Renata de Luiz Correia

**Alterações metabólicas e o papel da
mitocôndria no processo de
tumorigênese de astrocitomas
humanos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Neurologia

Orientadores: Suely Kazue Nagahashi Marie
Sueli Mieko Oba-Shinjo

**São Paulo
2010**

Renata de Luiz Correia

**Alterações metabólicas e o papel da
mitocôndria no processo de
tumorigênese de astrocitomas
humanos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Neurologia

Orientadores: Suely Kazue Nagahashi Marie
Sueli Mieko Oba-Shinjo

**São Paulo
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Correia, Renata de Luiz

Alterações metabólicas e o papel da mitocôndria no processo de tumorigênese de astrocitomas humanos / Renata de Luiz Correia. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Neurologia.

Área de concentração: Neurologia.

Orientadora: Suely Kazue Nagahashi Marie

Co-orientadora: Sueli Mieko Oba-Shinjo.

Descritores: 1.Astrocitoma 2.DNA mitocondrial 3.Fatores de transcrição mitocondrial 4.TFAM 5.POLG 6.Sobrevida

USP/FM/SBD-086/10

**Aos verdadeiros caminhos de sabedoria e
ascensão percorridos**

Agradecimentos

À minha família, pelo amor e apoio profissional imprescindíveis para meu contínuo caminho na ciência, educação e construção do saber.

À Profa. Dra. Suely K N Marie, pelos ensinamentos – não só científicos, mas em todas as esferas do conhecimento – meu muito obrigada pelas lições de vida, conduta e moral.

À Dra. Sueli M Oba-Shinjo, co-orientadora afetuosa e sábia, por instruir-me, em diversos sentidos, durante o desenvolvimento desta tese.

À Roseli da Silva, por ter me resgatado à ciência, pela amizade e, principalmente, por transformar a dureza da rotina em extroversão.

À guru Miyuki Uno, pela seriedade e companheirismo ímpar ao longo da minha evolução.

A todos os colegas do laboratório LIM15, que colaboraram direta ou indiretamente com a elaboração deste trabalho; em especial, à prontidão de Célia Miyagui, à descontração e carinho de Loira (Mussya), Mazé, Priscila e Simone (Bassora-Urso).

Aos colegas e médicos do ambulatório Dr. Flávio Miura, Tatiana Bukstein, Dona Dirce, Pedro Augusto (*in memoriam*), Fernanda P Guimarães e André Bianco, pela compaixão desprendida durante os atendimentos.

Aos Professores Dr. João Oliveira Bosco e Dr. Francisco Laurindo, pela condução e fosforilações pertinentes.

Ao Prof. Dr. Antônio Sesso, à Dra. Maria de Lourdes Higuchi, à Joyce Tiyeko Kawakami, à Karina Funabashi, à Júlia La Chioma Silvestre, à Fátima Curto e à Meire Pereira, por tornarem possível a realização dos experimentos em microscopia eletrônica.

Aos karatecas, guerreiros amigos, por me tornarem mais forte e alerta nesta luta diária.

A todos do Espaço Educacional, pela compreensão e afetuosa convivência.

Aos funcionários da pós-graduação pelo suporte administrativo, durante todo o andamento deste trabalho – em especial à atenção de Elisabeth Laurentano.

Ao CNPq, pelos proventos fornecidos durante a viabilização da tese.

SUMÁRIO

Lista de tabelas	ix
Lista de figuras	xi
Lista de abreviaturas	xiii
Resumo.....	xvi
Summary	xvii
 Introdução	 1
1. Bioenergética.....	1
1.1 Glicose aeróbica e anaeróbica.....	2
1.2 Ciclo do ácido tricarboxílico ou do ácido cítrico	3
2. Mitocôndria.....	6
2.1 Transporte de elétrons e fosforilação oxidativa.....	8
2.2 DNA mitocondrial e doenças.....	10
2.3 Replicação e transcrição mitocondrial.....	15
3. Efeito Walburg e alterações metabólicas mitocondriais	19
4. Tumores do sistema nervoso central.....	21
 Objetivos	 24
 Métodos	 26
1. Casuística.....	28
2. Análise de expressão gênica por microarray e seleção dos genes.....	29
3. Extração de DNA.....	27
4. Extração de RNA total	28
5. Síntese de DNA complementar por transcrição reversa.....	28
6. Quantificação do número de cópias de DNAm.....	29

6.1 Absoluta	29
6.1.1 Clonagem do DNA mitocondrial	30
6.2 Relativa	31
7. Quantificação do número de mitocôndrias	32
8. Análise da expressão por PCR em Tempo Real (QT-PCR)	34
9. Análise estatística.....	38
Resultados.....	39
1. Seleção dos genes através dos dados prévios de <i>microarray</i>	39
2. Validação dos genes implicados na via metabólica energética.....	44
3. Análise do número de cópias de DNAm.....	48
4. Morfometria mitocondrial	51
5. Expressão relativa dos fatores de transcrição e polimerase mitocondriais	56
6. Análise da sobrevida global.....	60
Discussão	65
Análise das vias metabólicas, glicólise, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa.....	66
Expressão dos genes relacionados ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos.....	70
Expressão dos genes relacionados à fosforilação oxidativa	71
Mitocôndria e câncer	72
Número de cópias do DNAm.....	73
Número de organelas mitocondriais	73
Morfologia mitocondrial	74
Fatores de replicação e transcrição mitocondriais.....	75

Conclusões.....	79
Anexos.....	80
Referências.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produtos de genes de codificação mitocondrial e nuclear envolvidos na fosforilação oxidativa	9
Tabela 2 – Classificação dos astrocitomas	21
Tabela 3 – Casuística do projeto	26
Tabela 4 – Cálculos para obtenção da curva padrão do DNA plasmidial	31
Tabela 5 – Equivalência de um ponto (+) em mm ²	34
Tabela 6 – Sequências e concentrações dos pares de primers para PCR em tempo real, tamanho dos produtos e eficiências de amplificação	37
Tabela 7 – Subunidades dos complexos da fosforilação oxidativa e expressão relativa dos genes	42
Tabela 8 – Enzima, gene codificador e expressão relativa em GBMs dos genes selecionados da via glicolítica, ciclo dos ácidos tricarboxílicos e fosforilação oxidativa	43
Tabela 9 – Valores de média e mediana do número de cópias relativo de DNAmT nos astrocitomas de diferentes graus de malignidade e tecido cerebral não tumoral	49
Tabela 10 – Morfometria mitocondrial de dois casos de GBM	54
Tabela 11 – Expressão relativa de TFAM, TFB1M, TFB2M e POLG em GBM	56
Tabela 12 – Valores de média, mediana das expressões relativas dos genes <i>TFAM</i> , <i>TFB1M</i> , <i>TFB2M</i> e <i>POLG</i> em astrocitomas de diferentes graus de malignidade e tecido cerebral não tumoral	58

Tabela 13 – Correlação de spearman dos valores de expressão relativa em astrocitomas dos genes <i>TFAM</i> , <i>TFB1M</i> , <i>TFB2M</i> e <i>POLG</i> e número de cópias do DNAm.....	59
Tabela 14 – Análise do risco relativo da coexpressão de <i>TFAM</i> e <i>POLG</i>	63
Tabela 15 – Valores de p entre os grupos tanto para a análise do número de cópias de DNAm como para a expressão relativa de <i>TFAM</i>	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da glicólise	5
Figura 2 – Ciclo dos ácidos tricarboxílicos	7
Figura 3 – Mitocôndria e esquema de fosforilação oxidativa	9
Figura 4 – DNA mitocondrial humano	12
Figura 5 – Deleções genômicas mitocondriais em tumores sólidos.....	13
Figura 6 – Esquema da iniciação da síntese de DNA mitocondrial.....	17
Figura 7 – Esquema do desenho do projeto	25
Figura 8 – Otimização dos <i>primers</i> do gene da piruvato quinase (PKM2) por PCRem tempo real	33
Figura 9 – Esquema da glicólise, enzimas envolvidas e expressão relativa dos genes.....	40
Figura 10 – Esquema do ciclo do ácido cítrico, enzimas envolvidas e expressão relativa dos genes	41
Figura 11 – Expressão relativa de genes implicados na via glicolítica.....	45
Figura 12 – Expressão relativa de genes implicados no CAT	46
Figura 13 – Expressão relativa de genes da fosforilação oxidativa	47
Figura 14 – Número de cópias de DNA mitocondrial em astrocitomas de diferentes graus de malignidade e tecido cerebral não tumoral	48
Figura 15 – Análises da quantificação do número de cópias de DNA mitocondrial.....	50
Figura 16 – Eletromicrografias do caso GBM 642	52
Figura 17 – Eletromicrografias do caso GBM 875	53
Figura 18 – Análise da morfometria mitocondrial comparada ao número de cópias de DNA mitocondrial	55

Figura 19 – Expressão relativa de <i>TFAM</i> , <i>POLG</i> , <i>TFB1M</i> e <i>TFB2M</i> em diferentes graus de malignidade e tecido cerebral não tumoral.....	58
Figura 20 – Sobrevida de pacientes com GBM em relação à expressão relativa de <i>TFAM</i> , <i>POLG</i> , <i>TFB1M</i> e <i>TFB2M</i> e número de cópias de DNAm.....	61
Figura 21 – Sobrevida dos pacientes com GBM em relação à coexpressão de <i>TFAM</i> e <i>POLG</i>	62
Figura 22 – Número de cópias de DNA mitocondrial e expressão relativa de <i>TFAM</i> de acordo com o tempo de sobrevida dos pacientes com GBM	64
Figura 23 – Vias metabólicas de sinalização de células em proliferação.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

A:	Nucleotídeo adenina
ADP:	Adenosina difosfato
ATP:	Adenosina trifosfato
ATPase-6:	Subunidade 6 de ATPase
C:	Nucleotídeo citosina
CAT:	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou do ácido cítrico
cDNA:	Ácido desoxirribonucléico complementar
CO ₂ :	Gás carbônico
COX:	Citocromo c oxidase
C-terminal:	Carboxil-terminal
D-loop:	Região não codificadora do DNAm que forma alça D (“displacement”)
DNA:	Ácido desoxirribonucléico
DNAm:	DNA mitocondrial
dNTP:	Deoxinucleotídeos trifosfatados
EDTA:	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF:	Epidermal growth factor
EGFR:	Receptor epidermal growth factor
FAD:	Flavina adenina dinucleotídeo
FADH ₂ :	Flavina adenina dinucleotídeo com íons de hidrogênio
FMUSP:	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FOX:	Fosforilação oxidativa
G:	Nucleotídeo guanina
G I:	Astrocitoma pilocítico ou grau I
G II:	Astrocitoma de baixo grau ou grau II
G III:	Astrocitoma anaplásico ou grau III
GBM:	Glioblastoma
GUS-Beta:	beta-glucoronidase gene
HC:	Hospital das Clínicas
HCl:	Ácido clorídrico

HPRT:	Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene
HIF- α :	Subunidade α do fator de transcrição induzido pela hipóxia
Hsp:	Proteína do choque térmico
IGmt:	Instabilidade genômica de DNAm
KCl:	Cloreto de potássio
KHCO ₃ :	Carbonato de potássio hidrogenado
kDa:	Kilodalton
kJ:	Kilojoule
LIM15:	Laboratório de Investigação Médica 15
mg:	Miligrama
MgCl ₂ :	Cloreto de magnésio
mM:	Milimolar
mol:	Quantidade de matéria
NaCl:	Cloreto de sódio
NAD ⁺ :	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH:	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
ng:	Nanograma
NH ₄ Cl:	Cloreto de amônio
NRF-1:	Fator respiratório nuclear 1
NRF-2:	Fator respiratório nuclear 2
N-terminal:	Amino-terminal
O ₂ :	Gás oxigênio
O _H :	Origem de replicação da cadeia pesada de DNAm
O _L :	Origem de replicação da cadeia leve de DNAm
OMS:	Organização mundial da saúde
p:	Braço curto do cromossomo
p	Probabilidade
pb	Pares de bases
PBS:	Solução tampão fosfato salina
PCR:	Reação em cadeia polimerase
pH:	Potencial de hidrogênio
PHD:	HIF- α prolil hidroxilase

Pi:	Fosfato inorgânico
POLG:	RNA polimerase mitocondrial subunidade catalítica γ
POLRMT:	RNA polimerase mitocondrial
PRC:	Coativador relacionado ao receptor ativado pela proliferação de peroxisomo
pVHL:	Produtos de gene von Hippel Lindau
q:	Braço longo do cromossomo
RNA:	Ácido ribonucléico
RNA _m :	Ácido ribonucléico mensageiro
RNA _r :	RNA ribossômico
RPM:	Rotações por minuto
RQ-PCR:	PCR semi-quantitativo em tempo real
RT-PCR:	Transcriptase Reversa PCR
SDS:	Dodecil sulfato de sódio
SNC:	Sistema nervoso central
SDH:	Succinato desidrogenase
T:	Nucleotídeo timina
TAE:	Tris-acetato EDTA
TE:	Tris-EDTA
TFAM:	Fator de transcrição mitocondrial A
TFB1M:	Fator de transcrição mitocondrial B1
TFB2M:	Fator de transcrição mitocondrial B2
TP53:	Tumor protein p53 gene
UV:	Ultra violeta
μ L:	Microlitro
β -F1-ATPase:	Subunidade catalítica β de ATP sintase
ΔG :	Entalpia da reação (energia livre de Gibbs)

RESUMO

CORREIA R.L. Alterações metabólicas e o papel da mitocôndria no processo de tumorigênese de astrocitomas humanos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

As mitocôndrias desempenham um papel fundamental na sobrevivência e morte celular. Alterações do DNA mitocondrial (DNAMt) – como, por exemplo, amplificação, mutação homoplásmica, deleção e depleção –, bem como suas implicações clínico-patológicas, tem sido analisadas em inúmeras neoplasias humanas. No intuito de se pesquisar alterações mitocondriais associadas à tumorigênese, o presente trabalho teve como objetivos analisar a expressão de genes implicados no metabolismo energético e envolvidos na replicação e transcrição mitocondriais, quantificar o número de organelas mitocondriais e de cópias de DNAMt e analisar a expressão dos genes em astrocitomas de diferentes graus de malignidade (23 OMS grau I, 26 grau II, 18 grau III e 84 grau IV ou GBM) em relação ao tecido cerebral não tumoral (22 amostras). As expressões relativas dos genes selecionados, bem como as quantificações relativa e absoluta do DNA mitocondrial, foram realizadas por PCR em tempo real. O aumento de expressão relativa de genes-chave da via glicolítica, alterações nos níveis de expressão dos genes do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e hipoexpressão de genes da fosforilação oxidativa detectados corroboraram o efeito Warburg. Foi demonstrado que a redução do número de cópias do DNAMt está associada com o grau de malignidade dos astrocitomas difusamente infiltrativos, sendo GBM o mais depletado e independente do número de organelas. As médias observadas para tecido não tumoral, astrocitoma grau I, grau II, grau III e GBM foram, respectivamente, 1,28, 0,26, 0,45, 0,42 e 0,17. Níveis aumentados de expressão relativa dos genes dos fatores de transcrição mitocondriais A (*TFAM*), B1 (*TFB1M*), B2 (*TFB2M*) e da subunidade catalítica da polimerase mitocondrial (*POLG*) foram detectados em todos os graus de astrocitomas, exceto *TFB2M* em astrocitoma grau II. Embora exista forte correlação entre os fatores de transcrição mitocondriais, somente os níveis de expressão de *POLG* se correlacionaram inversamente com o número de cópias de DNAMt. A expressão elevada de *TFAM* está associada a uma maior sobrevida no grupo de pacientes com GBM, interpretada como compensatório. As hiperexpressões de *TFAM* e *POLG* estão relacionadas a um melhor prognóstico em pacientes com GBM. Embora nossos achados da disfunção do metabolismo intermediário e depleção do DNAMt em astrocitomas corroborem a literatura, ainda não está bem esclarecida sua implicação na iniciação e manutenção da transformação maligna. Investigações futuras são necessárias para o esclarecimento destas questões.

Descritores: 1.Astrocitomas 2.DNA mitocondrial 3.Fatores de transcrição mitocondrial 4.TFAM 5.POLG 6.Sobrevida

SUMMARY

CORREIA R.L. Metabolic alterations and the role of mitochondria in tumorigenic process of human astrocytomas [thesis]. São Paulo: School of Medicine, University of São Paulo; 2010.

Mitochondria has a key role in cell survival and death. Mitochondrial DNA (mtDNA) alterations, for example, amplification, homoplasmic mutation, deletion and depletion, and their clinical and pathological implications have been analyzed in human malignancies. In order to search for mitochondrial alterations associated to tumorigenesis, this study aimed to analyze the expression levels of genes involved in energetic metabolism, and in mitochondrial replication and transcription, to quantify the number of mitochondrial organelle and mtDNA copy number in astrocytomas of different grades of malignancy (23 WHO grade I, 26 grade II, 18 grade III and 84 grade IV or GBM) related to non-neoplastic brain tissue (22 samples). The relative expression level of the selected genes as well as the relative and absolute quantification of mtDNA were performed by real-time PCR. Relative expression increase of glycolytic pathway key genes, change of citric acid cycle genes and hipoexpression of oxidative phosphorylation genes were detected, and confirmed the presence of Warburg effect. The reduced mtDNA copy number was associated to the grade of malignancy of diffusely infiltrating astrocytoma, being GBM the most depleted, and not related to parallel decrease in the number of organelle. The mean mtDNA copy number for non neoplastic tissue, astrocytoma grade I, grade II, grade III and GBM were respectively 1.28, 0.26, 0.45, 0.42 and 0.17. The increased relative gene expression of mitochondrial transcription factor A (*TFAM*), B1 (*TFB1M*), B2 (*TFB2M*) and the catalytic subunit of mitochondrial polymerase (*POLG*) were observed in all grades of astrocytoma, except *TFB2M* in grade II astrocytoma. Although a strong correlation was observed among the mitochondrial transcription factors, only the expression level of *POLG* correlated inversely to the mtDNA copy number. The overexpression of *TFAM* was associated with long-term survival in the GBM patients and interpreted as compensatory. *TFAM* and *POLG* overexpressions were related to better prognosis in GBM patients. Although our findings concerning the impairment of intermediary metabolism and depletion of mtDNA in astrocytomas confirmed previous reports, their role in initiation or maintenance of malignant transformation were not fully understood. Further investigations are needed to clarify these issues.

Descriptors: 1.Astrocytomas 2. mitochondrial DNA 3. Mitochondrial transcription factors 4. TFAM 5.POLG 6.Survival

INTRODUÇÃO

1. Bioenergética

A fermentação é um processo anaeróbio de degradação de um nutriente orgânico para obter energia sob a forma de adenosina trifosfato (ATP). A glicólise ou quebra da glicose é essencialmente anaeróbica e, portanto, a via metabólica mais primitiva e conservada em todas as formas de vida atuais, desde a mais antiga e simples bactéria até o mais complexo organismo multicelular, excetuando-se os vírus.

A eficiente estratégia da fotossíntese – ao converter energia solar em ligações químicas a partir da quebra de uma molécula de água (H₂O) e sua consequente liberação de oxigênio (O₂) para gerar seu “próprio alimento” – trouxe, entre várias consequências, uma importante: o aumento do nível de O₂ na atmosfera. A disponibilidade de oxigênio, por sua vez, abriu caminho para uma utilização bem mais eficiente de energia livre dessas moléculas produzidas pelos autótrofos, isto é, a respiração (Raven *et al*, 1996). Do ponto de vista da fisiologia, a respiração é o processo pelo qual um organismo vivo troca O₂ e dióxido de carbono (CO₂) com o seu meio ambiente; bioquimicamente, é o processo de oxidação da glicose até CO₂ e água expresso pela seguinte equação química:

A base da dieta dos seres humanos é composta por carboidratos; nisso, a glicose representa um componente diário, já que o açúcar comum, a sacarose, contém 50% de glicose e 50% de frutose. As moléculas de glicose, assim como as de frutose, são ativamente internalizadas nas células de mamíferos e convertidas a piruvato – isto é, cada molécula de glicose que sofre degradação, invariavelmente, por uma série de dez reações enzimáticas citoplasmáticas, produz duas moléculas de piruvato. A glicólise

anaeróbica possui um rendimento energético de somente duas moléculas de ATP, o que, embora seja suficiente para os procariontes e alguns eucariontes simples sobreviverem, representa apenas 5,2% da energia total que pode ser liberada a partir da completa oxidação da glicose. De fato, a glicólise em condições de aerobiose, encontrada na maioria dos eucariontes, é aproximadamente quatorze vezes mais eficiente, gerando 32 ATP (Nelson & Cox, 2000) – envolvendo não só a via glicolítica, mas também as subseqüentes reações oxidativas do ciclo do ácido cítrico (ou ciclo de Krebs) e da cadeia transportadora de elétrons.

1.1. Glicólise aeróbica e anaeróbica

Entre as espécies, a glicólise, ou via de Ebden-Meyrhof, varia apenas em pequenos detalhes de sua regulação e de acordo com o destino metabólico do piruvato. Nas leveduras, ele é transformado em etanol e CO₂ através da fermentação alcoólica. Em eritrócitos, outros microorganismos que não dependem do oxigênio e durante a contração muscular vigorosa – quando há baixos níveis de oxigênio dissolvido (hipoxia) –, o piruvato é apenas parcialmente oxidado, não segue para o ciclo de Krebs e não ocorre produção de ATP numa cadeia transportadora de elétrons, sendo reduzido a lactato. O ácido láctico funciona comoceptor final, recebendo elétrons da nicotinamida adenina dinucleotídeo, o NADH, e assim regenera o NAD⁺ (forma oxidada), que possui um papel importante na continuação da glicólise durante a desidrogenação do gliceroaldeído-3-fosfato (reação 6 da Figura 1).

É importante observar que, com a oxidação do piruvato, o NADH (proveniente da reação 6 da glicólise), que seria utilizado para sua redução, é poupado, possibilitando que os elétrons por ele transportados sejam depositados na cadeia respiratória e, em última análise, convertidos em ATP.

Nenhum acceptor final, no entanto, fornece tanta energia quanto o oxigênio, e logo, em condições de aerobiose, o piruvato não é reduzido, e sim oxidado a um composto com 2 carbonos (2C - acetato), posteriormente combinado com a Coenzima-A nas mitocôndrias pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase para formar acetil-CoA, com a liberação de uma molécula de CO_2 por cada piruvato oxidado (Figura 1).

1.2 Ciclo do ácido tricarboxílico ou do ácido cítrico

O acetil-CoA – proveniente da glicólise, da β -oxidação dos ácidos graxos ou da oxidação de alguns aminoácidos – participa da primeira reação do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (CAT), que é sua condensação com compostos de 4C para dar origem ao citrato (6C), seguida pela formação do isocitrato via aconitase. A oxidação do isocitrato em α -cetoglutarato origina uma molécula de CO_2 , reação esta dependente de NADH. A subsequente oxidação ocorre na presença da coenzima-A, havendo liberação de mais uma molécula de CO_2 e a conversão do α -cetoglutarato em succinil-CoA; este possui uma ligação tioéster altamente energética. No próximo passo, quando esta ligação é quebrada para originar o succinato, ocorre a liberação da energia livre para a síntese de GTP. O succinato, por sua vez, é oxidado a fumarato pela única enzima do ciclo ligada à membrana mitocondrial, a succinato desidrogenase (SDH). Os elétrons passam do succinato através da flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e centro de ferro-enzofre da SDH antes de entrar na cadeia transportadora de elétrons da membrana mitocondrial interna (complexo II). O fumarato é hidratado e convertido a malato, o qual sofre uma reação de oxidação, regenerando o oxaloacetato (4C) – que pode participar de mais uma reação de condensação com o acetil-CoA – dando continuidade ao ciclo (Voet, 2000). A série de oito reações cíclicas intramitocondriais descobertas por Hans Krebs, na qual quatro delas oxidativas liberam energia, que é conservada sob a forma de

coenzimas reduzidas (que podem ser visualizadas na Figura 2). Cada volta no CAT consome uma molécula de acetil-CoA e duas de O_2 , e são formadas duas moléculas de CO_2 , três de NADH, uma de $FADH_2$ e uma de GTP.

O CAT é uma via anfibólica, pois é utilizada tanto nos processos catabólicos quanto anabólicos: o citrato é um precursor de ácidos graxos e esteróides, e o α -cetoglutarato e o oxaloacetato podem originar os aminoácidos aspartato e glutamato por simples desaminação, cujos esqueletos carbônicos são utilizados para sintetizar purinas e pirimidinas. Além disso, o succinil-CoA é um intermediário na síntese do anel porfirínico do grupo heme de citocromos e hemoglobinas.

Nos eucariontes, portanto, a via glicolítica está integrada ao ciclo do ácido cítrico, que, por sua vez, está acoplado à cadeia transportadora de elétrons para que estas vias catabólicas juntas produzam ATP e seus precursores biológicos de uma maneira econômica e auto-regulada.

FIGURA 1 ESQUEMA DA GLICÓLISE. Séries de dez reações enzimáticas em azul e nome das respectivas enzimas em vermelho. A transformação do piruvato em acetil-CoA com a liberação de CO_2 é dependente de oxigênio e, portanto, faz parte da respiração celular. * Enzimas marca-passo da via.

2. Mitocôndria

A mitocôndria (*mitos*, filamento e *condria*, partícula) é uma organela celular de forma arredondada ou alongada envolta por duas membranas: a externa é lisa e reveste o espaço intramembranoso; a interna possui invaginações, as cristas mitocondriais (Figura 3A). Aderidos às cristas, há proteínas integrantes da cadeia respiratória e transportadores. No seu interior – ou matriz mitocondrial - localizam-se as enzimas do CAT (ciclo de Krebs), β -oxidação de ácidos graxos, do metabolismo do piruvato, RNAs, ribossomos, DNA mitocondrial (DNAMt), entre outros elementos.

As mitocôndrias estão intimamente ligadas à homeostase celular porque, apesar de variarem na quantidade e distribuição (de centenas a mais de 1000 por célula), sua localização está próxima aos pontos onde existe grande consumo de energia. Isto indica uma estreita relação entre essas organelas e as necessidades energéticas da célula, corroborando sua principal função, dentre muitas, de síntese de 90% do ATP celular através da fosforilação oxidativa (FOX) (Wallace, 1997).

1. Condensação: Citrato sintetase
2. Hidratação: Aconitase
3. Descarboxilação oxidativa: Isocitrato desidrogenase
4. Descarboxilação oxidativa: α- cetoglutarato desidrogenase
5. Ganho energético: Succinil-CoA sintetase
6. Desidrogenação: Succinato desidrogenase
7. Hidratação: Fumarase
8. Desidrogenação: Malato desidrogenase

FIGURA 2. CICLO DOS ÁCIDOS TRÍCARBOXÍLICOS. Reações em azul com suas respectivas enzimas. Figura modificada de Ferreira (2003).

2.1 Transporte de elétrons e fosforilação oxidativa

A cadeia respiratória é um grupo de cinco complexos enzimáticos responsáveis pela gradativa transferência de elétrons, oriundos do metabolismo intermediário, para a redução do oxigênio e síntese de ATP. Durante esse processo, há a formação de água e liberação de prótons H^+ da matriz para o espaço intramembranoso mitocondrial, de cujo mecanismo deriva a energia aproveitada pelo complexo V que favorece a formação de moléculas de ATP. Os elétrons captados pelas coenzimas reduzidas NADH e $FADH_2$ durante as oxidações do CAT são depositados nos complexos enzimáticos I e II, respectivamente, e transferidos para outros carreadores (complexo III, IV) de uma maneira gradativa até seu aceptor final, o oxigênio, produzindo água. Durante esta transferência, prótons H^+ são expelidos da matriz para o espaço entre membranas mitocondriais, gerando um gradiente eletroquímico responsável pelo potencial de membrana das mitocôndrias ($\Delta\psi$). Este potencial de membrana da ordem de 180 mV contribui para o armazenamento de energia livre disponível para a consequente reação de síntese de ATP no complexo V, que ocorre através do acoplamento de ADP mais fosfato inorgânico (P_i), dado pela reação $ADP + P_i \rightarrow ATP$. Este processo, conhecido como FOX, pode ser visualizado na Figura 3B.

A formação da cadeia respiratória está sob controle de dois sistemas genéticos: o genoma nuclear e o DNA mitocondrial. Os cinco complexos enzimáticos, que constituem o sistema de FOX, são produtos de 74 genes nucleares e de 13 genes mitocondriais, conforme apresentado na Tabela 1.

FIGURA 3 MITOCÔNDRIA E ESQUEMA DA FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA. **A**- Eletromicrografia de uma mitocôndria típica de célula renal de camundongo, aumento de 84.000x (Junqueira e Carneiro, 1991) **B**- Fosforilação oxidativa mostrando os complexos enzimáticos (I, II, III e IV F_0 , F_1) (Lehninger *et al.*, 1995).

