

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**

**LEANDRO BRUST**

**OCORRÊNCIA DE MUTAÇÕES MITOCONDRIAIS EM  
CARCINOMA DE MAMA.**

**CAXIAS DO SUL**

**2006**

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**LEANDRO BRUST**

**OCORRENCIA DE MUTAÇÕES MITOCONDRIAS EM**  
**CARCINOMA DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Serafini

**CAXIAS DO SUL**

**2006**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
UCS - BICE - Processamento Técnico

B912o Brust, Leandro

Ocorrência de mutações mitocondriais em carcinoma de mama  
/ Leandro Brust. - 2012.

71 f. : il ; 30 cm

Apresenta bibliografia.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

Dissertação (Mestrado) ó Universidade de Caxias do Sul,  
Programa de Mestrado em Biotecnologia, 2012.

1. Mamas - Câncer. 2. DNA mitocondrial - Mutações 3.  
Patologia de diferenciação celular - Carcinogênese. I. Título.

CDU 2.ed.: 618.19-006

Índice para o catálogo sistemático:

- |   |                 |
|---|-----------------|
| 1. Mamas - Câncer                                     | 618.19-006      |
| 2. DNA mitocondrial - Mutações                        | 601.4:575.224.4 |
| 3. Patologia de diferenciação celular ó Carcinogênese | 576.311.347     |

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária  
Ana Guimarães Pereira ó CRB 10/1460

# OCORRÊNCIA DE MUTAÇÕES MITOCONDRIAIS EM CARCINOMA DE MAMA

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.”



Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Pretto Serafini

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20/01/2006



Prof. Dr. Bernardo Garicochea



Prof. Dr. Dagoberto Vanoni de Godoy



Prof. Dr. Diego Bonatto

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL  
Biblioteca Central

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Airton Edison Brust e Maria Edite Brust, pelo ensinamento e valores aprendidos.

À minha namorada e futura esposa, Maria Luisa Miorin de Abreu, pela paciência e carinho desprendidos durante esta caminhada.

Ao Laboratório Diagnose de Patologia de Caxias do Sul, pelo material gentilmente cedido para o estudo, em especial a funcionária Maria Luiza.

Aos colegas médicos e patologistas Dr Eduardo Serafini (co-orientador) e Dr. Guilherme Piccoli Coelho pela valorosa ajuda na seleção dos casos e análise patológica efetuadas.

A todos aqueles que sugeriram, criticaram ou questionaram os mínimos detalhes deste trabalho, pois sem eles o resultado não teria sido o mesmo.

A um grande amigo e ajudante, o doutorando Femando Fracaro, pela inestimável ajuda na realização da parte prática deste trabalho.

À minha colega e doutoranda Lessandra Michelin, pelo apoio nos momentos difíceis e por ter me trazido a este centro do saber.

Por fim, ao meu mestre e doutor Sergio Echeverrigaray, pela sua brilhante idéia em estudar um assunto tão maravilhoso e empolgante como este, pelos seus ensinamentos, pela sua ciência, exemplo para muitos, e pela amizade que hoje nos aproxima.

## RESUMO

O câncer de mama é uma das neoplasias mais freqüentes em mulheres, conseqüentemente muitos esforços têm sido feitos na tentativa de se chegar a um diagnóstico mais precoce ou até mesmo na obtenção de maiores índices de cura. Neste sentido, o presente trabalho avaliou três tipos de alterações em nível de DNA mitocondrial com a intenção de verificar relações entre a apresentação clínico-patológica do tumor, na ocasião do ato cirúrgico, a ocorrência de mutações no DNA mitocondrial do tecido neoplásico primário e linfonodos axilares metastásicos. Para tanto, 82 amostras foram analisadas quanto à presença de alterações na alça D (D310 e microsátelite (CA).) e a ocorrência de grandes deleções na região 8295-13738. Os resultados mostraram que variações na região correspondente a alça D do mtDNA, tanto na região D310 quanto no microsátelite (CA)., são freqüentes, confirmado esta região como um "hot-spot" mutacional. Por outro lado, a deleção de 4977pb foi rara (4%) nas amostras analisadas, diferindo de resultados obtidos em outros trabalhos. Uma nova deleção de 5247pb na região 8295-13738 foram constatadas numa amostra de linfonodos metastásico. Comparação direta entre tumores primários e linfonodos metastásicos mostrou que em 53% dos linfonodos comprometidos apresentam alterações em nível de mtDNA. Estas alterações correspondem a deleções no microsátelite (CA). na região D310 e um caso de deleção de 4977pb. Considerando que as alterações em nível de mtDNA refletem a instabilidade do genoma, tal constatação pode ser tomada como indicativo do maior grau de malignidade das células presentes nos linfonodos metastásicos, e a ocorrência seleção de grupos celulares durante o processo de metastização.

**PALAVRAS-CHAVE:** Câncer de mama. Mutações no DNA mitocondrial. D-loop DNA.

## ABSTRACT

Breast cancer is one of the most frequent diseases among women, consequently much effort has been done in order to have earlier diagnosis or even to achieve higher cure rates. In this way, the present work had assessed three kinds of alterations in mitochondrial DNA aiming to verify possible relations between clinical and pathological data at the time of surgery and the occurrence of mitochondrial DNA mutations in the primary neoplastic tissue and metastatic axillary lymphonodes. In this sense, 82 samples were analyzed with respect to alterations at the D-loop region (D310 and microsatellite (CA)<sub>n</sub>) and occurrence of large deletions at the 8295-3738 region. The results showed that variations at the D-loop region of the mtDNA, both at the 0310 location and the microsatellite (CA)<sub>n</sub> are frequent, confirming this region as a mutational hot-spot. Conversely, the deletion of 4977bp was rare (4%) in the analyzed samples, differing from results obtained in other works. A new deletion of 5247 pb within the region 8295-3738 was found in a metastatic lymphonode sample. Direct comparison between primary tumor and metastatic lymphonodes showed that 53% of the compromised lymphonodes exhibit alterations at the mtDNA level. These alterations correspond to deletions at the microsatellite (CA)<sub>n</sub>, the D310 region, and one case of 4977bp deletion. Considering that alterations at mtDNA level reflect the genomic instability, the present results can be considered as indicative of the higher degree of malignance of the cells present at the metastatic lymphonodes, and the occurrence of clonal selection during the metastatic process.

**Keywords:** Breast cancer. Mitochondrial DNA mutations. D-loop DNA.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Origem das enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa do sistema mitocondrial humano.....	22
Tabela 2 - Características anátomopatológicas dos tumores analisados e achados quanto aos locos avaliados.....	45
Tabela 3 - Alterações nos padrões para os três locos avaliados entre o tumor de mama e linfonodos comprometidos.....	55



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo atual de progressão tumoral e origem metastática.....	16
Figura 2 - Papel central da mitocôndria no processo apoptótico.....	20
Figura 3 - Representação do DNA mitocondrial e seu genoma.....	21
Figura 4 - Fixação de mutações mitocondriais em famílias celulares.....	26
Figura 5 - Amplificação da região com do mtDNA humano a partir de DNA total de amostras parafinizadas e um padrão obtido de sangue humano.....	47
Figura 6 - Prevalência de padrões na região D310, microsatélite (CA) e deleções na região 8295-13738 do mtDNA em amostras de tumores d mama e linfonodos.....	49
Figura 7 - Amplificação do fragmento de 8469-13447bp detectando deleção de 4977pb no mtDNA, ausência de deleção e amplificação de fragmento de 196pb.....	50
Figura 8 - Exemplo da amplificação do fragmento de 109pb da região D310 (D-loop) do DNA mitocondrial em tumores de mama.....	51
Figura 9 - Padrões eletroforéticos da região D310 do mtDNA de amostras de tumores de mama e linfonodos.....	51
Figura 10 - Alelos do microsatélite (CA). localizado dentro da região D-loop do mtDNA e tumores e linfonodos.....	52
Figura 11 - Frequência dos alelos identificados para os locos D310 e microsatélite (CA) em amostras de linfonodos e tumores.....	53
Figura 12 - Comparação dos perfis para os três locos avaliados entre tumores de mama e linfonodos comprometidos.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

8 oxo-dG - 8-Oxo-2'-deoxyguanosina

16sRNA- RNA ribossômico 16S

23s - RNA ribossômico 23S

ASK1: quinase sinalizadora da apoptose

ATP - Adenosina trifosfato

ATPase 6 - Adenosina trifosfatase 6

CHC: carcinoma hepatocelular

DNA - ácidos desoxirribonucléico

EDF: fator estimulador epidérmico

ERRO ou ERO (espécies reativas de oxigênio)?

FNA: amostra por agulha fina

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio

JNK -Jun-N-amino-terminal kinase - quinase envolvida na sinalização celular

LOH: heterozigosidade

MAP: proteína de atividade mitógena

MAP3K - MAPK kinase - quinase envolvida na sinalização celular

MnSOD - superóxido dismutase manganês dependente

MSI: instabilidade microssatélite

mtDNA - DNA mitocondrial

ND1- NADH desidrogenase 1 mitocondrial

pb - pares de bases

PCR - reação de cadeia de polimerase

QPCR: PCR qualitativo

Rho<sup>o</sup> - ausência de mitocôndria

Rho - presença de mitocôndria

SAPK - quinase ativada por estresse

SOD: superóxido dismutase

SV40 - vírus de símios 40

TGF beta: fator estimulador tumoral

tRNA - RNA transportador

TRX: tireodoxina

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 O câncer: aspectos moleculares e a carcinogênese.....	14
2.2 Ciclo celular, genes e interação DNA nuclear e DNA mitocondrial.....	18
2.3 A mitocôndria e o seu DNA.....	20
2.4 A mitocôndria e os processos patológicos.....	23
2.5 Estresse oxidativo e câncer.....	28
2.6 Mutações em DNA mitocondrial e carcinoma de mama.....	33
3 OBJETIVOS.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 Material biológico.....	39
4.2 Extração de DNA total de tecido parafinizado.....	40
4.3 Reações de PCR para amplificação do mtDNA.....	40
4.4 Análise de polimorfismos no mtDNA.....	42
4.4.1 Análise de repetições em "tandem" no microsatélite mitocondrial (CA).....	42
4.4.2 Análise de polimorfismo na região D31 O através de SSCP.....	42
4.4.3 Análise de deleções na região 8295 e 13738 do mtDNA.....	43

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 Análise histopatológica e características do material analisado.....	44
5.2 Extração de DNA de amostras parafinizadas para análise de alterações no DNA mitocondrial.....	47
5.3 Análise de alterações na região D-loop e prevalência de deleção na região compreendida entre as bases 8295 e 13738 do mtDNA de tumores de mama e linfonodos.....	48
5.4 Considerações finais.....	56
6 CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS.....	60

## 1 INTRODUÇÃO

No século XXI temos observado que o câncer tem se destacado cada vez mais como um problema de saúde pública; sejam pelas proporções com que tem se apresentado, ou seja, pelas vultosas quantias de dinheiro que anualmente são utilizadas no seu tratamento. Estimativas oficiais para 2006 indicam que no Brasil devam ocorrer aproximadamente 450.000 casos novos de câncer, sendo 49 mil novos casos de câncer de mama, o mais prevalente no sexo feminino.

Dentre os fatores que contribuem para a elevada mortalidade atribuída ao câncer de mama podem ser salientados o atraso no diagnóstico, que muitas vezes poderia ser decisivo para a cura desta doença, bem como a ineficiência ou eficiência temporária que os medicamentos quimioterápicos apresentam para o tratamento deste tipo de neoplasia.

A atividade dos medicamentos utilizados no tratamento do câncer, na grande maioria das vezes ainda se baseia no bloqueio da divisão celular, mais especificamente no momento da replicação do DNA. Desta forma a compreensão do ciclo celular, da sua regulação, e dos fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam o desenvolvimento das células neoplásicas certamente contribuirá para a melhoria dos resultados com o tratamento do câncer.

Neste sentido, evidências crescentes apontam à participação direta ou indireta da mitocôndria nos processos de controle do ciclo celular e conseqüentemente, a importância das alterações mitocondriais no comportamento das células tumorais.

O grau de relação entre a causa e o efeito, no que tange às mutações mitocondriais e o processo da carcinogênese ainda não está esclarecido, pois alguns achados ainda não são consistentes. Talvez, com o aumento do número de casos, uma melhor seleção dos pacientes a serem avaliados e uma melhor estratificação dos subgrupos de risco para o desenvolvimento do câncer, seja possível esclarecer o papel das mitocôndrias e a importância das alterações em nível do DNA mitocondrial na carcinogênese, metástase, e comportamento dos tumores frente aos tratamentos radio e quimioterápicos empregados.

Apesar das dúvidas ainda existentes quanto à importância das mutações mitocondriais na carcinogênese, uma alta prevalência de mutações tem sido constatada em diversos tipos de

tumores, inclusive nos tumores de mama. Com base nestes resultados diversos autores consideram as alterações no mtDNA como marcadores potenciais na determinação da presença de células neoplásicas ou até da presença de clones celulares de alto risco

Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi determinar a ocorrência de alterações em nível de DNA mitocondrial em carcinoma de mama e linfonodos axilares metastáticos. Mais especificamente, a ocorrência de alterações na região da alça D, responsável pelo início da replicação e transcrição, e considerada como um "hot-spot" mutacional, bem como grandes deleções na região compreendida entre as posições 8295-13738pb.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O CÂNCER: ASPECTOS MOLECULARES E CARCINOGENESE

A compreensão da biologia molecular, juntamente com as novas informações sobre as sequências e organizações genéticas derivadas do projeto genoma humano, está expandindo dramaticamente as abordagens disponíveis para o estudo das alterações genéticas no câncer.

Uma das características mais importantes de todos os eucariotos superiores é a duração definida da vida dos organismos. O processo regulatório do crescimento e divisão das células somáticas individuais é altamente complexo e regulado. Uma exceção a esta regra é representada pelas células cancerosas. Nestas, a capacidade de multiplicação em locais inapropriados ou de propagação indefinida, pode ser letal para o organismo individual no qual elas ocorrem (WANG,2010).

Basicamente três tipos de modificações ocorrem quando uma célula toma-se tumorigênica: imortalização celular, com uma capacidade de multiplicação indefinida; transformação, onde fatores de controle celular, antes necessários para a sua multiplicação, tomam-se dispensáveis; metastatização, processo no qual a célula cancerosa adquire habilidade de invadir tecidos normais, estabelecendo-se em um novo habitat (LEWIN, 2001; STEVENSON, 2005).

Durante o ciclo celular, após sucessivas divisões, podemos observar um estágio senescente, onde a multiplicação celular cessa. Posteriormente ocorre um episódio de "crise" onde a maioria das células acaba morrendo; todavia, aquele grupo celular remanescente é capaz de dividir-se indefinidamente. Talvez, dentre todas estas etapas, o passo mais importante seja de que as propriedades celulares estarão alteradas na ocasião da emergência da "crise". Ao que tudo indica, inicia-se então o processo de imortalização. Em humanos, estima-se que as células entrem em crise após aproximadamente 40 gerações, mas somente alguns tipos celulares serão capazes de superar esta barreira (LEWIN, 2001).

