7	ADCY1	ADCY10	ADCY2	ADCY3	ADCY4	ADCY5	ADCY6
ADH6	ADCY8	ADCY9	ADH1A	ADH1B	ADH1C	ADH4	ADH5
ADSS	ADH7	ADHFE1	ADI1	ADK	ADO	ADPGK	ADSL
AGPAT2	ADSSL1	AFMID	AGA	AGK	AGL	AGMAT	AGPAT1
AGXT2	AGPAT3	AGPAT4	AGPAT5	AGPAT6	AGPAT9	AGPS	AGXT
AK1	AGXT2L1	AGXT2L2	AHCY	AHCYL1	AHCYL2	AIFM2	AIP
AKR1B10	AK2	AK3	AK3L1	AK5	AK7	AKR1A1	AKR1B1
AKR7A3	AKR1C1	AKR1C2	AKR1C3	AKR1C4	AKR1CL2	AKR1D1	AKR7A2
ALDH1A2	AKR7L	ALAD	ALAS1	ALAS2	ALDH16A1	ALDH18A1	ALDH1A1
ALDH3B1	ALDH1A3	ALDH1B1	ALDH1L1	ALDH1L2	ALDH2	ALDH3A1	ALDH3A2
ALDOA	ALDH3B2	ALDH4A1	ALDH5A1	ALDH6A1	ALDH7A1	ALDH8A1	ALDH9A1
ALG13	ALDOB	ALDOC	ALG1	ALG10	ALG10B	ALG11	ALG12
ALOX12	ALG14	ALG2	ALG3	ALG5	ALG6	ALG8	ALG9
AMD1	ALOX12B	ALOX15	ALOX15B	ALOX5	ALOX5AP	ALOXE3	AMACR
AMY1B	AMDHD1	AMDHD2	AMPD1	AMPD2	AMPD3	AMT	AMY1A
AOF1	AMY1C	AMY2A	AMY2B	ANKH	AOAH	AOC2	AOC3
AQP12A	AOF2	AOX1	APEH	APRT	AQP1	AQP10	AQP11
AQP8	AQP12B	AQP2	AQP3	AQP4	AQP5	AQP6	AQP7
ARSF	AQP9	ARG1	ARG2	ARSA	ARSB	ARSD	ARSE
ASAH2	ARSG	ARSH	ARSI	ARSJ	ARSK	AS3MT	ASAH1
ASNS	ASAH2B	ASAH2C	ASAH1	ASL	ASMT	ASMTL	ASNA1
ATP10B	ASNSD1	ASPA	ASPG	ASRGL1	ASS1	ATIC	ATP10A
ATP13A2	ATP10D	ATP11A	ATP11B	ATP11C	ATP12	ATP12A	ATP13A1
ATP1B1	ATP13A3	ATP13A4	ATP13A5	ATP1A1	ATP1A2	ATP1A3	ATP1A4
ATP2B2	ATP1B2	ATP1B3	ATP1B4	ATP2A1	ATP2A2	ATP2A3	ATP2B1
ATP5A1	ATP2B3	ATP2B4	ATP2C1	ATP2C2	ATP3	ATP4A	ATP4B

ATP5G2	ATP5B	ATP5C1	ATP5C2	ATP5D	ATP5E	ATP5F1	ATP5G1
ATP5O	ATP5G3	ATP5H	ATP5I	ATP5J	ATP5J2	ATP5L	ATP5L2
ATP6V0A4	ATP5S	ATP5SL	ATP6	ATP6AP1	ATP6AP2	ATP6V0A1	ATP6V0A2
ATP6V1B1	ATP6V0B	ATP6V0C	ATP6V0D1	ATP6V0D2	ATP6V0E1	ATP6V0E2	ATP6V1A
ATP6V1G1	ATP6V1B2	ATP6V1C1	ATP6V1C2	ATP6V1D	ATP6V1E1	ATP6V1E2	ATP6V1F
ATP8A2	ATP6V1G2	ATP6V1G3	ATP6V1H	ATP7A	ATP7B	ATP8	ATP8A1
AUH	ATP8B1	ATP8B2	ATP8B3	ATP8B4	ATP9A	ATP9B	ATPIF1
B3GALTL	B3GALNT1	B3GALNT2	B3GALT1	B3GALT2	B3GALT4	B3GALT5	B3GALT6
B3GNT5	B3GAT1	B3GAT2	B3GAT3	B3GNT1	B3GNT2	B3GNT3	B3GNT4
B4GALNT3	B3GNT6	B3GNT7	B3GNT8	B3GNT9	B3GNTL1	B4GALNT1	B4GALNT2
B4GALT7	B4GALNT4	B4GALT1	B4GALT2	B4GALT3	B4GALT4	B4GALT5	B4GALT6
BCKDHA	BAAT	BAK1	BBC3	BBOX1	BCAT1	BCAT2	BCHE
BDH2	BCKDHB	BCL2	BCL2L1	BCMO1	BCO2	BCS1L	BDH1
BLVRA	BEST1	BEST2	BEST3	BEST4	BHMT	BHMT2	BID
BTD	BLVRB	BNIP3	BPGM	BPHL	BPNT1	BSND	BST1
C9ORF95	C10ORF2	C14ORF68	C1GALT1	C20ORF59	C6ORF192	C6ORF66	C9ORF103
CA2	C9ORF98	CA1	CA10	CA11	CA12	CA13	CA14
CA9	CA3	CA4	CA5A	CA5B	CA6	CA7	CA8
CACNA1F	CABC1	CABC1/ADCK3	CACNA1A	CACNA1B	CACNA1C	CACNA1D	CACNA1E
CACNA2D4	CACNA1G	CACNA1H	CACNA1I	CACNA1S	CACNA2D1	CACNA2D2	CACNA2D3
CACNG4	CACNB1	CACNB2	CACNB3	CACNB4	CACNG1	CACNG2	CACNG3
CATSPER1	CACNG5	CACNG6	CACNG7	CACNG8	CAD	CANT1	CAT
CCBL1	CATSPER2	CATSPER3	CATSPERB	CBR1	CBR3	CBR4	CBS
CDS2	CCBL2	CDA	CDADC1	CDIPT	CDKN2A	CDO1	CDS1
CES3	CECR1	CEL	CEPT1	CERK	CERKL	CES1	CES2
CHIA	CES7	CFTR	CH25H	CHAT	CHDH	CHI3L1	CHI3L2
CHRNA1	CHID1	CHIT1	CHKA	CHKB	CHPF	CHPF2	CHPT1
CHRNA9	CHRNA10	CHRNA2	CHRNA3	CHRNA4	CHRNA5	CHRNA6	CHRNA7
CHST1	CHRN1B	CHRN1B2	CHRN1B3	CHRN1B4	CHRN1D	CHRN1E	CHRN1G
CHST4	CHST10	CHST11	CHST12	CHST13	CHST14	CHST2	CHST3
CKB	CHST5	CHST6	CHST7	CHST8	CHST9	CHSY1	CHSY3
CLCA2	CKBE	CKM	CKMT1A	CKMT1B	CKMT2	CLC	CLCA1
CLCN5	CLCA3	CLCA4	CLCC1	CLCN1	CLCN2	CLCN3	CLCN4
CLIC4	CLCN6	CLCN7	CLCNKA	CLCNKB	CLIC1	CLIC2	CLIC3
CNDP2	CLIC5	CLIC6	CLYBL	CMAS	CMBL	CMPK	CNDP1
COASY	CNGA1	CNGA2	CNGA3	CNGA4	CNGB1	CNGB3	CNP
COQ5	COMT	COMTD1	COQ10A	COQ10B	COQ2	COQ3	COQ4
COX16	COQ6	COQ7	COQ9	COX1	COX10	COX11	COX15
COX5A	COX17	COX18	COX19	COX2	COX3	COX4I1	COX4I2
COX7A2	COX5B	COX6A1	COX6A2	COX6B1	COX6B2	COX6C	COX7A1
CP	COX7A2L	COX7A3	COX7B	COX7B2	COX7C	COX8A	COX8C
CRLS1	CPOX	CPS1	CPT1A	CPT1B	CPT1C	CPT2	CRAT
CSGALNACT1	CROT	CRYL1	CRYM	CRYZ	CRYZL1	CS	CSAD
CYB561	CSGALNACT2	CTBS	CTH	CTNS	CTPS	CTPS2	CUBN
CYB5R4	CYB5A	CYB5B	CYB5D1	CYB5D2	CYB5R1	CYB5R2	CYB5R3
CYP11A1	CYB5RL	CYBA	CYBASC3	CYBB	CYBRD1	CYC1	CYCS
CYP20A1	CYP11B1	CYP11B2	CYP17A1	CYP19A1	CYP1A1	CYP1A2	CYP1B1
CYP27C1	CYP21A2	CYP24A1	CYP26A1	CYP26B1	CYP26C1	CYP27A1	CYP27B1
CYP2C9	CYP2A13	CYP2A6	CYP2A7	CYP2B6	CYP2C18	CYP2C19	CYP2C8
CYP2W1	CYP2D6	CYP2E1	CYP2F1	CYP2J2	CYP2R1	CYP2S1	CYP2U1

CYP4A22	CYP39A1	CYP3A4	CYP3A43	CYP3A5	CYP3A7	CYP46A1	CYP4A11
CYP4V2	CYP4B1	CYP4F11	CYP4F12	CYP4F2	CYP4F22	CYP4F3	CYP4F8
DAD1	CYP4X1	CYP4Z1	CYP51A1	CYP7A1	CYP7B1	CYP8B1	D2HGDH
DCI	DAGLA	DAGLB	DAK	DAO	DAP13	DBH	DBT
DDHD1	DCK	DCT	DCTD	DCXR	DDAH1	DDAH2	DDC
DEGS2	DDHD2	DDO	DDOST	DDT	DECR1	DECR2	DEGS1
DGKA	DERA	DGAT1	DGAT2	DGAT2L3	DGAT2L4	DGAT2L6	DGAT2L7
DGKQ	DGKB	DGKD	DGKE	DGKG	DGKH	DGKI	DGKK
DHFRL1	DGKZ	DGUOK	DHCR24	DHCR7	DHDDS	DHDH	DHFR
DHRS4	DHODH	DHRS1	DHRS11	DHRS12	DHRS13	DHRS2	DHRS3
DHTKD1	DHRS4L1	DHRS4L2	DHRS7	DHRS7B	DHRS7C	DHRS9	DHRSX
DMGDH	DIO1	DIO2	DIO3	DIRC2	DLAT	DLD	DLST
DPM1	DNM1L	DOLK	DOLPP1	DPAGT1	DPEP1	DPEP2	DPEP3
DPYSL5	DPM2	DPM3	DPYD	DPYS	DPYSL2	DPYSL3	DPYSL4
EBPL	DSE	DSEL	DTYMK	DUOX1	DUOX2	DUT	EBP
EDEM3	ECH1	ECHDC1	ECHDC2	ECHDC3	ECHS1	EDEM1	EDEM2
ELOVL7	EHHADH	ELOVL1	ELOVL2	ELOVL3	ELOVL4	ELOVL5	ELOVL6
ENPP1	ENO1	ENO2	ENO3	ENOPH1	ENOSF1	ENOX1	ENOX2
ENTPD2	ENPP2	ENPP3	ENPP4	ENPP5	ENPP6	ENPP7	ENTPD1
EPHX2	ENTPD3	ENTPD4	ENTPD5	ENTPD6	ENTPD7	ENTPD8	EPHX1
EXT1	EPX	ESD	ETFA	ETFB	ETFDH	ETNK1	ETNK2
FAAH2	EXT2	EXT3	EXTL1	EXTL2	EXTL3	FA2H	FAAH
FAR1	FADS1	FADS2	FADS3	FAH	FAHD1	FAHD2A	FAHD2B
FDX1L	FAR2	FASN	FBP1	FBP2	FDFT1	FDPS	FDX1
FLJ21865	FDXR	FECH	FH	FHIT	FIG4	FIS1	FLAD1
FN3K	FLVCR1	FLVCR2	FMO1	FMO2	FMO3	FMO4	FMO5
FPGS	FN3KRP	FOLH1	FOLR1	FOLR2	FOLR3	FOXRED1	FOXRED2
FUT10	FPGT	FRRS1	FTCD	FUCA1	FUCA2	FUK	FUT1
FUT8	FUT11	FUT2	FUT3	FUT4	FUT5	FUT6	FUT7
G6PD	FUT9	FXC1	FXN	G4.5	G6PC	G6PC2	G6PC3
GABRB1	GAA	GABRA1	GABRA2	GABRA3	GABRA4	GABRA5	GABRA6
GABRP	GABRB2	GABRB3	GABRD	GABRE	GABRG1	GABRG2	GABRG3
GAL3ST1	GABRQ	GABRR1	GABRR2	GABRR3	GAD1	GAD2	GADL1
GALM	GAL3ST2	GAL3ST3	GAL3ST4	GALC	GALE	GALK1	GALK2
GALNT14	GALNAC4S-6ST	GALNS	GALNT1	GALNT10	GALNT11	GALNT12	GALNT13
GALNT9	GALNT2	GALNT3	GALNT4	GALNT5	GALNT6	GALNT7	GALNT8
GANAB	GALNTL1	GALNTL2	GALNTL4	GALNTL5	GALNTL6	GALT	GAMT
GBA3	GANC	GAPDH	GAPDHS	GART	GATM	GBA	GBA2
GCLM	GBE1	GBGT1	GCAT	GCDH	GCH1	GCK	GCLC
GCSH	GCNT1	GCNT2	GCNT3	GCNT4	GCNT6	GCNT7	GCS1
GDPD5	GDA	GDAP1	GDE1	GDPD1	GDPD2	GDPD3	GDPD4
GGT1	GFM1	GFOD1	GFOD2	GFPT1	GFPT2	GGH	GGPS1
GK2	GGT2	GGT5	GGT6	GGT7	GGTLC1	GGTLC2	GK
GLDC	GK5	GLA	GLB1	GLB1L	GLB1L2	GLB1L3	GLCE
GLRB	GLO1	GLOD4	GLOD5	GLRA1	GLRA2	GLRA3	GLRA4
GLT25D1	GLRX	GLRX2	GLRX3	GLRX5	GLS	GLS2	GLT1D1
GLUD1	GLT25D2	GLT6D1	GLT8D1	GLT8D2	GLT8D3	GLT8D4	GLTP
GMPPA	GLUD2	GLUL	GLYAT	GLYATL1	GLYATL2	GLYCTK	GMDS
GNPDA1	GMPPB	GMPR	GMPR2	GMPS	GNE	GNMT	GNPAT
GOT2	GNPDA2	GNPNAT1	GNPTAB	GNPTG	GNS	GOT1	GOT1L1