Tabela 1 Produtos de genes de codificação mitocondrial e nuclear envolvidos na fosforilação oxidativa

Complexo Protéico	Nome dos produtos de genes do DNAm	Genes DNAn	Genes DNAm	Genes DNAn + Genes DNAm
I	ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6	36	7	43
II	-	4	0	4
III	Citocromo b	10	1	11
IV	COX I, COX II, COX III	10	3	13
V	ATPase 6, ATPase 8	14	2	16
Total		74	13	87

DNAn: DNA nuclear; DNAm: DNA mitocondrial. Adaptado de John Penta, 2001.

O complexo I, ou NADH-ubiquinona oxidoredutase, consiste em sete subunidades codificadas pelo DNAm (ND1-ND6 e ND4L) e trinta e seis pelo DNA nuclear, responsáveis pela oxidação do NADH. O complexo II, ou succinato ubiquinona oxidoredutase, é o único exclusivamente codificado pelo genoma nuclear, possuindo quatro subunidades para receberem os elétrons do $FADH_2$. O complexo III (ubiquinol-ferricitocromo c oxidoredutase) possui uma única subunidade codificada pelo genoma mitocondrial, citocromo b, e dez nucleares. O complexo IV, ou citocromo c oxidase (COX), é composto por treze subunidades; três delas são codificadas pelo DNAm

(COX I, II e III). Além dos complexos protéicos, existem dois pequenos transportadores de elétrons hidrofóbicos e móveis – coenzima Q10 e citocromo c – ambos sintetizados por genes nucleares. A síntese de ATP propriamente dita, realizada pelo complexo V ou ATPsintase, é também um mosaico genético constituído de duas subunidades, codificadas pelo genoma mitocondrial (ATPase 6 e ATPase 8) e pelo menos 14 nucleares.

2.2 DNA mitocondrial e doenças

Desde a década de 60, com a descoberta de que a mitocôndria tem seu próprio DNA, e de 1981, com a publicação de seu sequenciamento completo (Anderson *et al.*, 1981), pode-se acompanhar a descrição de um número crescente de doenças humanas atribuídas a mutações em DNA e DNAm (Servidei, 2003).

Moléculas de DNAm mutadas e intactas, ou originais à data do nascimento, podem coexistir em uma mesma célula, tecido ou órgão em um estado chamado heteroplasmia. Na mitocôndria que contém apenas DNAm mutado ou DNAm original, estes são chamados homoplásmicos, isto é, todas as cópias possuem o mesmo genótipo.

O genoma mitocondrial é mais vulnerável a danos oxidativos e está submetido a um maior índice de mutações em relação ao nuclear. As células são capazes de tolerar uma porcentagem alta de DNAm mutado (70-90%) antes de comprometer a cadeia respiratória. Entretanto, esta faixa representa uma linha tênue que varia de mutação para mutação e de tecido para tecido, dificultando, inclusive, o diagnóstico (Taylor & Turnbull, 2005). Defeitos mitocondriais ocorrem em uma variedade de doenças degenerativas, envelhecimento e câncer, e, apesar da complexidade genética mitocondrial, Chinnery e colaboradores (1997) demonstraram que o percentual de mutação de DNAm em tecidos de relevância clínica está correlacionado com a gravidade da doença.

Segundo Zeviani & Donato (2004), as mutações de DNAm são divididas em rearranjos de larga escala (deleções parciais ou duplicações) e mutação pontual herdada. As mutações em rearranjos incluem vários genes e são heteroplásmicas e esporádicas, enquanto que as mutações de ponto, herdadas matematicamente, podem ser heteroplásmicas ou homoplásmicas.

Células de mamíferos, particularmente do cérebro e da musculatura esquelética, possuem uma demanda energética alta e, portanto, necessitam permanentemente de oxigênio, isto é, do metabolismo mitocondrial eficiente. Os primeiros relatos de doenças envolvendo mitocôndria são derivados do estudo da síndrome de Kearns-Sayre (SKS) e da neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON). Pacientes com hipermetabolismo apresentavam na biópsia de músculo esquelético um número elevado de mitocôndrias anormais com uma única deleção de 5kb. Já em LHON, uma mutação de ponto, transmitida matematicamente, no gene ND4 (G11778A) num polipeptídeo do complexo I, resulta em um defeito parcial na transferência de elétron do NADH para ubiquinona, sendo suficiente para lesionar o nervo óptico, levando à cegueira (Schapira, 1999). Desde então, várias mutações em genes mitocondriais foram identificadas como responsáveis pela fraqueza muscular progressiva que caracteriza as miopatias mitocondriais (encefalopatia mitocondrial, acidose láctica e episódio de isquemia cerebral – conhecida como MELAS –, e a epilepsia mioclônica com fibra muscular rajada em vermelho – MERRF).

Atualmente, as doenças mitocondriais englobam uma variedade de sintomas clínicos que comumente afetam tecidos que requerem muito ATP – não só cerebral e muscular, mas também os do sistema renal, endócrino e hepático (Wallace, 1999; Taylor & Turnbull, 2005). A Figura 4 mostra o mapa do DNAm humano com a localização de algumas mutações patogênicas no genoma mitocondrial. Dentre todas as doenças mitocondriais, as manifestações clínicas neurológicas são as mais frequentes deste grupo caracterizado por anormalidades na FOX.

Em tumores, mutações no DNAm são frequentes em genes que codificam os complexos I, III-V, em regiões hipervariáveis e alterações

FIGURA 5 DELEÇÕES GENÔMICAS MITOCONDRIAS EM TUMORES SÓLIDOS. Adaptado de Penta *et al.* (2001).

Deleções na região D-loop em carcinoma hepático foram sugeridas como consequência da susceptibilidade maior que esta região do DNAm possui a espécies reativas ao oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS) (Yin *et al.*, 2004).

O aumento de ROS, tal como de superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^\cdot$), favorece o aumento de mutações tanto no DNAm quanto no DNA nuclear (DNA). Os relatos de células tumorais estarem submetidas a estresse oxidativo constitutivo são consistentes com a hipótese de que ROS afetam tanto a iniciação quanto a promoção da carcinogênese (Toyokuni, 1995; Wei, 1998). ROS também pode aumentar a tumorigênese pela ativação de vias de sinalização que regulam a proliferação celular, angiogênese e metástase (Storz, 2005).

A exposição crônica a ROS, dentre todos os seus efeitos danosos, pode inativar os centros de ferro e enxofre (Fe-S) dos componentes da cadeia transportadora de elétrons e do ciclo do ácido cítrico, resultando na alteração do potencial de membrana interna ($\Delta\psi$) e na consequente deficiência da produção energética. Frataxin, uma proteína localizada na matriz mitocondrial, controla a síntese desses conjugados Fe-S presentes

nas atividades de óxido-redução no CAT e na cadeia respiratória (complexos I, II e III). A expressão reduzida desta enzima leva ao desenvolvimento de uma doença neurodegenerativa chamada Ataxia de Friedreich (FRDA), acompanhada de cardiomiopatia, diabetes mellitus e, ocasionalmente, câncer atípico para a idade jovem. Relata-se que a alteração genética induzida de frataxin em camundongos prejudique a atividade das enzimas dependentes de Fe-S, além de diminuir a FOX, o que levaria à formação de tumores (Ristow, 2006).

A influência do acúmulo de mutações no DNAm e DNAn com o processo de tumorigênese pode também ser explicada através da inativação de genes supressores de tumor e/ou ativação de oncogenes. A inserção de DNAm no genoma nuclear já foi descrita como mecanismo de ativação de oncogenes (Droge, 2002). Várias enzimas mitocondriais são descritas como supressoras de tumor, tais como succinato desidrogenase (SDH) e fumarato hidratase. O produto do gene *Von Hippel Lindau (VHL)* de sinalização para degradação dependente de oxigênio, pVHL, liga-se a um fator que promove a adaptação de células a baixas quantidades de oxigênio pela indução da neovascularização e glicólise – conhecido como fator de transcrição induzido por hipoxia, HIF-1 α (Dang e Semenza, 1999). Prolil hidroxilase HIF- α catalisa a ligação de pVHL a HIF-1 α (Semenza, 2002). Selak e colaboradores (2005) promoveram o acúmulo de succinato através da inibição de SDH, levando à inibição da prolil hidroxilase HIF- α e impedindo a ligação de HIF-1 α com pVHL, estabilizando, assim, os níveis de HIF-1 α livre. A baixa atividade de SDH resulta em acúmulo de succinato na matriz mitocondrial e, conseqüentemente, no citosol. Os autores concluíram que o aumento de succinato no citoplasma pode aumentar a expressão de genes que contribuem com a angiogênese, metástase e glicólise. Em última análise, o succinato, um intermediário do CAT, pode atuar como um mensageiro intracelular, ligando a disfunção do ciclo de Krebs com o aumento de expressão de genes que facilitam a agressividade tumoral em paraganglioma e feocromocitoma.

2.3. Replicação e transcrição mitocondrial

A mitocôndria contém sistemas enzimáticos responsáveis por replicação e expressão distintos daqueles encontrados no núcleo. Entretanto, vários genes nucleares tem sido identificados como de fundamental importância para a homeostasia mitocondrial, uma vez que a manutenção da integridade do DNAm_t é essencial para o funcionamento normal da cadeia respiratória. O nível dos transcritos mitocondriais depende extensivamente do número de cópias de DNAm_t, e, portanto, sua regulação é importante na manutenção da produção aeróbica de ATP (Kanki *et al.*, 2004; Asin-Cayuela & Gustafsson, 2007).

Atualmente, há dois modelos que explicam a replicação mitocondrial. O primeiro descreve um processo assíncrono na origem da cadeia H (O_H), onde a síntese da fita H (cadeia pesada) é unidirecional, percorrendo 2/3 do DNAm_t até expor a origem da fita da cadeia leve (O_L), que inicia a replicação da fita L na direção oposta (Clayton, 1991; Shadel & Clayton, 1997). O outro modelo, simétrico, preconiza que a síntese de ambas as fitas, processadas a partir de múltiplas forquilhas bidirecionais de replicação (Bowmaker *et al.*, 2003).

A replicação do DNAm_t propriamente dita, independentemente do modo, inicia-se com a transcrição das regiões promotoras HSP1 e HSP2, que originam um precursor policistrônico de RNA, o qual é processado para produzir moléculas individuais de RNAt, RNAm e RNAr (Taylor & Turnbull, 2005; Shoubridge, 2001). Somente a região de terminação (*TERM*) está bem definida e localiza-se ao fim do gene *RNAr 16S*, que é dependente do fator de terminação mTERF. Essa proteína de 39kDa controla a expressão dos transcritos de H1 através da formação de uma alça entre HSP1 e o término do gene *RNAr 16S* (Scarpulla, 2008) (Figura 6A).

A transcrição da cadeia leve também produz um oligonucleotídeo de RNA que forma um híbrido de DNA-RNA na origem de replicação da fita-H. Embora os mecanismos moleculares ainda não estejam totalmente

esclarecidos, o híbrido e o tamanho da transição entre o *primer* de RNA e a formação da nova fita de DNA são estabilizadas no bloco II de sequências conservadas (CSBII) (Figura 6B). A fita pesada nascente termina a 700 pb após O_H, originando DNA 7S, que produz uma estrutura característica de três fitas chamada D-loop. Sua função, bem como os mecanismos pelos quais a replicação deve ou não proceder, são desconhecidos. Sequências associadas à terminação (TAS) são elementos de DNA curto (15pb) conservados em vertebrados e localizados na porção 3' da fita H, D-loop nascente. As sequências TAS são propostas como o ponto principal de regulação da replicação do genoma mitocondrial (Falkenberg *et al.*, 2007).

A subunidade catalítica γ A (POLG) da DNA-RNA polimerase mitocondrial (POLRMT) e a helicase replicativa mitocondrial (TWINKLE) possuem significativa homologia com a RNA polimerase monomérica vista em bacteriófagos T7 e T3. Considera-se que alguns genes requeridos para a replicação e expressão do DNAm foram adquiridos de um ancestral do fago T muito antes da evolução de células eucarióticas, talvez a tempo da ocorrência da endossimbiose mitocondrial. Diferentemente da RNA polimerase do fago T7, POLRMT não interage com o promotor e nem inicia a transcrição sozinha, necessitando simultaneamente da presença do fator de transcrição mitocondrial A (TFAM) e de pelo menos um de seus parálogos, os fatores de transcrição B1 (TFB1M) e B2 (TFB2M) (Falkenberg *et al.*, 2002 Taylor & Turnbull, 2005). Uma vez alterado, estes genes também são capazes de influenciar o metabolismo mitocondrial, causando doenças genéticas nucleares bem estabelecidas, como atrofia óptica dominante (OPA), paraplegia espástica hereditária e outras que possuem grande importância na patofisiologia de doenças mitocondriais autossômicas (Zeviani & Donato, 2004; Chinnery & Schon, 2003; Shoubridge, 2001).

O aumento do número de cópias de DNAm foi primeiramente observado em tumor de cólon (Yamamoto *et al.*, 1989) desde então, tanto o aumento quanto a diminuição do genoma mitocondrial vem sendo detectado em vários tipos de câncer (Mambo *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2005).

FIGURA 6 ESQUEMA DA INICIAÇÃO DA SÍNTESE DE DNA MITOCONDRIAL.

A- Alça formada pela ligação simultânea de mTERF a TERM e HSP1 que está ligado a TFAM e ao complexo formado entre POLRMT e um dos fatores de transcrição mitocondriais B (Scarpulla, 2008). **B-** Representação da região de regulação D-loop e posição de ligação de TFAM a complexo TFB2M/POLRMT. LSP: Região Promotora da fita leve; OH: Origem de replicação da fita pesada; HSP1; HSP2: Região Promotora 1 e 2 da fita pesada; CSB I, II, III: Blocos de sequências conservadas; TAS: Sequências associadas a terminação. Figura adaptada de Falkenberg *et al.*, (2007).

TFAM, uma proteína do grupo de alta mobilidade, liga-se ao DNAmT através de sua cauda C-terminal, abre e expõe a região promotora para que TFB2M ligue-se a fita simples e recrute POLRMT, formando um complexo (Gaspari *et al.*, 2004; D'Errico *et al.*, 2005). TFAM introduz, assim, modificações estruturais importantes para o reconhecimento da POLRMT ao LSP. Kanki e colaboradores (2004) relacionaram o aumento ou decréscimo no número de cópias de DNAmT diretamente com o aumento ou decréscimo

de TFAM em cultura de células, embora os níveis de transcritos não tenham se correlacionado com a quantidade de DNAMt. Os autores ainda sugerem a nomenclatura de mitocromossomo para a maioria das moléculas de TFAM ligadas a regiões não promotoras do DNAMt, formando nucleóides que possuem outro papel além de sua atividade transcricional na manutenção da integridade do DNAMt. Em contrapartida, a hiperexpressão transitória de *TFAM* em cultura de células estimulou a transcrição mitocondrial, no entanto, sem associação com um aumento no número de cópias de DNAMt (Maniura-Weber *et al.*, 2004; Ekstrand *et al.*, 2004). TFB1M e TFB2M são RNA metiltransferases que formam complexos com a POLRMT para auxiliarem na transcrição mitocondrial. O complexo TFB2M/POLRMT promove, *in vitro*, uma transcrição pelo menos duas vezes mais eficiente que TFB1M/POLRMT (Falkenberg *et al.*, 2002). TFB2M, ao longo da evolução, passou a ter uma menor atividade de metiltransferase do que TFB1M, e estabiliza a região promotora por se ligar à fita simples de DNA, evitando a formação de híbridos RNA-DNA, enquanto TFB1M está mais associada à modulação da tradução (Shadel, 2008; Falkenberg *et al.*, 2007).

Quando a disfunção da cadeia respiratória gera deficiência de ATP, isto pode estimular a biogênese mitocondrial através da ativação destes genes nucleares de replicação e transcrição mitocondriais na tentativa de compensar defeitos na fosforilação oxidativa. O coativador 1 α do receptor gamma, ativado pela proliferação de peroxissomo (PGC-1 α), pode ser a principal resposta celular a este estímulo, uma vez que controla a expressão dos fatores nucleares de respiração 1 e 2 (*NRF-1* e *NRF-2*), duas proteínas transativadoras que coordenam e regulam a expressão de *TFAM*, *TFB1M* e *TFB2M* (Gleyzer *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2006). A ativação de *TFAM* também foi descrita através da fosforilação de NRF-1, levando a um aumento no conteúdo de DNAMt (Piantadosi & Suliman, 2006).

3. Efeito Warburg e alterações metabólicas mitocondriais

As primeiras modificações quantitativas do genoma mitocondrial foram descritas na década de 70 por microscopia eletrônica, quando se observou que o número de organelas e sua proliferação estavam aumentados em vários oncocitomas. O conteúdo e a atividade da NADH desidrogenase e o complexo I mitocondriais estavam diminuídos nestes tumores, levando Simonnet e colaboradores (2002) à conclusão de que a deficiência do complexo I em oncocitomas pode ser um dos primeiros eventos causadores de aumento da biogênese mitocondrial, na tentativa de compensar a deficiente FOX. O aumento do metabolismo glicolítico em detrimento da oxidação fosforilativa é uma propriedade comum a células tumorais.

Na década de 20, Otto Warburg foi o primeiro a observar que a glicose é preferencialmente transformada em ácido láctico em tumores mesmo na presença de oxigênio (Warburg *et al.*, 1924). Este fenômeno ficou conhecido como Efeito Warburg. A via glicolítica é direcionada para a redução do piruvato em uma taxa maior de pelo menos dez vezes em relação ao tecido normal (Nelson & Cox; 2000). O gene da lactato desidrogenase A (*LDHA*) é alvo do oncogene *c-Myc* (Dang & Semenza, 1999). Foi verificado por Osthus (2000) que *c-Myc* transfectado em fibroblasto de rato e hepatócito ativa a fosfofrutoquinase (PFK), gliceroaldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), fosfoglicose isomerase (GPI), fosfogliceromutase (PGM) e transportador de glicose 1 (GLUT1). AMP-proteína quinase (AMPK), uma enzima que reconhece e sinaliza níveis energéticos celulares de ATP:AMP, é capaz de ativar os transportadores de glicose (GLUT1 e GLUT4) aumentando as taxas de glicólise e degradação de ácidos graxos para compensar quedas nos níveis de ATP. A atividade de AMPK foi interpretada como facilitadora da progressão tumoral (Ashrafian, 2006). A hiperexpressão preferencial de *GLUT1* (Rivenzon-Segal *et al.*, 2003) e a ativação da transcrição da isoforma II do gene da hexoquinase (Mathupala *et al.*, 2001) são descritos como mecanismos reguladores do

aumento da concentração intracelular de glicose. Além disto, o aumento da expressão de GLUT1 mostrou ser favorável ao prognóstico em pacientes com carcinoma de célula escamosa (Kunkel *et al.*, 2003).

Observou-se, em carcinomas renais e de cólon, uma redução da expressão de uma subunidade do complexo V (β -F1-ATPase) e aumento da expressão de *GAPDH* (Cuezva, 2002; López-Ríos *et al.*, 2007). Esses autores estabeleceram uma relação direta entre o grau de malignidade do tumor e a baixa atividade mitótica, mesmo sem entender completamente os mecanismos deste fenômeno. Foi proposto que o estado metabólico celular, definido como a razão entre o índice bioenergético mitocondrial e potencial glicolítico celular, possa representar uma marca de carcinogênese e fornecer um valor prognóstico em diferentes tipos de câncer. Assim, quanto menor o estado metabólico celular, maior seria a malignidade do tumor. Desta forma, células tumorais típicas, submetidas a nível normal de oxigênio, mantêm seu fenótipo glicolítico aumentado, indicando mais do que uma simples adaptação celular à hipoxia. Este fenótipo metabólico confere vantagem proliferativa durante a progressão tumoral (Gatenby & Gillies, 2004; 2008).

Quando a glicose não é mais suficiente, como ocorre em tumores sólidos, células malignas são forçadas a usarem um substrato energético alternativo, como a oxidação da glutamina, processo chamado glutaminólise. Rossignol e colaboradores (2004) mostraram que o metabolismo mitocondrial deficiente em células tumorais (HeLa) pode ser melhorado significativamente alterando somente a oferta de substrato, já que a FOX tem capacidade de se adaptar funcionalmente e estruturalmente a glutaminólise.

4. Tumores do sistema nervoso central

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) representam um grupo bastante heterogêneo de neoplasias originárias de tecidos intracranianos e meninges com quatro graus de malignidade de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), muito embora sua classificação histológica vem sendo um desafio há mais de um século. Variam em relação ao tecido de origem quanto à localização, padrão de disseminação, quadro clínico, história natural, idade de ocorrência e prognóstico (Collins, 2004).

Os astrocitomas, derivados dos tumores de tecido neuroepitelial (gliomas), são os mais comumente observados tanto em adultos como em crianças. Estes tumores são heterogêneos, variando de tumores indolentes, como o astrocitoma pilocítico, até tumores altamente malignos, como o glioblastoma (GBM) que é o mais frequente tipo histológico (Ohgaki, 2009). Os gliomas são englobados em três grupos principais: astrocitomas, oligodendrogliomas, oligoastrocitomas mistos e ependimomas, que podem, em geral, ser diferenciados através de seus achados histológicos, tais como atipia nuclear, mitose, proliferação microvascular e necrose. A Tabela 2 mostra a classificação dos astrocitomas baseado nestes critérios histológicos (Louis *et al.*, 2007).

Tabela 2 Classificação dos astrocitomas

Classificação		Critério Histológico
Grau I	Astrocitoma pilocítico	Não infiltrativo
Grau II	Astrocitoma de baixo grau	1- Atipia nuclear, citoplasma abundante, alterações microcísticas
Grau III	Astrocitoma anaplásico	2- Atipia nuclear e atividade mitótica
Grau IV	Glioblastoma	3- Atipia nuclear, mitose, proliferação endotelial e/ou necrose

Embora a incidência de tumores malignos cerebrais seja de 2% de todos os cânceres em adultos, eles representam o segundo câncer pediátrico mais comum, superado apenas pelas leucemias, sendo astrocitoma pilocítico o tumor sólido mais frequente em crianças. Nas últimas décadas, os avanços nas taxas de sobrevida global para estes tumores foram bastante modestos quando comparados a outras formas de

malignidade em crianças, sendo que a taxa de mortalidade observada para o grupo dos tumores do SNC ainda é o maior entre os cânceres pediátricos.

Astrocitomas de baixo grau, embora sejam de crescimento lento, diferem dos tumores circunscritos pelo alto nível de diferenciação celular e por serem difusamente infiltrativos. Pacientes com astrocitomas de baixo grau podem ter anos de crises convulsivas antes do aparecimento da lesão por imagem e possuem forte tendência à evolução para formas mais malignas. Um quarto dos tumores cerebrais concentra-se entre os graus II a IV. A sobrevida desses pacientes é de cinco anos em 40% a 65% dos casos e de 10 anos em 20% a 40% deles (Louis *et al.*, 2007).

A classificação molecular de gliomas vem sendo explorada na literatura (Shirahata *et al.*, 2007) e tem contribuído na caracterização genética destes tumores (Ohgaki e Kleihues, 2007). Astrocitomas anaplásicos, por exemplo, representam um estágio intermediário do ponto de vista clínico, morfológico e genético em direção a GBM. O desenvolvimento de gliomas é um processo complexo e envolve um grande número de genes. Vários deles foram correlacionados com astrocitomas, entre eles citam-se *Np95*, *LMO1*, *FCGBP*, *DSCAM* e *TXLN* identificados em nosso laboratório por análise de cDNA representacional diferenciada superexpressos em astrocitomas anaplásicos humano quando comparado com tecido do SNC não tumoral (Oba-Shinjo *et al.*, 2005).

A perda de uma cópia do cromossomo 10 (locus de *TFAM*), a trissomia do cromossomo 7, 19 e 20 são eventos frequentes em GBM, enquanto raro nos tumores astrocíticos de baixo grau, assim como a amplificação do receptor de fator de crescimento epidermal (*EGFR*), presente com alta frequência em GBM (Louis *et al.*, 2007). Importantes vias, como a de p53, possuem anormalidades genéticas em 87% das amostras em GBMs secundários detectadas por microarray de DNA de polimorfismo (SNP-Chip) (Yin *et al.*, 2009). As mutações somáticas de *TP53* foram detectadas em 7,4% de GBM analisados, 27,3% em astrocitomas anaplásicos e 43% em astrocitomas de baixo grau em pacientes brasileiros (Uno *et al.*, 2005). Comparando-se 20 GBMs e 10 casos não-tumorais por *microarray* e PCR

quantitativo, um estudo encontrou 8 genes dentre 18 superexpressos em GBMs primários que codificam proteínas de superfície celular (Scrideli *et al.*, 2008).

A análise multivariada de 340 pacientes de GBM mostrou que a radioterapia é o fator prognóstico mais relevante, seguido da ressecção cirúrgica total, localização tumoral, idade, e quimioterapia – principalmente por temozolamida (Mineo *et al.*, 2007).

Dados prévios do nosso laboratório mostraram por PCR em tempo real uma quantidade diminuída de DNAmT em 67,35% dos casos de GBM analisados (33/49) em relação ao grupo controle (tecido cerebral não-tumoral) (Huang, 2005). Além disso, verificou-se que pacientes com DNAmT depletados obtiveram, em média, um tempo de sobrevida menor (25,5 semanas) em relação ao grupo que não apresentou depleção de DNAmT (56 semanas), sugerindo que a diminuição do conteúdo do genoma mitocondrial esteja influenciando o prognóstico de pacientes com diagnóstico de GBM.

Com o rápido desenvolvimento das pesquisas, principalmente no campo da biologia molecular, o conhecimento dos processos que se relacionam com a origem, desenvolvimento e manutenção tumoral tem se mostrado em crescente e constante debate. Por mais estabelecido, tanto em níveis bioquímico e molecular, que o fenótipo glicolítico esteja em células tumorais, conferindo vantagens adaptativas, a presumida disfunção mitocondrial ainda não foi estabelecida na biologia do câncer. Torna-se evidente cada vez mais a complexidade dos eventos em nível gênico e molecular envolvidos na carcinogênese, como, por exemplo, a associação da p53 com a POLG (Achanta *et al.*, 2005). Nesse sentido, o esclarecimento do papel da mitocôndria revela-se como uma potencial ferramenta na diferenciação de situações fisiológicas e patológicas.

Este trabalho teve a finalidade de estudar o número de cópias de DNA mitocondrial na expressão de genes nucleares envolvidos no controle da replicação do DNA mitocondrial e relacionados no metabolismo energético em astrocitomas de diferentes graus para melhor compreensão da influência do metabolismo mitocondrial na progressão tumoral.

OBJETIVOS

- ✓ Analisar a expressão de genes envolvidos no metabolismo energético a partir de dados prévios de *microarray* de oligonucleotídeos e selecionar genes-chave para validar a expressão em amostras de GBM;
- ✓ Quantificar o número de cópias do DNA mitocondrial e a expressão de genes envolvidos na replicação e transcrição do DNA mitocondrial (*TFAM*, *TFB1M*, *TFB2M* e *POLG*) em astrocitomas de diferentes graus de malignidade, comparado ao tecido cerebral não-tumoral;
- ✓ Caracterizar o número de organelas mitocondriais em GBM;
- ✓ Relacionar os achados moleculares entre si e com dados de sexo, idade e sobrevida dos pacientes.

MÉTODOS

Este projeto tem como desenho a seleção e análise de genes envolvidos no metabolismo energético através de dados de expressão gênica de experimentos de *microarray* previamente realizados no laboratório. Foram também analisados o número de mitocôndrias e de cópias de DNAm, bem como de genes reguladores da replicação do genoma mitocondrial. Esta análise foi realizada em astrocitomas de diferentes graus de malignidade em comparação ao tecido cerebral não-tumoral. A Figura 7 mostra um esquema do desenho do projeto.

FIGURA 7 ESQUEMA DO DESENHO DO PROJETO

1. Casuística

Astrocitomas de diferentes graus e tecido não neoplásico do SNC foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido após ressecção pelo grupo de Tumores Encefálicos e Metástases da Divisão de Clínica Neurocirúrgica do Instituto Central do Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Todos os tecidos que foram utilizados no presente estudo possuem confirmação histopatológica da Divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP, de acordo com a classificação da OMS, e fazem parte do banco de amostras coletados durante o Projeto Genoma Clínico, com financiamento da Fapesp e do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do HC-FMUSP conforme Protocolo de Pesquisa Nº0173/07 (Anexo 1). Os consentimentos pós-informados foram obtidos de todos os pacientes com tumor ou responsáveis legais (Anexo 2) e estão sendo acompanhados clinicamente com protocolos padronizados para quimioterapia e radioterapia, bem como para análise da evolução por neuroimagem.

A casuística total deste projeto consiste de 174 amostras, das quais foram extraídos DNA e RNA, conforme mostra a Tabela 3. Dados clínicos e seguimento dos pacientes estão tabulados no Anexo 03.