A maioria das células cancerosas falha em diferenciar-se histologicamente. Em vez de prosseguirem a sua diferenciação, tais células são normalmente bloqueadas em um estágio precoce da sua evolução. Na replicação celular, quando ocorre um dano ao DNA, as células



normais sofrem apoptose ao passo que as células neoplásicas podem falhar neste ponto de checagem (COOPER, 2000; ZAMZAMI et al., 1996).

O aumento da incidência de cânceres humanos com a idade sugere que 6 - 7 eventos sejam necessários durante um período de 20 - 40 anos para a formação de um tumor (LEWIN, 2001). Estima-se que 60% de todos os cânceres ocorram em pessoas acima de 65 anos e 70% de todas as mortes por câncer ocorram nesta faixa etária (SINGH, 2004). A incidência média, ajustada para a idade, de câncer em pessoas com 65 anos ou mais é 10 vezes maior do que a média para pessoas abaixo de 65 anos. Os mecanismos pelos quais eventos moleculares estejam relacionados com o envelhecimento, ainda não foram esclarecidos. Pouco sabemos sobre este processo, mas uma interessante relação entre defeitos na função mitocondrial, envelhecimento e a tumorigênese tem sido observada (SINGH, 2004).

Os achados quanto a mutações no mtDNA têm sido muito variados e ainda não podemos afirmar de que para um determinado câncer podemos encontrar um padrão específico de mutações. Grandes deleções, se levarmos em conta o tamanho do genoma mitocondrial, foram encontradas nas mitocôndrias de tecido tumoral ou não, mas ao mesmo tempo deleções ainda maiores parecem ser indicativas de câncer de mama uma vez que elas não foram encontradas em tecidos normais (ZHU et al., 2005). Ao mesmo tempo, doenças não neoplásicas como miopatia ocular, Síndrome de Pearson ou até mesmo o próprio envelhecimento também fazem parte do rol de "condições" clínicas onde foram observadas disfunções mitocondriais (NISHIKAWA et al., 2005; KANG & HAMASAKI, 2005)

Em seu trabalho, Delsite et al. (2003) sugerem que o desenvolvimento de algumas doenças mitocondriais talvez seja uma consequência da terapia do câncer (quimioterapia). A importância deste achado talvez seja de que ao analisarmos mutações no mtDNA devemos ter muito cuidado com todos os possíveis fatores ou condições predisponentes para a sua ocorrência. Certamente esta observação não invalida a procura por um padrão de mutação tumor específica, até mesmo porque também buscamos compreender melhor quais são os eventos que levam a formação de um tumor.

Quanto à carcinogênese, uma vez estabelecida a população tumoral inicia-se o processo de seleção e expansão clonal, evento este considerado chave para o desenvolvimento tumoral. A figura 1 sumariza os modelos atuais de progressão tumoral e origem metastática. Durante o desenvolvimento da neoplasia, alterações genéticas randômicas resultam em uma população de células com vantagens proliferativas, originando o tumor através da progressão

clonal (A). Esta população celular, posteriormente, toma-se a progenitora de um clone celular que dominará a massa tumoral, compreendendo então o processo de progressão tumoral pelo domínio clonal (B). Por outro lado, variantes celulares com potencial primário para a metastatização poderiam existir primariamente no tumor, sendo que o seu crescimento poderia, através do tempo, sobrepor-se às demais populações celulares (C). Ao final, uma das hipóteses atuais sugere que os modelos de progressão clonal e variante metastática possam na verdade coexistir, contribuindo assim para o desenvolvimento de tumores metastáticos (D) (WANG,2010).

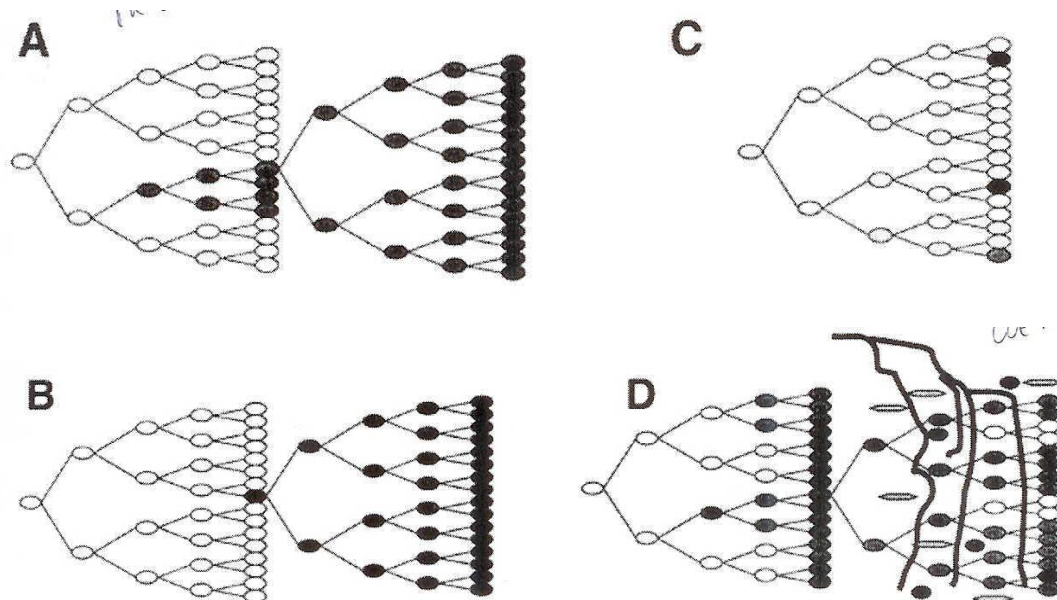


Figura 1. Modelo atual de progressão tumoral e origem metastática: expansão clonal

A: modelo de progressão clonal da tumorigênese. B: teoria do domínio clonal e progressão tumoral. C: modelo de variante metastática e progressão tumoral. D: hipótese atual para progressão tumoral. (Stevenson, 2005)

Os passos essenciais para a formação de metástases são similares para todos os tumores e consistem de: (1) transformação neoplásica e progressiva proliferação com suporte nutricional oriundo do próprio microambiente, por difusão; (2) neovascularização, o que já deve ocorrer quando o tumor excede 1 - 2 mm de diâmetro e que envolve a síntese e secreção de diferentes moléculas angiogênicas; (3) diminuição na expressão de moléculas de adesão e aumento da mobilidade celular; (4) liberação e embolização de células tumorais; (5) adesão às células endoteliais capilares; (6) extravasamento para o parênquima orgânico iniciando a

sua proliferação sob o efeito dos fatores de crescimento; e (7) resistência das células tumorais a destruição pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, a qual inclui respostas imunes específicas e não específicas (COOPER, 2000).

A detecção clínica de um tumor costuma ocorrer somente quando o tumor atinge 1g ou 10<sup>9</sup> células; mas devido à morte celular, para atingir este volume, a célula neoplásica necessita dividir-se mais de 30 vezes. A morte do paciente costuma ocorrer quando 10<sup>12</sup> células ou quando o peso de 1.000g do tumor é alcançado. Por volta da vigésima duplicação, com uma massa tumoral equivalente a 1mg, já podemos observar a neovascularização. Neste momento, inicia-se também o processo de metastatização hematogênica (WANG,2010).

A intrincada correlação entre todas estas etapas e os diversos mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese e na metastatização leva a crer que as mutações de genes específicos correspondem a um processo altamente ineficiente, até mesmo pelo grande número de alterações genéticas que tem sido documentada em tumores humanos, sem nenhum padrão que possa caracterizar definitivamente algum tipo tumoral (CAREW & HUANG 2002; KNUDSEN & GREEN, 2004).

A interação entre o genoma mitocondrial e o genoma nuclear é um dos achados essenciais para a manutenção da função celular normal. Pouco sabemos sobre a resposta nuclear ao déficit da função mitocondrial em células humanas, mas se olharmos para a quantidade de subunidades estruturais que participam do sistema de fosforilação oxidativa, de um total de 82 o mtDNA codifica apenas 13 destas, sendo o restante dependente do nDNA (HOUTEN et al., 2005; DELSITE et al., 2002; WELCH et al., 1998; CAREW & HUANG, 2002).

Da mesma forma, em linhagens de células de câncer de mama desprovidas de mitocôndrias (Rho0) pôde-se observar a hipoexpressão de vários genes nucleares envolvidos na sinalização celular, dentre eles a fosfolipase C, a fosfodiesterase 1A, a proteína da tirosina fosfatase C e o inibidor da quinase ciclina dependente p19 (DELSITE, 2002). Face às evidências crescentes podemos afirmar que no processo de carcinogênese encontramos alterações no ciclo celular, na expressão gênica nuclear e mitocondrial e na fosforilação oxidativa.

À medida em que se dá o crescimento tumoral, eventos moleculares e gênicos passam a ocorrer de uma forma anômala ao padrão esperado para as células normais. Estabelecer uma

correlação entre a progressão tumoral e o padrão de mutações mitocondriais ainda é um desafio.

## 2.2 CICLO CELULAR, GENES E INTERAÇÃO DNA NUCLEAR E DNA MITOCONDRIAL

O ciclo celular consiste de transições de um estado regulador para outro. Pontos de checagem podem retardar a progressão cíclica até que alguma condição intrínseca ou extrínseca tenha sido satisfeita. Toda e qualquer célula pode, a qualquer momento, seguir uma das três opções de comportamento: permanecer estática, dividir-se ou morrer (apoptose). Algumas células ainda podem diferenciar-se. Todo este processo se dá em resposta a sinais internos e externos (STRACHAN & READ, 2002). Para preservar a função e a integridade orgânica, o ciclo celular deve ser regulado em diferentes níveis. Isto inclui a entrada e saída dos ciclos, coordenação de múltiplos eventos celulares e geração de respostas que aumentam a probabilidade de sobrevivência a uma variedade de condições geradas pelo meio interno ou externo (REED, 2005).

Em uma população celular, a replicação e divisão de uma célula em uma geneticamente idêntica dependem de duas fases funcionais e duas fases preparativas. As fases funcionais do ciclo celular são a precisa cópia do DNA, conhecida como fase S, ou replicação do DNA. A divisão cromossômica entre as células denomina-se fase M ou mitose. O preparo para a fase S é conhecido como G1 e o preparo para a mitose é conhecido como G2. As células que não estejam ativamente se dividindo podem ser removidas da fase cíclica pela diferenciação terminal, ou então paradas temporariamente em um estado não cíclico conhecido como G0. Esta ordem de eventos é controlada por uma série de mecanismos de controle intracelular e também pode ser influenciada por fatores extracelulares. Tais fatores podem ser estimulatórios do crescimento, mitógenos ou antimitógenos, indutores da diferenciação, fatores de contato célula-célula ou fatores de ancoragem, bem como nutrientes (COOPER, 2000).

Para se desenvolver, as células tumorais precisam inativar o seu sistema de controle de replicação. Parte do sistema de controle do ciclo celular envolve os genes *rbl* (Retinoblastoma 1) e o gene *tp53*. Para a progressão tumoral, provavelmente estes dois genes precisam ser

inativados, sendo que eles estão entre os genes supressores tumorais que mais frequentemente aparecem alterados nas células dos tumores (STRACHAN & READ, 2002).

Quais são os fatores que necessitam estarem presentes para a inativação destes genes ainda não está esclarecido. Mutações no gene *rbl* produzem retinoblastoma esporádico ou hereditário. Pode parecer estranho como uma mutação constitucional em um gene tão fundamental para o controle do ciclo celular resulta especificamente em retinoblastomas e um pequeno número de outros tumores (ex. osteossarcoma); contudo, frequentemente em patologia molecular nos deparamos com situações onde mutações gênicas produzem um efeito fenotípico apenas em um subconjunto de células e tecidos. É possível que algumas mutações que levam à deficiência de uma proteína não se localizem no gene estrutural que a codifica (STRACHAN & READ, 2002; HELMAN e MALKIN, 2005).

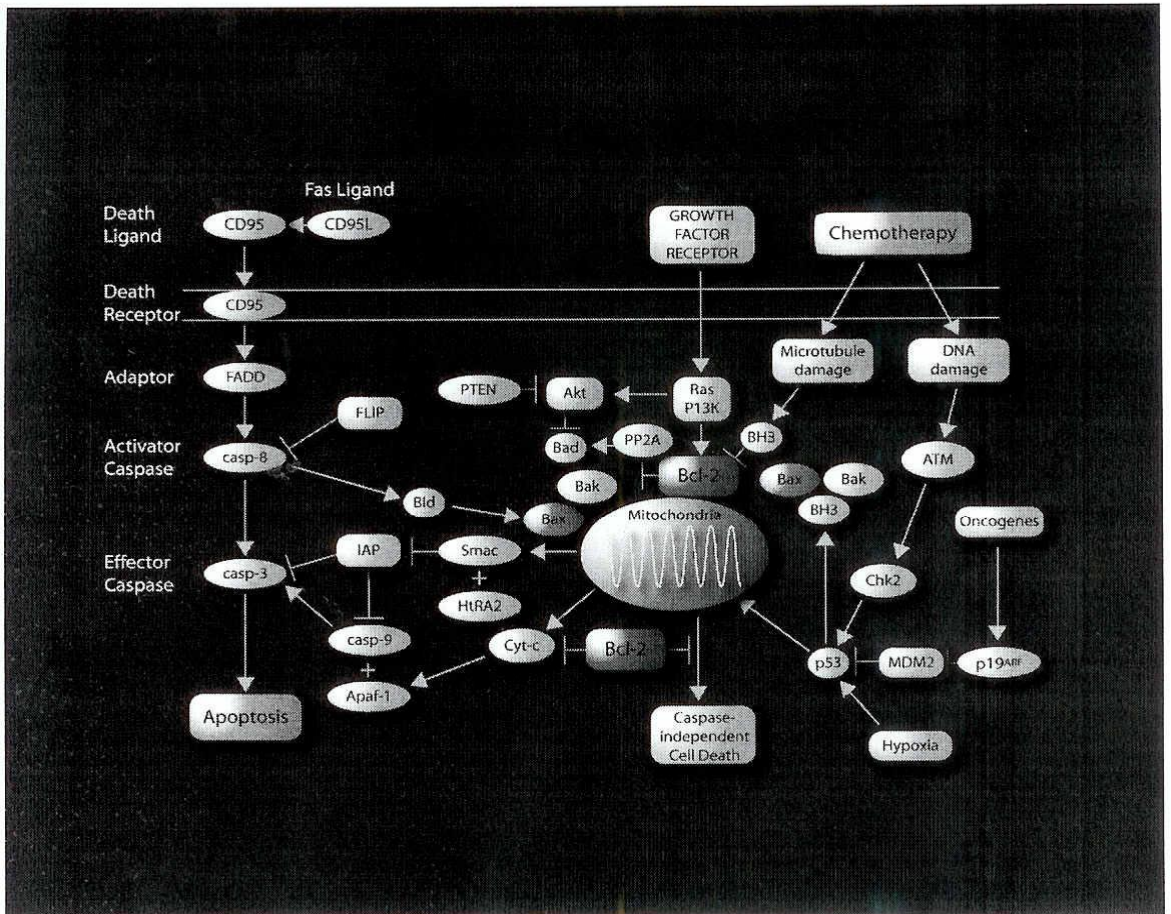
Embora o genoma mitocondrial e o nuclear sejam fisicamente distintos, sabe-se que há uma constante comunicação entre eles, de tal forma que possivelmente um dos fatores iniciadores de mutações mitocondriais podem ser as alterações em nível de nDNA (DELSITE et al. 2002; DELSITE et al. 2003).