GPSN2	GPAM	GPD1	GPD1L	GPD2	GPHN	GPI	GPLD1
GPX6	GPT	GPT2	GPX1	GPX2	GPX3	GPX4	GPX5
GRID1	GPX7	GPX8	GRHPR	GRIA1	GRIA2	GRIA3	GRIA4
GRIN2A	GRID2	GRIK1	GRIK2	GRIK3	GRIK4	GRIK5	GRIN1
GRXCR2	GRIN2B	GRIN2C	GRIN2D	GRIN3A	GRIN3B	GRPEL1	GRXCR1
GSTCD	GSR	GSS	GSTA1	GSTA2	GSTA3	GSTA4	GSTA5
GSTO2	GSTK1	GSTM1	GSTM2	GSTM3	GSTM4	GSTM5	GSTO1
GUCY1B3	GSTP1	GSTT1	GSTT2	GSTZ1	GTDC1	GUCY1A2	GUCY1A3
GYLTL1B	GUCY2C	GUCY2D	GUCY2F	GUK1	GUSB	GYG1	GYG2
HADHB	GYS1	GYS2	H6PD	HAAO	HACL1	HADH	HADHA
HAS3	HAGH	HAGHL	HAL	HAO1	HAO2	HAS1	HAS2
HEXA	HCCS	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4	HDC	HEPH
HISPPD2A	HEXB	HEXDC	HGD	HGSNAT	HIBADH	HIBCH	HISPPD1
HMGCLL1	HK1	HK2	HK3	HKDC1	HLCS	HMBS	HMGCL
HPDL	HMGCR	HMGCS1	HMGCS2	HMOX1	HMOX2	HNMT	HPD
HS3ST3A1	HPGD	HPRT1	HPSE	HPSE2	HS2ST1	HS3ST1	HS3ST2
HSD11B1	HS3ST3B1	HS3ST4	HS3ST5	HS3ST6	HS6ST1	HS6ST2	HS6ST3
HSD17B14	HSD11B1L	HSD11B2	HSD17B1	HSD17B10	HSD17B11	HSD17B12	HSD17B13
HSD3B2	HSD17B2	HSD17B3	HSD17B4	HSD17B6	HSD17B7	HSD17B8	HSD3B1
HTR3C	HSD3B7	HSDL1	HSDL2	HSP90AA1	HSPD1	HTR3A	HTR3B
HYI	HTR3D	HTR3E	HVCN1	HYAL1	HYAL2	HYAL3	HYAL4
IDI1	I	IAH1	IDH1	IDH2	IDH3A	IDH3B	IDH3G
IMPA1	IDI2	IDO1	IDO2	IDS	IDUA	ILVBL	IMMP1L
INPP4B	IMPA2	IMPAD1	IMPDH1	IMPDH2	INMT	INPP1	INPP4A
INPPL1	INPP5A	INPP5B	INPP5D	INPP5E	INPP5F	INPP5J	INPP5K
ISCA2	IP6K1	IP6K2	IP6K3	IPMK	IPPK	ISCA1	ISCA1L
ITPR1	ISCU	ISYNA1	ITPA	ITPK1	ITPKA	ITPKB	ITPKC
KCNA3	ITPR2	ITPR3	IVD	IYD	KCNA1	KCNA10	KCNA2
KCNB1	KCNA4	KCNA5	KCNA6	KCNA7	KCNAB1	KCNAB2	KCNAB3
KCND3	KCNB2	KCNC1	KCNC2	KCNC3	KCNC4	KCND1	KCND2
KCNG2	KCNE1	KCNE1L	KCNE2	KCNE3	KCNE4	KCNF1	KCNG1
KCNH6	KCNG3	KCNG4	KCNH1	KCNH2	KCNH3	KCNH4	KCNH5
KCNJ14	KCNH7	KCNH8	KCNJ1	KCNJ10	KCNJ11	KCNJ12	KCNJ13
KCNJ8	KCNJ15	KCNJ16	KCNJ2	KCNJ3	KCNJ4	KCNJ5	KCNJ6
KCNK17	KCNJ9	KCNK1	KCNK10	KCNK12	KCNK13	KCNK15	KCNK16
KCNK9	KCNK18	KCNK2	KCNK3	KCNK4	KCNK5	KCNK6	KCNK7
KCNN3	KCNMA1	KCNMB1	KCNMB2	KCNMB3	KCNMB4	KCNN1	KCNN2
KCNS2	KCNN4	KCNQ1	KCNQ2	KCNQ3	KCNQ4	KCNQ5	KCNS1
KCTD10	KCNS3	KCNT1	KCNT2	KCNU1	KCNV1	KCNV2	KCTD1
KCTD18	KCTD11	KCTD12	KCTD13	KCTD14	KCTD15	KCTD16	KCTD17
KCTD6	KCTD19	KCTD2	KCTD20	KCTD21	KCTD3	KCTD4	KCTD5
KLB	KCTD7	KCTD8	KCTD9	KDSR	KHK	KIF5A	KL
LASS3	KMO	KYNU	L2HGDH	LALBA	LARGE	LASS1	LASS2
LDHA	LASS4	LASS5	LASS6	LBR	LCAT	LCT	LCTL
LIAS	LDHAL6A	LDHAL6B	LDHB	LDHC	LDHD	LGICZ1	LGSN
LIPJ	LIPA	LIPC	LIPE	LIPF	LIPG	LIPH	LIPI
LPCAT3	LIPK	LIPM	LIPN	LIPT1	LNPEP	LPCAT1	LPCAT2
LPPR2	LPCAT4	LPGAT1	LPIN1	LPIN2	LPIN3	LPL	LPO
LYCAT	LPPR4	LRAT	LRPPRC	LSS	LST-3TM12	LTA4H	LTC4S
LYZL4	LYG1	LYPLA1	LYPLA2	LYPLAL1	LYZ	LYZL1	LYZL2

MAN2A1	LYZL6	MAGT1	MAK10	MAN1A1	MAN1A2	MAN1B1	MAN1C1
MANEAL	MAN2A2	MAN2B1	MAN2B2	MAN2C1	MANBA	MANBAL	MANEA
MBOAT4	MAOA	MAOB	MAT1A	MAT2A	MAT2B	MBOAT1	MBOAT2
MCEE	MBOAT7	MCART1	MCART2	MCART6	MCAT	MCCC1	MCCC2
ME2	MCOLN1	MCOLN2	MCOLN3	MDH1	MDH1B	MDH2	ME1
MFSD2	ME3	MECR	MFN1	MFNG	MFSD1	MFSD10	MFSD11
MGAT1	MFSD3	MFSD4	MFSD5	MFSD7	MFSD8	MFSD9	MGAM
MGLL	MGAT2	MGAT3	MGAT4A	MGAT4B	MGAT4C	MGAT5	MGAT5B
MIOX	MGST1	MGST2	MGST3	MICAL1	MICAL2	MICAL3	MINPP1
MME	MIP	MIPEP	MLYCD	MMAA	MMAB	MMACHC	MMADHC
MOGAT3	MMEL1	MOCOS	MOCOS1	MOCOS2	MOCOS3	MOGAT1	MOGAT2
MRPS22	MOSC1	MOSC2	MPI	MPO	MPST	MPV17	MRPS17
MTHFD2	MSRA	MSRB2	MSRB3	MSTO1	MTAP	MTHFD1	MTHFD1L
MTX2	MTHFD2L	MTHFR	MTHFS	MTHFSD	MTR	MTRR	MTTP
NADSYN1	MUT	MVD	MVK	NAALAD2	NAALADL1	NAALADL2	NADK
NANS	NAGA	NAGK	NAGLU	NAGPA	NAGS	NALCN	NANP
NAT14	NAPE-PLD	NAPRT1	NAT1	NAT10	NAT11	NAT12	NAT13
NAT9	NAT15	NAT2	NAT5	NAT6	NAT8	NAT8B	NAT8L
NDUFA11	NDOR1	NDST1	NDST2	NDST3	NDST4	NDUFA1	NDUFA10
NDUFA5	NDUFA12	NDUFA13	NDUFA2	NDUFA3	NDUFA4	NDUFA4L	NDUFA4L2
NDUFB1	NDUFA6	NDUFA7	NDUFA8	NDUFA9	NDUFAB1	NDUFAF1	NDUFAF2
NDUFB7	NDUFB10	NDUFB11	NDUFB2	NDUFB3	NDUFB4	NDUFB5	NDUFB6
NDUFS4	NDUFB8	NDUFB9	NDUFC1	NDUFC2	NDUFS1	NDUFS2	NDUFS3
NEFL	NDUFS5	NDUFS6	NDUFS7	NDUFS8	NDUFV1	NDUFV2	NDUFV3
NIT2	NEU1	NEU2	NEU3	NEU4	NFS1	NIPA1	NIT1
NMNAT1	NME1	NME2	NME3	NME4	NME5	NME6	NME7
NOS3	NMNAT2	NMNAT3	NMRAL1	NNMT	NNT	NOS1	NOS2
NPC2	NOX1	NOX3	NOX4	NOX5	NP	NPC1	NPC1L1
NT5C	NPL	NPR1	NPR2	NPR3	NQO1	NQO2	NSDHL
NT5DC3	NT5C1A	NT5C1B	NT5C2	NT5C3	NT5C3L	NT5DC1	NT5DC2
NUDT13	NT5DC4	NT5E	NT5M	NUDT1	NUDT10	NUDT11	NUDT12
NUDT2	NUDT14	NUDT15	NUDT16	NUDT16L1	NUDT17	NUDT18	NUDT19
NUDT8	NUDT21	NUDT22	NUDT3	NUDT4	NUDT5	NUDT6	NUDT7
ODC1	NUDT9	OAS1	OAS2	OAS3	OASL	OAT	OCA2
ORAI2	OGDH	OGDHL	OGFOD1	OGFOD2	OLAH	OPA1	ORAI1
OXSM	ORAI3	OSTALPHA	OSTBETA	OTC	OXA1L	OXCT1	OXCT2
PAH	P2RX1	P2RX2	P2RX3	P2RX4	P2RX5	P2RX6	P2RX7
PAP2D	PAICS	PAM	PANK1	PANK2	PANK3	PANK4	PAOX
PCK1	PAPSS1	PAPSS2	PC	PCBD1	PCBD2	PCCA	PCCB
PDE10A	PCK2	PCTP	PCYOX1	PCYOX1L	PCYT1A	PCYT1B	PCYT2
PDE3B	PDE11A	PDE12	PDE1A	PDE1B	PDE1C	PDE2A	PDE3A
PDE6C	PDE4A	PDE4B	PDE4C	PDE4D	PDE5A	PDE6A	PDE6B
PDE9A	PDE6D	PDE6G	PDE6H	PDE7A	PDE7B	PDE8A	PDE8B
PDXP	PDHA1	PDHA2	PDHB	PDHX	PDSS1	PDSS2	PDXK
PFKFB4	PECI	PECR	PEMT	PFAS	PFKFB1	PFKFB2	PFKFB3
PGAP1	PFKL	PFKM	PFKP	PGAM1	PGAM2	PGAM4	PGAM5
PGM2L1	PGD	PGDS	PGK1	PGK2	PGLS	PGM1	PGM2
PHYHD1	PGM3	PGM5	PGS1	PHGDH	PHOSPHO1	PHOSPHO2	PHYH
PIGF	PI4K2A	PI4K2B	PI4KA	PI4KB	PIGA	PIGB	PIGC
PIGP	PIGG	PIGH	PIGK	PIGL	PIGM	PIGN	PIGO