Tabela 3 Casuística do projeto

Amostras	RNA	DNA
Tecido não neoplásico	22	19
Astrocitoma grau I	23	18
Astrocitoma grau II	26	24
Astrocitoma grau III	18	18
Glioblastoma	84	78

2. Análise da expressão gênica por *microarray* e seleção de genes

Em um estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa (Marie *et al.*, 2008), foram utilizadas para hibridização de *microarrays* de oligonucleotídeos 55K (Codelink, GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) uma população de RNA de três amostras de GBM e um *pool* de tecido cerebral normal. Os valores de fluorescências normalizadas foram utilizados para o cálculo da razão da média das amostras de GBMs sobre o *pool* de tecido normal (T/N). A seleção de genes foi feita segundo comparação dessas razões com dados da literatura que corroboram, por exemplo, o fenótipo glicolítico aumentado em detrimento da FOX em tumores. Não há representação dos 13 genes codificados pelo genoma mitocondrial no microchip utilizado.

3. Extração de DNA

O DNA de tecido congelado foi extraído pelo método convencional fenol/clorofórmio. O tecido tumoral foi pesado e para cada 0,1g de tecido foram adicionados 1000µL de tampão de lise (NaCl 150mM, EDTA 25mM em pH 8,0), 20µL de proteinase K (10mg/mL) e 20µL de SDS 10%. A mistura foi incubada a 37°C por uma noite. Posteriormente, foi feita uma centrifugação por 15 min a 14.000 rpm. Foram adicionados para cada 500µL de sobrenadante, 250µL de fenol pH 8,0 e 250µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Após centrifugação de 5 min a 14.000 rpm, foi removido o sobrenadante, adicionando 500µL de clorofórmio e, em seguida, novamente centrifugado. Ao sobrenadante foram adicionados 40µL de NaCl 0,4M e 1000µL de etanol absoluto gelado, homogeneizado e mantido a -20°C por uma noite ou mais. O precipitado foi obtido após centrifugação de 15 min a 14.000 rpm, seco e ressuspensão em 50µL de água MilliQ. Em seguida,

foram adicionados a esta solução 25µL de NH₄Ac 7,5M e 300µL de etanol absoluto gelado, centrifugando por 5 min a 14.000 rpm. O precipitado foi lavado com 1000µL de etanol 70%, seco em temperatura ambiente e ressuspenso em tampão Tris-EDTA (TE). O DNA resultante foi quantificado e sua pureza analisada pela razão 260/280 nm no espectrofotômetro ND-1000 (NanoDropTechnologies, Inc). Valores entre 1,8 e 2,0 foram considerados satisfatórios. As amostras foram armazenadas a 4°C até sua utilização.

4. Extração de RNA total

Os tecidos foram analisados em cortes de 4µm corados com hematoxilina e eosina (HE) em prol da verificação da qualidade do mesmo. Porções de tecidos não tumorais (tecido normal, necrose) foram dissecados previamente à extração de RNA total dos tecidos neoplásicos. O RNA total foi extraído com RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc, Hilden, Alemanha). A qualidade das amostras foi verificada através de corrida eletroforética em gel denaturante de agarose, e as concentrações das mesmas foram determinadas através de leitura em espectrofotômetro. As amostras foram estocadas a -70°C até sua utilização para a síntese de DNA complementar (cDNA).

5. Síntese de DNA complementar por transcrição reversa

O procedimento em quatro etapas foi realizado com reagentes da Invitrogen. Inicialmente, uma prévia digestão com DNase foi feita para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico. A 1µg de RNA total (7,0µL) acrescentou-se 0,2µL de DNase (10U/µL), 0,3µL de água MilliQ,

2,0µL do tampão de síntese (First Strand Buffer 5X) e 0,5µL de inibidor de RNase (RNaseOUT), incubou-se a 37°C por 10 min e a 75°C por 5 min.

Para a denaturação do RNA e pareamento dos *primers*, foram adicionados, a cada amostra, 0,09µL de *primers* randômicos (3µg/µL), 0,5µL de *primer* dT (0,5µg/µL), 1,0µL de solução com mistura de dNTPs (10mM), 0,41µL de água MilliQ, e foram incubadas por mais 10 min a temperatura de 75°C.

Ao final deste processo, as amostras foram imediatamente resfriadas no gelo e foram acrescentados a cada uma 2,0µL do tampão de síntese (Buffer Superscript 5X), 1,0µL de DTT 0,1M, 0,5µL de RNaseOUT, 3,5µL de água MilliQ e 1,0µL de transcriptase reversa (SuperScript III, 200U/µL). As amostras foram levemente homogeneizadas e incubadas por 5 min a temperatura de 25°C, 120 min a 50°C e 15 min a 70°C. Após a transcrição reversa, o cDNA obtido passou por um tratamento com 1U de RNase H a 37°C por 30 min e 72°C por 10 min para eliminar eventuais híbridos formados. Foi, em seguida, diluído em TE e armazenado a -20°C para subsequente análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (QT-PCR).

6. Quantificação do número de cópias de DNAm

6.1 Absoluta

Plasmídeos contendo sequências-alvo clonadas são comumente utilizadas como padrão em quantificações por PCR (Lee *et al.*, 2008; Nakamura *et al.*, 2007). A quantificação absoluta do conteúdo de DNAm da casuística foi realizada por QT-PCR através da criação de uma curva padrão de DNA plasmidial para cada placa analisada.

6.1.1 Clonagem do DNA mitocondrial

Para a amplificação de um fragmento de DNAm foram desenhados dois *primers* (5'-3'), F- CCTAGCCGTTTACTCAATCCT e R- TGATGGCTAGGG-TGACTTCAT, constituindo um produto de PCR de 116 pb. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se 100ng de DNA em tampão Tris-HCl 10mM (pH 9,0), KCl 50mM, contendo 2mM de MgCl₂, mistura de dNTPs a 2,0mM, 10pmols de cada *primer* e 1 unidade de enzima Tth DNA polimerase (Biotools, Madri, Espanha), em volume final de 20μL.

As reações de PCR consistiram em: uma denaturação inicial de 94°C durante 5 min, seguida por 35 ciclos de denaturação a 94°C por 30s, anelamento a uma temperatura de 58°C por 30s e extensão a 72°C por 60s. Uma extensão final a 72°C por 10 min foi realizada. Cinco μL do produto de PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE para checar a eficiência da reação e o tamanho do produto esperado, utilizando-se padrão de tamanho molecular de DNA de 100pb (Invitrogen). Após a corrida, o gel foi corado em brometo de etídio e analisado com luz ultravioleta (ImageMaster-VDS, Pharmacia Biotech). A purificação do produto foi feita através da coluna GFX (GE Healthcare) e o inserto obtido foi introduzido no vetor pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, EUA), segundo instruções do fabricante.

O vetor foi transformado em bactéria *Escherichia coli DH5α* e os clones foram selecionados por ampicilina e expressão de galactosidase. Clones contendo plasmídeos com o inserto foram crescidos em meio líquido e os plasmídeos purificados com kit da Qiagen (Plasmid Midi Kit), quantificados e analisados por eletroforese em gel de agarose.

Para a obtenção da curva padrão do DNAm foram realizadas diluições seriadas do DNA plasmidial, e o cálculo do número de cópias foi realizado de acordo com o tamanho do plasmídeo. A massa de um único plasmídeo (m) é multiplicada pelo número de cópias de interesse (300.000 a 30) para se obter a massa de DNA plasmidial necessária (Tabela 4). m= (tamanho do

plasmideo com inserto pb) x (1 mol/ Número de Avogadro - $6,023 \times 10^{23}$) x (tamanho molecular médio de uma fita dupla de DNA- 660g/mol) logo, $m = (3116) \times (1,096 \times 10^{-21})$, $m = 3,4151 \times 10^{-18}$ (g). A equação obtida para análise dos cálculos foi $y = -1E-09x + 28,668$ e $R^2 = 0,767$.

Tabela 4 Cálculos para obtenção da curva padrão de DNA plasmidial.

(# Cópias de interesse)	m (g)	Massa DNA plasmidial		[] Final do DNA plasmidial (g/μL)
30.000.000.000	3,4151E-18	1,02E-07	/ 3 μL	3,42E-08
300.000.000		1,02E-09		3,42E-10
3.000.000		1,02E-11		3,42E-12
300.000		1,025E-12		3,415E-13
30000		1,025E-13		3,415E-14
3000		1,025E-14		3,415E-15
300		1,025E-15		3,415E-16
30		1,025E-16		3,415E-17

6.2 Relativa

O número de cópias relativo de DNAm_t foi analisado por QT-PCR utilizando-se DNA total extraído dos tecidos. Um gene de cópia única, hemoglobina beta (*HBB*), foi utilizado como referência (Kersting *et al.*, 2004) para o cálculo de $\Delta Ct1 = \text{média } Ct \text{ DNAm}_t - \text{média } Ct \text{ HBB}$ e relativamente pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, na qual $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct1 - \text{média } \Delta Ct \text{ dos tecidos não-tumorais}$ (Livak & Shmittgen, 2001). A Tabela 4 mostra a sequência e concentração dos *primers*, o tamanho dos produtos de PCR e as eficiências de amplificação do DNAm_t e *HBB*.

7. Quantificação do número de mitocôndrias

A análise para a contagem de organelas e volume mitocondriais foi feita através da leitura de eletromicrografias, utilizando sistemas testes (Gundersen & Jensen, 1987; Gundersen *et al.*, 1988) em colaboração e supervisão do Prof. Dr. Antônio Sesso, dessa instituição.

Foram avaliados casos de GBM apresentando diferenças significativas em relação ao número de cópias de DNA mitocondrial. As amostras de tecidos tumorais foram criocortadas e, em seguida, foi feita a seleção do fragmento, onde se encontrou mais de 80% de tecido tumoral e pouca ou nenhuma necrose por coloração em HE. Os fragmentos foram colocados em tubos de vidro e gradativamente descongelados, a fim de se preservar sua estrutura, saindo do nitrogênio líquido (-196°C), ficando por 24h no freezer (-80°C), 24h a -20°C e, após 2h no congelador da geladeira, foram fixados, adicionando-se 40mm³ de glutaraldeído 3% para cada 1mm³ do fragmento. Após a fixação, foram mantidos por mais 24h a 4°C, trocado o fixador, até serem cortados em fragmentos menores de no máximo 1mm.

O excesso de glutaraldeído foi retirado, e os fragmentos lavados com 1mL de PBS. Foram adicionados 500μL de ferrocianeto de potássio 3% e 500μL de tetróxido de ósmio 2%, mantidos por 1h45min com homogeneização a cada 15min. Após 2 lavagens com PBS, os fragmentos foram fixados com ósmio. O material foi lavado e adicionou-se acetato de uranila 1% por 1 hora. Depois, foram desidratados em alcoóis de concentrações crescentes, começando por 2 passagens de 10min em etanol 70%, 3 de 15min em etanol 95% e, em seguida, 4 de 15min em álcool absoluto. Foram feitas duas trocas em oxidopropileno por 15min, e, em seguida, partes iguais desta mistura e resina araldite foram adicionadas. Após 3h30min sob leve agitação, o material foi centrifugado, e deixado por mais 1h em resina pura a 40°C. Os fragmentos selecionados foram inclusos e deixados sob ação de calor a 60°C por 2 a 3 dias. Os blocos obtidos foram trimados. Cortes semifinos de 0,25μm foram realizados para seleção dos

melhores campos para posterior obtenção de cortes ultrafinos da ordem de $0,06\mu\text{m}$. Cada corte foi colocado sobre telas de cobre (200 “mesh”) para ser analisado e imagens foram capturadas em microscópio eletrônico (ZEISS, Axovision, Alemanha).

Segundo o teorema de Lesse, a fração de área (A_a) de um componente em um dado espaço que ocupa é, em média, igual à fração de volume (V_v) que o componente ocupa no mesmo espaço ($V_v=A_a$). Assim, a volumetria relativa por contagem de pontos serve para se estimar a fração de volume ocupada pelo conjunto de mitocôndrias. Os sistemas testes, impressos sobre transparência (anexo 4), são aplicados sobre as áreas a serem medidas, contando-se o número de pontos (+) que caem dentro dos perfis mitocondriais e o número de pontos totais sobre o citoplasma. Por convenção, conta-se a estrutura que estiver sob o ângulo superior direito da cruz diminuta. Não se deve usar número excessivo de pontos sobre poucas áreas seccionais que teriam pequena representatividade. O correto é aplicar o sistema teste com número adequado de pontos totais sobre várias áreas seccionais tomadas ao acaso.

A cada ponto do sistema teste pode-se associar uma certa área, que será o quociente da área total do sistema pelo número de pontos contados, levando-se em consideração o aumento final. Para calculá-lo, é necessário medir no filme o intervalo branco (27mm) e, na foto revelada, (Figura 16, delimitada em amarelo) o intervalo preto (85mm), que ficam na parte inferior, para se calcular a grandeza da ampliação ($85/27 = 3,14$). O aumento do filme é multiplicado por esta relação. Neste trabalho, a visão panorâmica utilizada foi de aumento 3,7K, logo, $1\mu\text{m}$ equivale a 11,6mm ($3,7 \times 3,14$), enquanto o aumento maior foi de 8,9K, equivalendo a 27,9mm. No sistema de pontos utilizado, há um quadrado cujo lado (l) foi medido em 25mm e contém dezesseis cruces (16+). Se $1\mu\text{m}$ equivale a 11,6mm, com lado 25mm, logo equivale a $2,15\mu\text{m}$; $l^2=4,62\mu\text{m}^2$ que corresponde a 16+, logo 1+ equivale a $0,29\mu\text{m}^2$. Aplicando-se a mesma metodologia para o aumento maior, 27,9mm equivale a $0,89\mu\text{m}$; $l^2=0,80\mu\text{m}^2$ e 1+, $0,05\mu\text{m}^2$. A Tabela 5 mostra a

área equivalente de cada ponto do sistema teste. A contagem foi realizada por dois observadores independentes.

Tabela 5 Equivalência de um ponto (+) em mm².

Conteúdo	Aumento	1µm-- mm	l (mm)	Área (mm ²)	1+--mm ²
Panorâmica	3,7K	11,6	2,15	4,62	0,29
Secções	8,9K	27,9	0,89	0,8	0,05

8. Análise de expressão por PCR em Tempo Real (QT-PCR)

Amostras de cDNA foram agrupados em uma casuística inicial de 10 casos de tecidos não-tumorais e 20 GBM para se analisar, preliminarmente, os genes selecionados por *microarray* neste estudo.

A seleção dos genes controles ou de referência endógena foi realizada segundo os critérios que incluem: níveis de expressão semelhantes em diferentes tipos celulares, ausência de comprometimento do gene com ciclo celular ou ativação celular e estabilidade comparável aos demais genes do estudo. Os dados quantitativos referentes à análise de expressão na casuística ampliada foram normalizados relativamente à média geométrica de três genes endógenos: hipoxantina fosforibosiltransferase (*HPRT*), glucuronidase beta (*GUSB*) e proteína reativa ATP-binding cassette da sub-família G, membro 2, (BCRP) (Vandesompele *et al.*, 2002; Kok *et al.*, 2005; Valente *et al.*, 2009).

Todos os ensaios foram feitos em duplicata em uma mistura de volume final 12µL, contendo 3µL de fita molde (cDNA, DNA plasmidial ou DNA), 6µL de Power SYBR Green I Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 3µL de par de *primer* em uma concentração de 200-600nM, previamente otimizados (Tabela 5). As condições de reação foram 10min de ativação da DNA polimerase a 95°C, 40 ciclos de 15s a 95°C e um minuto de pareamento e extensão a 60°C, seguido de um estágio de curva de dissociação, realizado em um aparelho ABI Prism 7500 (Applied

Biosystems). As reações foram repetidas quando os valores de Ct ultrapassaram um desvio padrão de 0,4.

Os *primers* para expressão gênica foram desenhados em exons diferentes para evitar amplificações de DNA genômico, e a formação de estrutura secundária, dímeros ou homologia com pseudogenes. A síntese foi realizada pela MWG (Biotech AG, Ebersberg, Alemanha) ou IDT (Coralville, IA, EUA) para amplificação de produtos de 80 a 140pb. A amplificação de produto único foi confirmada através da análise de suas curvas de dissociação. Os produtos de PCR foram também analisados por eletroforese em gel de agarose, corados com brometo de etídeo, para confirmação da amplificação do tamanho correto do produto. Para cada reação, foram testadas concentrações finais de *primers* mínimas que não prejudicassem a eficiência da reação. A eficiência de amplificação ($E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$) foi calculada utilizando-se diluições seriadas de cDNA ou DNA. A Figura 8 mostra uma das otimizações representativas, e, na Tabela 6, encontram-se as informações das sequências e concentrações dos *primers*, do tamanho dos produtos de PCR e das eficiências de amplificação.

A equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi aplicada no cálculo da expressão relativa gênica para $E = 100 \pm 10\%$, onde $\Delta Ct = \text{média Ct gene} - \text{média geométrica do Ct dos 3 normalizadores}$, e $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ tumor} - \text{média } \Delta Ct \text{ de tecidos não-tumorais}$ (Livak & Shmittgen, 2001). Para eficiências menores que 90%, os cálculos foram realizados segundo Pfaffi (2000). Os resultados são apresentados em escala logarítmica de base 10 para melhor visualização.

FIGURA 8 OTIMIZAÇÃO DOS *PRIMERS* DO GENE DA PIRUVATO KINASE (*PKM2*) POR PCR EM TEMPO REAL. A curva de amplificação das diferentes concentrações testadas mostra um pico único na curva de dissociação, confirmado por eletroforese de gel de agarose. P: Padrão de tamanho molecular. Produtos únicos 1: *PFKP* 119pb, 2: *PKM2* 108pb; 3: *LDHA* 153pb; 4: *LDHB* 132pb e 5: *PDHX* 149pb.

Tabela 6 Sequências e concentrações dos pares de *primers* para PCR em tempo real, tamanho dos produtos e eficiências de amplificação.

	GENES	Primers	Produto	[]	Eficiência
		Direito 5'-3' (F) Reverso 5'-3' (R)	(pb)	(nM)	
Normalizadores	<i>HPRT</i>	F- TGA GGATTGGAAAGGGTGT R- GAGCACACAGAGGGCTTACAA	118	200	100%
	<i>GUSB</i>	F - GAAAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT R-CCGAGTGAAGATCCOCTTTTAA	101	400	98%
	<i>BCRP</i>	F- OCTTOGACGTCAATAACAAGGAT R- OCTGOGATGGOGTTTAC	96	400	97%
Glicólise	<i>PFKP</i>	F- AACCTGTGGCAGAGCTGAAGA R- CGTCATAGCTGGCCTTGTACTTG	119	200	106%
	<i>ALDOC</i>	F- CCAGCTGTCCAGGAGTGTA R- GCAGOGTTGATGGCATT	83	400	99%
	<i>GAPDH</i>	F- AOCCTCTCTCCACCTTTGA R- CTGTTGCTGTAGCCAAATTOGT	102	400	97%
	<i>PKM2</i>	F- TGGGCTTATTTCTCTCCAGGTG R- AGOCCAGGAAGGTTTACA	108	200	101%
	<i>LDHA</i>	F- CTCTGAAGACTCTGCACCCAGAT R- CTGCCAAATCTGCTACAGAGAGTC	153	200	84%
	<i>LDHB</i>	F- GCACAGTTGCGGAAGAAGA R- GAGCAAGTTTCATCAGCCAGAGA	132	200	90%
	<i>PDHX</i>	F- CTA CTGCTGACTGTGACCTTGGAG R- TCATCCAGCTTACATTACATCT	149	200	101%
CAT	<i>ACO1</i>	F- GOGTGGTCACTACTACCTACAAGA R- AGGTTCAAGTAAAGGCCOACTT	122	400	97%
	<i>OGDH</i>	F- CAGTCTCAOCCACTAGGATAGGAAC R- CTAAGGCTCAGGCTCAAGATGAAG	118	400	93%
	<i>SDHA</i>	F- CGCTCTACTGATGAGACAAGATG R- GCAGAAGCGTATGAAGACAGTTATGA	113	400	73%
	<i>MDH2</i>	F- GCATOGGCAAAGTCTCTCTCT R- GCTCACTTCAGGGTCTTCAOG	109	400	92%
FOX	<i>NDUFS5</i>	F- AGAGAAGAGTCAAGGGCAGCA R- ATCTTGTAGGGCTGTTCAOCCACTC	120	200	86%
	<i>COX5B</i>	F- AAGGGAGCTTCAGGCACCA R- ACGCTGGTATTGTCTCTTTCACA	98	400	86%
	<i>ATP5C1</i>	F- CAAAATATGCOOGAGCTGAGA R- CTGAGGACACACCAATAAGGAGGT	135	400	87%
REPLICAÇÃO DNAm	<i>TFAM</i>	F- CTCOOCTTCAGTTTGTGT R- GCATOGGGTTCTGAGCTTT	135	200	83%
	<i>TFB1M</i>	F- ATGGCTCAGTACCTCTGCAATG R- TGGGCTGTATCAAGGGAGTGA	115	400	91%
	<i>TFB2M</i>	F- ATCCCGGAAATCCAGACTTGT R- GAOCAGGCTCATGTGCA	88	400	98%
	<i>POLG</i>	F- AGAGTTTATGACCAGCCGTGTGA R- CAAACTCTTCAAACAGCCACTTCA	101	400	96%
DNA genômico	<i>DNAm</i>	F- OCTAGCCGTTTACTCAATCCT R- TGATGGCTAGGGTGACTTCAT	116	400	108%
	<i>HBB</i>	F- GTG AAG GCT CAT GGC AAG A R- AGC TCA CTC AGT GTG GCA AAG	94	600	91%

9. Análise estatística

A análise da variância dos diferentes grupos mostrou que GBM não possui uma distribuição normal e portanto os testes estatísticos utilizados foram não-paramétricos, Mann-Whitney para dois grupos, Kruskal-Wallis para 3 ou mais grupos e Dunn para comparações múltiplas. As correlações entre o número de cópias relativo de DNAm e os valores de expressão relativa dos genes envolvidos na replicação foram realizadas através da correlação de Spearman. As curvas de sobrevida Kaplan Meier foram analisadas utilizando o teste *log rank (mantel cox)*, excluindo-se 6 casos de recidivas de GBM da casuística total. A análise multivariada foi realizada utilizando modelos de riscos proporcionais de *Cox*.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Os cálculos foram efetuados pelo programa de estatística SPSS versão 15.0 (SPSS, Chicago, IL) e os gráficos foram confeccionados no Graphpad versão 5.1 (www.graphpad.com).

RESULTADOS

1. Seleção dos genes através dos dados prévios de *microarray*

Os dados de fluorescência normalizados de *microarrays* de GBMs (3 amostras) e de tecido cerebral não tumoral controle (1 *pool* de 3 amostras) foram analisados pela razão das médias dos valores de GBMs pelo controle (T/N). Foram analisados genes que codificam enzimas da via glicolítica, do CAT e de codificação nuclear dos complexos da FOX (Anexo 5).

As razões T/N obtidas dos genes de enzimas da via glicolítica e do CAT estão apresentadas nas Figuras 9 e 10, respectivamente. Pode-se observar uma expressão relativa aumentada dos genes que codificam as enzimas envolvidas nas reações da glicólise e do CAT, exceto pela expressão relativa da frutosebifosfatoaldolase (*ALDOC*), triosefosfoisomerase (*TPI1*), subunidade E1 do complexo piruvato desidrogenase (*PDHA1*, *PDHA2* e *PDHB*), da aconitase 2 (*ACO2*), da isocitrato desidrogenase 3G (*IDH3G*), da α -cetoglutarato desidrogenase (*OGDH*) e da succinato desidrogenase A (*SDHA*), que estão abaixo ou próximos de 1, denotando uma expressão no GBM menor ou similar no tecido cerebral não tumoral. Dentre os genes mais expressos em GBM em relação ao tecido cerebral não tumoral da via glicolítica, incluem-se o gliceroaldeído-3-fosfodesidrogenase (*GAPDH*) e um dos genes da piruvato desidrogenase (*PDHX*), com valores de 49,6 e 18,89, respectivamente. Na via do citrato enumeram-se um dos genes da succinil-CoA sintetase (*SUCLG1*) e o da malato desidrogenase (*MDH2*) com hiperexpressão da ordem de 11 vezes no tumor em relação ao normal. Os *check points* de cada via foram selecionados pela importância na regulação alostérica, tal como a fosfofrutoquinase (*PFKP*), a piruvato quinase (*PKM2*), *OGDH* e *SDHA*, ou por inibição de acúmulo de seu substrato pela citrato sintase (CS). O desvio da glicólise anaeróbica foi analisado através da lactato desidrogenase A e B (*LDHA* e *LDHB*). Em contraste, a grande maioria dos genes da cadeia

respiratória estava próximo de 1, denotando uma baixa expressão destes genes nos GBMs analisados, como pode ser verificado na Tabela 7.

FIGURA 9: ESQUEMA DA GLICÓLISE, ENZIMAS ENVOLVIDAS E EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES. A razão T/N dos genes codificadores das enzimas (em vermelho) da via glicolítica encontra-se entre parênteses.

FIGURA 10: ESQUEMA DO CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO, ENZIMAS ENVOLVIDAS E EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES. A razão T/N dos genes codificadores das enzimas (em vermelho) do ciclo de Krebs encontra-se entre parênteses.

Os genes selecionados no presente estudo para análise por QT-PCR são apresentados na Tabela 8.

Tabela 7 SUBUNIDADES DOS COMPLEXOS DA FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA E EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES.

Complexo I - NADH ubiquinona oxidoreductase									
<i>NDUFA1</i>	<i>NDUFA2</i>	<i>NDUFA3</i>	<i>NDUFA4</i>	<i>NDUFA5</i>	<i>NDUFA6</i>	<i>NDUFA7</i>	<i>NDUFA8</i>	<i>NDUFA9</i>	<i>NDUFA10</i>
0,86	1,73	0,8	0,54	0,25	0,62	1,93	1,3	*	1,29
<i>NDUFA11</i>	<i>NDUFAF1</i>	<i>NDUFAB1</i>	<i>NDUFB1</i>	<i>NDUFB2</i>	<i>NDUFB3</i>	<i>NDUFB5</i>	<i>NDUFB6</i>	<i>NDUFB8</i>	<i>NDUFB9</i>
1,58	1,23	1,53	0,37	0,56	1,23	5,1	1,15	0,72	1,38
<i>NDUFB10</i>	<i>NDUFC1</i>	<i>NDUFC2</i>	<i>NDUFS1</i>	<i>NDUFS2</i>	<i>NDUFS3</i>	<i>NDUFS4</i>	<i>NDUFS5</i>	<i>NDUFS6</i>	<i>NDUFS7</i>
0,58	1,37	6,95	1,53	2,59	4,09	2,2	0,84	1,61	1,12
<i>NDUFS8</i>	<i>NDUFV1</i>	<i>NDUFV2</i>	<i>NDUFV3</i>						
2,19	4,29	5,15	0,66						
Complexo II- Succinato ubiquinona oxidoreductase									
<i>SDHA</i>	<i>SDHB</i>	<i>SDHC</i>	<i>SDHD</i>						
0,75	0,95	1,72	9,4						
Complexo III - Ubiquinol-ferricitocromo c oxidoreductase (cit b)									
<i>CYTB</i>	<i>UQCRC2</i>	<i>UQCRB</i>	<i>UQCRH</i>	<i>UQCRFS1</i>	<i>UQCR</i>	<i>HSPCO51</i>			
5,7	1,39	0,68	0,99	1,95	1,22	1,49			
Complexo IV- Citocromo c oxidoreductase (COX)									
<i>COX4L2</i>	<i>COX5A</i>	<i>COX5B</i>	<i>COX6A1</i>	<i>COX6A2</i>	<i>COX6B</i>	<i>COX6C</i>	<i>COX7B</i>	<i>COX7C</i>	<i>COX8C</i>
1,82	0,89	1,09	2,92	0,37	0,74	0,47	0,95	0,64	1,16
Complexo V- ATPsintase									
<i>ATP5B</i>	<i>ATP5C1</i>	<i>ATP5D</i>	<i>ATP5E</i>	<i>ATPF1</i>	<i>ATP5G1</i>	<i>ATP5H</i>			
4,35	1,42	2,01	2,06	3,46	2,66	1,99			
<i>ATP5I</i>	<i>ATP5J</i>	<i>ATP5L</i>	<i>ATP5O</i>	<i>ATP5S</i>	<i>ATPAF1</i>	<i>ATPAF2</i>			
0,64	1,28	1,45	1,77	1,78	3,64	9,86			

T/N: relação das médias dos valores de expressão de GBMs dos genes nucleares codificadores das enzimas participantes dos complexos I-V da cadeia respiratória sobre o valor do *pool* de normal, segundo dados de *microarray*.

Tabela 8 Enzima, gene codificador e expressão relativa em GBMs dos genes selecionados da via glicolítica, ciclo dos ácidos tricarboxílicos e fosforilação oxidativa.