A mitocôndria também desempenha um papel chave no processo de regulação da apoptose (PETIT et al. 1998). Assim sendo, as disfunções mitocondriais são um dos mais profundos achados nas células de câncer. Várias distinções já foram observadas entre as mitocôndrias de células normais e às neoplásicas envolvendo achados microscópicos, moleculares, bioquímicos, metabólicos e genéticos (DELSITE et al. 2002-2003; HARTRNAN et al. 2003).

Utilizando uma linhagem de células de câncer de mama desprovidas de mtDNA (Rho<sup>-</sup>), derivadas de uma linhagem Rho<sup>+</sup>, Delsite et al (2002) compararam, através de microarray, as diferenças entre a expressão gênica nuclear de ambos parentais. Seus resultados claramente mostram a expressão dos genes nucleares alterada, no que diz respeito à sinalização, metabolismo, crescimento, diferenciação e apoptose celular.

A identificação dos genes envolvidos neste processo de dualidade entre a carcinogênese e a permanência de um estado gênico "normal", na tentativa de se manter uma função mitocondrial adequada em resposta ao estresse oxidativo, ou outros fatores externos e internos, é crítica para a compreensão do papel da mitocôndria na formação tumoral. Neste contexto, a figura 2 representa de uma forma muito clara a importância que a mitocôndria

exerce sobre o controle do ciclo celular, definindo a sua progressão para a apoptose ou não, através de um papel centralizador no processo apoptótico (ZINKEL & KORSMEYER, 2005).



**Figura 2-** Papel central da mitocôndria no processo apoptótico (Zinkel & Korsmeyer, 2005)

### 2.3 A MITOCÔNDRIA E O SEU DNA

Estima-se que cada célula contenha várias centenas a milhares de mitocôndrias, e que cada mitocôndria contenha de um a dez genomas (ZHU et al., 2005; ROSSON & KESHGEGIAN, 2004; BIRCH-MACHIN, 2005).

O genoma mitocondrial é pequeno, mas altamente mutável quando comparado ao DNA nuclear. Ele é constituído por uma fita dupla de DNA circular, cuja sequência completa de nucleotídeos foi estabelecida por Anderson et al (1980). Seu comprimento é de 16.569 pb, contendo 44% G + C. As duas fitas apresentam diferenças significativas na sua composição de bases, de tal forma que as mesmas são denominadas de fita pesada (H, heavy), rica em guaninas e a fita leve (L, light), rica em citosinas.

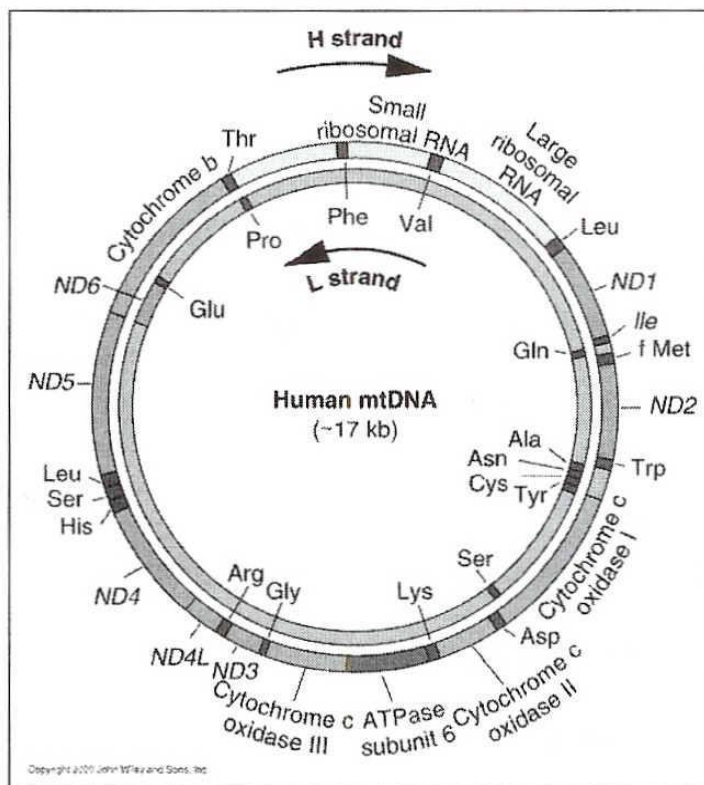


Figura 3 Representação do DNA mitocondrial e seu genoma. Observe a dupla fita de DNA composta por uma fita pesada (H) e uma fita leve (L) (Strachan & Read, 2002).

O genoma mitocondrial humano, visualizado na figura 3, é extremamente compacto sendo que cerca de 93% da sequência do mtDNA corresponde a sequências codificadoras. Ele contém 37 genes, sendo que nenhum possui íntrons. Vinte e oito genes são codificados pela fita pesada e 9 pela fita leve. Vinte e quatro especificam um produto maduro de RNA: 22 moléculas de tRNA mitocondrial e duas moléculas de rRNA mitocondrial (um rRNA de 23S e um rRNA de 16S). Os 13 genes remanescentes codificam polipeptídios que são sintetizados nos ribossomos mitocondriais. Cada um destes 13 polipeptídios codificados pelo genoma mitocondrial é uma subunidade de um dos complexos mitocondriais respiratórios, as múltiplas cadeias enzimáticas da fosforilação oxidativa, que são encarregadas da produção de ATP (STRACHAN & READ, 2002).

No sistema mitocondrial de fosforilação oxidativa há um total de cem subunidades polipeptídica distintas, de tal forma que todas as outras proteínas mitocondriais, incluindo numerosas enzimas, proteínas de transporte e proteínas estruturais são codificadas pelo genoma nuclear e traduzidas nos ribossomos citoplasmáticos antes de serem importadas para

o interior da mitocôndria (STRACHAN & READ, 2002). Este fato implica numa importante interação núcleo- citoplasmática, conforme já citado anteriormente.

No processo de fosforilação oxidativa, novamente a mitocôndria desempenha importante papel como um dos reguladores da funcionalidade celular. Neste sentido, a tabela 1 nos dá uma idéia da magnitude da sua participação na fosforilação oxidativa. De um total de cem subunidades polipeptídicas participantes neste processo metabólico, a vasta maioria é codificada por genes nucleares (STRACHAN & READ, 2002; HOUTEN et al., 2005).

Do genoma mitocondrial humano, a única região não codificadora importante e conhecida é aquela denominada alça de deslocamento D, alça D ou "D-loop". Essa é a região onde uma estrutura de DNA de fita tripla é gerada, por meio da síntese adicional de um curto pedaço da fita H do mtDNA, conhecida como DNA 7S. O D-loop é uma região de 1124 pb situada entre os nucleotídeos 16.024-576 (ZHU et al. 2005).

Tabela 1- Origem das enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa do sistema mitocondrial humano (Adaptado de Strachan & Read, 2002.)

	Codificado pelo mtDNA	Codificado pelo nDNA
Componentes do sistema da fosforilação oxidativa	13 subunidades	> 80 subunidades
I NADH-desidrogenase	7 subunidades	> 41 subunidades
II Succinato CoQ-redutase	0 subunidades	4 subunidades
III Complexo do citocromo b-c I	1 subunidades	10 subunidades
IV Complexo do citocromo c oxidase	3 subunidades	10 subunidades
V Complexo da ATP-sintetase	2 subunidades	14 subunidades
Componentes do aparato da síntese proteica	24	80
Componentes de tRNA	22 tRNAs	Nenhum
Componentes de rRNA	2 rRNAs	Nenhum
Proteínas ribossomais	Nenhuma	80

A alça D contém o promotor predominante para a transcrição das fitas H e L. De modo diferente ao da transcrição dos genes nucleares, onde genes individuais são geralmente



transcritos separadamente utilizando promotores individuais, a transcrição do DNA mitocondrial começa a partir dos promotores da região da alça D e continua em direções opostas pelas duas fitas, gerando grandes transcritos multigênicos.

Assim sendo, mutações nesta região talvez sejam àquelas de maior significância clínica para o estudo e compreensão da possível inter-relação entre as mitocôndrias mutadas e a carcinogênese, uma vez que a transcrição do genoma mitocondrial se inicia nesta região.

## 2.4 A MITOCÔNDRIA E OS PROCESSOS PATOLÓGICOS

Doenças comuns, estados clínicos e idade são apenas algumas das situações não relacionadas a tumor onde podemos encontrar mutações no mtDNA (KANG & HAMASAKI, 2005). Compreender qual o evento diferenciador para patologias tão distintas e com repercussões tão amplas em nível de viabilidade para a sobrevivência celular ainda é um dos nossos objetivos. O papel central da mitocôndria no controle de vários mecanismos celulares como a fosforilação oxidativa e do ciclo celular serve como estímulo para continuarmos nesta linha de pesquisa.

A mitocôndria é responsável pela produção de até 80% da energia necessária para a subsistência de uma célula (NAPOLITANO & SINGH, 2002). A este processo, compreendido por um verdadeiro maquinário respiratório, pode-se observar que o resultado é a produção aumentada de espécies de oxigênio reativo (ERO). As espécies de oxigênio reativo podem causar diferentes tipos de danos ao DNA; tais como quebras de cadeia, mutações frameshift, substituições de pares de bases e perda descontínua de heterozigose (SALVADOR et al., 2004). Esta concentração aumentada de ERO no microambiente mitocondrial, juntamente com a falta da ação protetora das histonas, a ausência dos íntrons e a deficiência no sistema de reparo no mtDNA, levam a um aumento na taxa de mutações no mtDNA em tomo de 10 a 100 vezes maior do que a média de mutações no nDNA (RICHARD et al., 2000). Isso pôde ser observado mais precisamente em roedores, onde a magnitude destas mutações em mtDNA é maior do que nos humanos (WANG et al., 1997).

Uma célula é capaz de tolerar altos níveis (90%) de dano ao seu mtDNA através de uma complementação funcional dos tipos selvagens remanescentes. Este fato, associado a sua capacidade de reduzida de reparo, leva ao acúmulo de dano genético, que por sua vez participará no processo da carcinogênese (BIRCH & MACHIN, 2005).

Mais de 100 mutações de ponto e 200 deleções e rearranjos já foram demonstradas como associadas às doenças mitocondriais (NAVIAUX, 2000), o que reafirma o importante papel que a mitocôndria desempenha frente às muitas doenças já estudadas.

A primeira doença mitocondrial descrita ocorreu em 1962, por Rolf Luft (NAPOLITANO & SINGH, 2002). Desde então, o número de doenças descobertas em que se observam disfunções mitocondriais por mutações no mtDNA, têm aumentado consideravelmente. Embora o mtDNA represente menos de 1 % do DNA total celular, os seus produtos gênicos são essenciais para a função celular normal.

Quando analisadas do ponto de vista metabólico, as células tumorais apresentam alterações que podem variar desde uma maior taxa de glicólise até mesmo um aumento na gliconeogênese (NAPOLITANO & SINGH, 2002; KLAUNIG & KAMENDULIS, 2004). Da mesma forma, em linhagens de células tumorais, têm sido observadas diferenças no número, tamanho e forma das mitocôndrias. Tumores de crescimento rápido tendem a apresentar mitocôndrias em menor número e tamanho (MAXIMO & SOBRINHO, 2000).

A ocorrência simultânea de mtDNA mutado e mtDNA selvagem é denominada de heteroplasmia. Durante a divisão celular as mitocôndrias são distribuídas para as células filhas de uma forma randômica. Na medida em que sucessivas novas células vão se formando, a população celular com mtDNA mutante pode variar. Uma vez que estas células passam a ter mtDNA exclusivamente mutante ou selvagem elas acabam se tomando homoplásmicas. Este efeito seletivo, de uma situação de heteroplasmia para homoplasmia, leva a observação de vários fenótipos entre indivíduos da mesma família sendo que cada um deles contém um tipo específico de mutação em nível de mtDNA (CAREW & HUANG, 2002). Atualmente alguns estudos tentam avaliar a ocorrência de populações homoplásmicas em tumores avançados, o que estaria diretamente relacionado com estes diferentes fenótipos (PARRELLA et al., 2001; CAREW & HUANG, 2002; KNUDSEN & GREEN, 2004).

Existem várias hipóteses tentando explicar a seleção clonal, que em última instância é representada pela homoplasmia (ZHU et al., 2005). Mutações somáticas no mtDNA podem ocorrer pela ação de agentes que lesam diretamente o seu DNA ou até mesmo através das EROs. Inicialmente as células contendo mitocôndrias mutadas são heteroplásmicas. Se a mutação confere uma desvantagem ao crescimento, a população de células com mtDNA mutado tende a diminuir. Inversamente, se a mutação confere uma vantagem no crescimento e sobrevivência, ela provavelmente evoluirá primeiramente para uma população heteroplásmica

emergente. Dependendo da duração e do grau de vantagem adquirida, estas células poderão se tornar uma população dominante, finalmente chegando ao estado de homoplasma. Uma outra forma de adquirir esta vantagem seletiva pode ser através de um segundo evento, tal como mutações adicionais causadas pelas ERO (CAREW & HUANG, 2002).

Todo este processo de seleção clonal pode ser melhor visualizado na Figura 4, onde uma população celular caracteristicamente homoplásmica não mutante (1) sofre a ação de fatores estimulatórios para a mutagênese. A mutação adquirida, presente ainda em caráter heteroplásmico, pode conferir uma desvantagem ao crescimento celular ocasionando a morte celular (2), ou então pode conferir uma vantagem seletiva ao crescimento deste clone (3). Concomitantemente, a biogênese mitocondrial aumentada, que acaba por interferir no crescimento e sobrevivência celulares, participa ativamente no processo de expansão clonal (4) (5). Por fim, com este evento, populações celulares homoplásmicas vão se formando à medida em que fatores estimulatórios externos (6) ou internos (7), através de um estresse oxidativo aumentado nas células mutadas, ocasionam instabilidade genética e dano ao nDNA (8) (CAREW & HUANG, 2002).