PIGY	PIGQ	PIGS	PIGT	PIGU	PIGV	PIGW	PIGX
PIK3CD	PIGZ	PIK3C2A	PIK3C2B	PIK3C2G	PIK3C3	PIK3CA	PIK3CB
PIP4K2A	PIK3CG	PIK3R1	PIK3R2	PIK3R3	PIK3R4	PIK3R5	PIK3R6
PIPOX	PIP4K2B	PIP4K2C	PIP5K1A	PIP5K1B	PIP5K1C	PIP5K3	PIP5KL1
PLA2G10	PISD	PKD1	PKD2	PKD2L1	PKLR	PKM2	PLA1A
PLA2G2D	PLA2G12A	PLA2G12B	PLA2G15	PLA2G16	PLA2G1B	PLA2G2A	PLA2G2C
PLA2G4E	PLA2G2E	PLA2G2F	PLA2G3	PLA2G4A	PLA2G4B	PLA2G4C	PLA2G4D
PLCB3	PLA2G4F	PLA2G5	PLA2G6	PLA2G7	PLB1	PLCB1	PLCB2
PLCH1	PLCB4	PLCD1	PLCD3	PLCD4	PLCE1	PLCG1	PLCG2
PLD1	PLCH2	PLCL1	PLCL2	PLCXD1	PLCXD2	PLCXD3	PLCZ1
PMM2	PLD2	PLD3	PLD4	PLD5	PLD6	PMAIP1	PMM1
PNPLA2	PMVK	PNLIP	PNLIPRP1	PNLIPRP2	PNLIPRP3	PNMT	PNPLA1
POFUT1	PNPLA3	PNPLA4	PNPLA5	PNPLA6	PNPLA7	PNPLA8	PNPO
POMT2	POFUT2	POLGB	POLGA	POLG	POLG2	POMGNT1	POMT1
PPAP2B	PON1	PON2	PON3	POR	PPA1	PPA2	PPAP2A
PPCS	PPAP2C	PPAPDC1A	PPAPDC1B	PPAPDC2	PPAPDC3	PPAT	PPCDC
PRG2	PPOX	PRDX1	PRDX2	PRDX3	PRDX4	PRDX5	PRDX6
PSAT	PRODH	PRODH2	PRPS1	PRPS1L1	PRPS2	PRPSAP1	PRPSAP2
PTGES2	PSPH	PTDSS1	PTDSS2	PTEN	PTER	PTGDS	PTGES
PUS1	PTGES3	PTGIS	PTGR1	PTGR2	PTGS1	PTGS2	PTS
QDPR	PYCR1	PYCR2	PYCRL	PYGB	PYGL	PYGM	PYROXD1
RDH13	QP-C	QPRT	RARS2	RBKS	RDH10	RDH11	RDH12
RHAG	RDH14	RDH16	RDH5	RDH8	RENBP	RETSAT	RFK
RRM1	RHBG	RHCG	RHOT1	RHOT2	RPE	RPE65	RPIA
SAT2	RRM2	RRM2B	RYR1	RYR2	RYR3	SARDH	SAT1
SCN10A	SATL1	SC4MOL	SC5DL	SCCPDH	SCD	SCD5	SCLY
SCN4A	SCN11A	SCN1A	SCN1B	SCN2A	SCN2B	SCN3A	SCN3B
SCNN1D	SCN4B	SCN5A	SCN7A	SCN8A	SCN9A	SCNN1A	SCNN1B
SDHAF1	SCNN1G	SCO1	SCO2	SCP2	SDH1	SDH5	SDHA
SDR42E1	SDHB	SDHC	SDHD	SDHF1	SDR16C5	SDR16C6	SDR39U1
SFXN1	SDR9C7	SDS	SDSL	SEPHS1	SEPHS2	SEPX1	SFN
SGPP1	SFXN2	SFXN3	SFXN4	SFXN5	SGMS1	SGMS2	SGPL1
SLC10A1	SGPP2	SGSH	SH3GLB1	SHMT1	SHMT2	SI	SIAE
SLC11A2	SLC10A2	SLC10A3	SLC10A4	SLC10A5	SLC10A6	SLC10A7	SLC11A1
SLC12A8	SLC12A1	SLC12A2	SLC12A3	SLC12A4	SLC12A5	SLC12A6	SLC12A7
SLC14A2	SLC12A9	SLC13A1	SLC13A2	SLC13A3	SLC13A4	SLC13A5	SLC14A1
SLC16A12	SLC15A1	SLC15A2	SLC15A3	SLC15A4	SLC16A1	SLC16A10	SLC16A11
SLC16A7	SLC16A13	SLC16A14	SLC16A2	SLC16A3	SLC16A4	SLC16A5	SLC16A6
SLC17A6	SLC16A8	SLC16A9	SLC17A1	SLC17A2	SLC17A3	SLC17A4	SLC17A5
SLC19A3	SLC17A7	SLC17A8	SLC18A1	SLC18A2	SLC18A3	SLC19A1	SLC19A2
SLC20A1	SLC1A1	SLC1A2	SLC1A3	SLC1A4	SLC1A5	SLC1A6	SLC1A7
SLC22A16	SLC20A2	SLC22A1	SLC22A11	SLC22A12	SLC22A13	SLC22A14	SLC22A15
SLC22A3	SLC22A17	SLC22A18	SLC22A18AS	SLC22A2	SLC22A20	SLC22A23	SLC22A24
SLC23A2	SLC22A4	SLC22A5	SLC22A6	SLC22A7	SLC22A8	SLC22A9	SLC23A1
SLC25A1	SLC23A3	SLC24A1	SLC24A2	SLC24A3	SLC24A4	SLC24A5	SLC24A6
SLC25A17	SLC25A10	SLC25A11	SLC25A12	SLC25A13	SLC25A14	SLC25A15	SLC25A16
SLC25A24	SLC25A18	SLC25A19	SLC25A2	SLC25A20	SLC25A21	SLC25A22	SLC25A23
SLC25A31	SLC25A25	SLC25A26	SLC25A27	SLC25A28	SLC25A29	SLC25A3	SLC25A30
SLC25A39	SLC25A32	SLC25A33	SLC25A34	SLC25A35	SLC25A36	SLC25A37	SLC25A38
SLC25A46	SLC25A4	SLC25A40	SLC25A41	SLC25A42	SLC25A43	SLC25A44	SLC25A45

SLC26A4	SLC25A5	SLC25A6	SLC26A1	SLC26A10	SLC26A11	SLC26A2	SLC26A3
SLC27A3	SLC26A5	SLC26A6	SLC26A7	SLC26A8	SLC26A9	SLC27A1	SLC27A2
SLC29A2	SLC27A4	SLC27A5	SLC27A6	SLC28A1	SLC28A2	SLC28A3	SLC29A1
SLC2A14	SLC29A3	SLC29A4	SLC2A1	SLC2A10	SLC2A11	SLC2A12	SLC2A13
SLC2A9	SLC2A2	SLC2A3	SLC2A4	SLC2A5	SLC2A6	SLC2A7	SLC2A8
SLC30A7	SLC30A1	SLC30A10	SLC30A2	SLC30A3	SLC30A4	SLC30A5	SLC30A6
SLC34A2	SLC30A8	SLC30A9	SLC31A1	SLC31A2	SLC32A1	SLC33A1	SLC34A1
SLC35B2	SLC34A3	SLC35A1	SLC35A2	SLC35A3	SLC35A4	SLC35A5	SLC35B1
SLC35E1	SLC35B3	SLC35B4	SLC35C1	SLC35C2	SLC35D1	SLC35D2	SLC35D3
SLC35F5	SLC35E2	SLC35E3	SLC35E4	SLC35F1	SLC35F2	SLC35F3	SLC35F4
SLC37A4	SLC36A1	SLC36A2	SLC36A3	SLC36A4	SLC37A1	SLC37A2	SLC37A3
SLC39A1	SLC38A1	SLC38A2	SLC38A3	SLC38A4	SLC38A5	SLC38A6	SLC38A7
SLC39A4	SLC39A10	SLC39A11	SLC39A12	SLC39A13	SLC39A14	SLC39A2	SLC39A3
SLC40A1	SLC39A5	SLC39A6	SLC39A7	SLC39A8	SLC39A9	SLC3A1	SLC3A2
SLC44A2	SLC41A1	SLC41A2	SLC41A3	SLC43A1	SLC43A2	SLC43A3	SLC44A1
SLC46A1	SLC44A3	SLC44A4	SLC44A5	SLC45A1	SLC45A2	SLC45A3	SLC45A4
SLC4A1AP	SLC46A2	SLC46A3	SLC47A1	SLC47A2	SLC4A1	SLC4A10	SLC4A11
SLC5A1	SLC4A2	SLC4A3	SLC4A4	SLC4A5	SLC4A7	SLC4A8	SLC4A9
SLC5A6	SLC5A10	SLC5A11	SLC5A12	SLC5A2	SLC5A3	SLC5A4	SLC5A5
SLC6A14	SLC5A7	SLC5A8	SLC5A9	SLC6A1	SLC6A11	SLC6A12	SLC6A13
SLC6A3	SLC6A15	SLC6A16	SLC6A17	SLC6A18	SLC6A19	SLC6A2	SLC6A20
SLC7A10	SLC6A4	SLC6A5	SLC6A6	SLC6A7	SLC6A8	SLC6A9	SLC7A1
SLC7A6	SLC7A11	SLC7A13	SLC7A14	SLC7A2	SLC7A3	SLC7A4	SLC7A5
SLC9A10	SLC7A7	SLC7A8	SLC7A9	SLC8A1	SLC8A2	SLC8A3	SLC9A1
SLC9A8	SLC9A11	SLC9A2	SLC9A3	SLC9A4	SLC9A5	SLC9A6	SLC9A7
SLCO3A1	SLC9A9	SLCO1A2	SLCO1B1	SLCO1B3	SLCO1C1	SLCO2A1	SLCO2B1
SMPD2	SLCO4A1	SLCO4C1	SLCO5A1	SLCO6A1	SLN	SMOX	SMPD1
SOD1	SMPD3	SMPD4	SMPDL3A	SMPDL3B	SMS	SOAT1	SOAT2
SPTLC1	SOD2	SOD3	SORD	SPHK1	SPHK2	SPNS1	SPR
SRD5A3	SPTLC2	SPTLC3	SQLE	SQRDL	SRD5A1	SRD5A2	SRD5A2L2
ST3GAL5	SRM	SRR	SRXN1	ST3GAL1	ST3GAL2	ST3GAL3	ST3GAL4
ST6GALNAC5	ST3GAL6	ST6GAL1	ST6GAL2	ST6GALNAC1	ST6GALNAC2	ST6GALNAC3	ST6GALNAC4
STAR	ST6GALNAC6	ST8SIA1	ST8SIA2	ST8SIA3	ST8SIA4	ST8SIA5	ST8SIA6
STARD7	STARD10	STARD13	STARD3	STARD3NL	STARD4	STARD5	STARD6
SULF1	STARD8	STARD9	STRA6	STS	SUCLA2	SUCLG1	SUCLG2
SULT1C3	SULF2	SULT1A1	SULT1A2	SULT1A3	SULT1A4	SULT1B1	SULT1C2
SURF1	SULT1C4	SULT1E1	SULT2A1	SULT2B1	SULT4A1	SULT6B1	SUOX
TALDO1	SV2A	SV2B	SV2C	SVOP	SYNJ1	SYNJ2	TACO1
TCN2	TAP1	TAP2	TAT	TAZ	TBXAS1	TCIRG1	TCN1
THNSL1	TDO2	TF	TGDS	TH	THEM2	THEM4	THEM5
TIMM44	THNSL2	THTPA	TIMM10	TIMM17A	TIMM17B	TIMM22	TIMM23
TKTL1	TIMM50	TIMM8A	TIMM8B	TIMM9	TK1	TK2	TKT
TOMM22	TKTL2	TM7SF2	TMCO3	TMEM104	TMEM70	TMLHE	TOMM20
TPCN1	TOMM34	TOMM40	TOMM40L	TOMM70A	TP	TP5	TP53
TREH	TPCN2	TPH1	TPH2	TPI1	TPK1	TPMT	TPO
TRPC7	TRMU	TRPA1	TRPC1	TRPC3	TRPC4	TRPC5	TRPC6
TRPM8	TRPM1	TRPM2	TRPM3	TRPM4	TRPM5	TRPM6	TRPM7
TSPO	TRPV1	TRPV2	TRPV3	TRPV4	TRPV5	TRPV6	TSFM
TXNRD2	TST	TSTA3	TTYH1	TTYH2	TTYH3	TUFM	TXNRD1
UCK1	TXNRD3	TYMP	TYMS	TYR	TYRP1	UAP1	UAP1L1

UGCG	UCK2	UCKL1	UCP1	UCP2	UCP3	UCRC	UEVLD
UGT1A4	UGCGL1	UGCGL2	UGDH	UGP2	UGT1A1	UGT1A10	UGT1A3
UGT2A3	UGT1A5	UGT1A6	UGT1A7	UGT1A8	UGT1A9	UGT2A1	UGT2A2
UGT3A1	UGT2B10	UGT2B11	UGT2B15	UGT2B17	UGT2B28	UGT2B4	UGT2B7
UQCR	UGT3A2	UGT8	UMPS	UPB1	UPP1	UPP2	UPRT
UROD	UQCRB	UQCRC1	UQCRC2	UQCRFS1	UQCRH	UQCRQ	UROC1
VKORC1	UROS	UST	UXS1	UXT	VDAC1	VDAC2	VDAC3
ZACN	VKORC1L1	WBSCR17	WWOX	XDH	XYLB	XYLT1	XYLT2
VDAC	ZADH2	PINK1	PARKIN	TFAM	NIX	OPTN	ATG32
MNF2	TWINKLE	TOP1	TOP3	TFB1M	TFB2M	CLIPP	MNF1
PPARGC1A	MCF	DRP1	PHB1	PHB2	ESRRA	NFE2L2	NRF1
	PPARGC1B	PPRC1					

Apêndice F. Lista dos genes diferencialmente expressos entre as os camundongos *Tfam*^{+/-} e *TFAM*^{+/+}

Gene	ENSEMBL ID	Fold change	FDR
Crisp3	ENSMUSG00000025433	117.22	0.01
Ighv1-22	ENSMUSG000000094561	55.67	0.05
Ighv1-7	ENSMUSG000000095200	17.32	0.02
Ighv1-82	ENSMUSG000000095127	16.42	9.92E-03
Igkv17-121	ENSMUSG000000076514	17.25	0.04
Igkv4-50	ENSMUSG000000076562	221.92	9.92E-03
Igkv4-59	ENSMUSG000000094006	64.37	7.09E-05
Igkv4-71	ENSMUSG000000073028	87.11	8.07E-06
Madcam1	ENSMUSG000000020310	26.05	7.17E-10
mt-Atp8	ENSMUSG000000064356	4.34	0.02

Apêndice G. Lista dos genes diferencialmente expressos entre as os camundongos *Tfam*^{fl/+} e *TFAM*^{+/+}

Gene	ENSEMBL ID	Fold change	FDR
Igkv6-23	ENSMUSG000000095630	245.04	5.23E-07
Ighv1-15	ENSMUSG000000103254	212.41	2.05E-03
Igkv4-63	ENSMUSG000000076550	59.79	0.65
Madcam1	ENSMUSG000000020310	52.04	3.50E-17
Igkv6-32	ENSMUSG000000095630	50.32	5.12E-03
Igkv12-44	ENSMUSG000000096422	20.19	0.03

Apêndice H. Lista dos genes diferencialmente expressos entre as os camundongos *Tfam^{fl/fl}* e *TFAM^{+/+}*