VIA	NOME	GENE	T/N
GLICÓLISE	Fosfofrutoquinase	<i>PFKP</i>	2,85
	Frutosebifosfatoaldolase C ou Aldolase C	<i>ALDOC</i>	0,18
	Gliceraldeído-3-P-desidrogenase	<i>GAPDH</i>	49,60
	Piruvato quinase	<i>PKM2</i>	2,82
	Lactato desidrogenase A	<i>LDHA</i>	8,36
	Lactato desidrogenase B	<i>LDHB</i>	5,69
	Piruvato desidrogenase	<i>PDHX</i>	18,89
CAT	Aconitase 1	<i>ACO1</i>	1,52
	α -Cetoglutarato desidrogenase	<i>OGDH</i>	1,04
	Succinato desidrogenase	<i>SDHA</i>	0,75
	Malato desidrogenase	<i>MDH2</i>	11,63
FOX	NADH desidrogenase ubiquinona (Fe-S) proteína 5	<i>NDUFS5</i>	0,84
	Citocromo c oxidase subunidade Vb	<i>COX5B</i>	1,09
	ATP sintase, complexo mitocondrial F1, polipeptídeo gamma 1	<i>ATP5C1</i>	1,42

T/N: relação das médias dos valores de expressão de GBMs sobre o valor do *pool* de normal, segundo dados de *microarray*.

2. Validação dos genes implicados na via metabólica energética

A expressão dos genes selecionados foi analisada em 20 amostras de GBM e 10 amostras de tecido cerebral não tumoral.

Os níveis de expressão dos genes *ALDOC*, *LDHB*, *ACO1*, *OGDH*, *SDHA* e todos da oxidação fosforilativa confirmaram sua baixa ou pouca expressão em GBMs em relação aos tecidos controles, enquanto *PFKP*, *GAPDH*, *PKM2*, *LDHA* e *MDH2* apresentaram-se hiperexpressos em GBMs (Figuras 11, 12 e 13). Somente a baixa expressão relativa de *PDHX* em GBMs que não validou os dados preliminares de *microarray*.

Os resultados das fluorescências de cada amostra de GBM, *pool* de tecido cerebral não tumoral e a razão dessas medidas dos genes citados na glicólise, CAT e FOX encontram-se no Anexo 5.

FIGURA 11: EXPRESSÃO RELATIVA DE GENES IMPLICADOS NA VIA GLICOLÍTICA. 20 amostras de GBM e 10 de tecidos cerebrais não-tumorais (NT) foram analisadas por PCR em tempo real. A normalização foi realizada com a média geométrica de *HPRT*, *GUSB* e *BCRP*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

FIGURA 12 EXPRESSÃO RELATIVA DE GENES IMPLICADOS NO CAT. 20 amostras de GBM e 10 de tecidos cerebrais não-tumorais (NT) foram analisadas por PCR em tempo real. A normalização foi realizada com a média geométrica de *HPRT*, *GUSB* e *BCRP*. Valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

FIGURA 13 EXPRESSÃO RELATIVA DE GENES DA FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA. 20 amostras de GBM e 10 de tecidos cerebrais não-tumorais (NT) foram analisadas por PCR em tempo real. A normalização foi realizada com a média geométrica de *HPRT*, *GUSB* e *BCRP*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. Análise do número de cópias de DNAm

O número de cópias do DNAm foi analisado em amostras de astrocitomas de diferentes graus de malignidade e em tecido cerebral não tumoral. Foi observado que o número de cópias do DNAm em astrocitomas, comparado ao tecido cerebral não-tumoral, apresentou uma diminuição significativa em paralelo com o aumento do grau de malignidade. Foram realizados dois tipos de análise; tanto na análise normalizada pelo gene *HBB* (Figura 14A) quanto na realizada pelo delta Ct (Figura 14B), o GBM foi o que apresentou menor número de cópias do DNAm. A Tabela 9 apresenta os valores das médias e medianas de ambas as análises. Os resultados de doze casos de astrocitoma grau II (GII), dez de astrocitoma grau III (GIII) e 49 de glioblastoma (GBM) foram previamente obtidos no laboratório e apresentados na tese de Huang (2005).

FIGURA 14 NÚMERO DE CÓPIAS DE DNA MITOCONDRIAL EM ASTROCITOMAS DE DIFERENTES GRAUS DE MALIGNIDADE E TECIDO CEREBRAL NÃO TUMORAL. **A-** Análise relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). **B-** Análise do ΔCt . são apresentados abaixo de cada subgrupo. NT: não tumoral; GI: astrocitoma grau I; GII: astrocitoma grau II; GIII: astrocitoma grau III; GBM: glioblastoma. T/NT: A razão dos valores médios do número de cópias de DNAm dos tumores e do tecido cerebral não tumoral. Comparações entre o grupo NT e os diferentes graus de astrocitomas são estatisticamente significativas. *** $p < 0,0003$; ** $p < 0,006$; * $p < 0,03$.

Tabela 9 Valores de média e mediana do número de cópias relativo de DNAm_t nos astrocitomas de diferentes graus de malignidade e tecido cerebral não-tumoral.

A) $2^{-\Delta\Delta Ct}$	NT	GI	GII	GIII	GBM
Média	1,28	0,26	0,45	0,42	0,17
Mediana	1,26	0,16	0,33	0,35	0,12
B) ΔCt					
Média	11,55	8,57	9,99	8,99	8,47
Mediana	11,9	8,89	9,97	10,03	8,43

NT: não tumoral; GI: astrocitoma grau I; GII: astrocitoma grau II; GIII: astrocitoma grau III; GBM: glioblastoma.

Observou-se, em astrocitomas grau III, duas populações diferentes com médias de número de cópias relativas distintas (0,66 e 0,03, respectivamente). O primeiro grupo com onze pacientes – com idade média de 35 anos, 79 meses de sobrevida e 36,3% de evolução para óbito (4/11) – não apresentou diferença estatística quando comparados com o segundo grupo, formado por sete pacientes de idade média 34 anos, 80 meses de sobrevida e 28,5% de óbitos (2/7) ($p=0,946$).

Considerando o aspecto histológico e a presença de células tumorais multinucleadas típicas de GBM, o resultado da quantificação relativa do número de cópias de DNAm_t realizado através do gene da hemoglobina beta de cópia única pode estar superestimado. Por este motivo, o conteúdo de DNAm_t também foi analisado através da quantificação absoluta.

A depleção de DNAm_t encontrada nos casos de GBM foi confirmada parcialmente pela quantificação absoluta com 18 pacientes com número de cópias do DNAm_t abaixo da média (Figura 15B), apesar da diferença das médias das amostras de GBMs e de tecidos cerebrais não tumorais não ser estatisticamente significativa ($p=0,90$).

FIGURA 15 ANÁLISES DA QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DE DNA MITOCONDRIAL. A e B: quantificação absoluta; C e D: quantificação relativa pelos valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$; E e F: quantificação relativa pelos valores de ΔC_t . *** $p < 0,0001$.

4. Morfometria mitocondrial

Para verificar se a depleção do número de cópias de DNAm_t foi devido a uma quantidade reduzida de mitocôndrias nas células – já que seu número varia de acordo com o tecido – foi realizada a contagem de organelas, áreas mitocondriais e citoplasmáticas e volume mitocondriais.

Dois casos de GBM, com número de cópias de DNAm_t relativo apresentando diferenças da ordem de 6 vezes, foram selecionados GBM 642 – com diagnóstico aos 42 anos, do sexo masculino, grau de ressecção maior que 90%, sobrevida de 17 meses e número de cópias relativo de 0,06 – e GBM 875, com diagnóstico aos 35 anos, do sexo masculino, grau de ressecção maior que 90%, sobrevida de 5 meses e número de cópias relativo de 0,4.

As eletromicrografias de dois campos representativos de cada caso podem ser visualizadas, respectivamente, nas Figuras 16 e 17.

A morfometria mitocondrial não apresentou diferença estatística significativa em relação ao número de organelas ($p=0,846$), área mitocondrial ($p=0,309$) e área citoplasmática ($p=0,309$), bem como à fração de volume ($p=0,240$) nos casos analisados com aumento 8,9K. Os resultados encontram-se na Tabela 10 e Figura 18.

FIGURA 16 ELETROMICROGRAFIAS DO CASO GBM 642. Amarelo: aumento 3,7K (panorâmica), N=109 e N=107, respectivamente. Vermelho: aumento 8,9K; N=32 e N=33, respectivamente). Pontos vermelhos mostram mitocôndrias características incluídas na contagem.

FIGURA 17 ELETROMICROGRAFIAS DO CASO GBM 875. Amarelo: aumento 3,7K (panorâmica), N=123 e N=106, respectivamente. Vermelho: aumento 8,9K; N=40 e N 45, respectivamente). Pontos vermelhos mostram mitocôndrias características incluídas na contagem.

Tabela 10 Morfometria mitocondrial de dois casos de GBM.

			Mitocôndria		Citoplasma		Fração de Vol (%)
			Nº (+)	Área (mm ²)	Nº (+)	Área (mm ²)	
	Aumento	Nº					
GBM 642	3,7 K	109	98	28,4	912	264,5	11
		107	94	27,3	814	236,1	12
	total	216	192	55,7	1726	500,5	22
	média	108	96	28	863	250	11
	DP	1	3	1	69	20	1
	8,9 K	47	86	4,3	481	24,1	18
		31	77	3,9	920	46,0	8
		28	71	3,6	1011	50,6	7
		32	99	5,0	1003	50,2	10
		24	50	2,5	632	31,6	8
		33	108	5,4	1014	50,7	11
	total	195	491	24,6	5061	253,1	62
	média	33	82	4	844	42	10
	DP	8	21	1	230	12	4
GBM 875	3,7 K	123	61	18	640	186	10
		106	70	20	815	236	9
	total	229	131	38,0	1455	422,0	18
	média	115	66	19	728	211	9
	DP	12	6	2	124	36	1
	8,9 K	40	91	4,6	654	32,7	14
		39	55	2,8	746	37,3	7
		14	12	0,6	380	19,0	3
		45	47	2,4	734	36,7	6
		52	130	6,5	998	49,9	13
		14	31	1,6	649	32,5	5
	total	204	366	18	4161	208	49
	média	34	61	3	694	35	8
	DP	16	43	2	199	10	4

Área: calculada ao multiplicar o nº de pontos (+) por quanto representa o mm² (0,29 para 3,7K ou 0,05 para 8,9K). Fração de volume: quociente da área mitocondrial e área citoplasmática multiplicado por 100. DP: desvio padrão.

FIGURA 18 ANÁLISE DA MORFOMETRIA MITOCONDRIAL COMPARADA AO NÚMERO DE CÓPIAS DE DNA MITOCONDRIAL. Número de cópias de DNAm: $p=0,008$; número de organelas $p=0,846$; área citoplasmática: $p=0,309$; área mitocondrial: $p=0,309$ e fração de volume: $p=0,240$.

5. Expressão relativa dos fatores de transcrição e polimerase mitocondriais

Os genes do fator de transcrição mitocondrial A (*TFAM*), B1 (*TFB1M*) e B2 (*TFB2M*) e a subunidade- γ catalítica da DNAm polimerase (*POLG*) são alguns dos genes codificados no núcleo implicados na variação do conteúdo genético mitocondrial. A expressão relativa em GBMs também foi analisada previamente nos dados de *microarray* (Tabela 11).

Tabela 11 Expressão relativa de *TFAM*, *TFB1M*, *TFB2M* e *POLG* em GBM.

	NOME	GENE	T/N
REPLICAÇÃO DO DNAm	Fator de transcrição mitocondrial A	<i>TFAM</i>	0,05
	Fator de transcrição mitocondrial B1	<i>TFB1M</i>	0,88
	Fator de transcrição mitocondrial B2	<i>TFB2M</i>	3,09
	DNAm Polimerase gamma	<i>POLG</i>	1,5

T/N: relação das médias dos valores de expressão de GBMs sobre o valor do *pool* de normal, segundo dados de *microarray*.

A análise nos casos de astrocitomas e tecidos cerebrais não tumorais mostrou um aumento discreto dos níveis de expressão relativa desses reguladores-chave na replicação do DNAm nos astrocitomas, com exceção de *TFB2M* no astrocitoma baixo grau (Figura 19).

A média, mediana e a razão dos valores médios de expressão relativa tumoral e tecido cerebral não neoplásico são mostradas na Tabela 12.

FIGURA 19 EXPRESSÃO RELATIVA DE *TFAM*, *POLG*, *TFB1M* e *TFB2M* EM DIFERENTES GRAUS DE MALIGNIDADE E TECIDO CEREBRAL NÃO TUMORAL. NT: não tumoral; GI: astrocitoma grau I; GII: astrocitoma grau II; GIII: astrocitoma grau III; GBM: glioblastoma. T/NT: A razão dos valores médios de expressão relativa dos tumores e do tecido cerebral não tumoral. Comparações entre os grupos estatisticamente significativas foram: *** $p < 0,0006$; ** $p < 0,007$; * $p < 0,045$.

Tabela 12 Valores de média, mediana das expressões relativas dos genes *TFAM*, *TFB1M*, *TFB2M* e *POLG* em astrocitomas de diferentes graus de malignidade e tecido cerebral não tumoral.

	NT		Astrocitomas							
	M	Med	Grau I		Grau II		Grau III		GBM	
			M	Med	M	Med	M	Med	M	Med
<i>TFAM</i>	1,04	1,03	2,33	2,15	1,92	1,63	2,31	1,99	1,68	1,39
<i>TFB1M</i>	1,09	1,03	1,90	2,06	1,22	1,14	1,89	1,86	2,21	1,8
<i>TFB2M</i>	1,12	1,06	1,48	1,41	1,01	0,92	2,03	1,73	1,97	1,48
<i>POLG</i>	1,03	0,87	1,62	1,39	1,85	1,56	2,49	2,18	2,86	2,29

(M) Média; (Med) Mediana; NT: tecido cerebral não tumoral; GBM: glioblastoma.

Foi realizada uma análise de correlação do número de cópias relativo de DNAm ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) com os resultados de expressão relativa dos genes envolvidos na replicação e transcrição mitocondriais.

Os níveis de expressão relativa de *TFAM* se correlacionaram diretamente com os de *TFB1M* nos astrocitomas graus II ($p < 0,0001$ e $R = 0,774$) e III ($p = 0,025$ e $R = 0,525$). A correlação direta de *TFB2M* com *TFAM* ($p = 0,007$ e $R = 0,514$, $p = 0,011$ e $R = 0,583$ e $p = 0,0003$ e $R = 0,399$ para os astrocitomas grau II, grau III e GBM, respectivamente) e *TFB1M* ($p = 0,004$ e $R = 0,545$, $p = 0,007$ e $R = 0,608$ e $p = 0,028$ e $R = 0,247$ para os astrocitomas grau II, grau III e GBM, respectivamente) foram estatisticamente significativas nos astrocitomas difusamente infiltrativos. Entretanto, apenas os valores de expressão relativa de *POLG* apresentaram relação indireta quando comparados com os valores do número de cópias relativo de DNAm ($p = 0,015$ e $R = -0,564$) (Tabela 13).

Tabela 13 CORRELAÇÃO DE SPERMAN DOS VALORES DE EXPRESSÃO RELATIVA EM ASTROCITOMAS DOS GENES *TFAM*, *TFB1M*, *TFB2M*, *POLG* E NÚMERO DE CÓPIAS DO DNAm.

			<i>TFB1M</i>	<i>TFB2M</i>	<i>POLG</i>	Nº de Cópias DNAm
AGI	<i>TFAM</i>	<i>R</i>	0,282	0,192	0,122	0,046
		<i>p</i>	0,193	0,381	0,581	0,855
	<i>TFB1M</i>	<i>R</i>	-	0,340	0,168	0,238
		<i>p</i>	-	0,113	0,444	0,341
	<i>TFB2M</i>	<i>R</i>		-	0,296	0,253
		<i>p</i>		-	0,170	0,311
	<i>POLG</i>	<i>R</i>			-	0,282
		<i>p</i>			-	0,257
AGII	<i>TFAM</i>	<i>R</i>	0.774	0.514	-0.121	-0.003
		<i>p</i>	<0.0001	0.007	0.557	0.987
	<i>TFB1M</i>	<i>R</i>	-	0.545	-0.302	-0.015
		<i>p</i>	-	0.004	0.134	0.945
	<i>TFB2M</i>	<i>R</i>		-	-0.243	0.103
		<i>p</i>		-	0.231	0.630
	<i>POLG</i>	<i>R</i>			-	0.165
		<i>p</i>			-	0.440
AGIII	<i>TFAM</i>	<i>R</i>	0.525	0.583	-0.034	-0.065
		<i>p</i>	0.025	0.011	0.893	0.798
	<i>TFB1M</i>	<i>R</i>	-	0.608	0.269	-0.317
		<i>p</i>	-	0.007	0.280	0.200
	<i>TFB2M</i>	<i>R</i>		-	0.406	-0.350
		<i>p</i>		-	0.095	0.155
	<i>POLG</i>	<i>R</i>			-	-0.564
		<i>p</i>			-	0.015
GBM	<i>TFAM</i>	<i>R</i>	-0.030	0.399	0.012	0.106
		<i>p</i>	0.791	0.0003	0.915	0.370
	<i>TFB1M</i>	<i>R</i>	-	0.247	0.162	-0.055
		<i>p</i>	-	0.028	0.153	0.640
	<i>TFB2M</i>	<i>R</i>		-	-0.143	0.015
		<i>p</i>		-	0.208	0.902
	<i>POLG</i>	<i>R</i>			-	0.018
		<i>p</i>			-	0.881

R (coeficiente de correlação)

6. Análise da sobrevida global

A casuística total de 78 pacientes com GBM teve uma média de idade de 52 anos e uma média de sobrevida de 12 meses. Foi utilizada a mediana de expressão relativa das amostras de GBM dos genes *TFAM* (1,4), *TFB1M* (1,8), *TFB2M* (1,5), *POLG* (2,3) e do número de cópias de DNAm (0,12) para dividir os grupos para análise de sobrevida (curva de Kaplan-Meier). Não houve diferença na sobrevida em todos os genes analisados, com valores de p respectivamente, 0,107, 0,451, 0,944, 0,213 e 0,486 (Anexo 6).

As curvas de sobrevida entre os 25 pacientes com maior expressão e os 25 com menor expressão relativa dos genes foram analisadas entre *TFAM* ($p=0,016$), *TFB1M* ($p=0,342$), *TFB2M* ($p=0,753$), *POLG* ($p=0,012$) e número de cópias de DNAm ($p=0,105$), sendo visualizados na Figura 20.

A análise da sobrevida dos casos com GBM também foi avaliada em relação à idade e ao sexo, sem efeito no prognóstico dos pacientes ($p=0,341$ e $p=0,579$, respectivamente) (Anexo 7).

Para se evitar o efeito cumulativo nas alterações mitocondriais devido ao processo de senescência, foi analisada a sobrevida dos pacientes em relação à mediana da expressão relativa dos fatores de transcrição mitocondriais, *POLG* e do número de cópias relativo de DNAm no grupo de pacientes com GBM com idade ao diagnóstico igual ou abaixo de 50 anos (média de idade de 38 anos). Não houve diferença nas curvas de sobrevida. Os valores de p não foram significativos para *TFAM* (0,416), *TFB1M* (0,687), *TFB2M* (0,995), *POLG* (0,313) e o número de cópias de DNAm com $p=0,985$ (Anexo 8).

FIGURA 20 SOBREVIDA DE PACIENTES COM GBM EM RELAÇÃO À EXPRESSÃO RELATIVA DE *TFAM*, *POLG*, *TFB1M*, *TFB2M* E NÚMERO DE CÓPIAS DE DNAm. 25 casos hiperexpressos e 25 hipoexpressos em relação a mediana foram utilizados para a análise.

Foram realizadas análises de sobrevida global em relação à coexpressão relativa de *TFAM* e *POLG* ($p=0,01$) (Figura 21), *TFAM* e *TFB1M* ($p=0,351$), *TFAM* e *TFB2M* ($p=0,441$), *POLG* e *TFB1M* ($p=0,466$), *POLG* e *TFB2M* ($p=0,443$), *TFB1M* e *TFB2M* ($p=0,289$) (Anexo 9), *TFAM* e DNAm ($p=0,374$), *POLG* e DNAm ($p=0,116$), *TFB1M* e DNAm ($p=0,487$) e *TFB2M* e DNAm ($p=0,347$) (Anexo 10).

FIGURA 21 SOBREVIDA DOS PACIENTES COM GBM EM RELAÇÃO À COEXPRESSÃO DE *TFAM* E *POLG*. Os dados de mediana da expressão relativa dos casos de GBM foram utilizados para separar os grupos de hiper e hipoexpressão dos genes.

A análise multivariada (modelo de regressão de Cox) mostra que pacientes com hipoexpressão de *TFAM* e hiperexpressão de *POLG*, e os com hiperexpressão de *TFAM* e hipoexpressão de *POLG*, possuem um risco de 3 e de 2,8 vezes, respectivamente, em relação aos casos com hiperexpressões de *TFAM* e *POLG*. Este fenômeno foi independente da idade e sexo ($p=0,537$, $p=0,565$, respectivamente) conforme mostrado na Tabela 14.

Tabela 14 Análise do risco relativo da coexpressão de *TFAM* e *POLG*.

<i>TFAM/POLG</i>	RR	<i>p</i>
hiper/hiper (ref)	1,00	0,010
hipo/hipo	1,79	0,099
hipo/hiper	3,00	0,002
hiper/hipo	2,85	0,004
Idade	1,00	0,537
Sexo	0,86	0,565

RR: risco relativo

Os pacientes com GBM foram divididos em três grupos em relação à sobrevida: até 12 meses (52 casos); de 12 até 24 meses (26 casos) e maior que 24 meses (9 casos). Observou-se que pacientes com sobrevida maior que 24 meses possuem níveis aumentados de expressão relativa de *TFAM* e concomitante menor depleção de número de cópias de DNAm quando comparados aos pacientes com sobrevida menor que 12 meses ($p=0,034$ e $p=0,049$, respectivamente). A Figura 22 mostra as médias do número de cópias relativo do DNAm e dos valores de expressão relativa de *TFAM* nestes grupos, bem como nos grupos de amostras não tumorais. Esta análise é válida tanto para a média quanto para a mediana dos grupos envolvidos (Tabela 15).

FIGURA 22 NÚMERO DE CÓPIAS DE DNA MITOCONDRIAL E EXPRESSÃO RELATIVA DE *TFAM* DE ACORDO COM O TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA DOS PACIENTES COM GBM. (m) meses, (NT) não-tumoral. Os valores mostram as médias dos grupos e as barras os desvios padrões. * $p < 0,09$; *** $p < 0,0006$.

Tabela 15 Valores de p entre os grupos tanto para a análise do número de cópias de DNAm como para a expressão relativa de *TFAM*.

Nº Cópias	NT	< 12m	12-24m	> 24m
DNAm	N=19	N=52	N=26	N=9
Média	1,28	0,16	0,18	0,27
Mediana	1,26	0,11	0,13	0,18
< 12m	<0,0001	-	0,128	0,049
12-24m	<0,0001	0,128	-	0,290
> 24m	0,0006	0,049	0,290	-
TFAM	NT	< 12m	12-24m	> 24m
Média	1,00	1,65	1,65	1,97
Mediana	0,93	1,29	1,42	1,75
< 12m	0,019	-	0,990	0,037
12-24m	0,090	0,990	-	0,034
> 24m	0,0003	0,037	0,034	-

DISCUSSÃO

Nos últimos anos, os avanços no tratamento de câncer tem sido modestos, embora investimentos significativos tenham sido empregados em pesquisas nesta área. Há trinta anos, a média de sobrevida de pacientes em estágios avançados tem sido por volta de 5 anos. No entanto, esse quadro muda quando existe a detecção antecipada de tumores quando estão confinados em órgãos, como é o caso dos de próstata, mama e cólon. A procura por bons marcadores que detectem antecipadamente a transformação maligna é a motivação do presente estudo. No intuito de se pesquisar alterações específicas mitocondriais associadas à tumorigênese, foi investigada a expressão de genes implicados no metabolismo energético, a quantificação do número de organelas e de cópias de DNAm, bem como dos genes envolvidos na replicação e transcrição mitocondriais em astrocitomas de diferentes graus de malignidade.

O efeito Warburg foi primeiramente descrito em 1920 como glicólise anaeróbica aumentada em tumores, mesmo na presença de oxigênio (Warburg *et al.*, 1924). Este fenômeno, sendo principal via de obtenção de ATP, é uma das alterações metabólicas fundamentais requeridas durante a transformação neoplásica. Embora a glicólise anaeróbica não seja o meio mais eficiente de gerar ATP por molécula de glicose, em termos de produção de energia, confere aos tumores uma vantagem no crescimento. Um mau funcionamento da mitocôndria e subsequente estímulo para utilização da glicose celular poderiam explicar os fundamentos de Warburg. Além disso, a resistência a drogas das células tumorais poderia ser também uma consequência das anormalidades nas mitocôndrias destas células. Um melhor entendimento nos mecanismos da glicólise aumentada e no silenciamento da atividade mitocondrial em células tumorais levou a um estudo dos genes implicados no metabolismo energético, bem como das alterações mitocondriais do presente trabalho.

Análise das vias metabólicas: glicólise, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa

Dentre os genes investigados da glicólise anaeróbica aumentada em tumores, a hexoquinase II (*HK2*), a fosfofrutoquinase (*PFKP*), a gliceroaldeído 3-fosfodesidrogenase (*GAPDH*), a piruvato quinase (*PKM2*) e a lactato desidrogenase A (*LDHA*) são comumente utilizados na caracterização do fenômeno observado por Warburg nos mais diversos tipos de câncer.

Os achados do aumento de expressão relativa de *PFKP*, *GAPDH*, *PKM2*, *LDHA*, concomitante com a hipoexpressão validada da frutosebifosfatoaldolase (*ALDOC*), parte do complexo da piruvato desidrogenase (*PDHX*) e *LDHB*, são discutidos abaixo acompanhados da visualização dos resultados obtidos na Figura 23.

A validação da expressão aumentada da *PFKP* foi confirmada pela razão da média dos 20 GBMs e 10 tecidos cerebrais não tumorais (20T/10N= 9,03). A hipoexpressão de *ALDOC* (T/N= 0,47), a princípio, inviabilizaria a continuação da via glicolítica, já que a formação do gliceroaldeído 3-fosfato, requerido para degradação subsequente, estaria comprometida. A verificação por *microarray* da elevada relação na análise da glicoquinase dependente de ADP (*ADPGK*) (T/N= 2,79) pode ocasionar um aumento da disponibilidade de glicose-6-fosfato (G6F), levando a um desvio da utilização da glicose para a via das pentoses. Uma evidência de que a glicose pode ser metabolizada por esta via foi através da análise do aumento significativo da taxa de G6F na utilização da via das pentoses, após indução por estresse oxidativo em comparação ao seu uso pela via glicolítica em células astrogiais (Wiesinger *et al.*, 1997). Além disso, inúmeros trabalhos tem demonstrado que tumores altamente malignos, que possuem pouca diferenciação e rápida proliferação celular – como é o caso de GBM –, exibem a capacidade de metabolizar glicose a lactato em altas taxas, dependentes de níveis elevados de hexoquinase (HK), como observado em hepatoma (Mathupala *et al.*, 2001). Quando há acúmulo de G6F, ocorre a dissociação da HK tipo II (ligada à membrana externa mitocondrial em condições normais), levando ao fechamento dos canais aniônicos dependentes de voltagem (VDAC) e ao consequente término da interação metabólico extra e intramitocondrial (glicólise e FOX) (Robey & Hay, 2006). O reaproveitamento de G6F pela via das pentoses, então, converte-a em ribose-5-fosfato, que, por sua vez, retorna à via glicolítica por ação de transaldolases, regenerando assim o gliceroaldeído 3-fosfato, substrato de GAPDH. O alto nível da fluorescência em GBMs medida por *microarray* do gene da transaldolase 1 (*TALDO1*) (T/N = 5,3), concomitante aos níveis aumentados de *GAPDH* (20T/10N = 5,6), sugere que o sentido da glicólise segue na formação do fosfoenolpiruvato (PEP), havendo um desvio de G6F pela via das pentoses, suportada também pelo aproveitamento de seu esqueleto carbônico para a síntese de nucleotídeos, requerida durante a rápida proliferação celular (Pelicano *et al.*, 2006; Heiden *et al.*, 2009).

A baixa expressão de *PDHX* (20T/10N=0,56), diferentemente da esperada pelos níveis detectáveis por *microarray*, pode refletir alterações no seu mecanismo de regulação complexo, que envolve outras duas proteínas: a piruvato desidrogenase quinase (PDK) e piruvato desidrogenase fosfatase (PDP) (Yeluri *et al.*, 2009).