A extensão com a qual alterações no mtDNA participam no processo tumoral é ainda desconhecida. Uma das situações propostas aponta no sentido de que as mutações nos genes que codificam a fosforilação oxidativa poderiam interferir na produção celular de ATP e conseqüentemente, no balanço energético da célula. A diminuição no ATP poderia assim afetar o desenvolvimento celular bloqueando a sua progressão através do ciclo celular (VAN DEN BOGERT et al., 1998)

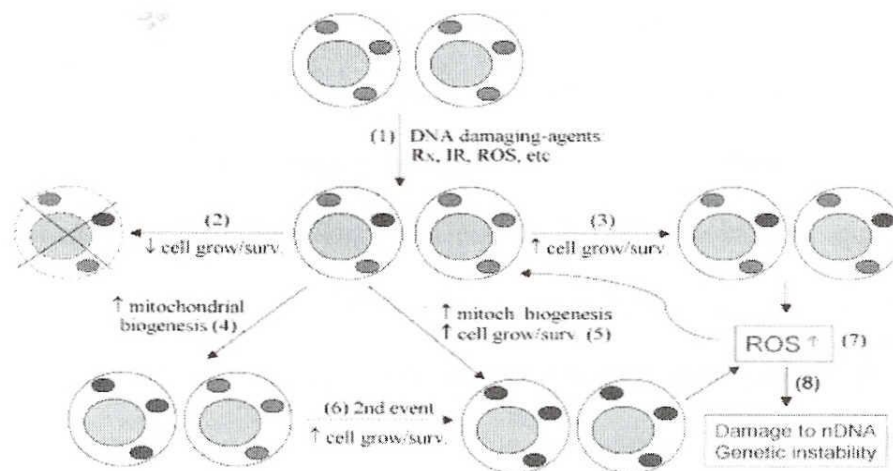


Figura 4. Fixação das mutações mitocondrias em famílias celulares (Carew & Huang 2002)

Diferentemente, muitos autores têm mostrado que a proliferação de células com alterações mitocondriais poderia também estar relacionada a estímulos oriundos das espécies reativas de oxigênio (ERO) (KLAUNIG & KAMENDULIS, 2004; PELICANO et al., 2004; KNUDSEN & GREEN, 2004). Mudanças no estado redox de moléculas sinalizadoras podem alterar a sua atividade bioquímica conduzindo a estimulação do crescimento celular. Em um dos exemplos, observou-se que as ERO possuem a propriedade de modular a habilidade da tioredoxina (TRX) em interagir e inibir a quinase sinalizadora da apoptose (ASK1). Esta, por sua vez, representa um membro da família da MAP3K, envolvido na via de sinalização do receptor do fator de necrose tumoral para a proteína quinase ativada por estresse (SAPK ou JNK). A via da MAPK é o maior mecanismo regulatório envolvido em muitos aspectos da função celular, como a regulação metabólica e a proliferação celular (STEVENSON, 2005).

Recentemente Wheelhouse et al (2005) avaliaram o padrão de mutações ou deleções na região D-loop das mitocôndrias de fígado neoplásico e não neoplásico, de pacientes infectados pelo vírus da hepatite B e encontraram uma aumentada incidência no número de mutações no tecido hepático de indivíduos com carcinoma hepatocelular (CHC), quando comparados ao grupo controle, que era compreendido por pacientes sem CHC. Nesse mesmo estudo, ao analisar os achados quanto à deleção no mtDNA de 4977pb, observou-se que esta mutação estava presente em 95% das amostras de tecido não neoplásico, bem como no grupo controle. Estes dados parecem contraditórios uma vez que em tumores malignos poderíamos esperar uma maior incidência no número de deleções no mtDNA. Uma das possíveis

explicações talvez possa ser a idade média dos pacientes analisados, de 55 anos. Em 1995 Fukushima et al mostraram que a incidência da deleção de 4977pb no mtDNA no tecido hepático aumenta de acordo com o aumento da idade. Enquanto grandes deleções na região codificadora do mtDNA são eliminadas durante a sua transformação, pequenas deleções na região regulatória do mtDNA podem fornecer uma vantagem seletiva (WHEELHOUSE et al., 2005).

Da mesma forma em que grandes deleções parecem ser eliminadas, alguns dados ainda apontam para observações contraditórias. Takai et al (1999) e Hayashi et al (1991) sugerem que genomas menores apresentam vantagens replicativas; ou seja, grandes deleções parecem ser interessantes do ponto de vista reprodutivo.

Quanto as alterações em nível de mtDNA, cabe ainda ressaltar que fragmentos de DNA mitocondrial foram observados inseridos no DNA nuclear, fato que sugere um possível papel destes fragmentos e conseqüentemente, de alterações no mtDNA, na ativação de alguns oncogenes (SHAY & WERBIN, 1992).

Ainda quanto ao controle do ciclo celular, pode-se observar uma indução à proliferação celular quando as células são expostas a baixas concentrações ou até mesmo a exposição transitória de espécies de oxigênio reativo (KLAUNIG & KAMENDULIS, 2004). Respostas celulares, como a estimulação da biogênese, transcrição e replicação do genoma mitocondrial, podem ser algumas das formas adotadas pela célula para compensar a disfunção da fosforilação oxidativa associada com o DNA mitocondrial mutado. O dano oxidativo e a indução destas mutações no mtDNA podem atuar em múltiplos estágios do processo da carcinogênese (KLAUNIG & KAMENDULIS, 2004).

Através da regulação dos fatores de transcrição dos genes e da alteração da via de transmissão de sinais, espécies de oxigênio reativo estão intimamente envolvidas na manutenção da expressão gênica, que pode estar relacionada com o desenvolvimento neoplásico. Ao final, podemos dizer que o ponto decisivo quanto a levar uma célula ao processo apoptótico ou não, depende da força e da duração da exposição aos agentes oxidantes, bem como do tipo celular envolvido (KLAUNIG & KAMENDULIS, 2004).

## 2.5 ESTRESSE OXIDATIVO E CÂNCER

As espécies de oxigênio reativo (ERO) são amplamente definidas como espécies químicas com propriedades reativas e incluem radicais livres como o superóxido e os radicais hidroxila (ambos contendo um elétron não pareado), bem como moléculas de peróxido de hidrogênio. Em sistemas biológicos, as ERO são constantemente geradas através de uma variedade de vias metabólicas, incluindo reações catalisadas por enzimas ou não (PELICANO et al., 2004).

Atualmente, evidências crescentes começam a estabelecer uma melhor correlação entre as ERO e a patogênese de várias doenças crônicas ou até mesmo com o câncer. Quando os mecanismos de controle antioxidante tomam-se exauridos ou sobrecarregados, o potencial redox celular passa a se deslocar para uma situação denominada de estresse oxidativo. Isto por sua vez, aumenta o potencial para o dano do ácido nucléico celular, lipídeos ou proteínas (KLAUNIG et al., 2004).

As células do câncer são metabolicamente muito ativas e isto provavelmente ocorra como uma consequência da proliferação celular descontrolada (REED, 2005; PELICANO et al., 2004) O aumento das espécies de oxigênio reativo em células tumorais tem sido estudado há muito tempo, sendo que uma das primeiras tentativas de se estabelecer esta relação foi um estudo de Swartz e Gutierrez (1977), onde procurou-se constatar um aumento no conteúdo de radicais livres em células de carcinoma de Walker.

Os primeiros estudos avaliando o genoma mitocondrial, datados da década de 1970, relatavam que a mitocôndria não possuía capacidade de reparo ao seu DNA. Atualmente sabemos que a mitocôndria possui mecanismos eficientes de reparo capazes de corrigir mutações ocasionadas pelo dano oxidativo (LARSEN et al., 2005). Talvez um dos fatores que possam influenciar e sobrepor esta capacidade de correção ao dano genômico seja o tempo de exposição aos agentes causadores ou até mesmo o grau de lesão ocorrida. Houten et al (2005) expuseram células de fibroblastos humanos transformadas - SV40, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tempos diferentes. Com um tempo de exposição de 15 min, ambos genomas (mitocondrial e nuclear) apresentaram uma completa reparação do dano ocasionado; todavia, quando expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por um tempo maior, de 60 min, as lesões ao mtDNA tomaram-se persistentes, retratarias aos mecanismos de reparo mesmo após 24 horas depois de cessada a exposição. Já o nDNA foi reparado depois de 90min da sua retirada do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ou seja, muito embora também disponha de mecanismos protetores ao seu DNA, um número menor de proteínas

com potencial papel na ressíntese e ligação do DNA mutado parece estar presente nas mitocôndrias (LARSEN et al., 2005).

Através de um método de PCR quantitativo (QPCR), Houten et al (2005) puderam mostrar em células de levedura, ratos e humanos, que o mtDNA sofre de 3 - 10 vezes mais dano do que o nDNA após exposição a situações de estresse oxidativo. As espécies de oxigênio reativo podem originar-se através de uma variedade de eventos e vias. Estima-se que em cada célula aproximadamente  $10^5$  lesões oxidativas sejam formadas por dia (KLAUNNIG & KAMENDULIS, 2004). As espécies de oxigênio reativo podem produzir diretamente quebras simples ou duplas na fita de DNA, modificações nas bases púricas, pirimídicas ou na deoxirribose. Os danos ao DNA podem resultar na parada ou na indução da transcrição, indução das vias de transdução do sinal, erros de replicação ou instabilidade genômica, e todas estas alterações podem ser vistas na carcinogênese (KLAUNNIG & KAMENDULIS, 2004; PELICANO et al., 2004).

As proteínas codificadas pelo mtDNA são essenciais para a execução da fosforilação oxidativa, sendo que as alterações do genoma mitocondrial podem ocasionar problemas severos de funcionalidade e viabilidade celulares. Dentre as funções mitocondriais podemos citar, além da produção de ATP, a sua participação na biossíntese do colesterol e dos fosfolípidos. A síntese aeróbica de ATP, através da fosforilação oxidativa mitocondrial, é responsável por mais de 80% da energia necessária à subsistência celular (KANG et al., 2005).

No processo de fosforilação oxidativa mitocondrial, elétrons são liberados através da cadeia respiratória e um gradiente de prótons é estabelecido através da membrana mitocondrial interna, como um curso de energia para a síntese de ATP. Neste contexto, alguns elétrons podem escapar da cadeia de transporte de elétrons, especialmente do complexo I e III, e reagir com o oxigênio molecular formando o superóxido (SAYBASILI et al., 2001; STANIEK et al., 2002). Estima-se que 2% do oxigênio consumido pela mitocôndria seja reduzido e forme superóxido, o qual é posteriormente convertido em peróxido de hidrogênio (FRIDOVICH, 1995). Desta forma, a mitocôndria pode ser considerada a maior fonte de ERO celular (RICHTER et al., 1995).

Os mecanismos de produção aumentada de superóxido nas mitocôndrias de células tumorais parecem ser os mesmos das células normais (KONSTANTINOV et al., 1987). Possivelmente sinais oncogênicos estimulem as células do câncer a produzir superóxido na

mitocôndria. Em fibroblastos de ratos, HAUFEL & BAUER (2001) observaram que TGF-beta (fator estimulador tumoral) e EGF (fator estimulador epidérmico) levam a produção de radicais superóxido. VAFA et al (2002) e HLAVATA et al (2003) também observaram que os oncogenes *c-myc* e *ras* também apresentam a capacidade de induzir a formação de EROs.

Enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona-S-transferase podem ser observadas em quantidades aumentadas em células tumorais onde o estresse oxidativo é presente em quantidades desproporcionais. Punnonen et al, (1994) encontraram níveis elevados de SOD no tecido tumoral de 23 pacientes com câncer de mama. Ao mesmo tempo, interessante, Nishiura et al (1992) encontraram uma correlação entre o nível de Mn-SOD, no soro de pacientes com leucemia e a regressão da doença, sugerindo que a Mn-SOD sérica possa servir como um marcador da atividade da doença.

Muitas células tumorais encontram-se em estado hipóxico. Parece haver uma correlação entre a hipóxia e a formação de ERO, mas as evidências ainda não são conclusivas. A produção de SOD nem sempre é observada em células tumorais, podendo algumas vezes ser encontrada uma redução da sua atividade (VAN DRIEL et al., 1997). Da mesma forma, alguns tumores exibem uma atividade da SOD inalterada (JUNG et al., 1997; PREUSS et al., 2000) Juntos, estes achados sugerem que as células malignas de diferentes tumores exibem uma heterogeneidade nos níveis de estresse oxidativo, associada com vários níveis de expressão de SOD e outras enzimas antioxidantes (PELICANO et al., 2004).

A despeito do nível elevado das EROs observadas em uma ampla variedade de tumores, o mecanismo exato pelo qual esta sobrecarga é gerada ainda não está definido. O grau de estresse oxidativo em uma célula é dependente do desbalanço entre o processo de geração e eliminação das ERO. Sob condições fisiológicas, a manutenção de um determinado nível de ERO intracelular é importante para a sinalização da proliferação celular (MURREL et al., 1990; MARTIN & BARRET, 2002).

Nas células tumorais, vários outros mecanismos também contribuem para a produção aumentada de ERO. Sinais oncogênicos têm sido mostrados como causadores do aumento da sua produção. O oncogene *c-myc* aumenta a geração de ERO, induzindo dano ao DNA, minimizando a função do p53 (VAFA et al., 2002). Recentemente Behrend (2003) revisou a associação entre ERO e a transformação oncogênica. O aumento no nível de estresse oxidativo pode induzir várias respostas biológicas, desde uma parada transitória no



crescimento e adaptação, até aumento na proliferação celular, senescência, apoptose ou necrose (DAVIES, 1999).

O dano causado pelas ERO é considerado o mais comum tipo de lesão no DNA (DIPPLE, 1995). Devido a sua natureza química reativa, as ERO são capazes de atacar vários componentes do DNA conduzindo a geração de uma variedade de produtos, que por sua vez podem danificar o mtDNA ou até mesmo o nDNA. Ao serem convertidos para peróxido de hidrogênio os radicais superóxido gerados na mitocôndria tomam-se estáveis e capazes de se deslocar para o núcleo (DAVIES, 1999).

Além das suas funções metabólicas a mitocôndria apresenta um papel chave nos eventos apoptóticos. As ERO podem afetar a via de sinalização estimulando a proliferação celular (PELICANO et al., 2004). O ciclo celular é influenciado por diversos mecanismos e vias. Com base nas mais variadas evidências, podemos dizer que a proliferação celular desregulada não pode ser explicada por um único mecanismo que controle o aumento da proliferação celular ou a inibição da apoptose, observadas em situações que favoreçam concentrações aumentadas dos oxidantes celulares (KLAUNNIG & KAMENDULIS, 2004).

As evidências quanto à interação entre as ERO e o ciclo celular são crescentes. Quando expostas ao peróxido de oxigênio e ao ânion superóxido, pode-se observar que as células de mamíferos são induzidas à mitogênese e à proliferação celular. Por outro lado, uma redução nos níveis de oxidantes celulares via suplementação com antioxidantes como superóxido dismutase, catalase, caroteno e flavonóides, leva a uma inibição do ciclo celular in vitro. Já altas concentrações de ERO ativam a via de sinalização da apoptose resultando em perda celular (KLAUNIG & KAMENDULIS, 2004).