Gene	ENSEMBL ID	Fold change	FDR
Eif2s3y	ENSMUSG00000069049	2,047.06	2.80E-04
Ddx3y	ENSMUSG00000069045	1,152.91	3.52E-04
Uty	ENSMUSG00000068457	506.08	1.66E-03
Kdm5d	ENSMUSG00000056673	402.26	1.91E-03
Ighv5-9	ENSMUSG00000095285	371.32	9.81E-03
Igkv6-23	ENSMUSG00000095630	245.04	5.23E-07
Ighv1-15	ENSMUSG00000103254	212.41	2.05E-03
Ighv4-1	ENSMUSG00000076655	192.7	2.43E-04
Ighv1-22	ENSMUSG00000094561	74.93	2.05E-03
Ighv2-2	ENSMUSG00000096464	57.98	1.66E-03
Madcam1	ENSMUSG00000020310	52.04	3.50E-17
Igkv6-32	ENSMUSG00000076576	50.32	5.12E-03
Igkv2-112	ENSMUSG00000076518	48.21	2.39E-04
Igkv4-74	ENSMUSG00000076543	41.16	0.04
Ighv1-34	ENSMUSG00000093955	39.02	0.01
Igkv4-71	ENSMUSG00000073028	37.34	1.66E-03
Ighv1-7	ENSMUSG00000095200	28.27	2.39E-04
Ighv1-82	ENSMUSG00000095127	23.55	1.25E-04
Igkv12-44	ENSMUSG00000096422	20.19	0.03
Ighg2c	ENSMUSG00000076612	19.82	0.03
Ighv1-26	ENSMUSG00000094546	19.67	1.25E-04
Igkv17-121	ENSMUSG00000076514	17.32	6.68E-03
Igkv9-120	ENSMUSG00000094872	14.09	0.01
Ighv1-53	ENSMUSG00000093894	13.31	3.76E-03
Igkv3-10	ENSMUSG00000076596	12.76	0.02
Mzb1	ENSMUSG00000024353	11.08	2.99E-04
Pcdhga5	ENSMUSG00000103567	10.53	0.02
Igkv8-28	ENSMUSG00000094356	8.05	0.02
Igha	ENSMUSG00000095079	7.22	1.66E-03
Ighv1-18	ENSMUSG00000076695	6.95	0.03
Ighj4	ENSMUSG00000076618	6.93	0.03
Jchain	ENSMUSG00000067149	6.92	7.06E-03
Gm16194	ENSMUSG00000084956	6.4	0.05
Ighj3	ENSMUSG00000076619	6.3	0.04
Foxp3	ENSMUSG00000039521	4.66	1.00E-03
Tdg	ENSMUSG00000034674	-2.85	2.05E-03
Ccl21a	ENSMUSG00000094686	-4.76	0.04
E030013I19Rik	ENSMUSG00000086843	-5.3	0.03
1810062G17Rik	ENSMUSG00000027713	-14.46	3.45E-04
Gm10142	ENSMUSG00000094146	-402.86	0.02

Apêndice I- Tabela contendo os 35 metabólitos mais diferencialmente abundantes entre os grupos de camundongo com deficiência no mtDNA_{cn}/TFAM.

Metabólito	HMDB ID	Anova p-value
N-Acetyl-Ornithine	HMDB03357	0.00059985
Carnitine.C4	HMDB02013	0.00074513
Aconitate	HMDB00072	0.00090353
O-Acetyl.Serine	HMDB03011	0.0011277
Orotate	HMDB00226	0.0012214
Acetyl.Choline	HMDB00044	0.0031923
Sn-Glycero3-Phosphate	HMDB00086	0.0041311
Guanidoacetic.Acid	HMDB00128	0.0048397
2-Isopropylmalic.Acid	HMDB00402	0.0062479
Urea	HMDB00294	0.0093421
Nad	HMDB00902	0.0095363
Valine	HMDB00883	0.010304
Citrate-Isocitrate	HMDB00193	0.010709
Nicotinamide	HMDB01406	0.013409
Carnitine.C3	HMDB00824	0.014491
Indole	HMDB00738	0.017568
Cadp-Ribose	HMDB11671	0.017802
N-Acetyl.Putrescine	HMDB02064	0.019812
Gluconic.Acid	HMDB00625	0.019832
Succinate	HMDB00254	0.020195
S.Lactoylglutathione.	HMDB01066	0.02199
Glutamate	HMDB03339	0.023717
Nadp	HMDB00217	0.028755
N-Acetyl-Alanine	HMDB00766	0.030234
Xanthosine.5-Monophosphate	HMDB01554	0.038923
Adenosine.5-Diphosphoribose	HMDB01178	0.039792
Galactose.1-Phosphate	HMDB00645	0.039981
Histidine	HMDB00177	0.042621
Myo.Inositol	HMDB00211	0.055527
Ribose.5-Phosphate	HMDB01548	0.056577
A-Keto-Glutarate	HMDB01552	0.057918
Phosphorylcholine	HMDB01565	0.060955
Adenosine	HMDB00050	0.075366
Carnitine.C8	HMDB00791	0.083686
Carnitine	HMDB00062	0.094863

9 ANEXOS

Anexo A: Aprovação do projeto de pesquisa no comitê de ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo do metabolismo energético com base na instabilidade do genoma mitocondrial na progressão do melanoma.

Pesquisador: Luiza Ferreira de Araújo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 19062013.8.0000.5440

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 402.629

Data da Relatoria: 19/07/2013

Apresentação do Projeto:

O melanoma é o câncer de pele que mais mata no Brasil e é conhecido por suas etapas clássicas de progressão, que culminam em células com alto potencial invasivo. Nos cânceres invasivos, a reprogramação metabólica é fundamental para a manutenção fisiopatológica das células neoplásicas. Essa reprogramação leva a down-regulação da OXPHOS, localizada na membrana mitocondrial interna. Estudos indicam que essa alteração metabólica é desencadeada pela produção de ROS, gerados a partir dos complexos mitocondriais, que levam a estabilização do HIF1 α , embora esse mecanismo ainda não esteja bem claro. Além disso, os ROS danificam o mtDNA e essas mutações já foram associados com o desenvolvimento do potencial metastático. As variações no mtDNA e suas consequências são poucos estudados durante a tumorigênese. Nossos resultados anteriores demonstraram um aumento na instabilidade do genoma mitocondrial durante as etapas de progressão do câncer colorretal. Em cada uma das etapas, diferentes complexos mitocondriais foram afetados, sugerindo papéis diferentes dos complexos mitocondriais na tumorigênese. Linhagens celulares derivadas de RGP, VGP e de melanoma metastáticos são excelentes modelos experimentais para a análise da instabilidade mitocondrial e suas consequências no metabolismo energético do melanoma. Como isso, nossa hipótese é que a instabilidade do genoma mitocondrial leva à reprogramação metabólica durante a progressão

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Anexo B: Manuscrito do trabalho que será submetido a uma revista indexada no Medline.

Mitochondrial genome instability regulates the energetic metabolism in melanoma via TFAM

Araujo LF^{1,2}, Siena ADD^{1,2}, Placa JR², Brotto DB^{1,2}, Barros II^{1,2}, Muys BR^{1,2}, Peronni KC², Sousa JF^{1,2}, Molfetta GA^{1,2}, West AP⁵, Leopoldino AM⁴, Espreafico EM³, Silva Jr WA^{1,2,6*}

¹Department of Genetics – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Brazil;

²National institute of Science and Technology in Stem Cell and Cell Therapy; Center for Cell-based Therapy-CEPID/FAPESP, Ribeirão Preto, Brazil.

³Department of Cellular and Molecular Biology- Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Brazil;

⁴Department of Clinical Analysis- Toxicology and Food Sciences, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil;

⁵Microbial Pathogenesis & Immunology, Health Science Center, Texas A&M University, College Station, USA.

⁶Center for Integrative System Biology - CISBi-NAP/USP, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author

E-mail address: wilsonjr@usp.br

Keywords: Mitochondrial genome, Metabolic reprogramming, TFAM, Instability, Melanoma

Abstract

Disruptive energetic metabolism is known as a hallmark of cancer and is necessary to supply the metabolic needs of high proliferative cells. Mitochondria are a central key player in cell metabolism and mitochondrial DNA instability has been involved in metabolic changes and can promote the expression of nuclear genes, contributing to tumorigenesis. In this study, we evaluate the effect of mtDNA instability on the energetic metabolism and nuclear gene expression, in melanoma cell lines and metastatic melanoma tumors. We showed a positive correlation of TFAM/mtDNAcn with glucose consumption and ATP production in melanoma cell lines. Accordingly, gene expression analysis showed a down-regulation of glycolytic enzymes in cell lines, and up-regulation of enzymes of the amino acid metabolism in melanoma tumors, suggesting that TFAM would regulate metabolism by deviating it away from glycolysis towards amino acid metabolism, especially glutamine. Also, our data indicates that TFAM can contribute to tumorigenesis, via VEGF expression. Our findings contribute to the understanding of how mtDNA instability affects melanoma cell metabolism, bringing new insights into the mechanism by which TFAM alters metabolism and tumorigenesis.

Introduction

Melanoma is a malignancy caused by a stochastic process model of mutation events in melanocytes, which are pigment-producing cells that can be found in the entire body (ZAIDI; DAY; MERLINO, 2008). Melanoma follows a typical progression, categorized based on cellular penetration: Radial growth phase (RGP), Vertical growth phase (VGP) and Metastatic melanoma (MET). Although histologically these stages are well characterized, molecular approaches are crucial to predict survival and guide therapy (ZAIDI; DAY; MERLINO, 2008).

Melanoma mutational landscapes have shown that the most mutated genes (BRAF, RAS, and NF1) are members of the MAPK pathway, a canonical signaling pathway composed by the GTPase RAS and activated RAF kinases (SCHADENDORF et al., 2015) that transfer mitogenic signals from growth factors to the nucleus. Although these gene products act on the same pathway, each mutated subtype has its gene expression profile (AKBANI et al., 2015). Also, the most mutated of these genes is BRAF. Proximally 65% of all melanomas carry the valine to glutamic acid substitution (V600E), which causes constitutive kinase activation (CHIN et al., 2012a; HAYWARD et al., 2017).

The BRAF^{V600E} mutation was previously reported as regulating the energetic metabolism of melanoma cells via mitochondrial biogenesis. Haq *et al.* showed that BRAF-mutated cells downregulated oxidative enzymes, mitochondrial function and increased lactate production (HAQ et al., 2013). Disruptive energetic metabolism is known as a hallmark of cancer and is necessary to supply the metabolic needs of high proliferative cells (HANAHAH; WEINBERG, 2011). The metabolic reprogramming in cancer was first described by Otto Warburg, stating that cancer cells switch their metabolism from oxidative phosphorylation (OXPHOS) to aerobic glycolysis, whereas the pyruvate rather than being oxidized within the mitochondria is converted to lactate, independently of the oxygen conditions (WARD; THOMPSON, 2012). To compensate for the low efficiency in ATP production of aerobic glycolysis, cancer cells would have to increase glucose uptake.

In this context, many oncogenes have been described regulating the energetic metabolism (GENTRIC; MIEULET; MECHTA-GRIGORIOU, 2017), including other metabolic pathways such as glutamine metabolism. An increased uptake of glutamine was previously observed in highly proliferative cells, and its metabolism was used to feed nucleotide and amino acid biosynthesis pathways (HOSIOS et al., 2016). Additionally, it has been reported that cancer cells with mitochondrial defects also rely on glutamine metabolism to supply the intermediates of TCA cycle (anaplerosis), essential to maintaining the function of the major biosynthesis pathways (MULLEN et al., 2014).

Due to its central role in the metabolism, many studies evaluated how mitochondrial DNA (mtDNA) changes could affect cancer metabolism. MtDNA depletion (REZNIK et al.,

2016), mutations (CHATTERJEE; MAMBO; SIDRANSKY, 2006; DE ARAUJO; SILVA, 2015), OXPHOS impairment, altered mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production and metabolite imbalances can trigger mitochondrial dysfunction, leading to mitochondrial stress signaling (RYAN; HOOGENRAAD, 2007; GUHA; AVADHANI, 2013) that can promote the expression of nuclear genes contributing to tumorigenesis (BISWAS; GUHA; AVADHANI, 2005; KULAWIEC; OWENS; SINGH, 2009). Moreover, mitochondrial dysfunction has been reported to promote tumor growth via silencing of the TFAM (BALLIET et al., 2011; WOO et al., 2012), a nuclear-encoded mitochondrial packaging and transcription factor, responsible for mtDNA maintenance (HALLBERG; LARSSON, 2011). TFAM homozygous knockout mice displayed a non-functional OXPHOS and severe mtDNA depletion, whereas TFAM heterozygous knockout manifested reduction in mtDNA and OXPHOS deficiency in heart (LARSSON et al., 1998).

In this study, we evaluate the effect of mtDNA instability on the energetic metabolism and nuclear gene expression in melanoma, and our results indicate upregulation of TFAM and a group of its target genes, which could explain the metabolic alteration observed here, including decreasing glucose consumption and increasing glutamine uptake. These alterations would supply the metabolic requirements of high proliferative cancer cells. Our data also suggest a pro-tumorigenic role of TFAM, triggering the expression of some angiogenesis genes via VEGF.

Results

Evaluation of mitochondrial genome alterations in melanoma cell lines

We successfully sequenced the mitochondrial genome of 9 melanoma cell lines (WM35, WM1552C, WM1789, WM278, WM902, WM793, 1205LU, WM1617 and WM9) and one melanocyte (FM308). We achieved an average coverage of 55x per genome. To minimize errors, we only considered variants supported by at least nine reads (GRIFFIN et al., 2014).