Contudo, a hipoexpressão de *PDHX* em contrapartida à hiperexpressão de *PKM2* (20T/10N=2,18) e *LDHA* (20T/10N=13,93) indicam o desvio da glicólise para a formação do ácido láctico. A alta expressão dos níveis do oncogene c-Myc eleva a atividade de *LDHA* e reprograma o metabolismo energético através da adição de glutamina como combustível celular (Wise *et al.*, 2008). A importância da glutamina foi demonstrada em alguns trabalhos através de seu papel no metabolismo da glicose no rim e em outros tecidos. Há evidências de que em estado pós-absortivo seja uma importante precursora da glicose, ao adicionar seus esqueletos de carbono, aumentando, assim, as concentrações de glicose no sangue via gliconeogênese renal e hepática, o que corresponde a 50% de toda a glicose produzida na circulação em situações de jejum prolongado (Felipo & Butterworth, 2002; Graham *et al.*, 2002). A correlação entre a elevada concentração de lactato e o risco de metástase em câncer de cabeça e pescoço foi encontrada por Brizel *et al.* (2001). Além disto, Fantin e colaboradores (2006) demonstraram que a inibição da atividade da lactato desidrogenase confere uma menor habilidade das células tumorais de proliferarem sob hipoxia, um estímulo da atividade mitocondrial, sugerindo um papel chave desta enzima na manutenção do tumor.

Expressão dos genes relacionados ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos

A hipoexpressão do gene que codifica o componente X da piruvato desidrogenase (*PDHX*) altera diretamente a síntese de acetil-CoA, substrato da citrato sintetase (*CS*), podendo comprometer a primeira reação do CAT. A expressão aumentada da ordem de 7 vezes de *CS*, detectável por *microarray*, indica, no entanto, que há alguma compensação para a manutenção dos níveis de seus substratos na mitocôndria. A reprogramação do metabolismo intermediário para a glutaminólise, mediada por c-Myc, aumentou níveis captados de glutamina em células de glioma SF188, garantindo sua taxa de renovação; observou-se, ainda, associação à transformação carcinogênica (Wise *et al.*, 2008), e, mais ainda, que mitocôndrias presentes em tecidos malignos exportam citrato em grandes quantidades, que é um precursor essencial da biossíntese de ácidos graxos e esteróides (Szutowicz *et al.*, 1979). Esta via encontra-se aumentada em vários tipos de câncer (Ristow, 2006), sugerindo ainda uma ligação com o fenômeno observado por Warburg em leucemias (Samudio *et al.*, 2009). A validação dos níveis de expressão de *ACO1*, *OGDH* e *SDHA* (20T/10N= 1,25; 1,21 e 1,23, respectivamente) estão de acordo com os achados de Yarian e colaboradores (2006) em relação às alterações da atividade da aconitase que afeta a eficiência de renovação do CAT e pode aumentar a concentração de citrato e malato citoplasmáticos. Evidências de que o malato em excesso é exportado da mitocôndria, servindo de precursor para a regeneração do piruvato sob a ação do aumento da malicase, já foram descritas (LaNoue & Schoolwerth, 1979; Heiden *et al.*, 2009). A hiperexpressão validada de *MDH2* (20T/10N=2,03) pode indicar a reversão da atividade enzimática da malato desidrogenase no sentido da síntese de malato em detrimento do oxaloacetato. Dessa forma, nossos achados sinalizam alterações nos níveis de expressão gênica correspondentes ao remodelamento do ciclo do ácido cítrico, dando suporte ao metabolismo de biomassa (nucleotídeos, ácidos graxos e lipídeos) associado à rápida proliferação celular.

Expressão dos genes relacionados à fosforilação oxidativa

A atividade da FOX analisada por imunohistoquímica da subunidade catalítica H^+ ATP sintase mitocondrial, β -F1-ATPase, correlacionou-se inversamente com níveis de expressão de GAPDH e PKM detectados em tecido de carcinoma pulmonar, fato observado por López-Ríos e colaboradores (2007). Nossos resultados, que mostraram a hipoexpressão dos genes que codificam os constituintes da cadeia respiratória, *NDUFS5*, *COX5B* e *ATP5C* (20T/10N=0,89; 0,83; 0,69, respectivamente), sugerem o desacoplamento da FOX. Aliados aos dados discutidos previamente, corroboram o efeito Warburg, contribuindo com o fenótipo glicolítico e garantindo as necessidades energéticas deste tipo infiltrativo e agressivo de tumor, mesmo na presença de alterações significativas no metabolismo mitocondrial.

De fato, a disponibilidade de substratos e o estado energético modulam as ações mitocondriais, diferenciando-as na composição e conteúdo de todos os complexos oxidativos, na atividade e expressão de genes envolvidos na cadeia respiratória, no número de mitocôndrias, em sua ultraestrutura e no conteúdo de DNAm por meios ainda não esclarecidos totalmente.

Mitocôndria e câncer

Durante a evolução dos seres vivos na Terra, foi vantajosa a simbiose de bactérias a células primitivas, que geraram as eucariontes de hoje (Falkenberg *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2006). Uma hipótese levantada por Bucay (2007) – considerando que a mitocôndria não perdeu sua identidade mantendo seu formato, tamanho e muitas funções – é a da competição biológica existente entre a mitocôndria e a célula hospedeira primitiva. Para estabelecer sua dominação, criou um complexo metabólico que garante sua permanência definitiva dentro da célula, permitindo, assim, continuar com suas funções ‘bacterianas’. Mitocôndrias distribuem-se com maior frequência nos tecidos que demandam maior energia como coração, músculo, sistemas endócrino e renal (Wallace, 1999). Bucay ainda cita c-Myc como oncogene oriundo do DNAm e responsável pela regulação da proliferação celular no câncer, sendo a mitocôndria a ‘única’ beneficiada quando a célula se torna maligna. Interações competitivas entre células e células-tronco foram amplamente discutidas por Johnston (2009) como um mecanismo homeostático essencial no crescimento e tamanho de órgãos e tecidos. A identidade ganhadora ou perdedora adquirida por uma célula, sensível aos níveis de ribossomos funcionais regulados por Myc, é potencialmente relevante nos transplantes terapêuticos e na identificação de genes envolvidos na disputa entre células não-tumorais (perdedoras) e tumorais (ganhadoras).

Desta forma, os resultados obtidos nas análises realizadas nos dados de *microarray* e baseados na observação de nossos achados referentes ao metabolismo energético sugerem que a fosforilação oxidativa não é um recurso energético tumoral, e que tanto a glicólise aumentada quanto a glutaminólise supririam estes organismos simbiotes energeticamente e ainda suportariam o efeito Warburg no tumor. Assim, a análise do comprometimento desta organela no processo de malignização nos astrocitomas difusamente infiltrativos motivou a procura de presença de alterações mitocondriais.

Número de cópias do DNAm

Na etapa seguinte de verificação do número de cópias de DNAm por dois métodos (quantificação absoluta e relativa por técnicas de PCR em tempo real), foi observada uma redução do DNAm em astrocitomas, especialmente em GBM e com depleção crescente do conteúdo genômico mitocondrial em função do aumento do grau de malignidade. A quantificação absoluta através de uma curva padrão plasmidial proposta por Pogoziński e colaboradores (2003) confirmou a depleção do genoma mitocondrial em 72% dos casos pela análise quantitativa por PCR em tempo real em relação ao gene de cópia única, a hemoglobina beta (*HBB*). Esta verificação por dois métodos distintos tornou o nosso achado mais consistente, estando de acordo com os estudos em outros tipos tumorais como câncer renal (Selvanayagam & Rajaraman, 1996), hepatoma (Lee *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2004) e câncer gástrico (Wu *et al.*, 2005). Já a depleção do número de cópias de DNAm em paralelo com o grau de malignidade foi também observada em carcinoma ovariano (Wang *et al.*, 2006), com a progressão tumoral e prognóstico em câncer de mama (Yu *et al.*, 2007) e com o aumento de invasão (Amuthan *et al.*, 2001), particularmente em câncer renal (Simonnet *et al.*, 2002).

O fato de se encontrar duas populações com números de cópias distintos em astrocitomas anaplásicos, sem aparente correlação, pode ser explicado pelo desafio na classificação histológica entre tumores de caráter anaplásico, no que diz respeito à diferenciação entre os graus III e IV (OMS).

Número de organelas mitocondriais

A etapa seguinte consistiu em responder a questão remetente à possibilidade da depleção do DNAm não estar vinculada a redução do número de organelas. Relata-se que, em média, haja 400 mitocôndrias por

célula humana, ocupando um quarto de todo citoplasma celular (Kagan & Srivastava, 2005). Seu número também é determinado segundo a demanda energética. Hepatócitos, por exemplo, possuem centenas de mitocôndrias, enquanto eritrócitos, que não possuem núcleos, quase não as apresentam, obtendo ATP quase exclusivamente da glicólise anaeróbica. Embora McIntosh (2001) tenha considerado a microscopia eletrônica como limitante para esta finalidade, questionando a preservação da integridade dos tecidos durante seu descongelamento, não há outra ferramenta que permita a morfometria direta do número de mitocôndrias na célula. Desta forma, procedeu-se à contagem das mitocôndrias em dois casos de GBM representativos, com extremos opostos do número de cópias de DNAm. As fotomicrografias eletrônicas, obtidas a partir de fragmentos tumorais congelados e gradativamente descongelados para a inclusão do material em resina, apresentaram a preservação suficiente das organelas para o procedimento da contagem. Este procedimento confirmou que não há redução no número de organelas mitocondriais, e, igualmente, não foram observadas diferenças nas áreas citoplasmáticas e mitocondriais, bem como de volume entre os dois casos estudados.

Morfologia mitocondrial

Além dos eventos de fusão, fissão e fragmentação descritos durante a divisão celular e apoptose, alterações da morfologia mitocondrial também são descritas dependendo de sua atividade energética. O fenótipo da respiração celular possui mitocôndrias com o formato ortodoxo (cristas ampliadas, expansão da matriz e reduzido espaço intracristas), o que leva a uma conformação condensada, apresentando aumento na densidade da matriz e largos espaços intracristas quando ocorre a mudança para o fenótipo glicolítico citoplasmático (Rossignol *et al.*, 2004; Alirol e Martinou, 2006). Estas alterações morfológicas não foram observadas nas mitocôndrias dos casos de GBM analisados no presente estudo.

Fatores de replicação e transcrição mitocondriais

Na tentativa de se compreender melhor os mecanismos pelos quais ocorre a redução no número de cópias de DNAm_t, foi estudada a expressão dos principais genes participantes na replicação e transcrição do genoma mitocondrial.

O TFAM tem como função, além de preservar a integridade do genoma mitocondrial (Kaufman *et al.*, 2007), a regulação direta da atividade de ambos os parólogos B em complexo com a RNA polimerase mitocondrial. No presente estudo, foi observado um aumento discreto da expressão relativa de *TFAM* correlacionada aos níveis de expressão relativa de *TFB1M* e *TFB2M*, corroborando a idéia de que a síntese de DNAm_t é dependente da associação com a transcrição realizada por TFB1M e/ou TFB2M (Pohjoismäki *et al.*, 2006). Embora possuam papéis distintos na biogênese e expressão gênica mitocondrial, a semelhança de expressão observada entre esses dois últimos e sua correlação direta em todos os astrocitomas difusamente infiltrativos (GII: $R = 0,54$ $p = 0,004$; GIII: $R = 0,61$ $p = 0,007$ e GBM: $R = 0,25$ $p = 0,028$) podem refletir seu histórico evolutivo comum de atividade de RNA metiltransferases (Cotney *et al.*, 2007; Falkenberg *et al.*, 2002). Membros da família dos coativadores de PGC-1 são importantes mediadores da biogênese mitocondrial devido à sua habilidade de ativar genes nucleares que codificam proteínas mitocondriais (Scarpulla, 2008). Esta via e seus alvos encontram-se em níveis elevados em oncocitomas tireoidianos (Savagner *et al.*, 2003) e em cancer endometrial tipo 1, ambos correlacionados ao aumento do DNA mitocondrial (Cormio *et al.*, 2009). Dados preliminares em nosso laboratório detectaram baixa expressão de PGC-1 α em amostras de GBM comparada a de tecido cerebral não-tumoral, sinalizando que a biogênese mitocondrial em nossa casuística pode estar alterada e também relacionada à diminuição do número de cópias do DNAm_t.

Foi encontrada uma correlação da expressão de *POLG* inversa ao

conteúdo de DNAm_t ($R = -0,564$ e $p=0,015$), sugerindo que haja um efeito compensatório da hiperexpressão de *POLG* nos graus mais malignos dos astrocitomas difusamente infiltrativos. A rápida taxa de crescimento que possui este tipo de tumor, sobrevivendo em um microambiente hipóxico, pode levar à desregulação da replicação do DNAm_t (Gattenby & Gillies, 2004; Rhudson & Chinnery, 2006) afetando, por exemplo as sequências TAS, que são propostas como o ponto principal de seu controle (Brown & Clayton, 2002). Uma proteína de 48kDa de ação semelhante a mTERF foi descrita ligando-se à sequência TAS e promovendo a formação de *D-loop* em bovinos (Madsen *et al.*, 1993). Estudos mais detalhados neste sentido podem auxiliar a compreensão da modulação deste processo replicativo. A síndrome da depleção do DNA mitocondrial é caracterizada pela redução do número de cópias do genoma mitocondrial e tem sido associada a mutações em oito genes nucleares que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos mitocondriais (*POLG*, *TK2*, *DGUOK*, *SUCLA2*, *PEO1* e *MPV17*). A mutação em *RRM2B*, alvo de p53, foi descrita como responsável pela grave depleção de DNA mitocondrial em quatro famílias, afetando 7 indivíduos (Bourdon *et al.*, 2007; Bornstein *et al.*, 2008), e está correlacionada com a progressão tumoral em câncer de cólon (Yoshida *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2005). O gene *POLG* foi encontrado mutado em 63% dos tumores de mama, e, quando expressos em células MCF7, induziu a depleção do DNAm_t, a diminuição da atividade e potencial de membrana mitocondriais, o aumento nos níveis de ROS e a invasão por matrigel (Singh *et al.*, 2009).

Os presentes resultados de aumento de expressão destes fatores de transcrição e replicação podem ser interpretados como efeito compensatório à presença de depleção do DNAm_t, levando à suposição de que ela possa levar a consequências quando a compensação não ocorrer ou for insuficiente. O impacto destas alterações foi verificado na sobrevida total dos pacientes com GBM.

A correlação da expressão de *TFAM* com a sobrevida global nos pacientes com GBM demonstrou um tempo de sobrevida maior nos

pacientes com maiores níveis de expressão relativa de *TFAM*. As diferenças significativas de expressão de *TFAM* entre pacientes de GBM com sobrevida maior de 24 meses e menor que 12 meses, apresentando maior e menor expressão relativa de *TFAM* – respectivamente ($p=0,037$) –, sugerem que o aumento compensatório da expressão de *TFAM* esteja vinculado a um melhor prognóstico em GBM. Esta especulação é reforçada quando o impacto da coexpressão relativa de *TFAM* e *POLG* é analisado na sobrevida global nos pacientes com GBM. Dezenove casos com hiperexpressão de *TFAM* e *POLG* possuem média de sobrevida de 22 meses em contraposição ao grupo de 20 indivíduos com hipo-coexpressão desses genes e média de sobrevida 12 meses ($p=0,01$). O modelo de regressão de Cox mostrou ainda que esse fenômeno independe do sexo e idade.

Os resultados do presente estudo permitiram a observação de associação de alteração do DNAm com um tipo de câncer do sistema nervoso central ainda não descrito na literatura. Estudos anteriores sugerem que a instabilidade genômica mitocondrial possa induzir ao colapso do potencial de membrana mitocondrial e provocar a abertura de seus canais para a liberação dos fatores promotores da morte celular programada (Augenlicht & Heerdt, 2001). No entanto, há também descrições de que o aumento da instabilidade genética possa ser responsável pela criação de um fenótipo mutante, resistente ao processo apoptótico com a subsequente iniciação e/ou progressão tumoral (Higuchi, 2007; Achanta *et al.*, 2005).

Além disto, é necessário considerar que os produtos de genes nucleares envolvidos na replicação e transcrição mitocondriais atuem como moléculas integradoras da comunicação entre mitocôndria e núcleo, um processo essencial para a homeostase energética, e que as proteínas envolvidas nesta transmissão possam desempenhar algum papel na tumorigênese (Verma *et al.*, 2007). A localização nuclear de *TFAM* dez vezes aumentada foi observada em hepatoma de rato e a identificação de sequências nucleares de *TFAM* humano foi descrita na sensibilização e proteção celulares em resposta a drogas quimioterápicas (Pastukh *et al.*, 2007).

Embora Kroemer (2006) e Kagan e Srivastava (2005) pontuem os diversos papéis mitocondriais desempenhados na biologia celular do câncer, a procura por marcadores preditivos tumorais efetivos e drogas anticancerígenas que explorem a bioenergética tumoral em seus diferentes aspectos devem ser metas continuamente perseguidas. O tratamento de células com piruvato, a inibição da glicólise por 3-bromopiruvato (3-BrP), 2-desoxiglicose (2-DG) oxitiamina e lonidamina indicam esta direção (Wang *et al.*, 2007; Rouleau *et al.*, 2007; Pelicano, 2006; Yeluri *et al.*, 2009). Lonidamina juntamente com diazepam foram utilizados no tratamento de recidiva de GBM mostrando um efeito citoestático no crescimento tumoral devido à alta taxa de pacientes estáveis (Oudard *et al.*, 2003). Recentemente, o trabalho de Pathania e colaboradores (2009) sugere a combinação de inibidores da glicólise e de reguladores do processo apoptótico que atuem no metabolismo da célula tumoral e mitocôndria como alternativa no desenho das terapias sinérgicas no combate ao câncer. Assim como Feron (2009) explora uma nova perspectiva terapêutica adjuvante à radioterapia convencional através da inibição do transportador de lactato (MCT1).

Contudo, ainda não se conhece se a depleção do DNAm é consequência da perda da função mitocondrial, característica de células cancerosas, ou se leva a um fenótipo mutante adaptada às necessidades da célula cancerosa, assim como se o desacoplamento da cadeia respiratória ou as alterações no DNA mitocondrial são eventos preditivos na mudança do metabolismo energético celular em câncer. Abordagens futuras são necessárias para o esclarecimento destas questões.

CONCLUSÕES

Os genes selecionados no estudo foram efetivos para caracterizar as alterações no metabolismo energético proposto no que concerne à glicólise aumentada, ao truncamento do ciclo do ácido cítrico e ao desacoplamento da cadeia respiratória, corroborando o efeito de Warburg.

As quantificações absoluta e relativa do número de cópias de DNAMt mostraram que existe uma associação entre a redução do número de cópias de DNAMt e o grau de malignidade dos astrocitomas difusamente infiltrativos.

A depleção do DNAMt entre os pacientes de GBM é independente do número de organelas mitocondriais, não apresentando diferenças de suas áreas mitocondriais e citoplasmáticas ocupadas.

Os níveis elevados de expressão relativa de *TFAM*, *TFB1M*, *TFB2M* e *POLG* em astrocitomas, se considerados ativados na tentativa de se aumentar a replicação, não foram suficientes para compensar a depleção mitocondrial em GBM, embora *POLG* tenha se correlacionado inversamente ao número de cópias de DNAMt.

Existe forte correlação entre os fatores de transcrição mitocondriais, corroborando o papel de *TFAM* no controle direto de *TFB1M* e *TFB2M* na iniciação da síntese de DNA mitocondrial.

A expressão aumentada de *TFAM* correlacionou-se com o grupo de pacientes com GBM de sobrevida maior que 24 meses. O efeito compensatório da expressão elevada de *TFAM*, juntamente com a de *POLG*, está relacionado a um melhor prognóstico em pacientes com GBM.

ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do Projeto pela Comissão de Ética

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 18.04.07, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa **nº 0173/07**, intitulado: **“PAPEL DA MITOCÔNDRIA NA TUMORIGÊNESE DE ASTROCITOMAS”**, apresentado pelo **DEPARTAMENTO DE NEUROLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra “c”)

Pesquisador (a) Responsável: **Profª. Drª. Suely Kazue Nagahashi Marie**

Pesquisador(a) Executante: **Renata de Luiz Correia**

CAPPesq, 18 de abril de 2007.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Este projeto pode nos ajudar a entender melhor como se desenvolvem os tumores de sistema nervoso central e, assim, tentar encontrar uma possibilidade de um tratamento mais eficaz no futuro. Durante a cirurgia, para a retirada do tumor, um pequeno pedaço deste tumor será enviado para o nosso estudo. Vai ser também coletado uma amostra de sangue para o mesmo estudo. Os desconfortos e riscos esperados são os dos procedimentos anestésicos da cirurgia e da punção de uma veia periférica. Quimioterapia e radioterapia são os procedimentos que poderiam ajudar no tratamento destes indivíduos e serão aplicados quando os médicos acharem necessário.

Estamos à disposição para oferecer todas informações sobre este estudo. O paciente tem total liberdade de sair do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga qualquer prejuízo no tratamento. O presente estudo não prevê quaisquer tipo de danos à saúde, decorrentes da pesquisa. Todos os dados do paciente serão mantidos em sigilo e privacidade.

Assinatura do(a) paciente ou Representante Legal: _____

Nome do(a) paciente: _____

RG do Prontuário Médico: _____

Médico Responsável: _____

Anexo 3 – Dados clínicos

	Número	AS3	AP	RGHC	Iniciais	Sexo	Idade	História clínica	Localização	Grau de ressecção	KPS Inicial	Diagnóstico	Terapia complementar	Seguimento	KPS final	Sobrevida Global
1	108				MMP	M	31a 1m		***	***	***	Normal		8a 5m		
2	132				EAO	M	51a 9m		***	***	***	Normal		8a 3m		
3	167				EA	M	39a 6m		***	***	***	Normal		8a 1m		
4	173				MIM	F	44a 0m		***	***	***	Normal		8a 1m		
5	179				ED	F	39a 7m		***	***	***	Normal		8a 1m		
6	189				RLG	F	35a 5m		***	***	***	Normal		8a 0m		
7	196				IG	F	44a 3m		***	***	***	Normal		8a 0m		
8	226				PST	M	38a 7m		***	***	***	Normal		7a 10m		
9	232				FPB	M	28a 4m		***	***	***	Normal		7a 9m		
10	237				AML	F	47a 5m		***	***	***	Normal		7a 9m		
11	245				GVA	M	25a 8m		***	***	***	Normal		7a 9m		
12	263				MML	M	27a 3m		***	***	***	Normal		7a 8m		
13	312				MCL	F	41a 0m		***	***	***	Normal		7a 5m		
14	330				JMR	M	32a 5m		***	***	***	Normal		7a 4m		
15	332				MSM	F	32a 5m		***	***	***	Normal		7a 4m		
16	349				AGCC	M	40a 7m		***	***	***	Normal		7a 3m		
17	714				VLPm	F	56a 9m		***	***	***	Normal		5a 8m		
18	755				SVSB	F	39a 10m		***	***	***	Normal		5a 6m		
19	805				SAD	F	37a 9m		***	***	***	Normal		5a 4m		
20	861				RM	M	35a 7m		***	***	***	Normal		5a 1m		
21	929				EPA	F	45a 0m		***	***	***	Normal		4a 9m		
22	969				GC	F			***	***	***	Normal		4a 7m		
1	185		50-8257-9	13522266H	APF	M	24a 1m	ND	cerebelo (vermis)	total	80%	Astrocitoma pilocítico	ND	8a 0m	100%	
2	335		54-2626-0	2568552A	MI	F	34a 8m	27a0m	lobo frontal, diencefalo dir e corpo caloso dir	>90%	80%	Astrocitoma pilocítico	não	7a 4m	70%	
3	352		54-6383-1	13578917K	JRS	M	35a 10m	0a2m	lobo temporal, occipital e parietal esq	ND	100%	Astrocitoma pilocítico	não	7a 3m	100%	
4	363		54-9952-6	6063214G	RFC	M	13a 4m	ND	lobo frontal, temporal esq	ND	ND	Astrocitoma pilocítico	ND	7a 2m	ND	
5	421		56-4821-1	13473553G	IAPV	F	16a 10m	ND	ND	ND	ND	Astrocitoma pilocítico	ND	6a 10m	ND	
6	436		56-8949-0	13570687I	WGG	M	18a 1m	ND	cerebelo (vermis)	total	90%	Astrocitoma pilocítico	não	6a 10m	70%	
7	463		57-3638-2	13449456G	SEM	F	16a 8m	4a0m	lobo parietal, occipital dir	ND	100%	Astrocitoma pilocítico	ND	6a 8m	100%	
8	495		58-1515-0	13492358C	ASJM	F	8a 7m	ND	lobo frontal dir	ND	ND	Astrocitoma pilocítico	ND	6a 6m	ND	
9	501		58-2590-3	13491797C	RJB	M	32a 2m	ND	cerebelo, hemisfério dir	ND	90%	Astrocitoma pilocítico	ND	6a 6m	90%	
10	570		59-5895-4	13594605C	KBRP	F	8a 4m	ND	ND	ND	ND	Astrocitoma pilocítico	ND	6a 11m	ND	
11	594		59-9510-8	3367062G	JCFS	M	18a 3m	ND	ND	ND	ND	Astrocitoma pilocítico	ND	6a 2m	ND	
12	601		60-0984-0	1359908G	JJS	M	21a 2m	ND	ND	ND	ND	Astrocitoma pilocítico	ND	6a 2m	ND	
13	828		64-8111-6	77071554A	WHO	M	16a 3m	ND	ND	ND	ND	Astrocitoma pilocítico	ND	5a 2m	ND	
14	878		65-6608-1	13658238-D	JBS	F	18a 0m	ND	ND	ND	ND	Astrocitoma pilocítico	ND	5a 0m	ND	
15	889		65-9211-2	13661866-B	WAD	F		0a6m	lobo frontal dir	total	100%	Astrocitoma pilocítico	ND	4a 11m	100%	
16	892		65-9601-0	13665259-F	RAR	M	14a 11m	ND	ND	ND	ND	Astrocitoma pilocítico	ND	4a 11m	ND	
17	932		66-7407-0	13672526-D	JSO	M	17a 10m	ND	ND	ND	ND	Astrocitoma pilocítico	ND	4a 9m	ND	
18	946		66-9467-5	3206638-A	PRTS	M	9a 4m	ND	ND	ND	ND	Astrocitoma pilocítico	ND	4a 8m	ND	
19	995				JTAN	M	22a 5m	ND	ND	ND	ND	Astrocitoma pilocítico	ND	4a 5m	ND	
20	1000		68-4796-0	13694475-E	DSS	M	4a 10m	ND	cerebelo (vermis), hemisfério esq	ND	ND	Astrocitoma pilocítico	ND	4a 5m	ND	
21	1044		69-6825-2	13610605-I	LRR	M	8a 11m	ND	cerebelo (vermis), hemisfério esq	>90%	100%	Astrocitoma pilocítico	ND	4a 2m	100%	
22	1049		69-8645-5	13708589-J	AOS	F	14a 1m	ND	ND	>90%	90%	Astrocitoma pilocítico	não	4a 1m	100%	
23	1058				RLS	M	22a 8m	ND	ND	ND	ND	Astrocitoma pilocítico	ND	4a 1m	ND	