A modificação da expressão gênica pelas espécies de oxigênio reativo tem efeito direto na proliferação celular e apoptose através da ativação dos fatores de transcrição; dentre eles a proteína ativadora mitógena (MAP), quinase/AP-1 e vias da NF-kB; (MARTINDALE et al., 2002; SHAULIAN & KARIN, 2001). A ativação mediada por oxidação da AP-1 resulta em um aumento da expressão da ciclina D 1 e da ciclina quinase dependente, que por sua vez promovem entrada da célula no processo mitótico e de divisão celular (SHAULIAN & KARIN, 2001). Da mesma forma, as ERO funcionam como mensageiros secundários envolvidos na ativação da NF-kB pelo fator de necrose tumoral e pelas citocinas (MARTINDALE et al., 2002).

O processo de controle da expressão gênica é complexo e amplo, sendo que a metilação do DNA também desempenha um papel controlador (HOLLIDAY, 1990). Evidências atuais mostram que as espécies de oxigênio reativo bem como o dano oxidativo ao DNA exercem papel modulador no padrão de metilação do DNA, contribuindo assim para o intrincado processo da carcinogênese (WEITZMAN et al., 1994; GAMA-SOSA et al., 1983).

A oxidação da guanina na posição C8 resulta na formação da 8-hidroxideoxiguanosina (8-oxo-dG), um dos mais estudados produtos do processo oxidativo no DNA (KLAUNNIG & KAMENDULIS, 2004). A 8-oxo-dG é considerada a maior lesão citotóxica e pré mutagênica induzida pelas EROs (HARTRNAN et al., 2003). Este tipo de alteração no DNA leva a transversões de  $G \rightleftharpoons T$ , podendo ser amplamente encontrado nos oncogenes ou genes supressores tumorais mutados (SHIBUTANI et al., 1991; HUSSAIN et al., 2003)

Ainda sobre a interação entre os genes e a biossíntese de ácidos nucléicos, quando avaliamos a sua expressão, o status de metilação do DNA celular pode ser considerado um mecanismo epigenético decisivo. Uma alteração na metilação pode conduzir a expressão gênica aberrante. Sob condições normais o DNA é metilado simetricamente e a este grau de atividade pode ser estabelecida uma correlação inversa com a expressão do gene correspondente (KLAUNIG et al., 2004). A hipermetilação pode inibir a transcrição dos genes supressores tumorais, tendo sido também associada com aumento da instabilidade genética e participação no processo de progressão da neoplasia (GREGER et al., 1994)

Um gene hipometilado é considerado como tendo um potencial aumentado para a sua expressão, quando comparado ao gene hipermetilado. Sabidamente a hipermetilação está associada a uma taxa aumentada de mutações e fatores extrínsecos, como a ação das ERO sobre o DNA e podem modificar este padrão de metilação (KLAUNIG et al., 2004). Em especial, observa-se que o dano oxidativo ao DNA está associado à diminuição na sua metilação. A formação de 8-hidroxidesoxiguanosina em seqüências como CpCpGpGp inibe a metilação de resíduos C adjacentes. Em suma, o papel do dano oxidativo ao DNA, das mutações, da expressão gênica alterada pelos oxidantes celulares, ou da sua metilação inadequada, têm sido discutidos cada vez mais amplamente no que tange a sua relação com o processo de carcinogênese (KLAUNIG et al., 2004).

Hartnran et al (2003) expuseram mutantes no gene *mev-1* do nematódeo *Caenorhabditis elegans* a estresse oxidativo e puderam observar uma correlação entre a geração na mitocôndria de ERO e a indução de dano ao nDNA. Neste trabalho, eles sugerem

que as ERO geradas na mitocôndria seriam capazes de mutar outros genes, incluindo genes supressores tumorais e oncogenes. Este processo envolveria três etapas, caracterizando um mecanismo específico que ao final contribuiria para a ocorrência de doenças associadas à idade: geração de ERO mitocondrial  $\Rightarrow$  dano ao nDNA  $\Rightarrow$  mutação.

Mutações nos genes codificadores da fosforilação oxidativa podem afetar a produção celular de ATP levando a uma alteração nas reservas energéticas. A diminuição no ATP pode afetar o ciclo celular bloqueando a sua progressão (VAN DEN BOGERT et al., 1988).

O peróxido de hidrogênio e outras espécies de oxigênio reativo parecem estar implicados na ativação de genes nucleares que estão envolvidos na transcrição e replicação mitocondrial. Baixos níveis de peróxido de hidrogênio parecem ser estimulatórios para a mitose em uma variedade de células de mamíferos (DAVIES, 1999).

Em suma, não podemos descartar a possibilidade de que toda esta resposta celular seja uma das formas de compensação à fosforilação oxidativa alterada (KLAUNIG & KAMENDULIS, 2004). Neste sentido, Shay et al. (1992) observaram fragmentos do mtDNA inseridos no nDNA sugerindo um possível papel destes nos mecanismos de ativação dos oncogenes, ativando assim a carcinogênese.

## 2.6 MUTAÇÕES EM DNA MITOCONDRIAL E CARCINOMA DE MAMA

Em câncer de mama, acredita-se que o acúmulo de aberrações genômicas ocorra muito precocemente no processo de tumorigênese, podendo inclusive preceder as mudanças morfológicas (LSAACS et al., 2004).

Observações iniciais apontam no sentido de que a perda da heterozigotidade (LOH) em sítios polimórficos está presente em hiperplasias (usualmente hiperplasia ductal e hiperplasia ductal atípica) de mamas de pacientes com câncer ou não; assim como também em lóbulos mamários normais e também adjacentes ao tecido tumoral maligno (DENG et al., 1996).

Alguns estudos começam a avaliar mais detalhadamente a ocorrência de mutações no mtDNA. Tan et al. (2001) avaliaram o mtDNA de tecido normal e tumoral de 19 pacientes com câncer de mama e encontraram mutações somáticas em 14 das 19 pacientes com tumor (74%). Destas, 81,5% estavam restritas a região D-loop; mas também foram encontrada

mutações nos genes 16S rRNA, ND2 e ATPase 6. Outras mutações, como a expressão elevada do mRNA do citocromo c oxidase II já foram encontradas em tumores de mama, quando comparadas ao tecido normal (SHARP et al., 1992).

Parrella et al. (2001) sequenciaram o genoma mitocondrial das células de câncer de mama de 18 pacientes e encontraram 12 (61%) mutações, sendo que destas, cinco (42%) ocorreram na região do D-Loop. Da mesma forma Zhu et al. (2005) analisaram o tumor e o aspirado por agulha fina de 15 pacientes com diagnóstico de câncer de mama e encontraram, nas amostras de tumor, mutações somáticas no mtDNA em 14 das 15 pacientes (93%). Foram identificadas 45 mutações diferentes. Destas 45 mutações somáticas encontradas, 35 se localizavam no mesmo locus, a região D-loop, reforçando outros achados (PARRELLA et al., 2002; PARRELLA et al., 2001; BUGART et al., 1995) que sugerem que este sítio seja um "hot spot" mutacional em uma variedade de malignidades. Nove (60%) dos casos tinham duas ou mais mutações no mtDNA. Dezesesseis das quarenta e cinco mutações ocorreram em sítios de polimorfismos.

A seqüência entre np 303 e 315 é uma região conservada do mtDNA. Profundas variações ou mutações nesta região podem desempenhar um importante papel na regulação da replicação do mtDNA. Zhu et al. (2005) sugerem 'que os achados consistentes e repetitivos de mutações ou variações nesta região (BIANCHI et al., 1995; BURGART et al., 1995; TAN et al., 2001; PARRELLA et al., 2001) podem ser indicativos de uma iniciação neoplásica, ao passo que mutações nas regiões np 204, 207 e 16.293 seriam indicativos da presença de câncer de mama (ZHU et al., 2005).

Uma análise muito interessante feita por Parrella et al (2001) diz respeito à avaliação das mutações encontradas em linfonodos axilares de duas pacientes com câncer de mama. Uma das pacientes teve dois tumores de mama (um a direita e outro a esquerda). O tumor da mama direita apresentou uma deleção de 1pb na região repetida do D-loop e o tumor da mama esquerda apresentou uma mutação de ponto na posição 3918, dentro do gene ND1. Na análise dos linfonodos metastáticos, somente a mutação correspondendo à deleção pôde ser observada, à semelhança do tumor primário. Estes dados sugerem que os tumores diferem geneticamente de um para outro, podendo originar-se de diferentes clones celulares ou então através de uma diferenciação precoce na progressão tumoral.

Neste mesmo estudo Parrella et al. (2001) expandiram a análise da região D-loop para 46 casos adicionais de câncer de mama, através do método de PCR. Somando todos os casos,

de um total de 64 tumores avaliados, foram encontradas 12 (19%) de mutações na região D-loop. A maioria das mutações correspondia a inserções ou deleções de 1 -2 pb, mas em dois casos pode-se observar uma deleção de 8 - 9 pb. Em uma tentativa de se estabelecer o potencial uso das mutações na região D310 na detecção do câncer, foram analisadas amostras de tecido mamário coletado por agulha fina (FNA) e linfonodos axilares metastáticos de pacientes com carcinoma de mama e que sabidamente apresentavam alterações na região D310 do mtDNA. Novamente, de um total de 5 amostras coletadas por agulha fina e 4 amostras de linfonodos, as mesmas deleções e inserções foram detectadas no tumor primário e no material analisado.

A busca por mutações que possam representar a presença de uma neoplasia de mama levou outros autores (ZHU et al., 2004) a avaliarem o mtDNA de amostras de tecido histologicamente normal e com neoplasia, de mamas com câncer, bem como também avaliar o mtDNA de mamas normais, sem câncer, e o mtDNA do sangue de pacientes com e sem câncer. Foram identificadas duas grandes deleções (3938 e 4388bp) nas amostras de tecido mamário tumoral ou não (peritumoral). A frequência destas deleções foi maior no tecido tumoral; muito embora não se pôde estabelecer uma correlação entre câncer de mama e estas mutações haja visto que no tecido normal de pacientes sem câncer tais mutações também foram visualizadas. Por outro lado, uma terceira evidência talvez possa ser considerada como indicativa da presença de câncer de mama. Trata-se da observação de uma deleção de 4576bp que foi evidenciada em 0% das amostras de tecido normal, em 13% das espécies de tecido histologicamente normal de mamas com câncer e em 77% das amostras de tecido tumoral. Estes achados são muito sugestivos de que possivelmente esta deleção seja indicativa de câncer de mama, ocorrendo precocemente no desenvolvimento da doença e tomando-se mais comum à medida que ocorra progressão tumoral.

Os motivos pelos quais estamos identificando diferenças no padrão de mutações para esta e outras neoplasias ainda não estão bem esclarecidos, mas uma das hipóteses provém de alguns estudos datados da década de 90. Acredita-se que menores genomas apresentem uma vantagem replicativa (TAKAI et al., 1999; HAYASHI et al., 1991); então, menores deleções parecem não se acumular. O acúmulo de deleções no mtDNA sugere a ocorrência de expansão clonal e isto parece especialmente importante no que tange a grandes deleções (ZHU et al., 2004).

Bianchi et al. (1995) encontraram uma deleção no mtDNA de 4977bp, presente em 14% das amostras de câncer de mama estudadas. Esta deleção frequentemente é denominada de "deleção comum de 4977pb". As deleções são conhecidas como causadoras de uma ampla variedade de doenças como miopatia ocular, Síndrome de Pearson e câncer de mama (RGOUNOVITCH et al., 2002; NAPOLITANO & SINGH, 2002). Uma das hipóteses quanto às causas destas deleções diz respeito a uma possível degradação do DNA pela idade (ZHU et al., 2004).

A procura por um padrão de mutação no mtDNA, que possa identificar as neoplasias, apresenta algumas vantagens sobre uma análise do nDNA: a) as mutações mitocondriais tendem a ser essencialmente homoplásmicas b) evidências apontam para o fato de que as células tumorais tenham um maior conteúdo de mtDNA do que as células normais (FLISS, 2000; JONES, 2001).

Em um novo trabalho, Zhu et al (2005) e Machin (2005) sugerem que os achados de mutações na região D-loop possam representar a presença de neoplasia de mama, o que poderia ajudar no seu diagnóstico precoce.

A frequência de instabilidade microssatélite (MSI) reportada em câncer de mama varia amplamente. A definição quanto a MSI se dá de acordo com cada autor, dependendo do número de inserções ou deleções de pb definidas e de quantos loci devem estar alterados para definir como MSI. Os achados de MSI em tumores podem variar de 37 -100%. Em seu trabalho, Zhu et al. (2004) encontraram MSI em 23,1% dos casos, quando estabelecidos como critério um marcador.

O genoma mitocondrial não possui autonomia quanto a sua transcrição, tradução, replicação e reparo, sendo dependente do genoma nuclear (ZHU et al., 2004). Como citado anteriormente, o mecanismo exato pelo qual estes dois genomas interagem ainda é pouco compreendido. Um estudo quanto as mudanças no nDNA e mtDNA, utilizando um marcador de microssatélite (MSI) associado a mapeamento de restrição, não encontrou nenhuma relação significativa entre a instabilidade microssatélite e a perda da heterozigidade (MSI/LOH) em câncer de mama.

Uma das hipóteses quanto ao desenvolvimento do câncer de mama diz respeito à prematura idade das células mamárias, onde após a retirada do estrógeno pela menopausa, observa-se um acúmulo de mutações no mtDNA. Ao final, algumas destas mutações acabam

por conduzir a transformação celular (ZHU et al., 2004). Neste sentido, cabe lembrar que o estrogênio apresenta uma importante participação no controle do ciclo celular, induzindo o gene c-Myc e a ciclina D1 a ativar uma cascata de sinalização que envolve subsequentemente, a ativação da ciclina E/CDK2 e posteriormente o bloqueio da síntese do p21. Quando interage com o c-Myc e com a ciclina D1, o estrogênio promove a transcrição gênica, ocasionando a entrada da célula na fase S do ciclo celular. Seus efeitos não se limitam única e exclusivamente ao estímulo sobre a homeostase celular, mas podem ser observados inclusive através de uma indução da transcrição do gene Bcl-2, promovendo um forte sinal antiapoptótico. Por último, observa-se que o estrogênio também apresenta sinergismo com a insulina, estimulando a progressão no ciclo celular através de uma interação com o gene p21 (DICKSON et al., 2005).

Talvez um dos desafios atuais seja estabelecer uma relação entre o possível efeito causador das mutações no mtDNA e o câncer. Outros estudos têm avaliado o achado de tais mutações com o comportamento clínico da doença ou então como uma forma de diagnóstico precoce. Parreila et al. (2002) avaliaram o material de 56 tumores primários, malignos e não encontraram nenhuma correlação entre a distribuição de anormalidades na região D-loop e os achados clínicos ou histopatológicos .