We found a total of 86 variants, from which 47% were in non-coding regions (40/86), 34% (29/86) were synonymous and 19% (17/86) were non-synonymous (see Supplementary Table S1 online) (Fig. 1A). As the WM cell lines represented specific stages of melanoma progression, we investigated the mutation load among the stages, however no difference was found among them ($p=0.6969$, Kruskal-Wallis test) (Fig. 1B). We then evaluate the load of mtDNA mutation per cell line separately (Fig. 1C) and noticed that the mutation accumulation was very heterogeneous across the cell lines. Aiming to establish a mutational pattern among the melanoma cell lines, we performed an unsupervised hierarchical clusterization, using the mutation frequencies on the protein coding genes. As a result, we found two differently mutated clusters, whereas the cell lines grouped independently of melanoma stage (Fig. 1D).

We performed a similar analysis with mtDNA copy number. As we observed in the mutation analysis, there was no difference on the mtDNA content among the melanoma stages ($p=0.6024$, Kruskal-Wallis test) (Fig. 2A) and the mtDNAcn varied among the cell lines (Fig. 2B), suggesting that mtDNAcn does not correlate with melanoma stages in our model.

Briefly, these data showed that there was no difference in the mitochondrial genome instability in cell lines representing different stages of melanoma progression.

Impact of mtDNA instability in the energetic metabolism of melanoma cell lines

As we did not find any difference in the mtDNA mutation load and content in melanoma stages, we proceeded with the analysis to evaluate the independent effect of these instability parameters on the energetic metabolism of the cell lines. We also investigated the TFAM expression, which was previously correlated with mtDNAcn content (TAN et al., 2015; REZNIK et al., 2016). As shown in Fig. 2C, such correlation was confirmed in our data ($r=0.676$, $p=0.032$, Pearson Correlation).

So, we investigated the impact of mtDNA mutation load, mtDNAcn and TFAM expression in hydrogen peroxide, ATP levels, glucose consumption and lactate production. Interestingly, ATP levels, which were equivalent among melanoma cells, were shown to be 5- to 10-fold higher in the melanoma cells than in primary melanocytes (Fig. 3A). Also, ATP levels were less influenced by oligomycin treatment in melanoma cells than in melanocytes (Fig. 3A), expectedly, if ATP production does not rely on OXPHOS as much as it does in non-transformed. Next, correlation analysis showed a positive correlation of ATP content with mtDNAcn ($r=0.86$, $p=0.002$, Pearson Correlation) (Fig. 3B and 3C), and a borderline correlation with TFAM expression ($r=0.666$, $p=0.05$, Pearson Correlation) (Fig. 3D). Also, glucose consumption (Fig. 4) was positively correlated with both mtDNAcn ($r=0.680$, $p=0.0436$, Pearson Correlation) and TFAM expression ($r=0.937$, $p=0.002$, Pearson Correlation) (Fig. 4C and 4D). These results suggest that melanoma cell lines with both low mtDNAcn and low TFAM expression consumed less glucose and produced lower amounts of ATP than those with higher mtDNAcn and higher TFAM expression levels. We did not find any association of either ATP levels or glucose consumption with the differentially mutated clusters. Also, no association was found between any mtDNA instability parameters with hydrogen peroxide levels (Supplemental Fig. S1) or lactate production (Supplemental Fig. S2). These data suggest that mtDNA content and TFAM expression seem to affect metabolic features, such as glucose consumption and ATP production, in melanoma cell lines.

TFAM regulation of nuclear gene expression in melanoma cell lines

Changes in the energetic metabolism are consequences of alterations in gene expression. As our previous results showed a correlation of TFAM/mtDNA and metabolic changes, we further investigated gene pathways that could be underlying these changes.

Even though TFAM and mtDNAcn have been widely reported as positively correlated, a lack of correlation between them in some cancer types (REZNIK et al., 2016) has also been reported. So, we chose to evaluate only the impact of TFAM levels in the regulation of gene expression, so we could expand our analysis to public data.

First, we evaluated the expression of TFAM in the WM melanoma cell lines and we noticed that, except for WM35, their expression was homogeneous (Fig. S3A). So, we expanded our panel using expression data previously generated by Pawlikowski *et al.* (PAWLIKOWSKI et al., 2013). (Fig. S3B), aiming to generate a cell line panel more heterogeneous regarding TFAM expression. We then selected two groups of cells lines: TFAM Up and TFAM Down (Fig. S3C). All the melanoma cell lines included harbored the BRAF^{V600E} mutation.

From the differential expression analysis between the two groups of melanoma cell lines, we found 295 differently expressed genes (DEGs) (FDR < 0.05), from which 131 were down-regulated and 164 were up-regulated in TFAM down cell lines (Fig. 5A and Supplementary Table S2 - Tab DEGs WM melanoma cell lines online), indicating clear gene expression differences between the groups. Interestingly, among the up-regulated genes in TFAM down cell lines, we found two targets of HIF1- α : LOX and VEGFC (Fig. 5A). To further investigate the correlation of TFAM and HIF1- α , we evaluated the expression of others HIF1- α targets across the cell lines (Fig. 5B) and, as a result, we could identify two clusters: one containing genes mostly up-regulated in TFAM down cells (Fig. 5B, Cluster I) and other with genes mostly down-regulated (Fig. 5B, Cluster II). Additional investigation of tumorigenic pathway that those genes may act, showed us that Cluster I genes were mainly involved in angiogenesis and Cluster II genes in glycolysis, suggesting that TFAM can regulate these pathways. The down regulation of glycolytic enzymes corroborates with the previous findings, since TFAM down melanoma cell lines consumed less glucose. Also, another metabolic enzyme, the PHGDH, was found down-regulated in TFAM down cell lines (Fig. 5A), emphasizing a role of TFAM in the regulation of the glycolytic pathway.

Although these results suggest that TFAM may regulate angiogenesis and metabolic pathways, we analyzed only a limited number of melanoma cell lines (n=8), therefore, to expand our findings, we proceeded with analysis of a higher number of metastatic melanoma tumors.

TFAM regulation of nuclear gene expression in metastatic melanoma tumors

To expand our analysis on TFAM regulation of gene expression, we analyzed metastatic melanoma tumors using mRNA expression data from the TCGA database. To avoid bias, in this analysis we selected only metastatic melanoma samples harboring a mutation in the V600 BRAF codon (n=127), once all the melanoma cell lines in our previous analysis also carried this mutation (Fig. S4A). To separate the melanoma tumors by TFAM expression, we applied the cut-off of 25% and 75% percentiles to select samples, respectively, with low TFAM expression (TFAM down, n=32) and high TFAM expression (TFAM up, n=32) (Fig. S4B).

We found a total of 796 DEGs (FDR<0.05), in which 385 were up-regulated and 411 were down-regulated in TFAM down samples (see Supplementary Table S2- DEGs TCGA online). Gene ontology analysis of these genes revealed that many biological processes associated with cell cycle and DNA repair were enriched (Fig. 6A). Additionally, when we plotted the top 70 DEGs (Fig. 6B), we noticed that sample clusterization was independent of mutations in the RAS (KRAS, NRAS, and HRAS) and NF1 genes, which have been described to modify gene expression patterns in melanoma, avoiding expression bias that might be caused for those genes. Further analyzing the top 70 DEGs, we observed some VEGF targets, such as CHI3L1, KLF1 and ESM1 (Fig. 6C). We then performed an upstream regulator analysis and, as we expected, the VEGF gene family was predicted as activated based on the expression of 44 targets (Activation Z-score= 3.838, p-value=7.71E-10), confirming the previous finding in melanoma cell lines whereas VEGFC gene was found up-regulated in TFAM down cell lines. These data suggest a dynamic role of TFAM regulating diverse pathways, such as cell cycle and DNA repair, and reinforcing the role of TFAM in angiogenesis via VEGF activation.

TFAM regulation of metabolic enzyme expression in metastatic melanoma tumors

In the previous analysis, we found a high number of DEGs (796 genes), however not many metabolic alterations appeared. So, aiming to investigate changes in metabolic pathways regulated by TFAM, we used a list previously published by Possomato *et al.* (POSSEMATO et al., 2011) to selected differently expressed metabolic enzymes in our metastatic melanoma analysis. As a result, we found 100 DEGs, 68 up-regulated and 32 down-regulated in TFAM down samples (see Supplementary Table S2- DEGs Metabolic enzymes-TCGA online). Enrichment pathway analysis with the DEGs revealed some interesting pathways that could be regulated by TFAM, such as amino acid transport and cellular response to oxidative stress (Fig. 7A). Investigating the top 70 genes, we noticed that the clusterization was independent of mutations in the RAS and NF1 genes, moreover the samples seems to cluster better based on the TFAM groups than the previous analysis, suggesting metabolic regulation by this gene.

The top 70 differentially expressed genes showed some interesting results. The GPX1 and GSTP1 were up-regulated in TFAM down samples, both of them major players in response to oxidative stress. Also, genes related to amino acid pathways, SLC1A5 (ASCT2) and SLC1A4 (ASCT1) were both up-regulated in TFAM down samples, and the BCAT1 gene was down-regulated, pointing that TFAM might regulate amino acid metabolism. Additionally, we also found up-regulation of two metabolic biosynthesis key players, G6PD and ATP6AP1 in TFAM down samples, suggesting that TFAM levels influence the expression of genes coding for key components of metabolic pathways in melanoma.

Discussion

In this study, we evaluate for the first time the impact of mitochondrial genome instability via TFAM in the energetic metabolism and gene expression using two melanoma models. In opposite to previous findings from our group using a colorectal cancer model of progression (DE ARAUJO et al., 2015), we did not observe an accumulation of mtDNA mutation load or decrease of mtDNA content in advanced stages of melanoma (Fig. 1 and 2). One hypothesis is the existence of a stability cell wise, whereas there may be high heterogeneity in the tumor samples, what would compromise the progression evaluation in our melanoma cell lines.

We reasoned that the impact of mtDNA instability in melanoma would be informative independently of an association with melanoma stage, so we analyzed the correlation of the number of mtDNA mutations with TFAM expression. On the public data analysis, we focused on analysing TFAM expression rather than mtDNA content, once to calculate mtDNAcn we would need raw DNA sequencing data (REZNIK et al., 2016), which is not as easily available as expression data.

Although TFAM depletion is not commonly considered as mtDNA instability parameter, recent findings have shown that TFAM silencing impairs mitochondrial DNA packing (HALLBERG; LARSSON, 2011; WEST et al., 2015), leading to dispersed nucleoid formation and mtDNA released to the cytosol, which also characterize a mtDNA instability. Indeed, DNA repair pathways were enriched in the gene ontology analysis, reinforcing the role of TFAM in maintaining mtDNA stability (Fig. 6A).

Energetic metabolic analysis showed a positive correlation of both low mtDNAcn and TFAM with less glucose consumption and lower ATP production (Fig. 3 and 4). The lower glucose consumption was later corroborated by the gene expression analysis, where we observed a down-regulation of glycolytic enzymes in TFAM down cell lines (Fig. 5B). Previous study using cancer cell lines without mtDNA showed similar results regarding ATP production, but opposite findings regarding glucose consumption and lactate production (TAN et al., 2015). As previously stated by the Warburg effect, cancer cells consume higher amounts of glucose

to compensate for OXPHOS deficiency (WARD; THOMPSON, 2012), however, after many studies, it is known that tumor metabolism is highly heterogeneous and can rely on alternative metabolic routes (GENTRIC; MIEULET; MECHTA-GRIGORIOU, 2017).

In this context, it was also previously described that cancer cells with mitochondrial dysfunction rely mostly on α -ketoglutarate to supply bioenergetics requirements (MULLEN et al., 2014). α -ketoglutarate can be generated from glutamine metabolism, as an alternative metabolic source of Carbone (DEBERARDINIS et al., 2007; ALTMAN; STINE; DANG, 2016). Our gene expression analysis in metastatic melanoma tumors showed an enrichment of amino acid transport pathways and an up-regulation of SLC1A5 (ASCT2), SLC1A4 (ASCT1) and ATP6AP1. SLC1A5 and SLC1A4 are both amino acid transporters, the former mostly responsible for glutamine influx and the latter for serine (YAMAMOTO et al., 2004; VAN GELDERMALSEN et al., 2016). ATP6AP1 is a subunit of the V-ATPase complex, responsible for sensing amino acids levels and activating mTORC1 signaling, which controls protein synthesis (OKOSUN et al., 2016). Moreover, we also observed an up-regulation of G6PD, an enzyme that acts on the first step of the pentose phosphate pathway, extremely important for cancer cells, once it generates phosphate required for nucleic acid synthesis (PATRA; HAY, 2014). These data suggest that to bypass the down-regulation of glycolysis, TFAM regulates the energetic metabolism towards amino acid pathways, especially glutamine, to maintain the metabolic requirements of the cancer cells.

The role of TFAM in the regulation of oxidative stress remains unclear in our analysis. Previous studies have shown depletion of TFAM triggering ROS production (BALLIET et al., 2011; WOO et al., 2012), whereas in our study we could not find any correlation between hydrogen peroxide and TFAM expression (Supplemental Fig. S1). On the other hand, in the metastatic tumor analysis, we observed an up-regulation of GPX1 and GSTP1, which act on the conversion of hydrogen peroxide to water (GILL; PISKOUNOVA; MORRISON, 2017), suggesting a response to high levels of ROS in TFAM down samples (Fig. 7). The melanoma tumor analysis was performed in a higher number of samples, so we believe that the limited number of melanoma cell lines might compromise any correlation of TFAM and hydrogen peroxide in our data.

Our analysis also showed two targets of HIF1- α up-regulated in TFAM down cell lines: LOX, responsible for invasive properties of hypoxia cancer cells mainly through mechanisms of cell adhesion (ERLER et al., 2006) and VEGFC, which promotes lymphangiogenesis (CARMELIET, 2005) and was previously associated with metastasis (SU et al., 2007; DUFIES et al., 2017). HIF1- α stabilization is the major response mechanism to hypoxia, and it has been described in many cancer types, once it can trigger pro-tumorigenic genes, such the ones that we found up-regulated in our TFAM down melanoma cell lines (ERLER et al., 2006).