	Número	AS3	AP	RGHC	Iniciais	Sexo	Idade	História clínica	Localização	Grau de ressecção	KPS Inicial	Diagnóstico	Terapia complementar	Seguimento	KPS final	Sobrevida Global
1	55	89	46-6343-8	2623330D	MAP	F	36a 9m	10a0m	temporal, insula esq	>90%	90%	Astrocitoma grau II	sim	8a 11m	100%	
2	76	14	47-3260-0	3361902H	ML	M	27a 3m	0a4m	lobo temporal esq	>90%	90%	Astrocitoma grau II	sim			4a 8m
3	101	10	48-3300-7	7047105H	JNO	F	23a 7m	0a4m	lobo frontal dir	>90%	100%	Astrocitoma grau II	sim	8a 6m	100%	
4	118	2	49-1687-5	13546582F	AMC	F	45a 11m	0a9m	lobo frontal dir	total	90%	Astrocitoma grau II	sim		50%	2a 0m
5	239	40	52-0559-0	13548901E	JRA	M	56a 6m	0a6m	lobo frontal esq	>90%	60%	Astrocitoma grau II	sim	7a 9m	40%	
6	250	39	52-2827-1	13562412F	MBC	F	30a 6m	5a0m	lobo frontal, parietal dir	50-90%	100%	Astrocitoma grau II	sim	7a 9m	100%	
7	254	38	52-3726-2	13572670I	MGSJ	F	24a 8m	0a3m	lobo temporal esq	50-90%	50%	Astrocitoma grau II	não	7a 8m	90%	
8	267	1	52-7365-0	13574538G	AMM	M	43a 6m	ND	lobo frontal dir	parcial	100%	Astrocitoma grau II	sim	7a 8m	90%	
9	328	15	54-0842-3	77063187A	CHR	M	39a 2m	0a5m	lobo parietal dir	>90%	100%	Astrocitoma grau II	não	7a 4m	90%	
10	341	14	54-4295-8	3361902H	ML	M	28a 8m	ND	lobo temporal esq	>90%	90%	Astrocitoma grau II	sim		100%	3a 3m
11	346	16	54-5126-4	77062139H	RTP	M	23a 2m	0a8m	lobo parietal dir	parcial	ND	Astrocitoma grau II	não	7a 3m	ND	
12	392	22	55-7686-5	3233880E	ARV	F	38a 6m	4a10m	lobo parietal, corpo caloso esq	>90%	100%	Astrocitoma grau II	sim	7a 1m	90%	
13	412	1	56-2912-8	13574538G	AMM	M	44a 3m	3a0m	lobo frontal dir	ND	100%	Astrocitoma grau II	ND	6a 11m	90%	
14	452	62	57-1922-4	77062882E	MRS	M	41a 3m	0a5m	lobo frontal dir	>90%	60%	Astrocitoma grau II	sim	6a 9m	70%	
15	453	60	57-1958-5	3144835K	JOJ	M	28a 2m	0a4m	lobo frontal dir	50-90%	100%	Astrocitoma grau II	sim	6a 9m	100%	
16	467	63	57-4432-6	13484936E	MAM	F	41a 5m	0a4m	lobo temporal, insula, dir	50-90%	100%	Astrocitoma grau II	sim		100%	3a 5m
17	490	52	58-0272-5	13491090E	NNS	M	35a 10m	0a7m	lobo frontal dir	total	100%	Astrocitoma grau II	não		80%	3a 2m
18	577	78	59-6637-0	13592815B	RNN	F	35a 10m	2a0m	lobo temporal esq	>90%	70%	Astrocitoma grau II	não	6a 3m	100%	
19	715	88	62-2613-2	13622992A	AOE	F	27a 4m	0a6m	cerebelo (vermis), tronco cerebral (ponte)	>90%	80%	Astrocitoma grau II	não		ND	0a 9m
20	806	93	64-1370-6	13643283-C	ESM	M	39a 5m	2a0m	lobo frontal, parietal esq	<50%	70%	Astrocitoma grau II	não	5a 4m	90%	
21	999	115	68-4581-1	13683439-B	JWMS	M	25a 10m	0a3m	lobo parietal, occipital dir	<50%	100%	Astrocitoma grau II	não	4a 5m	100%	
22	1016	119	68-7346-4	77068029-G	ES	M	35a 1m	0a9m	lobo frontal, temporal esq	<50%	100%	Astrocitoma grau II	não	6a 1m	100%	
23	1095	127	71-3078-3	13722519-E	JPS	M	32a 2m	5a0m	lobo frontal, parietal, insula, diencefalo, corpo caloso	<50%	80%	Astrocitoma grau II	sim	3a 10m	100%	
24	1099	129	71-4215-3	13723677-B	MGSA	F	32a 11m	0a9m	lobo temporal, insula, esq	total	100%	Astrocitoma grau II	sim	3a 9m	80%	
25	1113	62			MRS	M	41a 3m	ND	lobo frontal dir	>90%	80%	Astrocitoma grau II	ND	3a 8m	70%	
26	1155	140			JSA	F	25a 0m	0a2m	lobo temporal dir	total	90%	Astrocitoma grau II	sim	3a 5m	100%	
1	28	51	45-5543-0	3003852-K	GAB	M	33a 4m	7a0m	lobo frontal esq	50-90%	90%	Astrocitoma grau III	sim	9a 1m	60%	
2	34	53	45-7850-3	3324020-E	MGCJ	M	18a 2m	2a0m	lobo frontal, corpo caloso, dir	<50%	90%	Astrocitoma grau III	sim	9a 0m	100%	
3	73	51	47-2162-4	7042702A	MCV	F	24a 11m	0a9m	Ventrículo (VLL) dir	50-90%	100%	Astrocitoma grau III	não	8a 9m	100%	
4	233	41	51-9554-3	13567029I	OAA	F	58a 7m	8a0m	lobo frontal, parietal, temporal, insula, dir	50-90%	ND	Astrocitoma grau III	não		ND	1a 1m
5	249	3	52-2586-8	3259481K	AC	M	32a 2m	8a0m	lobo frontal dir	>90%	100%	Astrocitoma grau III	sim		30%	0a 7m
6	338	11	54-3528-5	13580020H	LKH	F	37a 6m	0a1m	lobo frontal dir e esq	50-90%	90%	Astrocitoma grau III	sim		40%	1a 2m
7	347	17	54-5552-9	13579476I	WCS	M	15a 3m	0a1m	tronco cerebral, ponte	>90%	40%	Astrocitoma grau III	sim	7a 3m	90%	
8	360	18	54-9361-7	77063981H	ICVK	F	32a 2m	1a8m	lobo frontal, parietal, corpo caloso esq	>90%	100%	Astrocitoma grau III	sim	7a 3m	100%	
9	366	8	55-0872-0	13452901C	GPJ	M	37a 0m	0a2m	lobo frontal, temporal, insula, esq	<50%	100%	Astrocitoma grau III	sim	7a 2m	100%	
10	410	410	56-2773-7	13472055H	AAS	M	29a 4m	0a1m	lobo frontal esq	>90%	100%	Astrocitoma grau III	sim	6a 11m	100%	
11	428	428	56-6174-9	13454723D	FCS	M	22a 3m	ND	lobo parietal esq	<50%	100%	Astrocitoma grau III	sim	6a 10m	60%	
12	478	478	57-6718-0	77066277G	ASM	M	36a 4m	0a3m	lobo frontal dir e esq, lobo temporal esq, corpo caloso	50-90%	60%	Astrocitoma grau III	sim		40%	1a 9m
13	514	514	58-5446-6	13498164D	LFF	M	37a 7m	2a0m	lobo temporal, parietal esq	50-90%	90%	Astrocitoma grau III	sim	6a 5m	100%	
14	734	100			JRS	M	31a 9m	0a0m2s	cerebelo, hemisfério esq	>90%	100%	Astrocitoma grau I - III	***	5a 7m	100%	
15	905	38	66-1379-9	13572670-I	MGSJ	F	27a 6m	ND	lobo temporal esq	ND	90%	Astrocitoma grau III	ND	4a 11m	100%	
16	981	93			ANS	M	21a 3m	ND		ND	ND	Astrocitoma grau III	ND	4a 6m	ND	
17	1033	121	69-3015-8	77060584-C	MDDT	F	29a 6m	4a4m	ND	>90%	100%	Astrocitoma grau III	não	4a 3m	ND	
18	1036	120	69-3029-8	13702355-F	VGCJ	F	46a 2m	0a1m	lobo temporal dir	>90%	60%	Astrocitoma grau III	não		ND	0a 3m

	Número	AS3	AP	RGHC	Iniciais	Sexo	Idade	História clínica	Localização	Grau de ressecção	KPS Inicial	Diagnóstico	Terapia complementar	Seguimento	KPS final	Sobrevida Global
1	35	12	45-8832-0/458758-8	1352122-H		M	52a 11m	0a0m2s	lobo temporal esq, lobo occipital esq	total	80%	GBM	sim		50%	3a 9m
2	74	50	47-2426-7	7045824G	UC	M	74a 4m	0a6m	lobo frontal parietal esq	subtotal > 90%	40%	GBM	sim		ND	1a 5m
3	175	47		3316801G	MTC	F	56a 6m	0a4m	lobo temporal insula dir	50-90%	ND	GBM	não		ND	0a 5m
4	194	46	51-0694-0	77060472A	OB	M	71a 6m	0a4m	lobo parietal temporal esq	total	80%	GBM	sim		60%	1a 10m
5	204	44	51-3734-9	2837573G	BL	F	62a 2m	0a1m	lobo parietal occipital dir	subtotal > 90%	ND	GBM	ND		ND	0a 7m
6	208	43		2869282K	EFC	M	62a 4m	0a1m	lobo frontal, temporal, insula e diencefalo (dir)	subtotal > 90%	ND	GBM	não		ND	0a 6m
7	256	37	52-4509-5	13572856A	CDS	M	41a 3m	0a1m	lobo parietal temporal dir	subtotal > 90%	80%	GBM	não		50%	0a 2m
8	269	36		13574725E	ELAD	F	65a 1m	0a2m	lobo frontal dir	total	ND	GBM	não		ND	0a 0m
9	274	4	52-8714-6	77062152I	BCJ	F	47a 3m	0a2m	lobo frontal parietal esq	total	90%	GBM	sim		90%	1a 5m
10	297	33	53-3674-0	13445637B	MCE	F	78a 11m	0a0m1s	lobo parietal dir	total	60%	GBM	sim		60%	0a 11m
11	317	29	53-7898-2	2357547B	MJO	F	71a 6m	0a1m	lobo temporal dir	total	50%	GBM	não		ND	0a 2m
12	356	9	54-7434-5	5163770G	JS	M	74a 2m	0a3m	lobo frontal temporal insula dir	total	70%	GBM	sim		50%	0a 11m
13	370	19	55-1404-5	13581612B	WAS	M	45a 2m	0a3m	lobo parietal, occipital e temporal dir	subtotal > 90%	100%	GBM	sim		90%	1a 1m
14	384	20	55-5488-8	1356103K	CSS	M	45a 5m	0a3m	lobo parietal e temporal dir. Tronco cerebral (mese	subtotal > 90%	50%	GBM	sim		40%	0a 4m
15	391	21	55-7112-0	13581546D	IPP	F	54a 7m	0a2m	lobo parietal temporal dir	subtotal > 90%	50%	GBM	sim		40%	1a 0m
16	397	24	55-8650-0	2995994F	MCS	F	58a 11m	0a2m	lobo parietal frontal esq	subtotal > 90%	90%	GBM	não		ND	0a 5m
17	442	55	56-9206-7	13473990D	MSS	M	68a 9m	0a7m	lobo frontal, temporal e parietal dir	subtotal > 90%	50%	GBM	não		ND	0a 4m
18	450	58	57-1498-2	13481051K	CMT	F	61a 6m	0a2m	lobo temporal esq	parcial	100%	GBM	sim		40%	1a 2m
19	458	61	57-2532-1	13482791J	MAA	F	60a 10m	0a1m	lobo parietal dir	total	40%	GBM	não		40%	0a 3m
20	485	72	57-8817-0	13489242I	ASS	M	67a 2m	0a3m	lobo parietal temporal dir	total	60%	GBM	sim		50%	0a 6m
21	496	71	58-1738-2	3009732B	SASC	F	57a 6m	0a0m2s	lobo parietal temporal dir	subtotal > 90%	70%	GBM	não		40%	0a 8m
22	498	65	58-1946-6	3346247F	GP	F	17a 3m	0a5m	lobo frontal, parietal e temporal dir	subtotal > 90%	30%	GBM	sim		30%	0a 4m
23	503	66	58-3233-0	13470665B	JRF	M	63a 10m	0a1m	lobo parietal e occipital dir, corpo caloso bilateral	subtotal > 90%	100%	GBM	sim		50%	0a 2m
24	510	56	58-4389-8	3335161J	VRS	M	56a 7m	0a3m	lobo parietal dir	total	50%	GBM	sim		50%	1a 11m
25	522	69	58-6616-2	13498664F	MFC	M	48a 1m	0a0m3s	lobo temporal esq	total	100%	GBM	sim		100%	2a 0m
26	524	70	58-6808-6	13499574B	ZFR	F	59a 7m	0a2m	lobo frontal dir	subtotal > 90%	90%	GBM	sim		100%	0a 8m
27	547	74	59-1211-3	13590219J	AA	M	71a 11m	0a0m2s	lobo parietal e temporal dir	>90%	100%	GBM	sim		70%	1a 1m
28	555	24A	59-3422-2	13592731D	ADM	M	57a 0m	ND	***	Parcial	90%	GBM	***		ND	1a 6m
29	573	77	59-6190-4	3337216F	EM	M	50a 9m	0a1m	lobo frontal, parietal, temporal, insula esq	total	80%	GBM	sim		70%	0a 9m
30	592	79	59-9328-8	13599910A	MRKMB	F	40a 11m	0a1m	lobo frontal dir	total	80%	GBM	sim		100%	1a 2m
31	629	85	60-6149-4	13605568F	JLS	M	65a 4m	0a1m	lobo frontal esq	50-90%	70%	GBM	sim		50%	1a 2m
32	632	59	60-6580-5	13607484I	WAP	F	41a 2m	4a0m	lobo frontal esq	subtotal > 90%	90%	GBM	sim		40%	2a 4m
33	638	76	60-7528-2	13603203G	VFC	M	55a 8m	0a2m	lobo frontal, parietal e occipital dir	total	40%	GBM	não		ND	0a 2m
34	640	86	60-7753-6	44104649F	LPS	F	58a 11m	0a4m	lobo temporal esq	total	100%	GBM	não		80%	0a 5m
35	642	82	60-7749-8	13608382J	NDT	M	42a 11m	0a0m2s	lobo parietal e temporal dir	subtotal > 90%	60%	GBM	sim		40%	1a 5m
36	663	84	61-2537-9	3011915I	AFP	M	65a 11m	0a0m2s	lobo parietal e occipital dir	total	60%	GBM	sim		70%	0a 7m
37	684	87	61-7187-7	13616873G	ADM	F	56a 1m	0a2m	lobo parietal e occipital esq	total	70%	GBM	não		70%	0a 3m
38	687	68	61-7615-1	13619180I	LZ	M	45a 11m	0a1m	lobo parietal dir	total	90%	GBM	sim		100%	0a 10m
39	698	80	61-9020-0	13621334B	ERL	M	58a 5m	0a0m1s	***	total	70%	GBM	sim		60%	0a 9m
40	724	36A	62-4884-5	13625792E	ACF	F	62a 2m	ND	***	>90%	ND	GBM	não	5a 8m	ND	
41	743	45A	628701-8	2173677-K	JPP	M	51a 10m	ND	frontal bilateral	>90%	90%	GBM	***		90%	0a 2m
42	750	101	62-9711-0	13613008-D	NR	M	51a 7m	0a1m	lobo temporal esq	total	90%	GBM	não		ND	0a 6m
43	792	97	63-8599-0	44106871-I	IS	M	34a 6m	1a0m	lobo parietal e temporal dir	ND	40%	GBM	não		ND	0a 5m
44	795	90	63-9408-6	13640608-J	JCN	M	28a 2m	0a5m	lobo frontal, parietal, temporal, insula, diencefalo di	subtotal > 90%	100%	GBM	sim		50%	0a 11m
45	852	103	65-2002-2	13654470A	AFP	M	60a 2m	0a1m2s	lobo parietal, temporal, insula dir	subtotal > 90%	80%	GBM	não		ND	1a 1m
46	854	95	65-2828-7	13655653B	GFS	M	46a 4m	0a4m	lobo parietal e temporal dir	subtotal > 90%	100%	GBM	sim	5a 1m	100%	
47	875	97	65-5776-7	44106871-I	IS	M	34a 11m	1a0m	lobo parietal e temporal dir	subtotal > 90%	40%	GBM	não		ND	0a 1m
48	879	99	65-7270-7	3024155-H	AM	M	61a 4m	1a0m	lobo temporal dir, ventriculo VVLL, multicêntrico	total	70%	GBM	sim		60%	0a 3m
49	881	96	65-7715-6	13661416-K	JBF	M	49a 10m	0a3m	lobo parietal e temporal bilateral	subtotal > 90%	50%	GBM	não		50%	0a 4m
50	884	98	65-8286-9	13663130-B	ILR	F	52a 10m	0a2m	lobo parietal, temporal, occipital dir	total	90%	GBM	sim		30%	2a 3m
51	885		65-8283-4	2105118-C	MCG	F	86a 7m	ND	ND	ND	ND	GBM	ND		ND	0a 2m
52	891	117	65-9493-0	13664358-H	FD	M	57a 1m	0a1m	lobo occipital dir	subtotal > 90%	90%	GBM	sim		80%	0a 7m
53	901	104	66-0382-3	13665181-J	GMS	M	16a 1m	0a2m	temporal esq	> 90%	100%	GBM	não		100%	0a 2m

	Número	AS3	AP	RGHC	Iniciais	Sexo	Idade	História clínica	Localização	Grau de ressecção	KPS Inicial	Diagnóstico	Terapia complementar	Seguimento	KPS final	Sobrevida Global
54	903	111	66-0989-9	1366243-J	GSS	M	55a 11m	0a4m	lobo temporal, insula esq	total	100%	GBM	sim		70%	1a 10m
55	925	106	66-5405-5	13672566-C	PMO	M	40a 5m	0a2m	lobo parietal, temporal dir	total	100%	GBM	não		ND	1a 0m
56	930	107	66-6758-9	13572505-G	ASA	M	26a 5m	5a0m	lobo frontal, parietal esq	50-90%	100%	GBM	sim		80%	2a 7m
57	1002	112	68-5149-5	13693256-A	MMC	M	40a 5m	1a0m	lobo temporal dir	> 90%	100%	GBM	sim		ND	0a 2m
58	1003	110	68-5148-7	13694933-J	DGS	M	68a 3m	0a2m	lobo frontal, temporal esq	>90%	70%	GBM	não		ND	0a 4m
59	1007	38	68-6084-2	13572670-I	MGSJ	F	28a 1m	ND	lobo temporal esq	subtotal > 90%	100%	GBM	não		50%	0a 3m
60	1009	114	68-6226-8	13680596-I	MALP	F	38a 9m	0a2m	lobo frontal dir	subtotal > 90%	70%	GBM	sim		50%	0a 7m
62	1070		70-3955-7	77077431-F	MR	M	72a 8m	ND	ND	ND	ND	GBM	ND		ND	0a 8m
63	1074	122	70-4471-2	13714223-E	ILO	M	32a 4m	ND	lobo temporal dir	total	100%	GBM	sim	4a 9m	100%	
64	1077	59	70-6006-8	13607484-I	VAP	F	43a 3m	ND	lobo frontal esq	ND	90%	GBM	ND		40%	0a 3m
65	1084	123	70-9092-7	13718609-B	AJ	M	54a 8m	0a1m	lobo frontal, parietal, temporal dir	subtotal > 90%	100%	GBM	sim		70%	0a 5m
66	1091	128	71-1551-2	13625572-H	WJGS	M	56a 4m	1a0m	lobo temporal dir	subtotal > 90%	90%	GBM	sim		80%	1a 11m
67	1103	123	71-5874-2	13718609-B	AJ	M	54a 10m	0a1m	lobo frontal, parietal, temporal dir	subtotal > 90%	100%	GBM	sim		70%	0a 4m
68	1118	134	72-2757-4	13731814-H	APS	F	60a 9m	0a3m	lobo frontal, parietal, temporal dir	subtotal > 90%	70%	GBM	***		ND	0a 2m
69	1122	132	68-9633-2	55441508-G	AFP	M	68a 9m	0a3m	lobo occipital dir	subtotal > 90%	100%	GBM	***		90%	0a 5m
70	1123	135	72-4527-0	13732747-F	EFS	M	52a 1m	0a3m	lobo temporal esq	subtotal > 90%	100%	GBM	sim		40%	0a 11m
71	1124	133	68-9996-0	13732923-H	AE	M	63a 1m	0a2m	lobo parietal, temporal e insula dir	subtotal > 90%	50%	GBM	***		60%	0a 4m
72	1133	138	72-8168-4	55302090A	FCC	M	52a 4m	0a0m 1s	****	subtotal > 90%	70%	GBM	***		ND	0a 9m
73	1144	139	73-1961-4	13740714K	SRS	M	76a 10m	0a1m	lobo frontal, temporal, parietal dir	subtotal > 90%	100%	GBM	não		ND	0a 2m
74	1161	141		13743659E	GFS	M	39a 6m	0a0m3s	lobo frontal, parietal esq	subtotal > 90%	70%	GBM	sim		70%	1a 3m
75	1162	144	4376	13743549A	MÉS	F	68a 2m	0a2m	lobo parietal, temporal dir	ND	100%	GBM	sim		70%	1a 4m
76	1169	142	5805	13746356E	VMO	F	56a 5m	0a1m	lobo temporal esq	subtotal > 90%	100%	GBM	sim		100%	1a 4m
77	1190	143	17398	13756119E	ESB	F	58a 1m	0a1m	lobo frontal esq	subtotal > 90%	90%	GBM	sim		70%	1a 2m
78	1194	107		13572505-G	ASM	M	28a 1m	ND	lobo frontal, parietal esq	ND	100%		***		60%	0a 11m
79	1199	61A	71-4851-8	13716278-H	FRN	M	31a 0m	0a6m	lobo frontal parietal temporal insula esq	< 50%	90%	GBM	sim		90%	0a 3m
80	1205	145		13749545-H	OLAN	M	69a 11m	0a1m2s	lobo temporal dir	ND	100%	GBM	sim	3a 7m	100%	
81	1212	61A		13716278-H	FRN	M	31a 1m	0a6m	lobo frontal parietal temporal insula esq	ND	ND		ND		ND	0a 1m
82	1232	146	6934	13770362-G	FBS	M	58a 10m	0a0m2s	lobo temporal dir	ND	100%	GBM	sim		70%	1a 0m
83	1237	147	7960	89031629-I	APN	M	59a 9m	0a1m	lobo temporal dir	>90%	80%	GBM	sim		80%	0a 7m
84	1243	148	10145	13773467-E	VCT	M	47a 5m	0a7m	lobo occipital esq	>90%	80%	GBM	sim		60%	0a 10m
85	1250	149	13001	13774296-K	MFL	M	63a 2m	0a0m2s	lobo frontal, temporal esq	subtotal > 90%	100%	GBM	sim		60%	0a 7m

Anexo 4 – Sistema-teste de pontos

Anexo 5 – Dados de *microarray*

VIA Nº Acc. Descrição do gene			Intensidades Normalizadas					
			GBM1 (T)	GBM2 (T)	GBM3 (T)	Pool (N)	MÉDIA (T)	T/N
GLICOLISE	NM_000188.	hexokinase 1 (HK1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1	2,81	1,34	1,52	1,13	1,89	1,67
	NM_000189.	hexokinase 2 (HK2)	0,20	0,42	0,78	0,73	0,46	0,63
	NM_002115.	hexokinase 3 (white cell) (HK3), nuclear gene encoding mitochondrial protein	0,60	1,10	0,80	1,63	0,83	0,51
	NM_001486.	glucokinase (hexokinase 4) regulator (GCKR)	3,09	3,60	2,92	1,63	3,20	1,96
	NM_033507.	glucokinase (hexokinase 4, maturity onset diabetes of the young 2) (GOK), transcript variant 2	0,54	3,08	2,05	2,21	1,89	0,86
	NM_031284.	ATP-dependent glucokinase (ADP-GK)	16,78	23,93	19,69	7,23	20,14	2,78
	NM_000175.	glucose phosphate isomerase (GPI)	3,16	5,57	7,54	0,83	5,42	6,50
	NM_002626.	phosphofructokinase, liver (PFKL), transcript variant 2, mRNA liver	0,82	1,41	1,68	1,23	1,30	1,06
	NM_002627.	phosphofructokinase, platelet (PFKP)	1,18	0,93	1,98	0,48	1,36	2,85
	NM_000289.	phosphofructokinase, muscle (PFKM) esquelético adulto	1,10	0,99	1,39	0,93	1,16	1,26
	NM_000507.	fructose-1,6-bisphosphatase 1 (FBP1)	3,97	7,93	4,17	4,38	5,36	1,22
	NM_005165.	aldolase C, fructose-bisphosphate (ALDOC)	19,37	40,18	115,19	314,92	58,25	0,18
	NM_000365.	triosephosphate isomerase 1 (TPI1)	145,91	309,06	323,31	347,18	259,43	0,75
	NM_002046.	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD)	157,08	147,16	202,22	3,40	168,82	49,64
	NM_014364.	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, spermatogenic (GAPDS)	6,84	10,71	9,65	21,11	9,07	0,43
	NM_000291.	phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)	9,25	10,91	12,53	0,83	10,90	13,07
	NM_001724.	2,3-bisphosphoglycerate mutase (BPGM), transcript variant 1	2,63	2,11	1,62	0,72	2,12	2,96
	NM_001428.	enolase 1, (alpha) (ENO1)	235,01	351,52	339,85	349,12	308,79	0,88
	NM_001975.	enolase 2 (gamma, neuronal) (ENO2)	6,90	9,22	8,58	2,73	8,23	3,01
	NM_001976.	enolase 3, (beta, muscle) (ENO3), transcript variant 1	10,99	9,39	15,86	6,07	12,08	1,99
	NM_182470.	pyruvate kinase, muscle (PKM2), transcript variant 2	49,62	57,63	55,75	19,25	54,33	2,82
	NM_000298.	pyruvate kinase, liver and RBC (PKLR), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1	3,14	3,77	3,80	3,63	5,06	3,93
	NM_005566.	lactate dehydrogenase A (LDHA)	64,87	171,17	201,25	17,43	145,77	8,36
	NM_002300.	lactate dehydrogenase B (LDHB)	112,49	81,37	101,44	17,30	98,43	5,69
	NM_017448.	lactate dehydrogenase C (LDHC), transcript variant 2	0,18	0,04	0,21	0,90	0,14	0,15
	NM_194436.	lactate dehydrogenase D (LDHD), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 2	4,32	2,22	1,80	4,56	2,78	0,61
	NM_033195.	lactate dehydrogenase A -like (LDHL)	0,52	-0,08	0,23	0,53	0,22	0,42
	NM_000284.	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1 (PDHA1) E1	14,06	14,36	26,71	16,72	18,37	1,10
	NM_005390.	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 2 (PDHA2)	0,41	0,20	0,41	0,38	0,34	0,90
	NM_000925.	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta (PDHB)	50,78	38,67	62,18	68,74	50,54	0,74
	NM_001931.	dihydrolipoamide S-acetyltransferase (E2 component of pyruvate dehydrogenase complex) (DLAT)	2,78	2,25	3,49	0,43	2,84	6,58
	NM_000108.	dihydrolipoamide dehydrogenase (E3 component of pyruvate dehydrogenase complex, 2-oxo-glutarate complex, branched chain keto s	5,92	7,04	7,21	0,69	6,72	9,79
	NM_003477.	pyruvate dehydrogenase complex, component X (PDHX)	1,43	1,38	0,64	0,06	1,15	18,89
	NM_006755.	transaldolase 1 (TALDO1)	3,46	3,83	4,59	0,75	3,96	5,29
CAT	NM_198324.	citrate synthase (CS), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 2	2,88	2,49	10,64	0,76	5,34	6,98
	NM_002197.	aconitase 1, soluble (ACO1)	15,60	23,26	19,62	12,76	19,50	1,53
	NM_001098.	aconitase 2, mitochondrial (ACO2), nuclear gene encoding mitochondrial protein	0,53	0,61	0,39	1,23	1,01	0,84
	NM_005896.	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble (IDH1)	2,82	1,96	1,92	0,41	2,23	5,40
	NM_002168.	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial (IDH2)	0,66	0,86	0,38	0,28	0,63	2,27
	NM_005530.	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha (IDH3A), nuclear gene encoding mitochondrial protein	3,67	2,66	3,69	0,98	3,34	3,39
	NM_004135.	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) gamma (IDH3G), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1	15,87	14,23	18,82	19,60	16,31	0,83
	NM_002541.	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide) (OGDH)	0,82	0,46	0,46	0,56	0,58	1,05
	NM_018245.	oxoglutarate dehydrogenase-like (OGDHL)	0,66	0,38	0,29	1,12	0,44	0,40
	NM_003849.	succinate-CoA ligase, GDP-forming, alpha subunit (SUCLG1)	7,83	4,36	6,35	0,56	6,18	11,02
	NM_003848.	succinate-CoA ligase, GDP-forming, beta subunit (SUCLG2)	1,73	2,70	2,78	0,68	2,40	3,52
	NM_000143.	fumarate hydratase (FH), nuclear gene encoding mitochondrial protein	17,45	9,82	19,57	2,38	2,71	3,18
	NM_005917.	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble) (MDH1)	62,04	52,76	75,09	148,11	63,30	0,43
	NM_005918.	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial) (MDH2)	29,97	30,83	48,28	3,13	36,36	11,63
FOX COMPLEXO I	NM_004541.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 1, 75kDa (NDUFA1), nuclear gene encoding mitochondrial protein	113,24	103,26	113,14	128,23	109,88	0,86
	NM_002488.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 2, 8kDa (NDUFA2)	19,54	12,95	15,37	9,24	15,95	1,73
	NM_004542.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 3, 9kDa (NDUFA3)	25,42	59,82	86,33	71,16	57,19	0,80
	NM_002489.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4, 9kDa (NDUFA4), nuclear gene encoding mitochondrial protein	1,23	0,89	1,36	2,13	1,16	0,54
	NM_005000.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 5, 13kDa (NDUFA5), nuclear gene encoding mitochondrial protein	11,41	15,72	15,58	56,37	14,24	0,25
	NM_002490.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 6, 14kDa (NDUFA6)	38,08	33,48	44,01	62,20	38,52	0,62
	NM_005001.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 7, 145kDa (NDUFA7)	14,01	34,86	39,93	15,34	29,60	1,93
	NM_014222.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 8, 19kDa (NDUFA8), nuclear gene encoding mitochondrial protein	1,54	6,51	10,86	4,85	6,30	1,30
	NM_005000.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 9, 39kDa (NDUFA9), mRNA	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	NM_004544.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 10, 42kDa (NDUFA10), nuclear gene encoding mitochondrial protein	1,62	2,36	2,30	1,63	2,09	1,29
	NM_175614.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 11, 147kDa (NDUFA11)	0,59	1,06	0,86	0,53	0,84	1,58
	NM_016013.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, assembly factor 1 (NDUFAF1), mRNA	14,13	22,53	28,22	17,65	21,63	1,23
	NM_005003.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta subcomplex, 1, 8kDa (NDUFAB1)	52,64	38,45	48,27	30,27	46,45	1,53
	NM_004545.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 1, 7kDa (NDUFB1)	18,60	23,81	31,36	66,02	24,59	0,37
	NM_004546.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 2, 8kDa (NDUFB2), nuclear gene encoding mitochondrial protein	71,18	76,94	107,40	151,36	85,17	0,56
	NM_002491.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 3, 12kDa (NDUFB3)	1,15	1,03	1,58	1,02	1,25	1,23
	NM_002492.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 5, 16kDa (NDUFB5), nuclear gene encoding mitochondrial protein	26,95	19,96	33,35	5,25	26,75	5,10
	NM_182739.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 6, 17kDa (NDUFB6), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript va	9,47	9,75	10,58	8,67	9,93	1,15
	NM_005004.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 8, 19kDa (NDUFB8)	92,35	53,71	66,29	98,76	70,78	0,72
	NM_005005.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 9, 22kDa (NDUFB9)	79,80	70,40	106,62	61,81	85,61	1,38
	NM_004548.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 10, 22kDa (NDUFB10)	47,72	67,98	72,13	107,54	62,61	0,58
	NM_002494.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknow n, 1, 6kDa (NDUFC1)	37,79	20,42	30,83	21,59	29,68	1,37
	NM_004549.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknow n, 2, 145kDa (NDUFC2)	15,78	17,20	24,27	2,75	19,08	6,95
	NM_005006.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75kDa (NADH-coenzyme Q reductase) (NDUFS1), nuclear gene encoding mitochon	23,89	15,80	23,54	13,75	21,08	1,53
	NM_004550.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2, 49kDa (NADH-coenzyme Q reductase) (NDUFS2)	7,31	4,94	8,15	2,62	6,80	2,59
	NM_004551.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3, 30kDa (NADH-coenzyme Q reductase) (NDUFS3)	20,21	19,37	36,06	6,17	25,21	4,09
	NM_002495.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 4, 18kDa (NADH-coenzyme Q reductase) (NDUFS4)	31,11	36,25	41,14	16,43	36,16	2,20
	NM_004552.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 5, 15kDa (NADH-coenzyme Q reductase) (NDUFS5)	142,01	101,69	139,20	152,05	127,63	0,84
	NM_004553.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6, 13kDa (NADH-coenzyme Q reductase) (NDUFS6)	40,21	44,61	71,00	32,23	51,94	1,61
	NM_024407.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7, 20kDa (NADH-coenzyme Q reductase) (NDUFS7)	13,97	26,32	25,23	19,56	21,84	1,12
	NM_002496.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8, 23kDa (NADH-coenzyme Q reductase) (NDUFS8)	29,68	37,84	41,86	16,66	36,46	2,19
	NM_007103.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1, 51kDa (NDUFV1)	6,58	12,46	7,97	2,10	9,00	4,29
	NM_021074.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, 24kDa (NDUFV2)	58,90	44,64	63,64	10,83	55,73	5,15
	NM_021075.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 3, 10kDa (NDUFV3), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1	2,27	3,60	5,07	5,51	3,65	0,66