Por fim, o desenvolvimento tumoral envolve o acúmulo de várias alterações genéticas, incluindo anormalidades nos oncogenes e ou nos genes supressores tumorais, bem como LOH ou MSI (ZHU et al., 2004). Possivelmente haja uma correlação entre a ocorrência de stress oxidativo em condições desproporcionais e a ocorrência de câncer de mama, através destas anormalidades genéticas adquiridas ou geradas. As evidências atuais quanto a esta inter-relação de causa e efeito para o câncer e as ERO estão aumentando, principalmente face às descobertas da participação da mitocôndria no ciclo celular (CAREW & HUANG, 2002; KLAUNIG & KAMENDULIS, 2004).

### 3 OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo verificar se há uma correlação entre a progressão do câncer de mama, de localizado para o comprometimento axilar, com uma maior ocorrência de mutações no mtDNA a medida em que a doença progride. Pretende-se verificar se a expansão clonal de células com o mtDNA mutado pode de fato ser mais um dos inúmeros fatores moleculares presentes na carcinogênese da neoplasia de mama. Secundariamente serão avaliados os tipos de mutações no DNA mitocondrial mais encontrados na amostra populacional analisada, comparando-as com aquelas já evidenciadas pela literatura científica.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

No presente trabalho analisamos o tecido tumoral, fixado em parafina e proveniente do tratamento cirúrgico de 64 pacientes com carcinoma de mama. Destes, em 17 casos obtivemos o material do tumor primário (mama) e os respectivos linfonodos axilares metastáticos. As amostras foram devidamente identificadas de acordo com o número de registro do banco de dados do laboratório Diagnose.

Todos os casos foram obtidos do material cirúrgico de pacientes operados nos hospitais de Caxias do Sul e posteriormente analisados no laboratório de Patologia Diagnose, também de Caxias do Sul. A procura pelos casos se deu de uma forma não específica, retrospectiva aos anos de 2004 e início de 2005. Foram incluídos na análise todos os casos de carcinoma de mama encontrados na busca, sendo que em apenas uma situação o material correspondia ao tecido tumoral de uma metástase hepática (M1) oriunda de um carcinoma de mama. Propositadamente também avaliamos o tecido tumoral oriundo de linfonodos axilares metastáticos a fim de verificar o comportamento biológico do mesmo tumor em diferentes estágios evolutivos.

Após selecionados os casos foram feitos cortes de aproximadamente 30 $\mu$ m de espessura, com os respectivos blocos de parafina, correspondendo a uma imagem em espelho do material que foi submetido a extração do DNA. Todas estas lâminas foram conferidas por um patologista do laboratório Diagnose, através de microscopia óptica com aumento de 100 vezes, quanto à presença de material tumoral.

Após esta conferência, com um maior grau de certificação de que estávamos trabalhando com tecido tumoral, realizamos a extração manual do excesso de parafina com o auxílio de uma lâmina de bisturi. O material remanescente, consistindo primariamente de carcinoma de mama, foi então submetido a técnica de extração do DNA total, descrita a seguir.

## 4.2 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DE TECIDO PARAFINIZADO

O tecido então foi transferido para um tubo Eppendorf (1,5ml). Após, o material foi lavado por 3 vezes, com 600µl de Xilol por 15min a 65°C até a extração de toda parafina, sendo centrifugado a 12.000 RPM por 5 min, entre cada etapa. O material resultante foi novamente lavado com Etanol absoluto. Foram então acrescentados 200µl de tampão de lise (50mM Tris-HCl, pH 8,0; 1mM EDTA e 0,5% Triton X-100) e 200µl de TEP (10mM Tris, 1mM EDTA, 10µl de pronase - 20mg/ml). Os tubos foram incubados a 50°C por 24 horas. A seguir, adicionamos 50µl de TEP. O material foi novamente submetido à incubação por 24 horas, a 50°C. Foram acrescentados 500µl de isopropanol. O material foi colocado sob uma temperatura de -20°C por 2 horas, e após foi centrifugado a 12.000rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de eppendorf, onde foram adicionados 600 µl de etanol a 70%. O etanol foi removido, deixando-se o pellet secando ao final. O DNA foi ressuspenso em 100µl de TE pH7,5 (MASHAL et al., 1993).

## 4.3 REAÇÕES DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO mtDNA

Três tipos de alterações em nível de DNA mitocondrial foram avaliadas através de PCR utilizando as seguintes seqüências iniciadoras (primers):

1- Análise de variação no número de repetições de microsátélites (CA)<sub>n</sub>. localizado no D-loop do DNA mitocondrial foi realizada utilizando de acordo com o protocolo descritopor (SZIBOR et al, 1997) utilizando as seqüências:

F- 5'-CTC CCA TAC TAC TAA TCT CA-3'

R- 5'-TGG TTG GTT CGG GGT ATG- 3'

2. Análise de variações na região D310 (D-loop), considerada como hot-spot mutacional em câncer de mama, foi realizada através de amplificação utilizando os primers:

F- 5'-ACAATTGAATGTCTGCACAGCCACTT-3 ,

R- 5'-GGCAGAGATGTGTTTAAGTGCTG-3'

Estes primers amplificam um fragmento de 109pb no genoma mitocondrial normal (RICHARD, 2000). Alterações nesta região foram avaliadas através de SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) conforme descrito a seguir.

Determinação de deleções na região 8295 e 13738 do mtDNA. Para avaliação deleções nesta região, muito comum em vários tipos de tumores, foram utilizados os primers (Richard 2000):

mtF8295 5'- CCC ACT GTA AAG CTA ACT TAG C-3'

mtR13738- 5'- GGT TTC GAT GAT GTG GTC TTT G -3'

Além destes, visando identificar mitocôndrias sem a deleção e avaliar heteroplasmia foram utilizados os primers seguintes que amplificam parte do gene COIII, perdido na maior parte das deleções na região avaliada (RICHARD 2000).

mtF8295- 5'- CTG AGC CTT TTA CCA CTC CAG-3'

mtR8600- 5'- GGT GAT TGA TAC TCC TGA TGC G -3'

As amplificações foram realizadas num volume total de 25µl, contendo: 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 3mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25mM de dNTPs, 1µM de cada primer, 4µl de DNA total extraído conforme o procedimento anteriormente descrito, e 0,3 unidades de Taq DNA polimerase (Gibco).

A amplificação das quatro regiões foi realizada em termociclador MJResearch MD 100, utilizando-se 40 ciclos com temperaturas e tempos dependentes de cada região a amplificar; sendo para os primer de avaliação da região de microssatélite 52°C., para os primers da região D-loop 62°C, para os primers da deleção 60°C e para os primers controle com 62°C.

As condições utilizadas para amplificação foram: 5 minutos a 94° C, 40 ciclos de desnaturação (94°C, 30s), anelamento na temperatura específica de cada conjunto de primers (60s), extensão (72°C, 60s), e uma extensão final de 5 minutos a 720C.

#### 4.4 ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NO mtDNA

##### 4.4.1 Análise De Repetições Em "Tandem" No Microsatélite Mitocondrial (CA)<sub>n</sub>

As amostras amplificadas correspondentes à região microsatélite (CA)<sub>n</sub> foram acrescidas de 10µl de tampão (10mM de NaOH, 0,0025% de azul de bromofenol, 0,0025% de xileno cianol, em formamida 95%), e aplicadas em géis de poliacrilamida 10% em tampão TBE (50mM de trisma, 50mM de ácido bórico e 2,4mM de EDTA), com 15cm de comprimento. Um padrão de peso molecular (fago Lambda clivado com as enzimas EcoRI e HindIII) foi incluído em todos os géis.

A separação eletroforética dos fragmentos amplificados foi realizada sob corrente constante de 90V por 14 h a 4°C. Após separação os géis foram corados com nitrato de prata de acordo com o seguinte procedimento:

O gel de poliacrilamida ficou submerso por 30 min em uma solução fixadora de ácido acético 10%. Após três lavagens (10 minutos cada uma) com água destilada, foi adicionada uma solução de nitrato de prata, composta por 0,5gr de nitrato de prata, 500ml de água destilada e 500µl de formaldeído. Os géis foram incubados por um período de 30 minutos a temperatura ambiente seguindo-se uma rápida lavagem dos mesmos (30seg) com água destilada. Adicionou-se então a solução reveladora, consistindo de 12gr de carbonato de sódio, 500ml de água destilada e 500µl de formaldeído. Os géis foram incubados a temperatura ambiente com agitação lenta até o surgimento das bandas, momento no qual foram adicionados 500ml de uma solução de EDTA 1 % para parar a reação.

Após coloração os géis foram digitalizados em scanner AOC para registro e posterior avaliação do peso molecular dos segmentos.

##### 4.4.2. Análise De Polimorfismo Na Região D310 Através De SSCP

Inicialmente as amostras amplificadas referentes a região D310 foram acrescidas de 10 µl de tampão (10mM de NaOH, 0,0025% de azul de bromofenol, 0,0025% de xileno cianol, em formamida 95%) e colocadas em banho de água fervente (100°C) por 5 minutos. Após, elas foram rapidamente resfriadas em um banho de gelo e álcool a -20°C, e mantidas neste até a aplicação no gel.

No caso das análises de D310 os géis de poliacrilamida 10% em tampão TBE (50mM de trisma, 50mM de ácido bórico e 2,4mM de EDTA), com 15 cm de comprimento foram inicialmente submetidos a uma pré-corrida a 250V por 1 h. Após este período as amostras, assim como o padrão de peso molecular (fago Lambda clivado com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*), foram aplicadas no gel. A separação eletroforética foi realizada sob corrente constante de 250V por um período de aproximadamente 1 hora.

Assim como na avaliação do microssatélite os géis foram corados com nitrato de prata e digitalizados.

#### **4.4.3. Análise De Deleções Na Região 8295 E 13738 Do mtDNA**

Os segmentos amplificados utilizando os primers mtF8295 e mtRJ3738, e mtF8295 e mtR8600 (COIII), foram aplicados diretamente em gel de agarose 1,5% em TBE contendo de brometo de etídio (0,75mg/ml). A separação dos fragmentos amplificados foi realizada por eletroforese com voltagem constante de 90V. Após separação os segmentos foram visualizados sob luz ultravioleta. Todos os géis foram digitalizados com o auxílio de sistema UVITEC para posterior análise de tamanho dos fragmentos por comparação com o padrão de peso molecular (fago Lambda clivado com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E CARACTERÍSTICAS DO MATERIAL ANALISADO

Quanto ao tipo histológico avaliamos predominantemente casos de carcinoma ductal invasor (n=78), 3 casos de carcinoma lobular invasor e um caso de carcinoma de mama metastático para o fígado (M1).

O grau histológico é dividido em I a III, sendo que os carcinomas de Grau I correspondem aos tumores bem diferenciados, Grau II moderadamente diferenciados e Grau III diferenciados. Sabe-se que quanto maior o grau histológico maior será a agressividade do tumor. Dentre os casos passíveis de classificação quanto ao grau histológico (78), observa-se a seguinte distribuição: 13% de casos com grau I, 58% dos casos com grau II e 29% dos casos com grau III (Tabela 2).

O número de linfonodos acometidos por carcinoma de mama, demonstrado na tabela 2 como N, variou de 0 a 22. Quando agrupados de acordo com o sistema de estadiamento da AJCC (2002), podemos observar a seguinte distribuição: 54% dos casos com axila negativa N0 (não comprometida), 15% dos casos com envolvimento axilar N1 (até 3 linfonodos comprometidos); 31% dos casos com envolvimento axilar N2 (acima de 3 linfonodos comprometidos). Ainda hoje considera-se o número de linfonodos acometidos um dos fatores prognósticos mais importantes.

Tabela 2. Características anatomopatológicas dos tumores analisados e achados quanto aos locos avaliados.

Amostra	Características Anatomopatológicas			Locos avaliados			
	GH	T	LN	COIII	Deleção	D310	(CA)n.
LN 45429	III	T3	22	+	-	B	M
LN 47892	II	T3	19	+	-	B	B
LN 44552	II	T2	14	+	4977pb	A	M
LN 50382	III	T2	10	+	4977pb	A	M
LN 44553	III	T2	8	+	-	B	B
TU 45429	III	T3	22	+	-	A	M
TU 44553	III	T2	8	+	-	A	A
TU 47892	II	T3	19	+	-	B	M
TU 44552	II	T2	14	+	-	A	M
TU 41745	I	TI	0	+	5247pb	B	M
TU 44671	II	T2	0	+	-	A	M
TU 47692	II	TI	0	+	-	B	M
LN 51169	II	TI	6	+	-	A	B
LN 54934	II	T2	14	+	-	A	M
LN 751185	II	T2	14	+	-	A	M
LN 755226	II	T4	12	+	-	A	M
TU 54934	II	T2	14	+	-	A	M
TU 51940	II	TI	0	+	-	A	M
TU 56297	II	TI	0	+	-	A	B
TU 281	II	T2	0	+	-	B	M
TU 001	II	T2	0	+	-	B	M
TU 53502	I	TI	0	+	-	A	M
TU 51545	II	TI	0	+	-	B	M
TU 52833	II	TI	0	+	-	A	M
TU 55226	II	T4	12	+	-	A	M
TU 53815	II	T2	1	+	-	A	M
TU 50514	II	T1	0	+	-	A	M
TU 49705	II	T2	10	+	-	A	M
TU 57319	II	T2	10	+	-	A	M
TU 57078	II	TI	0	+	-	A	M
TU 57400	III	TI	0	+	-	A	M
TU 58055	II	T2	0	+	-	A	M

TU 52152	I	T4	0	+	-	B	M
TU 54410	III	T2	0	+	-	A	M
TU 51169	II	T1	6	+	-	B	M
TU 51185"	-	T2	14	+	-	A	M
TU 1640"	-	M1	-	+	-	A	M
TU 29121	III	T2	0	+	-	A	B
LN 27777	II	T1	2	+	-	A	M
LN 19576	III	T2	16	+	-	A	M
TU 19576	III	T2	16	+	-	A	M
TU 25144	II	T1	0	+	-	A	M

Amostra- número de registro, TU- tumor LN- linfonodo, GH- Grau histológico (I-III), T- Tamanho (T1-T4), Número de linfonodos acometidos (N),. (carcinoma lobular invasor), M1 (metástase de carcinoma de mama), amplificação de COIII, Deleção na região 8295 e 13738 do mtDNA, D310- alelos A e B, (CA)n- alelos A, M e B.

Por fim, a coluna T da tabela 2 descreve o tamanho do tumor na ocasião do ato cirúrgico. A variabilidade do tamanho tumoral oscilou entre, tumores menores do que 2cm de diâmetro até 8cm, ou então tumores com acometimento cutâneo, independente do seu tamanho. De acordo com o sistema de estadiamento da American Joint Committee for Cancer 2002 (AJCC), tumores de até 1cm são classificados como T1, tumores com dimensões entre 2 e 5 cm são classificados como T2, tumores acima de 5cm como T3 e tumores com acometimento cutâneo ou invasão de parede torácica como T4. A distribuição dos tumores analisados foi de 45% para tumores T1, 47% para tumores T2, 4% para tumores T3 e 4% para tumores T4. Propositadamente foram excluídos todos os casos de tumor in situ

## 5.2 EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS PARAFINIZADAS PARA ANÁLISE DE ALTERAÇÕES NO DNA MITOCONDRIAL.