Also, both gene expression analysis in melanoma cell lines and metastatic melanoma tumors suggested that the depletion of TFAM triggers angiogenesis via VEGF (Fig. 5 and 6). Indeed, previous studies have reported tumor growth in an intestinal cancer model (WOO et al., 2012) and a xenograft model of breast cancer (BALLIET et al., 2011), emphasizing a pro-tumorigenic role of TFAM. However, none of them have evaluated VEGF expression. Oppositely, a study with non-small cell lung carcinoma suggested an anti-tumorigenic role of TFAM, whereas silencing of this gene triggered cell cycle arrest, inhibiting cancer cell proliferation and migration (XIE et al., 2016). Gene ontology analysis of our data also showed many cell cycle pathways enriched. Due to high heterogeneity among cancer types, we believe that only an *in vivo* analysis using a melanoma model would confirm the tumorigenic role of TFAM in melanomagenesis.

In conclusion, this study evaluated for the first time the role of TFAM in melanoma using melanoma cell lines and metastatic melanoma tumors. We showed that TFAM expression alters energetic metabolism and ATP production. Gene expression analysis indicated that TFAM down-regulation would deviate the metabolism from the glycolysis towards amino acid metabolism, especially glutamine, which could supply the metabolic needs of melanoma cells as an alternative source of carbon independent of glucose. Additionally, our analysis also indicated a pro-tumorigenic role of TFAM, suggesting that the tumor growth, previously reported in other tumor types (BALLIET et al., 2011; WOO et al., 2012), might be triggered by the expression of VEGF. Our findings contribute to the understanding of mtDNA instability in cancer, bringing new insights of its impact in metabolism and tumorigenesis.

Methods

Cell culture

We used a set of melanoma cell lines that encompass the stages of melanoma progress: WM35, WM1552C and WM1789 representing the RGP; WM278, WM902, WM793, representing the VGP; and 1205LU, WM1617 and WM9, representing metastatic melanomas. The pairs WM278/WM1617 and WM793/1205LU were established from the same patient. The WM melanoma cell lines were cultivated as previously described (SOUSA; ESPREAFICO, 2008). Additionally, we used melanocytes previously isolated from neonatal foreskin (FM308) and maintained according to (SOUSA et al., 2010). All the cell lines were kindly provided by Dr. Enilza Espreafico (Ribeirão Preto Medical School-USP).

Mitochondrial genome sequencing and analysis

DNA and RNA were isolated from the cell lines with the AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal kit (Qiagen), following the manufactures protocol. The DNA was used for whole

exome analysis as described previously (DE ARAUJO et al., 2015). Briefly, For the exome library preparation, we used the Nextera Exome Enrichment kit (Illumina) and then proceed for 55-bp paired-end sequencing with the TruSeq SBS v5 Kit, in the Genome Analyzer Ix (GAIIx) Illumina platform. Sequencer .bcl basecall files were demultiplexed and formatted into .fastq files using CASAVA software (Illumina), followed by quality control in the FastQC software. Fastq files were then aligned using the BWA-MEM (LI; DURBIN, 2009), generating BAM files.

The BAM files were used in the Mitoseek software (GUO et al., 2013), which extracts the reads mapped against the mtDNA, align them to the mitochondrial reference sequence rCRS (ANDREWS et al., 1999) and call variants. Mitochondrial genome copy number was inferred as previously described (DE ARAUJO et al., 2015).

RNA-seq analysis

For the RNA-seq analysis, after integrity evaluation, 300ng of RNA were used for library preparation with the TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep kit with RiboZero (Illumina). The sequencing reaction proceeds as described before in the whole-exome sequencing: a 55-bp paired-end sequencing using the TruSeq SBS v5 Kit, in the Genome Analyzer Ix (GAIIx) Illumina platform. The software STAR was used to map the reads (GRCh38 -Gencode), count and annotate the transcripts (DOBIN et al., 2013). Normalization and differential expression analysis were performed with edgeR package in R (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010). False discovery rate (FDR) was used to adjust p values. Genes with adjusted p value<0.05 were considered differentially expressed. Volcanos plots and heatmaps were also generated in R.

Public data analysis

To expand our melanoma cell lines panel, we used publicly available data generated elsewhere and deposited under the code GSE46818 at GEO (PAWLIKOWSKI et al., 2013). The data consisted on a RNA-seq from seven melanoma cell lines (A375, A2058, c32, MalMe3M, SKMEL28, SKMEL5, WM2664) and one melanocyte (EBRAF-MC), also sequenced at the GAIIx (Illumina). The data was downloaded in .sra file and converted to .fastq using SRA toolkit (LEINONEN et al., 2010). Then, the fastq files were combined with the data that we have generated before and analyzed as we described.

Metastatic melanoma mRNA expression data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) platform was downloaded through the Broad GDAC Firehose (<https://gdac.broadinstitute.org/>). Clinical information and mutational data on the BRAF, NRAS, KRAS and NF1 genes were retrieved using the cBioPortal (CERAMI et al., 2012). The data was compiled in R and differential expression analysis was performed as mentioned before using edgeR (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010). Gene ontology enrichment analysis was

performed with the clusterProfiler package, also in R(YU et al., 2012), and upstream regulators analysis with Ingenuity pathway analysis.

Hydrogen peroxide measurement

To measure hydrogen peroxide (H_2O_2) production, we used the Amplex Red kit (Amplex Red Hydrogen Peroxide/Proxidase Assay Kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Briefly, we prepared a Krebs-Ringer-phosphate solution with glucose (KRP: 145 mM of NaCl, 5.7 mM of sodium phosphate, 4.86 mM of KCl, 0.54 mM of $CaCl_2$, 1.22 mM of $MgSO_4$, 5.5 mM of glucose, pH de 7.35), containing 50 μ M of Amplex Red and 0,1 U/mL of peroxide hydrogen oxirredutase. We added 1×10^5 cells to this solution and incubated for 10 min at 37°C. The fluorescence was quantified for 60 min in the FLUOstar Omega plate reader (BMG Labtech). All the reactions were performed in triplicate. As a positive control, we treated the cells with 250 μ M of t-butyl (pro-oxidant agent) for 30 min.

ATP measurement

Intracellular ATP measurements were performed using the CellTiter-Glo Assay (Promega), following the manufactures' instructions. Briefly, we added 50µl of the Celltiter-glo reagent in a well containing 5×10^3 cells that were plated the night before. The cells were agitated for 2 min at 700rpm to the lysate. After a 10 min incubation, the fluorescence was read in the FLUOstar Omega plate reader (BMG Labtech). All the reactions were performed in triplicate and, we also treated the cells with 10µM of oligomycin (ATP synthase blocker) for 30 min, as control of the reaction.

Glucose consumption and lactate production rates

To measure the glucose consumption and the lactate production, 1×10^5 cells were plated in triplicate for 6 days. In every 24 hours, we collected the supernatants and counted the number of cells per well. After the 6th day, the levels of glucose and lactate were measured in the YSI 2700 Select Biochemistry Analyzer.

The glucose consumption rate (qGlc) and lactate production rate (qLac) were calculated as previously described (SCHOP et al., 2009). The rates encompass the amount of metabolite consumed or produced, taking into account the number of cells per day. The rates were calculated during the exponential growth phase of each cell line.

Statistical analysis

Statistical analysis and scatter plots generations were performed in R using the package R commander (FOX, 2005) and bar plots of the metabolic assays were generated in GraphPad Prism 6. The level of statistical significance was established at $p < 0.05$. The statistical tests that were applied are described in their respective results.

References

- AKBANI, R. et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. **Cell**, v. 161, n. 7, p. 1681–1696, jun. 2015.
- ALTMAN, B. J. et al. From Krebs to Clinic: Glutamine Metabolism to Cancer Therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 10, p. 619–634, out. 2016.
- ANDREWS, R. M. et al. Reanalysis and Revision of the Cambridge Reference Sequence for Human Mitochondrial DNA. **Nature Genetics**, v. 23, n. 2, p. 147–147, out. 1999.
- BALLIET, R. M. et al. Mitochondrial Oxidative Stress in Cancer-Associated Fibroblasts Drives Lactate Production, Promoting Breast Cancer Tumor Growth: Understanding the Aging and Cancer Connection. **Cell Cycle**, v. 10, n. 23, p. 4065–4073, 1 dez. 2011.
- BAUERLE, M. R. et al. Mechanistic Diversity of Radical S-Adenosylmethionine (SAM)-

Dependent Methylation. **The Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 7, p. 3995–4002, 13 fev. 2015.

BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **The World Allergy Organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, jan. 2012.

BISWAS, G. et al. Mitochondria-to-Nucleus Stress Signaling in Mammalian Cells: Nature of Nuclear Gene Targets, Transcription Regulation, and Induced Resistance to Apoptosis. **Gene**, v. 354, p. 132–139, 18 jul. 2005.

BOROUGHES, L. K. et al. Metabolic Pathways Promoting Cancer Cell Survival and Growth. **Nature cell biology**, v. 17, n. 4, p. 351–359, abr. 2015.

CAIRNS, R. A. et al. Regulation of Cancer Cell Metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85–95, 1 fev. 2011.

CARMELET, P. VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. **Oncology**, v. 69 Suppl 3, n. 3, p. 4–10, 2005.

CERAMI, E. et al. The cBio Cancer Genomics Portal: an Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 5, p. 401–404, maio 2012.

CHANG, Y. et al. Sun Exposure and Melanoma Risk at Different Latitudes: a Pooled Analysis of 5700 Cases and 7216 Controls. **International journal of ...**, 2009.

CHAPMAN, P. B. et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. **The New England journal of medicine**, v. 364, n. 26, p. 2507–2516, 30 jun. 2011.

CHATTERJEE, A. et al. Mitochondrial DNA Mutations in Human Cancer. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4663–4674, 7 ago. 2006.

CHIARUGI, A. et al. The NAD Metabolome--a Key Determinant of Cancer Cell Biology. **Nature Publishing Group**, v. 12, n. 11, p. 741–752, nov. 2012.

CHIARUTTINI, G. et al. B Cells and the Humoral Response in Melanoma: the Overlooked Players of the Tumor Microenvironment. **Oncolimmunology**, v. 6, n. 4, p. e1294296, 3 mar. 2017.

CHIN, E. H. I. W. G. K. S. A. M. I. J.-P. T. E. N. D. A. L. L. C. P. D. D. A. R. M. L. K. C. A. S. D. V. G. S. N. S. R. O. W. W. K. A. N. W. J. W. K. C. D. M. K. S.-H. G. C. M. N. M. M. J. L. M. D. J. G. S. W. D. B. H. D. S. E. L. S. G. G. G. L. G. L. et al. A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 251–263, 20 jul. 2012a.

CHIN, E. H. I. W. G. K. S. A. M. I. J.-P. T. E. N. D. A. L. L. C. P. D. D. A. R. M. L. K. C. A. S. D. V. G. S. N. S. R. O. W. W. K. A. N. W. J. W. K. C. D. M. K. S.-H. G. C. M. N. M. M. J. L. M. D. J. G. S. W. D. B. H. D. S. E. L. S. G. G. G. L. G. L. et al. A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 251–263, 20 jul. 2012b.

CLAYTON, D. A. et al. Circular Dimer and Catenate Forms of Mitochondrial DNA in Human Leukaemic Leucocytes. **Nature**, v. 216, n. 5116, p. 652–657, 18 nov. 1967.

COLLER, H. A. et al. High Frequency of Homoplasmic Mitochondrial DNA Mutations in Human Tumors Can Be Explained Without Selection. **Nature Genetics**, v. 28, n. 2, p. 147–150, jun. 2001.

CORAZAO-ROZAS, P. et al. Mitochondrial Oxidative Stress Is the Achille's Heel of Melanoma Cells Resistant to Braf-Mutant Inhibitor. **Oncotarget**, v. 4, n. 11, p. 1986–1998, nov. 2013.

CORI, G. T. et al. Enzymatic Breakdown of Glycogen in Liver Extracts. **Experimental Biology and Medicine**, v. 39, n. 2, p. 337–338, 1 nov. 1938.

DAHLMAN, K. B. et al. BRAF(L597) Mutations in Melanoma Are Associated with Sensitivity to MEK Inhibitors. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 9, p. 791–797, set. 2012.

DANKORT, D. et al. A New Mouse Model to Explore the Initiation, Progression, and Therapy of BRAFV600E-Induced Lung Tumors. **Genes & Development**, v. 21, n. 4, p. 379–384, 15 fev. 2007.

DANKORT, D. et al. BrafV600E Cooperates with Pten Loss to Induce Metastatic Melanoma. **Nature Genetics**, v. 41, n. 5, p. 544–552, 12 mar. 2009.

DE ARAUJO, L. F. et al. Understanding the Role of mtDNA in Tumor Progression. **Precision Medicine**, v. 1, n. 0, 15 out. 2015.

DE ARAUJO, L. F. et al. Mitochondrial Genome Instability in Colorectal Adenoma and Adenocarcinoma. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 36, n. 11, p. 8869–8879, nov. 2015.

DEBERARDINIS, R. J. et al. Beyond Aerobic Glycolysis: Transformed Cells Can Engage in Glutamine Metabolism That Exceeds the Requirement for Protein and Nucleotide Synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 49, p. 19345–19350, 4 dez. 2007.

DEMUNTER, A. et al. Analysis of N- and K-Ras Mutations in the Distinctive Tumor Progression Phases of Melanoma. **The Journal of investigative dermatology**, v. 117, n. 6, p. 1483–1489, dez. 2001.

DHILLON, A. S. et al. MAP Kinase Signalling Pathways in Cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3279–3290, 14 maio 2007.

DOBIN, A. et al. STAR: Ultrafast Universal RNA-Seq Aligner. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 29, n. 1, p. 15–21, 1 jan. 2013.

DUFIES, M. et al. Sunitinib Stimulates Expression of VEGFC by Tumor Cells and Promotes Lymphangiogenesis in Clear Cell Renal Cell Carcinomas. **Cancer Research**, v. 77, n. 5, p. 1212–1226, 1 mar. 2017.