FOX II	NM_004168. succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp) (SDHA), nuclear gene encoding mitochondrial protein	20,08	31,69	50,83	45,51	34,20	0,75
	NM_003000. succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (b) (SDHB)	1,97	1,42	1,71	1,79	1,70	0,95
	NM_003001. succinate dehydrogenase complex, subunit C, integral membrane protein, 15kDa (SDHC), nuclear gene encoding mitochondrial protein	22,67	15,20	23,77	11,95	20,55	1,72
	NM_003002. succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein (SDHD), nuclear gene encoding mitochondrial protein	32,47	30,54	30,21	3,30	31,07	9,40
FOX III	NM_003366. ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II (UQCRC2)	28,75	45,59	54,70	31,02	43,01	1,39
	NM_006294. ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein (UQCRCB)	139,08	147,39	161,33	219,45	149,27	0,68
	NM_006004. ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein (UQCRCF)	120,35	86,93	124,88	111,39	110,72	0,99
	NM_006003. ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1 (UQCRCF1)	31,95	40,30	51,58	21,22	41,28	1,95
FOX III	NM_006830. ubiquinol-cytochrome c reductase (64kD) subunit (UQCRC)	8,21	7,48	10,69	7,21	8,79	1,22
	NM_013387. ubiquinol-cytochrome c reductase complex (72 kD) (HSPC051)	43,27	47,44	64,63	34,74	51,78	1,49
FOX COMPLEXO IV	NM_001861. cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1 (COX4I1)	40,65	43,96	52,75	9,68	45,79	4,73
	NM_032609. cytochrome c oxidase subunit IV isoform 2 (COX4I2), nuclear gene encoding mitochondrial protein	0,99	3,12	2,13	1,15	2,08	1,82
	NM_004255. cytochrome c oxidase subunit Va (COX5A), nuclear gene encoding mitochondrial protein	37,19	38,69	54,31	48,92	43,39	0,89
	NM_001862. cytochrome c oxidase subunit Vb (COX5B)	91,07	86,28	106,88	86,77	94,74	1,09
FOX COMPLEXO IV	NM_004373. cytochrome c oxidase subunit Vta polypeptide 1 (COX6A1), nuclear gene encoding mitochondrial protein	122,27	99,98	129,83	40,13	117,36	2,92
	NM_005205. cytochrome c oxidase subunit Vta polypeptide 2 (COX6A2), nuclear gene encoding mitochondrial protein	0,76	0,43	0,87	1,85	0,68	0,37
	NM_001863. cytochrome c oxidase subunit Vb (COX6B)	72,03	92,79	94,18	115,97	86,33	0,74
	NM_004374. cytochrome c oxidase subunit Vtc (COX6C)	8,24	7,31	8,95	17,46	8,17	0,47
FOX COMPLEXO IV	NM_001864. cytochrome c oxidase subunit Vta polypeptide 1 (muscle) (COX7A1)	4,93	8,83	12,90	30,28	8,89	0,29
	NM_001865. cytochrome c oxidase subunit Vta polypeptide 2 (liver) (COX7A2)	223,31	174,11	201,10	314,06	199,51	0,64
	NM_001866. cytochrome c oxidase subunit Vlb (COX7B), nuclear gene encoding mitochondrial protein	149,89	132,11	152,13	153,12	144,71	0,95
	NM_130902. cytochrome c oxidase subunit Vlb2 (COX7B2)	2,04	2,03	1,94	1,54	2,00	1,30
FOX COMPLEXO IV	NM_001867. cytochrome c oxidase subunit Vlc (COX7C), nuclear gene encoding mitochondrial protein	275,59	235,45	249,79	395,15	253,61	0,64
	NM_182971. cytochrome c oxidase subunit 8C (COX8C)	0,50	0,24	0,56	0,37	0,43	1,16
	NM_001303. COX10 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein, heme A: farnesyltransferase (yeast) (COX10), nuclear gene encoding mitochond	1,71	1,82	1,78	1,31	1,77	1,35
	NM_004375. COX11 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast) (COX11), nuclear gene encoding mitochondrial protein	23,93	12,73	27,19	23,02	21,28	0,92
FOX COMPLEXO IV	NM_004376. COX15 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast) (COX15), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript var	3,94	1,86	2,82	0,90	2,88	3,20
	NM_005694. COX17 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast) (COX17), nuclear gene encoding mitochondrial protein	57,34	32,89	36,88	23,39	42,37	1,81
FOX COMPLEXO V	NM_004046. ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1, cardiac muscle (ATP5A1), transcript variant 2, nuc	11,06	7,05	10,50	1,49	9,54	6,39
	NM_001696. ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide (ATP5B), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRN	66,26	66,88	74,33	15,91	69,16	4,35
	NM_005174. ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1 (ATP5C1), transcript variant 2, nuclear gene encoding	50,36	34,80	67,82	35,83	50,99	1,42
	NM_001687. ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit (ATP5D), transcript variant 1, nuclear gene encoding mitochond	8,06	17,52	24,67	8,35	16,75	2,01
FOX COMPLEXO V	NM_006886. ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit (ATP5E), nuclear gene encoding mitochondrial protein	314,10	337,51	355,83	162,68	335,81	2,06
	NM_001688. ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b, isoform 1 (ATP5F1)	116,16	115,39	137,81	35,63	123,12	3,46
	NM_005175. ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 1 (ATP5G1)	25,62	25,65	37,23	11,10	29,50	2,66
	NM_005176. ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 2 (ATP5G2)	174,00	173,11	186,63	141,38	177,91	1,26
FOX COMPLEXO V	NM_001689. ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9) isoform 3 (ATP5G3)	102,93	70,62	135,13	81,85	102,89	1,26
	NM_006356. ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d (ATP5H)	50,45	55,38	74,02	30,10	59,95	1,99
	NM_007100. ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit e (ATP5I)	33,85	23,45	31,51	46,08	29,60	0,64
	NM_001685. ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F6 (ATP5J), nuclear gene encoding mitochondrial protein	40,79	51,16	57,31	38,90	49,75	1,28
FOX COMPLEXO V	NM_004889. ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit f, isoform 2 (ATP5J2)	52,88	59,33	83,85	69,57	65,35	0,94
	NM_006476. ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit g (ATP5L)	19,18	21,18	25,14	15,11	21,83	1,45
	NM_001697. ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit (oligomycin sensitivity conferring protein) (ATP5O), nuclear gene e	25,05	34,75	41,00	18,96	33,60	1,77
	NM_015684. ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit s (factor B) (ATP5S)	1,16	1,25	1,32	0,70	1,24	1,78
FOX COMPLEXO V	NM_022745. ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1 (ATPAF1), mRNA	6,54	7,34	10,74	2,26	8,21	3,64
	NM_145691. ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2 (ATPAF2), nuclear gene encoding mitochondrial protein	1,73	2,05	2,10	0,20	1,96	9,86
nd: não determinado							

Anexo 6 – Curvas de sobrevida em relação à expressão relativa *TFAM*, *POLG*, *TFB1M*, *TFB2M* e número de cópias de DNAm

Anexo 7 – Curvas de sobrevida em relação à idade e sexo

Anexo 8 – Curvas de sobrevida de pacientes com GBM com idade ao diagnóstico igual ou abaixo de 50 anos

Anexo 9 – Curvas de sobrevida de coexpressão entre *TFAM* e *TFB1M*, *TFAM* e *TFB2M*, *TFB1M* e *POLG*, *TFB2M* e *POLG*, *TFB1M* e *TFB2M*

Anexo 10 – Curvas de sobrevida em relação ao número de cópias de DNAmT em relação a *TFAM*, *POLG*, *TFB1M* e *TFB2M*

Anexo 11 – Manuscrito submetido

Mitochondrial DNA depletion and its correlation with DEPLETION AND ITS *TFAM*, *TFB1M*, *TFB2M* and *POLG* in human diffusely infiltrating astrocytomas

Running title: Mitochondrial DNA depletion in astrocytomas

RL Correia, SM Oba-Shinjo, M Uno, N Huang and SKN Marie

Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Department of Neurology, School of Medicine, University of São Paulo. São Paulo, Brazil.

Correspondence: SKN Marie, Av Dr. Arnaldo, 455, 4th floor, room 4110, 01246-903, São Paulo, SP, Brazil.

e-mail: sknmarie@usp.br

Abstract

Mitochondrial dysfunction occurs in several degenerative diseases, aging and in cancer cells. Deregulation of mitochondrial DNA (mtDNA) content has been observed in a number of human malignancies. We analyzed mtDNA copy number and relative expression level of four genes involved in mitochondrial replication and transcription by quantitative real time PCR in different malignant grades of diffusely infiltrating astrocytoma (24 WHO grade II, 18 grade III, and 78 grade IV/ glioblastoma - GBM) compared to 19 non-neoplastic brain tissues (NN). A marked decrease of mtDNA copy number in parallel to the increase of malignancy was observed, being mostly depleted in GBM (relative expression averages in NN, GII, GIII and GBM of 1.28, 0.45, 0.42 and 0.17, respectively). High relative expression levels of genes that codes for mitochondrial transcription factors A (*TFAM*), B1 (*TFB1M*), B2 (*TFB2M*) and mitochondrial polymerase catalytic subunit (*POLG*) were detected in all astrocytoma samples. *POLG* expression was related to decreased mtDNA copy number ($R = -0.56$ and $p = 0.015$). Twenty five GBM patients with *TFAM* overexpression presented longer cumulative survival time than twenty five presenting hypoexpression ($p = 0.016$). Our results suggest that mtDNA depletion in infiltrative astrocytoma is not successfully reverted by enhancing the expression level of mtDNA main replication regulators. Nonetheless, overexpression of *TFAM* and *POLG* related to prognosis among GBM patients.

Keywords Mitochondrial DNA depletion; *TFAM*, *POLG*; astrocytomas.

Introduction

Mitochondrial mass and mitochondrial DNA (mtDNA) copy number in individual cell varies with tissue type. Internal or external factors associated with ATP demand such as exercise (Booth, 1991), hypoxia (Hoppeler *et al.*, 2003) and steroid hormones stimulation (Mattingly, 2008) may influence these parameters. Increased mitochondrial RNA in pre-malignant colon lesion was first reported in 1989 (Yamamoto *et al.*). Then, significantly elevated mtDNA copy number was demonstrated in endometrial adenocarcinoma (Wang *et al.*, 2005) and thyroid tumors (Mambo *et al.*, 2005) compared to respective normal tissue. In contrast, mtDNA copy number and mitochondrial respiratory proteins reduction were observed in hepatocellular (Yin *et al.*, 2004), ovarian (Wang *et al.*, 2006) and breast carcinoma (Yu *et al.*, 2007). In humans, mtDNA is copied by a 195kDa heterotrimer consisting on mitochondrial polymerase catalytic subunit- γ (p140 or POLG) and two identical accessory subunits (p55 or POLG2), and mitochondrial DNA directed-RNA polymerase (POLMRT) (Hudson and Chinnery, 2006). POLMRT forms a complex with two other mitochondrial transcription factors B paralogues, TFB1M and TFB2M, to recognize the promoter at D-loop region (Falkenberg *et al.*, 2007). The mitochondrial replication mechanism is not completely determined (Taylor and Turnbull, 2005), however, it has been accepted that the transcription of light-strand promoter (LSP) is required for the initiation of heavy-strand DNA replication at H-strand origin (O_H), which is assisted by mitochondrial transcription factor A (TFAM) (Shadel, 2008; Scarpulla, 2008). Knockdown of *TFAM* has been shown to cause mtDNA depletion in cultured cells (Pohjoismaki *et al.*, 2006), and *TFAM* overexpression in mouse resulted in increase of mtDNA copy number without increase of respiratory chain capacity or mitochondrial mass (Ekstrand *et al.*, 2004). In addition to this role in mtDNA replication, TFAM forms nucleoid structures to maintain the mtDNA integrity. Depletion of mtDNA might be regulated in a tissue-specific manner and it has been reported a strong correlation with cancer progression, being a potential tool to identify patients with poor prognosis (Simonnet *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008).

Astrocytoma arises from brain cells named astrocytes and presents different grades of malignancy according to the World Health Organization (WHO): grade I - pilocytic astrocytoma, grade II - low grade astrocytoma, grade III - anaplastic astrocytoma and grade IV - glioblastoma (GBM). Pilocytic astrocytoma is circumscribed, more benign in contrast to diffusely infiltrative astrocytomas (grade II to IV), being GBM the most malignant and common human brain tumor. (Louis *et al.*, 2007). The infiltrative characteristic of grade II to IV astrocytomas limits the extent of safe surgical resection, and they are often resistant to chemotherapeutic adjuvant therapy. Despite the cumulative efforts, GBM patients present the poorest prognosis and survival time restricted to one year in most of them (Mineo *et al.*, 2007).

The objective of the present study was to analyze the mtDNA copy number in diffusely infiltrating astrocytoma compared to non-neoplastic brain samples, correlate to gene expression levels of mitochondrial transcription factors A, B1, B2 and mitochondrial polymerase subunit- γ , and overall survival time.

Results

mtDNA copy number

The mtDNA copy number was significantly reduced in grades II to IV astrocytomas compared to non-neoplastic samples, and a decreasing step of the copy numbers according to the increase in malignancy was observed. GBM cases presented the lowest mean of mtDNA content compared to non-neoplastic brain tissue ($p < 0.0001$) (Figure 1). Two groups were detected among grade III astrocytoma: a group of seven cases presenting lower mtDNA copy number (average=0.031) and a group consisting of the remaining eleven cases (average=0.661). No significant difference on overall survival time was observed between these two groups ($p=0.95$).

Correlation of TFAM, TFB1M, TFB2M and POLG expression levels with the malignant grade of astrocytomas

The mean transcript levels of these key regulators of mtDNA copy number were significantly higher in all malignant grades of astrocytoma compared to non-neoplastic brain tissue, except for *TFB1M* and *TFB2M* to grade II astrocytomas (Figure 2). However, significant relative co-expression levels of those last was observed in the astrocytoma samples of all grades (grade II: $R=0.54$, $p=0.004$; grade III: $R=0.61$, $p=0.007$ and GBM: $R=0.25$, $p=0.03$). Also, *TFAM* directly related to *TFB2M* in grade II ($R=0.51$; $p=0.007$), GIII ($R=0.58$, $p=0.011$) and GBM ($R=0.34$, $p=0.0003$) and to *TFB1M* in grade II ($R=0.77$; $p < 0.0001$) and grade III ($R=0.52$; $p=0.025$) cases. Additionally, *POLG* relative expression levels correlated indirectly to mtDNA copy number in astrocytoma grade III ($R= -0.564$ and $p=0.015$), in contrast to the absence of correlation concerning the expression levels of the other three genes.

Survival time among GBM patients associated to mtDNA copy number and TFAM and POLG expression levels

The GBMs patients presented mean age of 53 years old, and a mean survival of 12 months. The overall survival time was shorter among patients presenting lesser mtDNA content. Thus, 52 out of 78 GBM patients who presented survival time within 12

months harbored lower mtDNA copy number than nine GBM with survival time above 24 months ($p=0.049$) (Figure 3). In addition, *TFAM* and *POLG* expression levels were significantly higher in GBM cases compared to non-neoplastic brain tissue samples ($p=0.01$; $p<0.0001$, respectively), and similarly it was higher among long time GBM survivors (more than 24 months) than short time GBM survivors (less than 12 months) ($p=0.037$; $p=0.034$, respectively) (Figure 3).

The survival time of these patients was analyzed by Kaplan-Meier curve subgrouping them in relation to the median of the relative expression levels of *TFAM* (1.39), *TFB1M* (1.80), *TFB2M* (1.46) and *POLG* (2.23). Increased *TFAM* and *POLG* expression was associated to longer overall survival time among GBM patients. Thus, twenty five GBM cases with high relative expression levels of both genes showed a median survival of 10 and 12 months, respectively, in contrast to 7 months survival time presented by 25 patients presenting low expression levels of *TFAM* and *POLG* ($p=0.025$, $p=0.006$) (Figure 4).

On contrast, no significant difference in cumulative survival has been detected among GBM patients when paralogues *TFB1M* and *TFB2M* median relative expression values ($p=0.45$; 0.94 ; respectively), or median mtDNA copy number ($p=0.98$) were considered. No significant differences were also observed when co-expression of *TFAM* and either *TFB1M* or *TFB2M* median expression values were analyzed in relation to survival time.

Discussion

A striking decrease in mtDNA content was observed in all grades of astrocytoma, being the lowest in the most malignant grade, GBM, in accordance to previous reports in other types of tumor as renal cancer (Selvanayagam & Rajaraman, 1996), hepatocellular carcinoma (Lee *et al.*, 2004, Yin *et al.*, 2004), and gastric cancer (Wu *et al.*, 2005). The additional correlation, the lesser mtDNA copy number the higher the grade of tumor, has also been reported in ovarian carcinoma (Wang *et al.*, 2006), breast cancer (Yu *et al.*, 2007), and particularly related to increased invasiveness in renal cancer (Simonnet *et al.*, 2002). Experiment with murine skeletal myoblast C2C12 *in vitro* has shown invasive phenotype and overexpression of tumor-specific markers as cathepsin L, transforming growth factor β in response to induced mtDNA depletion, providing further evidence of tumor progression and invasiveness associated to mtDNA depletion (Amuthan *et al.*, 2001).

To better understand the mechanism of mtDNA depletion we checked the expression level of the main genes participating in mtDNA replication and transcription. Interestingly, we found an inverse linear correlation of *POLG* expression to mtDNA content, suggesting that compensatory *POLG* overexpression was taking place in all malignant

grades of astrocytoma analyzed. This transcription is carried out by a mitochondrial RNA polymerase (POLRMT) assisted by TFAM, that recruits POLRMT to the promoter site, and by TFB1M and TFB2M, forming a complex. Transcription of mtDNA does not start in the absence of TFAM (Asin-Cayuela and Gustafsson, 2007). Additionally, TFAM binds non-specifically to entire mtDNA, forming nucleoid structures, to maintain and to preserve the mitochondrial genome (Kaufman *et al.*, 2007). The *TFAM* expression level was also increased in astrocytoma samples compared to non-neoplastic brain tissue ($p=0.017$), and furthermore, its expression correlated linearly with the other two transcription factors, *TFB1M* and *TFB2M*. A compensatory mechanism induced by the mtDNA depletion was also suggested at the transcriptional level of mtDNA. Moreover, the correlation of *TFAM* and *POLG* expressions among GBM patients to overall survival time suggests longer survival time when more efficient was the compensatory increase of both *TFAM* and *POLG* expressions were achieved. This speculation was based on the observation of higher relative expressions of both genes among GBM patients who survived more than 24 months.

In summary, our results corroborate that depletion of mtDNA in cancer cells may be responsible for further progression and /or play a role in tumorigenesis. Low mtDNA content was associated to higher malignancy. The causes of mtDNA depletion include mutation of the nuclear DNA, changes in microenvironment inducing imbalance of mitochondrial nucleotide pools, defects in mtDNA repair mechanism, and ROS generation, which should be addressed in next steps for better understanding of these findings in cancer progression.

Materials and Methods

Tissue samples

One hundred and twenty astrocytoma specimens were obtained during therapeutic surgical approach including 24 grade II, 18 grade III, 78 glioblastoma (GBM), and 19 non-neoplastic brain tissue from epilepsy surgeries of temporal lobectomy by the neurosurgery group of the Department of Neurology at Hospital das Clinicas, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. All tissue samples were immediately snap-frozen in liquid nitrogen upon resection, and informed consent was obtained from all patients. This project has the approval of the Ethical Committee of the institution.

DNA extraction

Frozen tissue DNA was extracted by the standard phenol/chloroform method. Purified samples were suspended in TE buffer and final concentrations were determined by spectrophotometry.

RNA extraction and synthesis of cDNA

Total RNA was extracted from tissues samples using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) or RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany). Synthesis of cDNA was performed using Super Script III (Invitrogen) according to the manufacturer's specifications and concentrations were determined by spectrophotometry.

The mitochondrial DNA copy number quantification

A single copy gene, hemoglobin beta (*HBB*) was used as reference to determine the status of mtDNA by Power SYBR Green quantitative real time PCR (QT-PCR) on ABI Prism 7500 sequence detector (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primer sequences at a final concentration of 400-600nM were as follows (5'-3'): mtDNA F: TGATGGCTAGGGTGAAGTTCAT mtDNA R: CCTAGCCGTTTACTCAATCCT; *HBB* F: GTGAAGGCTCATGGCAAGA and *HBB* R: AGCTCACTCAGGTGTGGCAAAG (IDT, Coralville, IA). The cycle conditions were 10min period of polymerase activation at 95°C, 40 cycles at 95 °C for 15s, and 60°C for 1min. All assays were done in duplicate and eventually repeated when standard deviation was above 0.4.

Gene expression

Quantitative data were also carried out by QT-PCR and normalized relative to the geometric mean of 3 housekeeping genes: hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT*) glucuronidase beta (*GUSB*), and ATP-binding cassette transporter G2 (*BCRP*). The equation $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was applied to calculate the relative genes expression levels (Livak & Schmittgen, 2001). The primers were designed to amplify 80-150 bp length amplicons, with a melting temperature of 60°C and synthesized by IDT as follows (5' to 3'); *TFAM* F:CTCCCCCTTCAGTTTTGTGT, *TFAM* R: GCATCGGG-TTCTGAGCTTT; *TFB1M* F: ATGGCTCAGTACCTCTGCAATG, *TFB1M* R: TGGGCTGTATCAAGGGAGTGA ; *TFB2M* F: ATCCCGGAAATCCAGACTTGT, *TFB2M* R: GACCAAGGCTCCATGTGCA; *POLG* F: AGAGTTTATGACCAGCCGTGTGA; *POLG* R: CAAACTCTTCAAACAGCCACTTCA; *HPRT* F: TGAGGATTTGGAAAGGGTGT, *HPRT* R: GAGCACACAGAGGGCTACAA; *GUSB* F: GAAAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT , *GUSB* R: CCGAGTGAAGATCCCCTTTTAA; *BCRP* F: CCTTCGACGTCAATAACAAGGAT *BCRP* R: CCTGCGATGGCGTTTAC. PCR was carried out as follows: 5 min at 50°C, 10 min at 95°C, 40 cycles at 95°C for 15s, and 60°C for 1 min. All assays were done in duplicate and eventually repeated when standard deviation was above 0.4. The results are presented in boxplot graph type.

Statistical analysis

The non parametric tests were Kruskal-Wallis, Dunn and Spearman correlation once GBM samples have no normal distribution in all tested groups. The survival plot was acquired by Kaplan-Meier test. All the statistical analysis was performed by SSPS, version

15.0 (Chicago, IL, USA). Differences were considered to be statistically significant at $p < 0.05$.

Conflict of interest

There is no competing financial interests in relation to the work described.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) and tumor tissues bank by Genome Clinic Project supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP process #04/12133-6, SP) and Ludwig Cancer Institute (São Paulo, SP). We sincerely thank Paulo Henrique Aguiar, Hector Navarro, Clemar Correa, Manoel Jacobsen Teixeira and residents of the Tumores Encefálicos e Metástases Group of the Divisão de Clínica Neurocirúrgica do Instituto Central do Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP for the therapeutical and diagnosis procedures of all patients included in this work.

References

- Amuthan G, Biswas G, Zhang SY, Klein-Szanto A, Vijayasarathy C, Avadhani NG. (2001). Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *The EMBO J.* **20**: 1910-1920.
- Asin-Cayuela J, Gustafsson CM. (2007). Mitochondrial transcription and its regulation in mammalian cells. *Trends Biochem Sci.* **32**: 111-117.
- Booth FW. (1991). Cytochrome c protein synthesis rate in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol.* **71**: 1225-1230.
- Ekstrand MI, Falkenberg M, Rantanen A, Park CB, Gaspari M, Hultenby K, *et al.* (2004). Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Human Mol Genet.* **13**: 935–944.
- Falkenberg M, Larsson NG, Gustafsson CM. (2007). DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**: 679–699.
- Hoppeler H, Voegt M, Weibel ER, Flück. (2003). Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia. *Exp. Physiol.* **88**: 109-119.

Hudson G, Chinnery PF. (2006). Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease. *Hum Mol Genet.* **15**: 244-252.

Kaufman BA, Durisic N, Mativetsky JN, *et al.* (2007). The Mitochondrial Transcription Factor TFAM Coordinates the Assembly of Multiple DNA Molecules into Nucleoid-like Structures. *Mol Biol Cell.* **18**: 3225–3236.

Lee JD, Yun M, Lee JM, Choi Y, Choi YH, Kim JS, *et al.* (2004). Analysis of gene expression profiles of hepatocellular carcinomas with regard to 18F-fluorodeoxyglucose uptake pattern on positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **31**: 1621-1630.

Lin PC, Lin JK, Yang SH, Wang HS, Li AFY, Chang SC. (2008). Expression of beta-F1-ATPase and mitochondrial transcription factor A and the change in mitochondrial content in colorectal cancer: clinical data analysis and evidence from an in vitro study. *Int J Colorectal Dis.* **23**: 1223-1232.

Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods.* **25**: 402– 408.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, *et al.* (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **114**: 97-109.

Mambo E, Chatterjee A, Xing M, Tallini G, Haugen BR, Yeung SC, *et al.* (2005). Tumor-specific changes in mtDNA content in human cancer. *Int J Cancer.* **116**: 920-924.