As 82 amostras analisadas foram obtidas na forma de cortes histológicos de material parafinado cedido pelo Laboratório Diagnóstico. Assim sendo, um primeiro momento na realização do trabalho foi a otimização de um sistema de extração de DNA total de material parafinado. Para tanto, foram utilizados os métodos descritos por Bielawski et al. (2001) e



um método adaptado daquele utilizado no Laboratório de Patologia da Universidade de Caxias do Sul, especificado no item 4.2.1 da metodologia.

Destes dois métodos, apenas o segundo levou à obtenção de DNA de alta qualidade passível de amplificação através de PCR. A eficiência deste método pode ser visualizada na Figura 5, na qual é apresentada a amplificação da região COIII de 6 amostras.

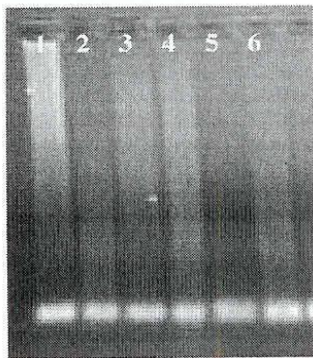


Figura 5. Amplificação da região com do mtDNA humano a partir de DNA total de amostras parafinizadas (2-6), e um padrão obtido de sangue humano (1).

### 5.3 ANÁLISE DE ALTERAÇÕES NA REGIÃO D-loop E PREVALÊNCIA DE DELEÇÃO NA REGIÃO COMPRENDIDA ENTRE AS BASES 8295 E 13738 DO MTDNA DE TUMORES DE MAMA E LINFONODOS

As 82 amostras foram analisadas quanto à presença de grandes deleções na região entre as bases 8295 e 13738, e mutações na região D310 e no microsatélite (CA)<sub>n</sub> ambas na região controladora "D-loop" (Tabela 2).

Grandes deleções entre as bases 8295 e 13738 do mtDNA foram avaliadas através da amplificação da mesma por PCR. A região representa 5443pb, sendo portanto muito grande

para ser amplificada pela metodologia de PCR empregada. Entretanto, grandes deleções dentro desta região surgem como fragmentos amplificados de pesos moleculares menores do que 1500pb. Neste sentido, Zhu et al. (2004) analisando amostras de tumores de mama, identificaram deleções de 4977pb, 4576pb, 4388pb e 3938pb dentro desta região.

Concomitantemente, as amostras foram avaliadas quanto à presença da região correspondente ao gene COIII (citocromo III), o qual encontra-se dentro da região avaliada, e que deve amplificar unicamente em mitocôndrias que não apresentam estas grandes deleções.

Das amostras avaliadas apenas três (4%) apresentaram amplificações correspondentes a deleções na região 8295 e 13738 (Figura 6). Como pode ser observado na Figura 7, duas amostras (LN 44552 e LN 50382) apresentaram deleção de 4977pb, e uma amostra (TU 41745) apresentou uma deleção maior de 5247pb, reportada pela primeira vez neste trabalho.

Deleções de 4977pb foram observadas por Zhu et al. (2004) em células normais e tumores de mama, em frequência da ordem de 26 e 44%, respectivamente. Dentre as deleções observadas por estes autores apenas a deleção de 4576pb foi específica de células tumorais, enquanto a deleção de 4977pb é encontrada tanto em células normais quanto tumorais (Bianchi et al., 1995). A frequência de deleções observada no presente trabalho foi muito inferior àquela observada por Zhu et al. (2004), mesmo em tecidos normais. Tal diferença pode estar relacionada a diversos fatores entre os quais a idade das pacientes, que neste trabalho foi de 54,92 anos na média, tipo histológico das amostras, grau histológico, nível educacional elevado da população estudada, ou até mesmo devido ao grande número de casos com axila negativa (54%), ou até mesmo por fatores étnicos locais.

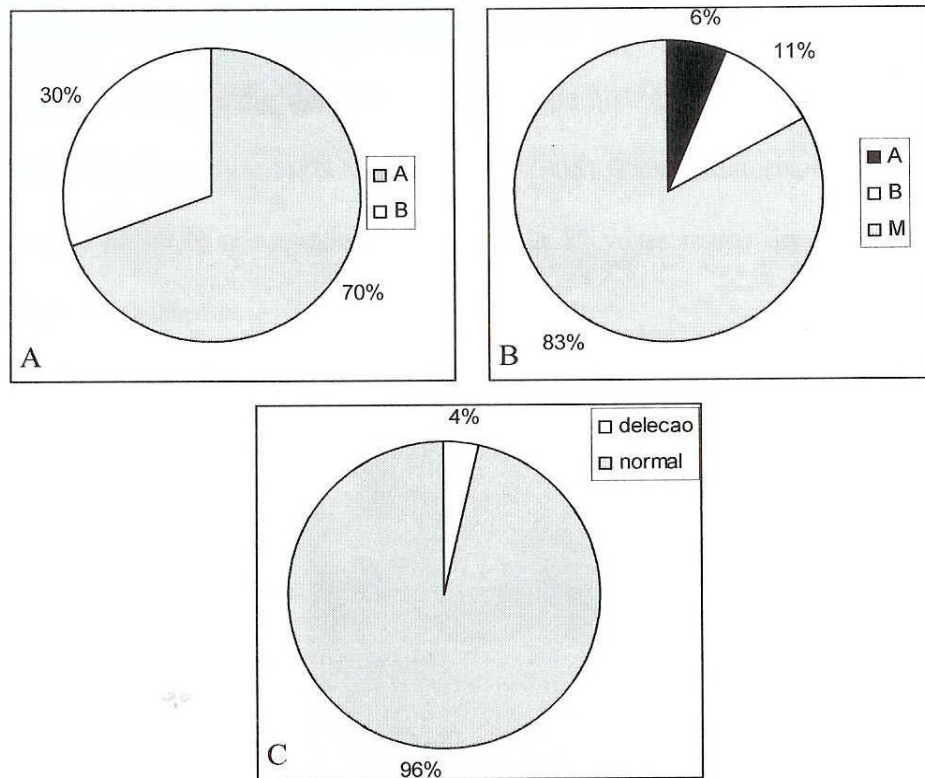


Figura 6. Prevalência de padrões na região D310 (A)- (alelos A e B), microssatélite (CA)<sub>n</sub> (B)- (alelos A, M e B) e deleções na região 8295 e 13738 do mtDNA (C), em amostras de tumores de mama e linfonodos.

Deleções na região 8295 e 13738, e outras grandes deleções no mtDNA, são responsáveis por uma ampla gama de doenças incluindo ataxia, neuropatia óptica, retinopatia, glomerulopatias, demência, doenças que progridem com a idade (Napolitano & Singh, 2002; Grossman & Shoubridge, 1996), e uma série de tumores, incluindo câncer de mama, no qual a prevalência de grandes deleções varia entre 30 a 75% (Maximo et al., 1998; Jessie et al., 2001, Maximo et al., 2000; Zhu et al., 2004). Acredita-se que a causa da existência de uma região com elevada taxa de deleção no mtDNA esteja relacionada com a estrutura do mtDNA, particularmente seqüências ricas em AT flanqueando a região de quebra 5' das grandes deleções, a ausência de histonas, e de mecanismos ineficientes de reparo de DNA (HOU et al., 1998; LARSEN et al., 2005). Tais características fazem com que a taxa de mutação no DNA mitocondrial humano seja 17 vezes maior do que no DNA nuclear (SIGURGARDOTTIR et al., 2000).

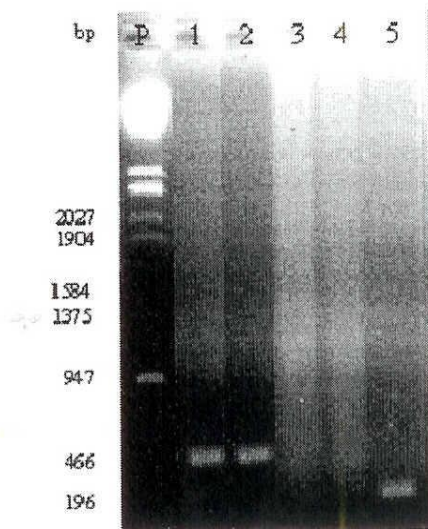


Figura 7. Amplificação do fragmento de 8469-13447pb, detectando deleção de 4977pb no mtDNA das amostra 23 (1) e 24 (2), ausência de deleção nas amostra 17 e 18, e amplificação de fragmento de 196bp na amostra 12. Padrão de peso molecular Lambda *EcoRI/HindIII*.

As três amostras nas quais foi evidenciada a ocorrência de grandes deleções também apresentaram amplificação da região COIII, indicando a coexistência de mitocôndrias com e sem deleção nas mesmas células, situação comumente definida como heteroplasmia, ou presença de um mosaico de "células com e sem deleção no tumor.

Apesar destas serem situações comuns, o fato de grandes deleções serem encontradas em maior frequência em tumores do que em células normais tem apoiado a hipótese de que as células tumorais consistem exclusivamente de mutantes (homoplasmia) (COLLER et al., 2001).

A região de deslocamento (D-loop) corresponde a uma sequência de 1124pb não codificante localizada entre os resíduos 16024 e 576bp do genoma mitocondrial. Esta região atua como promotor tanto para a fita leve quanto para a fita pesada do mtDNA, e contém elementos essenciais para a transcrição e replicação (Anderson et al., 1980). Devido a sua constituição e pela presença de regiões repetitivas, a região D-loop é considerada um "hot-spot" mutacional no genoma mitocondrial (Richard et al., 2000; Carew & Huang, 2002; Suzuki et al., 2003; Zhu et al., 2005). Assim sendo, no presente trabalho foram avaliadas duas regiões do D-loop, a região D310 e a microsatélite (CA)<sub>n</sub>.

A amplificação de D310, localizada entre os nucleotídeos 303 e 315, resultou em fragmentos de aproximadamente 109pb evidenciados em todas as amostras (Figura 8).

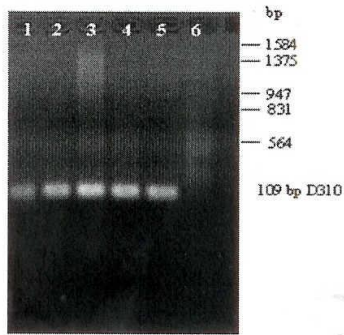


Figura 8. Exemplo da amplificação do fragmento de 109bp da região D310 (D-loop) do DNA mitocondrial em tumores de mama. 1- amostra 10, 2- amostra 11, 3- amostra 12, 4- amostra 13, 5- amostra 14, 6- branco.

Quando submetidos a análise conformacional por SSCP (single sequence conformational polymorphism), dois tipos de perfis eletroforéticos foram evidenciados para a região D310 do mtDNA nas amostras de tumores e linfonodos analisadas (Figura 9).

A frequência de cada um destes perfis foi de 30% do perfil B e 70% do perfil A

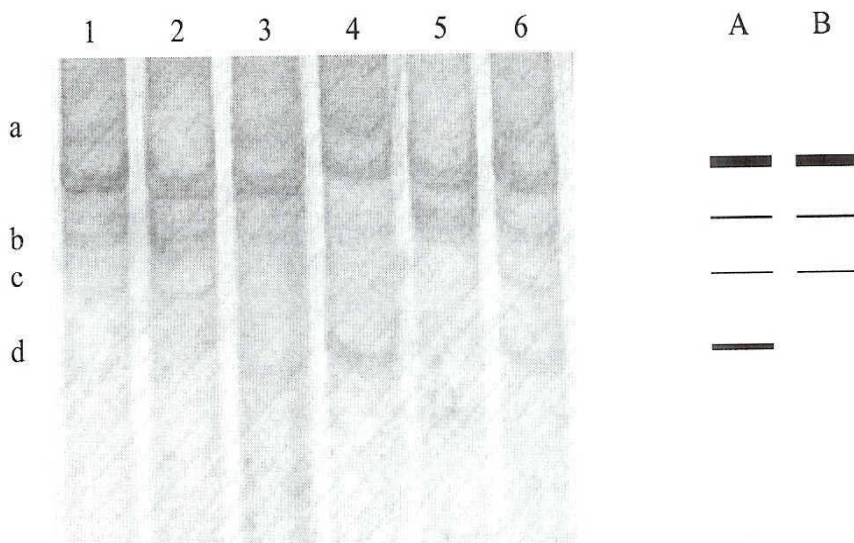


Figura 9. Padrões eletroforéticos da região D310 do mtDNA de amostras de tumores de mama e linfonodos. (1) TU 30597 1/4, (2) TU 31651 1/10, (3) TU 28371 1/7, (4) LN 28173 8/8, (5) TU 20992 1/4, (6) TU 281731/8.

(Figura6). Deleções ou inserções nesta região foram observadas em aproximadamente 20% dos tumores analisados por Sanchez et al. (2001) e Parrella et al. (2001). Apesar da falta de informação sobre as células normais das pacientes, por se tratar de um estudo retrospectivo baseado em amostras parafinizadas, a elevada frequência dos dois padrões evidenciados

comprovam a alta variabilidade dentro da região 0310. O polimorfismo nesta região corresponde a modificação no número de resíduos de citosina (7C a 9C) na primeira parte da seqüência poli-C (CCCCCC...TCCCCC), sendo o alelo 7C o mais comum (Sanchez et al., 2001).

Alterações na região D310 podem resultar em importantes modificações na estabilidade no DNA mitocondrial já que a mesma está envolvida na formação e persistência de uma estrutura híbrida DNA-RNA que participa no início de replicação da fita pesada do mtDNA humano (Lee et al., 1998).

A terceira região analisada no genoma mitocondrial das amostras tumorais foi o microssatélite (CA)<sub>n</sub> localizado a partir da posição 514bp do mtDNA humano (Anderson et al., 1980). Conforme pode ser observado na Figura 10, três alelos foram identificados: o alelo B com baixo número de repetições, o alelo M com um número intermediário e o alelo A com o maior número de repetições. O alelo mais prevalente nas amostras analisados foi o alelo A (83%), seguido pelos alelos B (11 %) e A (6%) (Figura 6).

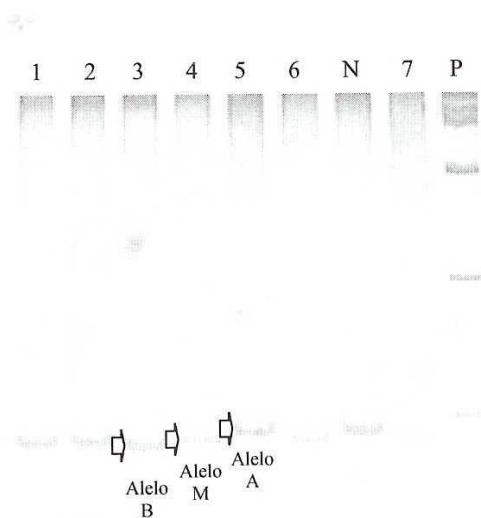


Figura 10. Alelos do microssatélite (CA)<sub>n</sub> localizado dentro da região D-loop do mtDNA em tumores e linfonodos. (1) LN 9802 3/6, (2 )TU 12072 1/10, (3) TU 123303/13, (4) TU 9425 1/9, (5) TU 9800 1/13, (6) TU 9802 1/6, (7) TU 9538 1/5, (P) padrão de peso molecular Lambda *EcoRI/HindIII*.