EMBLEY, T. M. et al. Eukaryotic Evolution, Changes and Challenges. **Nature**, v. 440, n. 7084, p. 623–630, 30 mar. 2006.

ERLER, J. T. et al. Lysyl Oxidase Is Essential for Hypoxia-Induced Metastasis. **Nature**, v. 440, n. 7088, p. 1222–1226, 27 abr. 2006.

FAGERBERG, L. et al. Analysis of the Human Tissue-Specific Expression by Genome-Wide Integration of Transcriptomics and Antibody-Based Proteomics. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 13, n. 2, p. 397–406, fev. 2014.

FERNANDES, N. C. et al. Melanoma Cutâneo: Estudo Prospectivo De 65 Casos Cutaneous Melanoma: Prospective Study of 65 Cases. **An bras ...**, 2005.

FISHER, R. P. et al. A Transcription Factor Required for Promoter Recognition by Human Mitochondrial RNA Polymerase. Accurate Initiation at the Heavy- and Light-Strand Promoters Dissected and Reconstituted in Vitro. **The Journal of biological chemistry**, v. 260, n. 20, p. 11330–11338, 15 set. 1985.

FOX, J. The RCommander: a Basic-Statistics Graphical User Interface to R. **Journal of Statistical Software**, v. 14, n. 9, p. 1–42, 2005.

GENTLEMAN, R. C. et al. Bioconductor: Open Software Development for Computational Biology and Bioinformatics. **Genome biology**, v. 5, n. 10, p. R80, 2004.

GENTRIC, G. et al. Heterogeneity in Cancer Metabolism: New Concepts in an Old Field. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 26, n. 9, p. 462–485, 20 mar. 2017.

GHELLI, A. et al. The Cytochrome B P.278Y>C Mutation Causative of a Multisystem Disorder Enhances Superoxide Production and Alters Supramolecular Interactions of Respiratory Chain Complexes. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 11, p. 2141–2151, 13 maio 2013.

GILL, J. G. et al. Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, p. 030791–13, 12 jan. 2017.

GILMOUR, S. K. Polyamines and Nonmelanoma Skin Cancer. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 224, n. 3, p. 249–256, 1 nov. 2007.

GREENE, V. R. et al. Frequencies of NRAS and BRAF Mutations Increase From the Radial to the Vertical Growth Phase in Cutaneous Melanoma. **The Journal of investigative dermatology**, v. 129, n. 6, p. 1483–1488, jun. 2009.

GRIFFIN, H. R. et al. Accurate Mitochondrial DNA Sequencing Using Off-Target Reads Provides a Single Test to Identify Pathogenic Point Mutations. **Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics**, v. 16, n. 12, p. 962–971, dez. 2014.

GU, Z. et al. Complex Heatmaps Reveal Patterns and Correlations in Multidimensional Genomic Data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 32, n. 18, p. 2847–2849, 15 set. 2016.

GUHA, M. et al. Mitochondrial Retrograde Signaling at the Crossroads of Tumor Bioenergetics, Genetics and Epigenetics. **MITOCH**, v. 13, n. 6, p. 577–591, 1 nov. 2013.

GUO, Y. et al. MitoSeek: Extracting Mitochondria Information and Performing High-Throughput Mitochondria Sequencing Analysis. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 29, n. 9, p. 1210–1211, 1 maio 2013.

HALLBERG, B. M. et al. TFAM Forces mtDNA to Make a U-Turn. **Nature structural & molecular biology**, v. 18, n. 11, p. 1179–1181, nov. 2011.

HANAHAN, D. et al. Hallmarks of Cancer: the Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

HANAHAN, D. et al. **The hallmarks of cancer**. Tradução. [s.l.] Oxford University Press, 2016. v. 1

HAQ, R. et al. Oncogenic BRAF Regulates Oxidative Metabolism via PGC1 α and MITF. **Cancer Cell**, v. 23, n. 3, p. 302–315, mar. 2013.

- HAQQ, C. et al. The Gene Expression Signatures of Melanoma Progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 17, p. 6092–6097, 26 abr. 2005.
- HAYWARD, N. K. et al. Whole-Genome Landscapes of Major Melanoma Subtypes. **Nature**, p. 1–18, 3 maio 2017.
- HE, Y. et al. Heteroplasmic Mitochondrial DNA Mutations in Normal and Tumour Cells. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 610–614, 25 mar. 2010.
- HENSLEY, C. T. et al. Metabolic Heterogeneity in Human Lung Tumors. **Cell**, v. 164, n. 4, p. 681–694, 11 fev. 2016.
- HOSIOS, A. M. et al. Amino Acids Rather Than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells. **Developmental cell**, v. 36, n. 5, p. 540–549, 7 mar. 2016.
- HUANG, T. **Next Generation Sequencing to Characterize Mitochondrial Genomic DNA Heteroplasmy**. Tradução. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2011. v. 2319.8.1–19.8.12 p.
- HUIJBERS, A. et al. The Proportion of Tumor-Stroma as a Strong Prognosticator for Stage II and III Colon Cancer Patients: Validation in the VICTOR Trial. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 24, n. 1, p. 179–185, jan. 2013.
- HUSSEIN, M. R. Extracutaneous Malignant Melanomas. **Cancer investigation**, v. 26, n. 5, p. 516–534, jun. 2008.
- HYLAND, P. L. et al. Constitutive Mitochondrial DNA Copy Number in Peripheral Blood of Melanoma Families with and Without CDKN2A Mutations. **Journal of carcinogenesis & mutagenesis**, v. 2014, n. Suppl 4, 2014.
- ICHIHARA, A. et al. Transaminase of Branched Chain Amino Acids. I. Branched Chain Amino Acids-Alpha-Ketoglutarate Transaminase. **Journal of biochemistry**, v. 59, n. 2, p. 160–169, fev. 1966.
- IMANISHI, H. et al. Mitochondrial DNA Mutations Regulate Metastasis of Human Breast Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e23401, 2011.
- INCA. **Estimativas de Câncer 2016**. Acesso em: 6 jun. 2017.
- ISHIKAWA, K. et al. ROS-Generating Mitochondrial DNA Mutations Can Regulate Tumor Cell Metastasis. **Science**, v. 320, n. 5876, p. 661–664, 2 maio 2008.
- ISHIKAWA, K. et al. A Novel Function of mtDNA: Its Involvement in Metastasis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1201, n. 1, p. 40–43, 1 jul. 2010.
- JAYAPRAKASH, A. D. et al. Stable Heteroplasmy at the Single-Cell Level Is Facilitated by Intercellular Exchange of mtDNA. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 4, p. 2177–2187, 27 fev. 2015.
- JENG, J.-Y. et al. Maintenance of Mitochondrial DNA Copy Number and Expression Are Essential for Preservation of Mitochondrial Function and Cell Growth. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 103, n. 2, p. 347–357, 2008.
- KIM, J.-W. et al. HIF-1-Mediated Expression of Pyruvate Dehydrogenase Kinase: a Metabolic Switch Required for Cellular Adaptation to Hypoxia. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 3, p.

177–185, mar. 2006.

KIM, S.-H. et al. Overexpression of Extracellular Superoxide Dismutase (EC-SOD) in Mouse Skin Plays a Protective Role in DMBA/TPA-Induced Tumor Formation. 2005.

KING, A. et al. Succinate Dehydrogenase and Fumarate Hydratase: Linking Mitochondrial Dysfunction and Cancer. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4675–4682, 7 ago. 2006.

KREBS, H. A. et al. The Role of Citric Acid in Intermediate Metabolism in Animal Tissues. **FEBS Letters**, v. 117, n. S1, p. K2–K10, 14 nov. 2001.

KULAWIEC, M. et al. Cancer Cell Mitochondria Confer Apoptosis Resistance and Promote Metastasis. **Cancer biology & therapy**, v. 8, n. 14, p. 1378–1385, jul. 2009.

LADÁNYI, A. et al. Prognostic Impact of B-Cell Density in Cutaneous Melanoma. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, v. 60, n. 12, p. 1729–1738, dez. 2011.

LARSSON, N.-G. et al. Mitochondrial Transcription Factor a Is Necessary for mtDNA Maintenance and Embryogenesis in Mice. **Nature Genetics**, v. 18, n. 3, p. 231–236, 1 mar. 1998.

LEINONEN, R. et al. The Sequence Read Archive. **Nucleic acids research**, v. 39, n. Database, p. D19–D21, 22 dez. 2010.

LEUNG, E. et al. Mucosal Vascular Addressin Cell Adhesion Molecule-1 Is Expressed Outside the Endothelial Lineage on Fibroblasts and Melanoma Cells. **Immunology and cell biology**, v. 81, n. 4, p. 320–327, ago. 2003.

LI, H. A Statistical Framework for SNP Calling, Mutation Discovery, Association Mapping and Population Genetical Parameter Estimation From Sequencing Data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 27, n. 21, p. 2987–2993, 1 nov. 2011.

LI, H. et al. Fast and Accurate Short Read Alignment with Burrows-Wheeler Transform. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 25, n. 14, p. 1754–1760, 15 jul. 2009.

LIETH, E. et al. Nitrogen Shuttling Between Neurons and Glial Cells During Glutamate Synthesis. **Journal of neurochemistry**, v. 76, n. 6, p. 1712–1723, mar. 2001.

LUO, C. et al. A PGC1 α -Mediated Transcriptional Axis Suppresses Melanoma Metastasis. **Nature**, v. 537, n. 7620, p. 422–426, 31 ago. 2016.

LUO, J. Cancer's Sweet Tooth for Serine. **Breast cancer research : BCR**, v. 13, n. 6, p. 317, 2011.

MADDOCKS, O. D. K. et al. Serine Metabolism Supports the Methionine Cycle and DNA/RNA Methylation Through De Novo ATP Synthesis in Cancer Cells. **Molecular cell**, v. 61, n. 2, p. 210–221, 21 jan. 2016.

MATOBA, S. et al. P53 Regulates Mitochondrial Respiration. **Science**, v. 312, n. 5780, p. 1650–1653, 16 jun. 2006.

MAYAKONDA, A. et al. Maftools: Efficient Analysis, Visualization and Summarization of MAF Files From Large-Scale Cohort Based Cancer Studies. 2016.

MCKENNA, A. et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce Framework for Analyzing Next-Generation DNA Sequencing Data. **Genome research**, v. 20, n. 9, p. 1297–1303, set.

2010.

MCLAREN, W. et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. **Genome biology**, v. 17, n. 1, p. 122, 6 jun. 2016.

MEI, H. et al. Reduced mtDNA Copy Number Increases the Sensitivity of Tumor Cells to Chemotherapeutic Drugs. **Cell death & disease**, v. 6, n. 4, p. e1710, 2 abr. 2015.

MITCHELL, P. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic Type of Mechanism. **Nature**, v. 191, n. 4784, p. 144–148, 8 jul. 1961.

MITHANI, S. K. et al. Nonsynonymous Somatic Mitochondrial Mutations Occur in the Majority of Cutaneous Melanomas. **Melanoma research**, v. 18, n. 3, p. 214–219, jun. 2008.

MOREADITH, R. W. et al. The Pathways of Glutamate and Glutamine Oxidation by Tumor Cell Mitochondria. Role of Mitochondrial NAD(P)⁺-Dependent Malic Enzyme. **The Journal of biological chemistry**, v. 259, n. 10, p. 6215–6221, 25 maio 1984.

MULLARKY, E. et al. PHGDH Amplification and Altered Glucose Metabolism in Human Melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 24, n. 6, p. 1112–1115, dez. 2011.

MULLEN, A. R. et al. Oxidation of Alpha-Ketoglutarate Is Required for Reductive Carboxylation in Cancer Cells with Mitochondrial Defects. **CellReports**, v. 7, n. 5, p. 1679–1690, 12 jun. 2014.

NELSON, D. L. et al. **Lehninger principles of biochemistry**. Tradução. [s.l.: s.n.]

NETWORK, T. C. G. A. et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. **Cell**, v. 161, n. 7, p. 1681–1696, 18 jun. 2015.

OKOSUN, J. et al. Recurrent mTORC1-Activating RRAGC Mutations in Follicular Lymphoma. **Nature Genetics**, v. 48, n. 2, p. 183–188, fev. 2016.

PATRA, K. C. et al. The Pentose Phosphate Pathway and Cancer. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 8, p. 347–354, ago. 2014.

PAVLIDES, S. et al. The Reverse Warburg Effect: Aerobic Glycolysis in Cancer Associated Fibroblasts and the Tumor Stroma. **Cell Cycle**, v. 8, n. 23, p. 3984–4001, 28 out. 2014.

PAWLIKOWSKI, J. S. et al. Wnt Signaling Potentiates Nevogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 40, p. 16009–16014, 1 out. 2013.

PEGG, A. E. et al. Polyamines and Neoplastic Growth. **Biochemical Society transactions**, v. 35, n. Pt 2, p. 295–299, abr. 2007.

PELANDA, R. et al. Central B-Cell Tolerance: Where Selection Begins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 4, p. a007146, 1 abr. 2012.

POSSEMATO, R. et al. Functional Genomics Reveal That the Serine Synthesis Pathway Is Essential in Breast Cancer. **Nature**, v. 476, n. 7360, p. 346–350, 18 ago. 2011.

RATNIKOV, B. I. et al. Metabolic Rewiring in Melanoma. v. 36, n. 2, p. 171–181, 6 jun. 2016.

REZNIK, E. et al. Mitochondrial DNA Copy Number Variation Across Human Cancers. **eLife**, v. 5, p. e10769, 22 fev. 2016.