Marie SKN, Okamoto OK, Uno M, Hasegawa APG, Oba-Shinjo SM, Cohen T, *et al.* (2008). Maternal embryonic leucine zipper kinase transcript abundance correlates with malignancy grade in human astrocytomas. *Int J Cancer.* **122**: 807-815.

Mattingly KA, Ivanova MM, Riggs KA, Wickramasinghe NS, Barch MJ, Klinge CM. (2008). Estradiol stimulates transcription of nuclear respiratory factor-1 and increases mitochondrial biogenesis. *Mol Endocrinol.* **22**: 609-622.

Mineo JF, Bordron A, Baroncini M, Ramirez C, Maurage CA, Blond S, *et al.* (2007). Prognosis factors of survival time in patients with glioblastoma multiforme: a multivariate analysis of 340 patients. *Acta Neurochir (Wien).* **149**: 245-252.

Pohjoismäki JL, Wanrooij S, Hyvärinen AK, Goffart S, Holt IJ, Spelbrink JN, *et al.* (2006). Alterations to the expression level of mitochondrial transcription factor A, TFAM, modify the mode of mitochondrial DNA replication in cultured human cells. *Nucleic Acids Res.* **34**: 5815-5828.

Scarpulla RS. (2008). Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev.* **88**: 611-638,

Selvanayagam P and Rajaraman S. (1996). Detection of mitochondrial genome depletion by a novel cDNA in renal cell carcinoma. *Lab Invest.* **74**: 592-599.

Shadel GS. (2008). Expression and maintenance of mitochondrial DNA. *Am J Pathol.* **172**: 1445-1456.

Simonnet H, Alazard N, Pfeiffer K, Gallou C, Beroud C, Demont J, *et al.* (2002). Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis.* **23**: 759–768.

Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. (2005). *Nat. Genet.* **6**: 389-402.

Wang Y, Liu VWS, Xue WC, Tsang PCK, Cheung ANY, Ngan HYS. (2005). The increase of mitochondrial DNA content in endometrial adenocarcinoma cells: A quantitative study using laser-captured microdissected tissues. *Gynecol Oncol.* **98**: 104 – 110.

Wang Y, Liu VWS, Xue WC, Cheung ANY, Ngan HYS. (2006). Association of decreased mitochondrial DNA content with ovarian cancer progression. *Br J Cancer.* **95**: 1087-1091.

Wu CW, Yin PH, Hung WY, Li AF, Li SH, Chi CW, *et al.* (2005) Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in gastric cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* **44**: 19-28.

Yamada S, Nomoto S, Fujii T, Kaneko T, Takeda S, Inoue S, *et al.* (2006). Correlation between copy number of mitochondrial DNA and clinico-pathologic parameters of hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol.* **32**: 303-307.

Yamamoto J, Matsumoto K, Furuya T. (1989). Lymphangioma of the ascending colon. *Clin Gastroenterol.* **11**: 598-599.

Yin PH, Lee HC, Chau GY, Wu YT, Li SH, Lui WY, *et al.* (2004). Alteration of the copy

number and deletion of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. **90**: 2390-2396.

Yu M, Zhou Y, Shi Y, Ning L, Yang Y, Wei X, *et al.* (2007). Reduced mitochondrial DNA copy number is correlated with tumor progression and prognosis in chinese breast cancer patients. *IUBMB Life*. **59**: 450-457.

Figure Legends

Figure 1 Relative mtDNA copy number in diffusely infiltrative astrocytomas compared to non neoplastic brain tissues. A single copy gene, hemoglobin beta (*HBB*) was used as reference to calculate the relative *mtDNA* copy number by the equation $2^{-\Delta\Delta C_t}$. The horizontal bars show mtDNA copy number median of non neoplastic (NN) (1.26), grade II astrocytoma (GII) (0.33), grade III astrocytoma (GIII) (0.35) and glioblastoma (GBM) (0.12). The differences between groups were statistically significant *** $p < 0.0001$. Tissue samples, DNA extraction and all quantitative real time PCR (QT-PCR) assays were done as previously described (Marie *et al.*, 2008).

Figure 2 The relative expression level mean values of *TFAM*, *POLG*, *TFB1M* and *TFB2M* in tumoral and non neoplastic brain tissues are 1.96; 1.88; 1.22; 0.97 in GII; 2.31; 2.49; 1.89; 2.03 in AGIII and 1.69; 2.63; 2.19; 1.92 in GBM, respectively. Total RNA from the same diffusely infiltrative astrocytomas samples (GII, GIII and GBM) described for the mtDNA quantification and NN tissues were reverse transcribed and cDNA were analyzed by RQ-PCR. Expression levels ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) were calculated of each sample based on geometric mean of *HPRT*, *GUSB* and *BCRP* housekeeping genes. The p value difference of expression level of genes between all groups are: 0.0002 for *TFAM*, 0.0004 for *TFB2M* and < 0.0001 for *POLG* and *TFB1M* transcription levels.

Figure 3 Comparison of mtDNA copy number and relative expression levels of *TFAM* and *POLG* between three groups: non-neoplastic brain tissues (NN; N=19); GBM patients with survival time shorter than 12 months (<12m; N=52) and GBM patients with survival time longer than 24 months (>24m; N=9). The mean values among these groups for mtDNA copy number, *TFAM* and *POLG* were 1.28, 0.16, 0.27; 1.00, 1.65, 1.97 and 0.86, 2.21, 3.10, respectively. The differences between groups in relation of mtDNA copy number were statistically significant: *** $p < 0.0006$ (NN *versus* GBM <12 months and NN *versus* GBM > 24 months) * $p = 0.049$ (GBM <12 months *versus* GBM > 24 months), for relative expression levels of *TFAM*: *** $p = 0.0003$ (NN *versus* GBM>24 months), * $p = 0.019$ (NN *versus* GBM<12months) and * $p = 0.037$ (GBM <12 months *versus* GBM >24 months) and for relative expression levels of *POLG*: *** $p < 0.0001$ (NN *versus* GBM>24 months and GBM<12months)

and $*p=0.034$ (GBM <12 months *versus* GBM >24 months).

Figure 4 Survival time of fifty GBM patients concerning *TFAM* and *POLG* relative expression levels (25 high expressions *versus* 25 low expressions). Survival was calculated by the Kaplan-Meier method, and comparison between study groups was performed with the *log-rank* test. The difference of survival between the two groups were statistically significant ($p=0.025$ and $p=0.006$, respectively) presenting median survival time differences of 3 and 5 months, respectively for hiperexpression and hypoexpression groups.

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

REFERÊNCIAS

- Achanta G, Sasaki R, Feng, Li, Carew JS, Lu W; Pelicano H, Keating MJ, Huang P. Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma. *Embo J*. 2005; 24:3482-3492.
- Alirol E & Martinou JC. Mitochondria and cancer: is there a morphological connection? *Oncogene*, 2006; 25:4706-4716.
- Amuthan, G; Biswas, G; Zhang, S-Y; Klein-Szanto, A; Vijayasarathy, C e Avadhani, NG. Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *The EMBO J*. 2001; 20: 1910-1920.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981; 290:457-65.
- Ashrafian H. Cancer's sweet tooth: the Janus effect of glucose metabolims in tumorigenesis. *Lancet*. 2006; 367:618-23.
- Asin-Cayuela J and Gustafsson CM. Mitochondrial transcription and its regulation in mammalian cells. *Trends Biochem Sci*. 2007; 32:111-117.
- Augenlicht LH & Heerdt BG. Mitochondria: integrators in tumorigenesis? *Nat Genet*. 2001; 28:104-105.
- Bornstein B, Area E, Flanigan KM, Ganesh J, Jayakar P, Swoboda KJ, Coku J, Naini A, Shanske S, Tanji K, Hirano M, DiMauro S. Mitochondrial DNA depletion syndrome due to mutations in the RRM2B gene. *Neuromuscul Disord*. 2008; 18:453-459.
- Bourdon A, Minai L, Serre V, Jais JP, Sarzi E, Aubert S, Chrétien D, de Lonlay P, Paquis-Flucklinger V, Arakawa H, Nakamura Y, Munnich A, Rötig A. Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet*. 2007; 39:776-780.
- Bowmaker M, Yang YM, Yasukawa T, Reyes A, Jacobs HT, Huberman JA, Holt IJ. Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J Biol Chem*. 2003; 278:50961-50969.
- Brizel, DM; Schroeder, T; Scher, RL; Walenta, S; Clough, RW; Dewhirst, MW; Klierer, WM. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastase in head-and-neck cancer. 42nd Annual meeting of the American Society of Therapeutic Radiology and Oncology. 2001 Outubro, Boston, MA, EUA.

- Brown TA & Clayton DA. Release of replication termination controls mitochondrial DNA copy number after depletion with 2',3'-dideoxycytidine. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30:2004-2010.
- Bucay AH. The biological significance of cancer: Mitochondria as a cause of cancer and the inhibition of glycolysis with citrate as a cancer treatment. *Med Hypotheses.* 2007; 69:826-828.
- Cheng WC; Berman SB; Ivanovska I; Jonas EA; Lee SJ; Chen Y; Kaczmarek, LK; Pineda F; Hardwick JM. Mitochondrial factors with dual roles in death and survival. *Oncogene.* 2006; 25:4697-4705.
- Chinnery PF; Howell N; Lightowlers RN. Molecular pathology of MELAS and MERF. The relationship between mutation load and clinical phenotypes. *Brain.* 1997; 120:1713-1721.
- Chinnery PF & Schon EA. Mitochondria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003; 74:1188-1199.
- Choi Y-S, Hong J-M, Lim S, Ko KS, Pak, YK. Impaired peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 α (PGC-1 α) on mitochondrial transcription factor A (Tfam) promoter. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 344:708-712.
- Clayton DA. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu Rev Cell Biol.* 1991; 7:453-78.
- Collins VP. Brain tumors: classification and genes. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2004; 75:ii2-ii11.
- Cormio A, Guerra F, Cormio G, Pesce V, Fracasso F, Loizzi V, Cantatore P, Selvaggi L, Gadaleta MN. The PGC-1 α - dependent pathway of mitochondrial biogenesis is upregulated in type I endometrial cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 390:1182-1185.
- Cotney J, Wang Z, Shadel GS. Relative abundance of the human mitochondrial transcription system and distinct roles for h-mtTFB1 and h-mtTFB2 in mitochondrial biogenesis and gene expression. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35:4042-4054.
- Cuezva JM; Krajewska M; Heredia ML; Krajewski S; Santamaria G; Kim,H; Zapata,JM; Marusawa, Chamorro M; Reed JC. The bioenergetic signature of cancer: A marker of tumor progression. *Cancer Res.* 2002; 62:6674-6681.
- Dang CV & Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci.* 1999, 24:68-72.

- Deng ZL, Xie DW, Bostick RM, Miao XJ, Gong YL, Zhang JH, Wargovich MJ. Novel genetic variations of the p53R2 gene in patients with colorectal adenoma and controls. *World J Gastroenterol*. 2005; 33:5169-5173.
- D'Errico I, Dinardo MM, Capozzi O, De Virgilio C, Gadaleta G. History of the Tfam gene in primates. *Gene*. 2005; 362:125-32.
- Droge W. Free radicals in the physiology control of cell function. *Physiol Rev*. 2002; 82:47-95.
- Ekstrand M.I; Falkenberg M; Rantanen A; Park C.B; Gaspari M; Hultenby K; Rustin P; Gustafsson C.M; Larsson NG. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum Mol Genet*. 2004; 13:935–944.
- Falkenberg M; Gaspari M; Rantanen A; Trifunovic A; Larsson NG; Gustafsson CM. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet*. 2002; 31:289-294.
- Falkenberg M, Larsson NG, Gustafsson CM. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu. Rev. Biochem*. 2007; 76:679–699.
- Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Fantin, Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Res*. 2006; 9:425-34.
- Felipo V; Butterworth RF. Mitochondrial dysfunction in acute hyperammonemia. *Neurochem Int*. 2002; 40: 487-491.
- Feron, O. Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother Oncol*. 2009, 92:329-333.
- Ferreira, CP. *Bioquímica Básica*. São Paulo: MNP 5ª ed, rev. e ampl.; 2003.
- Gaspari M; Larsson NG; Gustafsson CM. *The transcription machinery in mammalian mitochondria*. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1654:148-152.
- Gatenby RA & Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature*. 2004; 4:891-899.
- Gatenby RA & Gillies RJ. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nature*. 2008; 8:56-61.
- Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol*. 2005; 25:1354-1366.

- Graham TE, Sgro V, Friars D, Gibala MJ. Glutamate ingestion: the plasma and muscle free amino acid pools of resting humans. *Am J Endocrinol Metab.* 2000; 278:83-89.
- Gundersen HJG & Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J. Microsc.* 1987, 147:229-263.
- Gundersen HJG; Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A and West MJ. The new stereological tools: disector, fractionators, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scan (APMIS)* 1988; 96:857-881.
- Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009; 324:1029-1033.
- Higuchi M. Regulation of mitochondrial DNA content and cancer. *Mitochondrion.* 2007; 7:53-57.
- Huang, N. Análise quantitativa de DNA mitocondrial em astrocitomas difusos e a sua correlação com o prognóstico [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005; 233p.
- Hudson G, Chinnery PF. Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease. *Hum Mol Genet.* 2006; 15:244-252.
- Johnston LA. Competitive interactions between cells: death, growth, and geography. *Science.* 2009; 324:1679-1682.
- Junqueira LC & Carneiro J. Histologia básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 8ªed, 1995. p.63-76.
- Kagan J & Srivastava S. Mitochondria as a target for early detection and diagnosis of cancer. *Clinical Laboratory Sciences.* 2005; 42:453-472.
- Kanki T, Ohgaki K, Gaspari M, Gustafsson CM, Fukuoh A, Sasaki N, Hamasaki N, Kang D. Architectural role of mitochondrial transcription factor A in maintenance of human mitochondrial DNA. *Mol Cell Biol.* 2004; 22:9823-9834.
- Kaufman BA, Durisic N, Mativetsky JN. The Mitochondrial transcription factor TFAM Coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures. *Mol Biol Cell.* 2007; 18:3225-3236.
- Kersting C, Tidow N, Schmidt H, Liedtke C, Neumann J, Boecker W, van Diest PJ, Brandt B, Buerger H. Gene dosage PCR and fluorescence in situ hybridization reveal low frequency of egfr amplifications despite protein overexpression in invasive breast carcinoma. *Lab Invest.* 2004; 84:582-7.

- Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW, Span PN. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest*. 2005; 85:154-159.
- Koolman J & Röhm, K-H. Color atlas of biochemistry. Nova York; 1996. p.435.
- Kroemer G. Mitochondria in cancer. *Oncogene*. 2006; 25:4630-4632.
- Kunkel M, Reichert TE, Benz P, Lehr HA, Jeong JH, Wieand S, Bartenstein P, Wagner W, Whiteside TL. Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2003; 97:1015–1024.
- LaNoue KF & Schoolwerth AC. Metabolite transport in mitochondria. *Annu Rev Biochem*. 1979; 48:871-922.
- Lee JD, Yun M, Lee JM, Choi Y, Choi YH, Kim JS, et al. Analysis of gene expression profiles of hepatocellular carcinomas with regard to 18F-fluorodeoxyglucose uptake pattern on positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004; 31:1621-30
- Lee C, Lee S, Shin SG, Hwang S. Real-time PCR determination of rRNA gene copy number: absolute and relative quantification assays with Escherichia coli. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008; 78:371-376.
- Lehninger AL; Nelson DL; Cox MM. *Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 2a Ed; 1995.
- Livak KJ & Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) method. *Methods*. 2001; 25:402-408.
- López-Ríos F. Sánchez-Aragós M, García-García, E, Ortega, AD, Berrendero, JR, Pozo-Rodríguez, F, López-Encuentra A, Ballestín C e Cuezva, JM. Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avity of carcinomas. *Cancer Res*. 2007; 67:9013-9017.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007, 114:97-109.
- Louis DN; Ohgaki H; Wiestler OD; Cavenee WK. WHO Classification of tumors of the central nervous system, Lyon: IARC Press. 2007; p1-52.
- Madsen CS, Ghivizzani SC, Hauswirth WW. Protein binding to a single termination-associated sequence in the mitochondrial DNA D-loop region. *Mol Cell Biol*. 1993; 13:2162-2171.

- Mambo E, Chatterjee A, Xing M, Tallini G, Haugen BR, Yeung SC, Sukumar S, Sidransky D. Tumor-specific changes in mtDNA content in human cancer. *Int J Cancer*. 2005; 116:920-924.
- Maniura-Weber K, Goffart S, Garstka HL, Montoya J, Wiesner RJ. Transiente overexpression of mitochondrial transcription factor A (Tfam) is sufficient to stimulate mitochondrial DNA transcription, but not sufficient to increase mtDNA copy number in cultured cells. *Nucleic Acid. Res*. 2004; 32:6015-6027.
- Marie SKN, Okamoto OK, Uno M, Hasegawa APG, Oba-Shinjo SM, Cohen T, Camargo AA, Kosoy A, Carlotti Jr. CG Toledo, S, Moreira-Filho CA, Zago MA, Simpson AJ, Caballero OL. Maternal embryonic leucine zipper kinase transcript abundance correlates with malignancy grade in human astrocytomas. *Int. J. Cancer*. 2008; 122: 807-815.
- Mathupala SP, Rempel A & Pedersen PL. Glucose catabolism in cancer cells. *J Biol Chem*. 2001; 276:43407-43412.
- McIntosh JR. Eletron microscopy of cells: A new beginning for a new century. *J Cell Biol*. 2001, 153: F25-F32.
- Mineo JF, Bordron A, Baroncini M, Ramirez C, Maurage CA, Blond S e Dam-Hieu P. Prognosis factors of survival time in patients with glioblastoma multiforme: a multivariate analysis of 340 patients. *Acta Neurochir (Wien)*. 2007; 149(3):245-52.
- Nakamura H, Dan S, Akashi T, Unno, M, Yamori T. Absolute quantification of four isoforms of the class I phosphoinositide-3-kinase catalytic subunit by real-time RT-PCR. *Biol Pharm Bull*. 2007; 30:1181-1184.
- Nelson DL & Cox MM. Lehninger Principles of biochemistry. Nova York: Worth Publishers 3^aed, 2000.
- Oba-Shinjo SM, Bengtson MH, Winnischofe SMB, Colin C, Vedoy CG; Mendonça, Z, Marie SKN, Sogayar, MC. Identification of novel differentially expressed genes in human astrocytomas by cDNA representational difference analysis. *Mol Brain Res*. 2005; 140:25-33.
- Ohgaki H. Epidemiology of brain tumors. *Methods Mol Biol*. 2009; 472:323-42.
- Ohgaki H & Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am. J Pathol*, 2007; 170:1445-1453.
- Osthus RC, Shim H, Kim S, Qing L, Reddy R, Mukherjeei M, Xui Y, Wonsey D, Lee LA, Dang CV. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem*. 2000; 275:21797–21800.

- Oudard S, Carpentier A, Banu E, Fauchon F, Celerier D, Poupon MF, Dutrillaux B, Andrieu JM, Delattre JY. Phase II study of lonidamine and diazepam in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *Neurooncol.* 2003; 63:81-86.
- Pathania D, Millard M, Neamati N. Opportunities in discovery and delivery of anticancer drugs targeting mitochondria and cancer cell metabolism. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009; 61:1250-1275.
- Pastukh V, Shokolenko I, Wang B, Wilson G, Alexeyev M. Human mitochondrial transcription factor A possesses multiple subcellular targeting signals. *FEBS Journal.* 2007; 274: 6488-6499.
- Pelicano H; Martin, DS, Xu RH, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene.* 2006; 25:4633-4646.
- Penta JS; Johnson FM, Wachsman, JT, Copeland WC. Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat Res.* 2001; 488:119-133.
- Pfaffi MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res.* 2001; 29:2004-2007.
- Piantadosi CA & Suliman HB. Mitochondrial transcription factor A induction by redox activation of nuclear respiratory factor 1. *J Biol Chem.* 2006; 281:324-333.
- Pogozelski WK, Hamel CJC, Woeller CF; Jackson WE, Zullo SJ, Fischel-Ghodsian N, Blakely WF. Quantification of total mitochondrial DNA and the 4977-bp common deletion in Pearson's syndrome lymphoblasts using a fluorogenic 5'-nuclease (TaqMan) real-time polymerase chain reaction assay and plasmid external calibration standards. *Mitochondrion.* 2003; 2:415-427.
- Pohjoismäki JL, Wanrooij S, Hyvärinen AK, Goffart S, Holt IJ, Spelbrink JN, Jacobs HT. Alterations to the expression level of mitochondrial transcription factor A, TFAM, modify the mode of mitochondrial DNA replication in cultured human cells. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34:5815-5828
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. *Biologia vegetal.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 5^aed, 1996. p.1-89.
- Ristow M. Oxidative metabolism in cancer growth. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006; 9:339-345.
- Rivenzon-Segal D, Boldin-Adamsky S, Seger D, Seger R, Degani H. Glycolysis and glucose transporter 1 as markers of response to hormonal therapy in breast cancer. *Int J. Cancer,* 2003; 107:177-182.
- Robey RB, Hay N. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene.* 2006, 34:4683-96.

- Rossignol R, Glikerson R, Aggeler, R. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.* 2004; 64:985-993.
- Rouleau C, Rakotoarivelo C, Petite D, Lambert K, Fabre C, Bonardet A, Mercier J, Baldet P, Privat A, Langley K e Mersel M. Piruvate modifies glycolytic and oxidative metabolism of rat embryonic spinal cord astrocyte cell lines and prevents their spontaneous transformation. *J Neurochem.* 2007, 100:1589-1598.
- Samudio I, Fiegl, M Andreeff, M. Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer Res.* 2009; 69:2163-2165.
- Savagner F, Mirebeau D, Jacques C, Guyetant S, Morgan C, Franc B, Reynier P, Malthiery Y. PGC-1-related coactivator and targets are upregulated in thyroid oncocyoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 310:779-784.
- Scarpulla RS. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev.* 2008; 88:611-638.
- Schapira, AHV. Human complex I defects in neurodegenerative disorders. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1364:260-70.
- Schapira, AHV. Mitochondrial disorders. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1410:99-102.
- Scrideli CA, Carlotti Jr CG, Okamoto OK, Andrade VS, Cortez MAA, Motta, FJN, Lucio-Eterovic AK, Neder L, Rosemberg S, Oba-Shinjo SM, Marie SKN, Tone LG. Gene expression profile analysis of primary glioblastomas and non-neoplastic brain tissue: identification of potential target genes by oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. *J Neurooncol.* 2008; 88:281-291.
- Selak MA; Armour SM, MacKenzie ED, Boulabail H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB, Gottlieb E. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell.* 2005; 7:77-86.
- Selvanayagam P, Rajaraman S. Detection of mitochondrial genome depletion by a novel cDNA in renal cell carcinoma. *Lab Invest.* 1996; 74:592-9.
- Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends in Mol Med.* 2002; 8:62-66.
- Servidei S. Mitochondrial encephalomyopathies. *Gene Mutation Neuromuscul Disord.* 2003; 13:109-114.
- Shadel GS & Clayton DA. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem.* 1997; 66:409-35.

- Shadel GS. Expression and maintenance of mitochondrial DNA. *Am J Pathol.* 2008; 172:1445-1456.
- Shirahata M, Iwao-Koizumi K, Saito S, Ueno N, Oda M, Hashimoto N, Takahashi JA, Kato K. Gene expression-based molecular diagnostic system for malignant gliomas is superior to histological diagnosis. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:7341-56.
- Shoubridge EA. Nuclear Genetic Defects of oxidative phosphorylation. *Hum Mol Genet.* 2001; 10:2277-2284.
- Simonnet, H, Alazard N, Pfeiffer K, Gallou C, Beroud C, Demont, J, Bouvier R, Schagger, Godinot C. Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 2002; 23: 759-768.
- Singh KK, Avyasamy V, Owens K, Koul MS e Vujcic, M. Mutations in mitochondrial DNA polymerase γ promotes breast tumorigenesis. *J Hum Genet.* 2009, 54:516-524.
- Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci.* 2005; 10:1881-1896.
- Szutowicz A, Kwiatkowski J, Angielski S Lipogenetic and glycolytic enzyme activities in carcinoma and nonmalignant diseases of the human breast. *Br J Cancer.* 1979; 39:681-87.
- Taanman JW, Rahman S, Pagnamenta AT, Morris AA, Bitner-Glindzicz M, Wolf NI, Leonard JV, Clayton PT, Schapira AH. Analysis of mutant DNA polymerase gamma in patients with mitochondrial DNA depletion. *Hum Mutat.* 2009; 30:248-254.
- Taylor RW & Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature.* 2005; 6:389-402.
- Toyokuni S. Persistent oxidative stress in cancer. *Febs Lett.* 1995; 358:1-3.
- Uno M, Oba-Shinjo SM, Aguiar PH, Leite CC, Rosemberg S, Miura FK, Junior RM, Scaffa M, Marie SKN. Detection of somatic TP53 splice site mutations in diffuse astrocytomas. *Cancer Letters.* 2005; 224:321-327.
- Valente V, Teixeira SA, Neder L, Oswaldo OK, Oba-Shinjo SM, Marie, SKN, Scrideli CA, Paçó-Larson ML, Carlotti Jr. CG. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Molecular Biology*, 2009; 10:17-28.

- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3:34-46.
- Verma M, Naviaux RK, Tanaka M, Kumar D, Franceschi C, Singh KK. Meeting Report: mitochondrial DNA and cancer epidemiology. *Cancer Res.* 2007; 2:437-439.
- Voet D, Voet J, Pratt CW. Fundamentos de Bioquímica. Porto Alegre: Artmed, 2000. 931p.
- Wallace, DC. Mitochondrial DNA in aging and disease. *Sci Am.* 1997; 277: 40-47.
- Wallace, DC. Mitochondrial disease in man and mouse. *Science.* 1999; 283:1482-1487.
- Wang Y, Liu VWS, Xue WC, Cheung ANY, Ngan HYS. Association of decreased mitochondrial DNA content with ovarian cancer progression. *Br J Cancer.* 2006; 95:1087-1091.
- Wang X, Perez E, Liu R, Yan L-J, Mallet RT, Yang SH. Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N_SH cells. *Brain Res.* 2007; 1132:1-9.
- Warburg O, et al. The metabolism of tumors. *Biochem Z.* 1924; 152:319.
- Wei Y-H. Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1998; 217:53-63.
- Wiesinger, H; Hamprecht, B; Dringen, R. Metabolic pathways for glucose in astrocytes. *Glia* 1997; 21:22-34
- Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang XY, Pfeiffer HK;, Nissim I, Daikhin E, Yudkoff M, McMahon SB, Thompson CB. *Myc* regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 2008; 105:18782-18787.
- Wu CW, Yin PH, Hung WY, Li AF, Li SH, Chi CW, et al. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in gastric cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2005, 44:19-28.
- Yamada S, Nomoto S, Fujii T, Kaneko T, Takeda S, Inoue S, Kanazumi N, Nakao A. Correlation between copy number of mitochondrial DNA and clinico-pathologic parameters of hepatocellular carcinoma. *EJSO.* 2006; 32:303-307.
- Yamamoto J, Matsumoto K, Furuya T. Lymphangioma of the ascending colon. *Clin Gastroenterol.* 1989, 11: 598-599.

- Yarian CS, Toroser D, Sohal RS. Aconitase is the main functional target of aging in the citric acid cycle of kidney from mice. *Mech Ageing Dev.* 2006; 127:79-84.
- Yeluri S, Madhok B, Prasad KR, Quirke P, Jayne DG. Cancer's craving for sugar: an opportunity for clinical exploitation. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009, 135:867-877.
- Yin D, Ogawa S, Kawamata N, Tunici P, Finocchiaro G, Eoli M, Ruckert C, Huynh T, Liu G, Kato M, Sanada M, Jauch A, Dugas M, Black KL, Koeffler HP. High-resolution genomic copy number profiling of glioblastoma multiforme by single nucleotide polymorphism DNA microarray. *Mol Cancer Res.* 2009; 7:665-677.
- Yin PH, Lee HC, Chau GY, Wu YT, Li SH, Liu WY, Wei YH, Liu TY, Chi CW. Alterations of the copy number and deletion of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 2004;90:2390-2396.
- Yoshida T, Haga S, Numata Y, Yamashita K, Mikami T, Ogawa T, Ohkusa T, Okayasu I. Disruption of the p53-p53r2 DNA repair system in ulcerative colitis contributes to colon tumorigenesis. *Int J Cancer.* 2006; 118:1395-1403.
- Yu M, Zhou Y, Shi Y, Ning L, Yang Y, Wei X, et al. Reduced mitochondrial DNA copy number is correlated with tumor progression and prognosis in chinese breast cancer patients. *IUBMB Life* 2007; 59:450-457.
- Zeviani M. & Donato S. Mitochondrial disorders. *Brain.* 2004; 127:2153-2172.