- RITCHIE, M. E. et al. Limma Powers Differential Expression Analyses for RNA-Sequencing and Microarray Studies. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 7, p. e47–e47, 20 abr. 2015.
- ROBINSON, M. D. et al. edgeR: a Bioconductor Package for Differential Expression Analysis of Digital Gene Expression Data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 1 jan. 2010.
- RYAN, M. T. et al. Mitochondrial-Nuclear Communications. **dx.doi.org**, v. 76, n. 1, p. 701–722, 19 jun. 2007.
- SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 15003, 23 abr. 2015.
- SCHIOPPA, T. et al. B Regulatory Cells and the Tumor-Promoting Actions of TNF- α During Squamous Carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 26, p. 10662–10667, 28 jun. 2011.
- SCHON, E. A. et al. Human Mitochondrial DNA: Roles of Inherited and Somatic Mutations. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 12, p. 878–890, 16 nov. 2012.
- SCHOP, D. et al. Growth, Metabolism, and Growth Inhibitors of Mesenchymal Stem Cells. ... **Engineering Part A**, v. 15, n. 8, p. 1877–1886, ago. 2009.
- SELAKE, M. A. et al. Succinate Links TCA Cycle Dysfunction to Oncogenesis by Inhibiting HIF- α Prolyl Hydroxylase. **Cancer Cell**, v. 7, n. 1, p. 77–85, jan. 2005.
- SHI, C. et al. S-Adenosylmethionine Decarboxylase Overexpression Inhibits Mouse Skin Tumor Promotion. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 7, p. 1310–1318, 1 jul. 2012.
- SIEGEL, R. L. et al. Cancer Statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7–30, 1 jan. 2017.
- SOSMAN, J. A. et al. Survival in BRAF V600-Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. **The New England journal of medicine**, v. 366, n. 8, p. 707–714, 23 fev. 2012.
- SOUSA, J. F. et al. Suppression Subtractive Hybridization Profiles of Radial Growth Phase and Metastatic Melanoma Cell Lines Reveal Novel Potential Targets. **BMC Cancer**, v. 8, n. 1, p. 3, 22 jan. 2008.
- SOUSA, J. F. et al. Novel Primate-Specific Genes, RMEL 1, 2 and 3, with Highly Restricted Expression in Melanoma, Assessed by New Data Mining Tool. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, p. e13510, 2010.
- STRICKAERT, A. et al. Cancer Heterogeneity Is Not Compatible with One Unique Cancer Cell Metabolic Map. **Oncogene**, v. 36, n. 19, p. 2637–2642, 11 maio 2017.
- SU, J. L. et al. The Role of the VEGF-C/VEGFR-3 Axis in Cancer Progression. **British Journal of Cancer**, v. 96, n. 4, p. 541–545, 26 fev. 2007.
- SWEET, W. H. Localization of Intracranial Lesions by Scanning with Positron-Emitting Arsenic. **Journal of the American Medical Association**, v. 157, n. 14, p. 1183, 2 abr. 1955.
- TAKEUCHI, H. et al. Detection of Mitochondrial DNA Alterations in Plasma of Malignant Melanoma Patients. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1022, n. 1, p. 50–54, jun. 2004.

TAN, A. S. et al. Mitochondrial Genome Acquisition Restores Respiratory Function and Tumorigenic Potential of Cancer Cells Without Mitochondrial DNA. **Cell Metabolism**, v. 21, n. 1, p. 81–94, 6 jan. 2015.

TAYLOR, R. W. et al. Mitochondrial DNA Mutations in Human Disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 5, p. 389–402, 1 maio 2005.

THOMAS, R. R. et al. Recombinant Human Mitochondrial Transcription Factor a Stimulates Mitochondrial Biogenesis and ATP Synthesis, Improves Motor Function After MPTP, Reduces Oxidative Stress and Increases Survival After Endotoxin. **Mitochondrion**, v. 11, n. 1, p. 108–118, jan. 2011a.

THOMAS, R. R. et al. Recombinant Human Mitochondrial Transcription Factor a Stimulates Mitochondrial Biogenesis and ATP Synthesis, Improves Motor Function After MPTP, Reduces Oxidative Stress and Increases Survival After Endotoxin. **Mitochondrion**, v. 11, n. 1, p. 108–118, jan. 2011b.

TOMASETTI, C. et al. Stem Cell Divisions, Somatic Mutations, Cancer Etiology, and Cancer Prevention. **Science**, v. 355, n. 6331, p. 1330–1334, 24 mar. 2017.

TÖNJES, M. et al. BCAT1 Promotes Cell Proliferation Through Amino Acid Catabolism in Gliomas Carrying Wild-Type IDH1. **Nature Medicine**, v. 19, n. 7, p. 901–908, jul. 2013.

TSAI, J. et al. Discovery of a Selective Inhibitor of Oncogenic B-Raf Kinase with Potent Antimelanoma Activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 8, p. 3041–3046, 26 fev. 2008.

VAN GELDERMALSEN, M. et al. ASCT2/SLC1A5 Controls Glutamine Uptake and Tumour Growth in Triple-Negative Basal-Like Breast Cancer. **Oncogene**, v. 35, n. 24, p. 3201–3208, 16 jun. 2016.

VAN STAVEREN, W. C. G. et al. Human Cancer Cell Lines: Experimental Models for Cancer Cells in Situ? for Cancer Stem Cells? **Biochimica et biophysica acta**, v. 1795, n. 2, p. 92–103, abr. 2009.

VANDER HEIDEN, M. G. et al. Understanding the Warburg Effect: the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 22 maio 2009.

VENEGAS, V. et al. **Real-Time Quantitative PCR Analysis of Mitochondrial DNA Content**. Tradução. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc, 2011. 19.7.1–19.7.12 p.

VULTUR, A. et al. SnapShot: Melanoma. **Cancer Cell**, v. 23, n. 5, p. 706–706.e1, 13 maio 2013.

WALLACE, D. C. Mitochondria and Cancer. p. 1–14, 1 out. 2012.

WARBURG, O. The Metabolism of Carcinoma Cells. **The Journal of Cancer Research**, v. 9, n. 1, p. 148–163, 1 mar. 1925.

WARBURG, O. On the Origin of Cancer Cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309–314, 24 fev. 1956.

WARD, P. S. et al. Metabolic Reprogramming: a Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 297–308, mar. 2012.

WEST, A. P. et al. Mitochondrial DNA Stress Primes the Antiviral Innate Immune Response.

Nature, v. 520, n. 7548, p. 553–557, 2 fev. 2015.

WOO, D. K. et al. Mitochondrial Genome Instability and ROS Enhance Intestinal Tumorigenesis in APCMin/+ Mice. **The American Journal of Pathology**, v. 180, n. 1, p. 24–31, 1 jan. 2012.

XIA, J. et al. **Metabolomic Data Processing, Analysis, and Interpretation Using MetaboAnalyst**. Tradução. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2002. 1–48 p.

XIE, D. et al. Downregulation of TFAM Inhibits the Tumorigenesis of Non-Small Cell Lung Cancer by Activating ROS-Mediated JNK/p38MAPK Signaling and Reducing Cellular Bioenergetics. **Oncotarget**, v. 7, n. 10, p. 11609–11624, 8 mar. 2016.

YAMAMOTO, T. et al. Functional Identification of ASCT1 Neutral Amino Acid Transporter as the Predominant System for the Uptake of L-Serine in Rat Neurons in Primary Culture. **Neuroscience research**, v. 49, n. 1, p. 101–111, maio 2004.

YU, G. et al. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. **Omics : a journal of integrative biology**, v. 16, n. 5, p. 284–287, maio 2012.

YU, M. Generation, Function and Diagnostic Value of Mitochondrial DNA Copy Number Alterations in Human Cancers. **Life Sciences**, v. 89, n. 3-4, p. 65–71, jul. 2011.

YUAN, M. et al. A Positive/Negative Ion&Ndash;Switching, Targeted Mass Spectrometry&Ndash;Based Metabolomics Platform for Bodily Fluids, Cells, and Fresh and Fixed Tissue. **Nature Protocols**, v. 7, n. 5, p. 872–881, 12 abr. 2012.

ZAIDI, M. R. et al. From UVs to Metastases: Modeling Melanoma Initiation and Progression in the Mouse. **The Journal of investigative dermatology**, v. 128, n. 10, p. 2381–2391, out. 2008.

ZHANG, G. et al. Targeting Mitochondrial Biogenesis to Overcome Drug Resistance to MAPK Inhibitors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 5, p. 1834–1856, 2 maio 2016a.

ZHANG, G. et al. Targeting Mitochondrial Biogenesis to Overcome Drug Resistance to MAPK Inhibitors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 5, p. 1834–1856, 2 maio 2016b.

ZHANG, W. et al. Stromal Control of Cystine Metabolism Promotes Cancer Cell Survival in Chronic Lymphocytic Leukaemia. **Nature cell biology**, v. 14, n. 3, p. 276–286, 19 fev. 2012.

ZHOU, S. et al. Frequency and Phenotypic Implications of Mitochondrial DNA Mutations in Human Squamous Cell Cancers of the Head and Neck. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 18, p. 7540–7545, 1 maio 2007.

Figures and legends

Figure 1: mtDNA mutational analysis in the melanocyte and melanoma cell lines. (A) Circos plot of the mtDNA. External dots represent all the 86 mutations found in their respective gene, and inner circles represent the average coverage of the sequencing for each cell line in the following order (from inside): FM308, WM35, WM1552, WM1789, WM278, WM793, WM902, 1205Lu, WM1617 and WM9; (B) There was no difference in the mtDNA mutation load among the melanoma stages ($p=0.6969$, Kruskal-Wallis test); (C) Plot of the number of mutations per cell line showing that they varied a lot independently of the melanoma stage; (D) Hierarchical clusterization analysis showing two differently mutated clusters (orange and red bars) that were generated based on the frequency of mutation in protein-encoded genes. Note in C, that genetically paired cell lines (WM793/1205Lu and WM278/WM1617), consistently, showed equal number of mutations among the members of each pair.

Figure 2: mtDNA copy number analysis in the melanoma cell lines. (A) There was no difference in the mtDNA content among the melanoma stages ($p=0.6024$, Kruskal-Wallis test); (C) Plot of the mtDNAcn per cell line; (D) Positive correlation between mtDNAcn and TFAM expression ($r=0.676$, $p=0.032$, Pearson Correlation).

Figure 3: ATP measurement in the melanocyte and melanoma cell lines. (A) ATP basal levels in the melanocyte and melanoma cell lines. The oligomycin treatment was used as a control of the reaction. (B) There was no difference in the ATP basal production between the differentially mtDNA mutated clusters ($p=0.06$, Student t test); (C) Positive correlation between ATP levels and mtDNAcn ($r=0.86$, $p=0.002$, Pearson Correlation); (D) Correlation between ATP levels and TFAM expression ($r=0.666$, $p=0.05$, Pearson Correlation).

Figure 4: Glucose consumption rate in the melanoma cell lines. (A) Glucose consumption rate (qGlc) per melanoma cell lines. The negative number indicates consumption of the metabolite over a period of 24 hours. (B) There was no difference in the qGlc between the differentially mtDNA mutated clusters ($p=0.8670$, Student t test); (C) Positive correlation between qGlc and mtDNAcn ($r=0.680$, $p=0.0436$, Pearson Correlation); (D) Positive correlation between qGlc and TFAM expression ($r=0.937$, $p=0.002$, Pearson Correlation). For the B, C and D graphs we plotted the absolute number of qGlc.

Figure 5: Differential expression analysis in melanoma cell lines with different TFAM expression. (A) Volcano plot showing the highly different expressed genes; (B) Heatmap with the gene expression pattern of the HIF- α main targets.

Figure 7: Differential expression analysis of metabolic enzymes in metastatic melanoma tumors with different TFAM expression. (A) Gene ontology pathways enriched with the differentially expressed enzymes; (B) Heatmap showing the top 70 genes differently expressed between the groups;

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was financed by The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), grant #465539/2014-9; São Paulo Research Foundation (FAPESP), grants #2013/25119-0, 2015/21940-7 and #2013/08135-2; and by Research Support of the University Sao Paulo, CISBi-NAP/USP grant #12.1.25441.01.2. We would like to thank Amanda Mizukami for the help on the glucose and lactate analysis; Adriana Aparecida Marques and Marcelo Gomes de Paula by technical support.

Authors contribution

L.F.A, D.B.B, I.I.B, B.R.M and KCP conducted the metabolic experiments and the exome sequencing of the melanoma cell lines. L.F.A, A.D.D.S and J.R.P performed the bioinformatics analysis. L.F.A, J.F.S, G.A.M, A.P.W., A.M.L., E.M.E and W.A.S.J contribute to the writing the structure of the manuscript. All authors reviewed and approved the final manuscript.

Supplementary Figures

Figure S1: Hydrogen peroxide measurement in the melanoma cell lines. (A) Hydrogen peroxide levels in the melanoma cell lines. The t-butyl treatment was used as a control of the reaction. (B) There was no difference in the Hydrogen peroxide levels between the differentially mtDNA mutated clusters ($p=0.66$, Student t test); We also didn't find any correlation between hydrogen peroxide levels and mtDNAcn ($r=0.0723$, $p=0.5734$, Pearson Correlation) or with TFAM expression ($r=0.431$, $p=0.167$, Pearson Correlation).

Figure S2: Lactate production rate in the melanoma cell lines. (A) Lactate production rate (qLac) per melanoma cell lines. (B) There was no difference in the qLac between the differentially mtDNA mutated clusters ($p=0.3343$, Student t test); (B) We also didn't find any correlation between qLac rates and mtDNAcn ($r=-0.0878$, $p=0.4933$, Pearson Correlation) or with TFAM expression ($r=-0.250$, $p=0.3164$, Pearson Correlation).

Figure S3: TFAM expression in the melanoma cell lines. (A) TFAM expression across the WM melanoma cell lines and in the expanded cell line panel (B); Differential expression between the melanoma cell lines with high and low TFAM expression ($p=0.0001383$, student t test).

Figure S4: TFAM expression in the metastatic melanoma tumors. (A) Lollipop showing the BRAF genes and the mutations found in melanoma samples, including metastatic and primary. To avoid bias, in our analysis we only used metastatic samples; (B) Quantil-quantil plot with the TFAM expression across all the metastatic melanoma samples harboring the BRAF^{V600E} mutation. For our analysis, we selected TFAM down and TFAM up samples based on the percentiles.