A ocorrência de mutações no número de cópias da repetição CA no microsatélite mitocondrial em tumores é controversa. Heerdt et al. (1994) estudaram 24 pacientes sequenciando a região D-loop de células de tumores coloretais e células normais e não encontraram alterações no microsatélite. Resultados semelhantes foram obtidos por Habano et al. (1999) em estudo envolvendo 45 pacientes com câncer coloretal. Entretanto, Richard et al. (2000) observou 42,5% de alterações na região microsatélite mitocondrial em tumores de mama. Considerando a taxa espontânea de alterações na região microsatélite mitocondrial em gametas femininos (2,6%) e aquela observada em tumores de mama, Richard et al. (2000) concluíram que neste tipo de tumores ocorre um aumento de 16x na taxa de mutações para este.

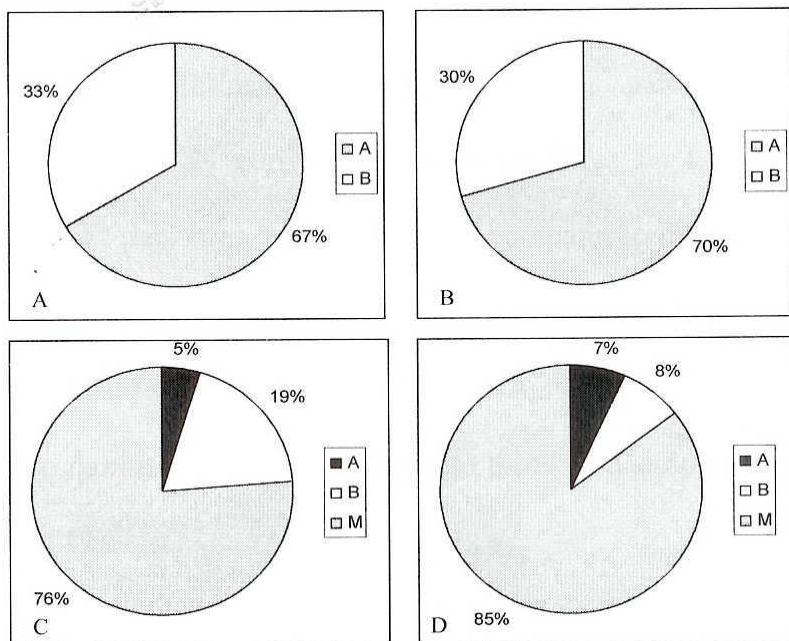


Figura 11. Frequência dos alelos identificados para os locos D310 (A e B) e microsatélite (CA)n. (C e D) em amostras de linfonodos (A e C) e tumores (B e D).

A avaliação das frequências dos alelos do D310 e do microssatélite em tumores de mama e em linfonodos (Figura 11) mostra que não há diferenças significativas na frequência dos alelos para o loco D310, mas há um aumento do alelo B do microssatélite em linfonodos.

A diferença das deleções, os padrões obtidos para os locos D310 e microssatélite (CA)<sub>n</sub> indicam homoplasmia, dando suporte às considerações de Richard et al (2000) no que diz respeito à seleção e vantagem adaptativa das células com mutações no DNA mitocondrial sobre as células normais, levando ao domínio de populações mutantes. Segundo estes autores, danos no DNA mitocondrial provocados por radicais livres e erros no sistema de reparo por Pol $\beta$  devem ocorrer ao acaso, dando lugar a células heteroplásmicas formando múltiplas subpopulações de moléculas de mtDNA mutadas. Durante as milhares de divisões necessárias ao progresso e expansão do tumor, as moléculas de m tDNA que possuem vantagens replicativas facilmente substituem outras subpopulações levando à homoplasmia.

Das 82 amostras, 34 corresponderam a amostras de tumor de mama e linfonodo oriundos das mesmas pacientes, permitindo uma comparação direta das modificações entre as populações celulares do tumor primário e dos linfonodos comprometidos. A comparação destas amostras quanto aos locos avaliados no mtDNA, mostrou que nove (53%) apresenta alterações entre o tumor e o linfonodo, enquanto 8 (47%) não apresentam alterações nos locos avaliados (Figura 12).

Dos nove casos nos quais foram constatadas alterações entre o tumor e o linfonodo, três casos apresentaram apenas alteração no loco D310, quatro apenas no loco microssatélite, um com deleção no linfonodo, e um com alterações tanto no loco D310 quanto no microssatélite (Figura 12).

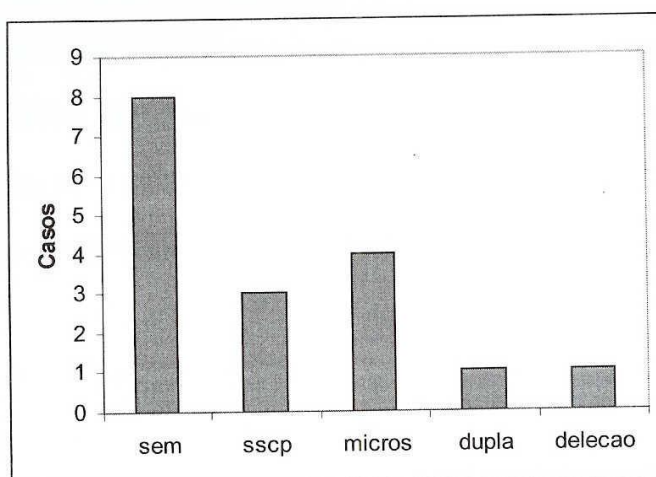




Figura 12. Comparação dos perfis para os três locos avaliados entre tumores de mama e linfonodos comprometidos. Sem- sem alteração, sscp- alteração no perfil D310, micro- $\rightarrow$  alteração no microsatélite (CA)<sub>n</sub>, dupla- alteração em D310 e microsatélite, deleção- deleção no fragmento de 8469-13447pb.

As três alterações no loco D310 foram no sentido padrão A para padrão B (Tabela 3). Entretanto, a única alteração dupla apresentou mudança do padrão B para A. Assim sendo, apesar do pequeno número de amostras observa-se uma tendência no sentido da modificação de padrão. A ausência de referência a respeito dos distintos padrões de SSCP para o loco D310 impede maiores conclusões sobre a natureza das alterações observadas e o efeito que as mesmas possam ter sobre a replicação e transcrição do DNA mitocondrial. Neste sentido, Parrella et al. (2002) observaram o mesmo tipo de alteração nos quatro sedimentos urinários de pacientes com câncer de bexiga e nos três aspirados de câncer de mama, indicando que as alterações no loco D310 podem representar uma boa ferramenta molecular para a detecção de câncer. Parella et al. (2001) e Tan et al. (2001), estudando tumores de mama, identificaram deleções de uma a nove bases, e inserções de uma e duas bases na região correspondente ao loco D310. As alterações entre tecido normal e tumoral mais frequentes neste loco correspondem a inserções de resíduos de citosina e alterações de T >CT (ZHU et al., 2005). Não há referência quanto a estudos objetivando especificamente a comparação entre tumor primário, linfonodos e metástases.

Tabela 3. Alterações nos padrões para os três locos avaliados entre o tumor de mama e linfonodos comprometidos.

<b>Tumor &gt; Linfonodo</b>	<b>Deleção</b>	<b>D310</b>	<b>Microsatélite (CA)<sub>n</sub></b>
TU > LN 9698	-	A > B	-
TU > LN 32650	-	A > B	-
TU > LN 45429	-	A > B	-
TU > LN 24853	-	-	A > M
TU > LN 27777	-	-	A > M
TU > LN 44553	-	-	A > B
TU > LN 47892	-	-	M > B
TU > LN 51169	-	B > A	M > B
TU > LN 44552	N > 4977pb	-	-

No caso das cinco alterações (Tabela 3), considerando a dupla alteração, no loco relativo ao microssatélite (CA)n observa-se que todos os casos apresentam redução do número de repetições em "tandem", seja de padrões M para B ou A para B. Assim como no loco D310, apesar do pequeno número de amostras, os dados indicam uma tendência de acúmulo de deleções no microssatélite nos linfonodos quando comparados com o tumor primário de mama. Richard et al. (2000) comparando tecido normal e tumoral (câncer de mama) encontraram nove casos de deleção no microssatélite (CA)n e sete casos de inserção neste loco, indicando que, no tumor primário, as alterações neste loco não apresentam tendência marcante.

Apenas um dos casos avaliados de tumor/linfonodo apresentou deleção (Tabela 3), estando à mesma presente unicamente no linfonodo. Assim como os outros dois casos de deleção, esta se mostrou heteroplásmica, indicando que tal alteração surgiu, possivelmente, após a instalação da população neoplásica no linfonodo.

#### 5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitos esforços estão sendo empregados na tentativa de que possamos, em um futuro não muito distante, avaliar melhor nossos pacientes quanto ao risco de se desenvolver uma neoplasia, quanto a uma melhor abordagem preventiva a ser empregada e quanto a maior eficiência das armas terapêuticas a serem utilizadas, apresentando menor toxicidade e maior especificidade. Os avanços começam a se tornar visíveis. Através de uma análise de mutação nos genes BRCA1 e BRCA2 podemos estimar um risco de desenvolvimento de um câncer de mama, ao longo da vida, da ordem de 40 a 85% (BLACKWOOD & WEBER; 1998; MIKI et al., 1994).

A análise dos tipos e da prevalência das mutações mitocondriais em pacientes com carcinoma de mama parece ser um dos caminhos promissores na biologia molecular. Muitos são os mecanismos moleculares envolvidos neste processo de carcinogênese, onde podemos observar aspectos de comportamento biológico diferenciados destes tumores, quando encontramos mutações no mtDNA. Ao que tudo indica, tais mutações parecem ser eventos

marcadores da presença desta doença, bem como também parecem apontar no sentido de uma mudança no comportamento biológico das células neoplásicas na medida em que observamos uma progressão clínica do tumor.

Em um primeiro momento pode parecer que os números observados neste trabalho quanto a presença de deleções no mtDNA ou até mesmo quanto ao padrão de modificação nos alelos encontrados sejam irrelevantes; mas quando passamos a utilizar critérios clínicos de estratificação de risco para a evolução do processo de metastização de uma neoplasia de mama (a saber: número de linfonodos acometidos, grau histológico e tamanho do tumor, dentre outros) passamos a nos deparar com dados muito semelhantes aos já observados por diversos autores (TAN et al., 2001; ZHU et al., 2005; PARRELA et al., 2001; ROSSON & KESHGEGIAN, 2004).

Possivelmente, ampliando o número de casos avaliados no que tange a análise do mtDNA do tumor primário e do mtDNA de linfonodos axilares metastáticos ou até mesmo de mtDNA de metástases de carcinoma de mama, excluindo-se os casos considerados de baixo risco para recidiva tumoral, encontraremos um maior índice de mutações nos tumores de mama. Não obstante, comparar estes achados com a evolução clínica destes pacientes, levando-se em conta também os tratamentos empregados após o ato cirúrgico, parece ser uma área de pesquisa muito promissora. A análise de mutações no mtDNA não se restringe a uma busca exclusiva de marcadores moleculares para a obtenção de um diagnóstico precoce, mas também poderá vir a ser mais uma ferramenta decisiva quanto a escolha do melhor fármaco a ser empregado para uma determinada patologia.

## 6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos é possível concluir:

- a) A metodologia adotada possibilita a extração de mtDNA de amostras parafinizadas de tumores de mama com elevada eficiência, o que por sua vez torna viáveis estudos retrospectivos e o acompanhamento histopatológico do material utilizado para a avaliação de alterações em nível de mtDNA.
- b) Variações na região correspondente a alça D do mtDNA são frequentes, tanto na região D310 quanto no microssatélite (CA)<sub>n</sub>, sendo que os alelos mais frequentes foram o alelo B da região D310 (70%) e o alelo M (83%) do microssatélite. O elevado polimorfismo da região D-loop, previamente constatado em outros trabalhos, faz desta uma região interessante para estudos de alteração em nível de mtDNA.
- c) A deleção de 4977pb foi rara (4%) nas amostras analisadas, diferindo de resultados obtidos em outros trabalhos. Por outro lado, uma nova deleção de 5247pb na região 8295-13738 foi constatada numa amostra de linfonodo metastático.
- d) Não foi observada diferença significativa na frequência dos alelos A e B da região D310 entre tumor primário e linfonodos metastáticos, mas foi constatado um aumento significativo na frequência de alelos com menor número de repetições no microssatélite (CA)<sub>n</sub> em linfonodos comprometidos. Esta última observação é indicativa da ocorrência preferencial de deleções na alça D.
- e) Comparação direta entre tumores primários e linfonodos metastáticos mostrou que em 53% dos linfonodos comprometidos observam-se alterações em nível de mtDNA. Estas alterações correspondem a deleções no microssatélite, (CA)<sub>n</sub> na região D310 e um caso de deleção de 4977pb. Considerando que as alterações em nível de mtDNA refletem a instabilidade do

genoma, tal constatação confirma o maior grau de malignidade das células presentes nos linfonodos metastáticos e a seleção de grupos celulares durante o processo de metastização.

## REFERÊNCIAS

AJCC. **American Joint Comition For Cancer**. 2002 Acesso em 06 julho 2005. Disponível em < <http://www.cancerstaging.org/>>

ANDERSON, C.T.M.; FRIEDBERG, E.C. **The presence of nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylase in extracts of human KB cells**. Nucl. Acids. Res.1980. 8, 875-888.

BEHREND, L.; HENDERSON, G.; ZWACKA, R.M. **Reactive oxygen species in oncogenic transformation**. Biochen. Soc. Trans. 2003. 31, 1441-1444

BIANCHI, M.S.; BIANCHI, N.O.; BAILLIET, A. **Mitochondrial DNA mutations in nonnaland tumor tissues from breast cancer patients**. Cytogenet. 1995. Cell Genetics 71: 99-103.

Bielawski, K.; et al. The suitability of DNA extracted from fonnalin-fixed, paraffin-embedded tissues for double differential polymerase chain reaction analysis. International Journal of Molecular Medicine. 2001. 8: 573-578.

BIRCH - M.ACHIN, A.M. Using mitochondrial DNA as a biosensor of early cancer deveIopment.**British Journal of Cancer**. 2005. 93: 271-272.

BLACKWOOD, M.A.; WEBER, B.L. BRCA1 and BRCA2: from molecular genetics to clinical medicine. **Journal of Clinical Oncology**. 1998. 16: 1639-1641.

BURGART LJ, et al **Somatic mitochondrial mutation in gastric cancer**. Am J Pathol 1995, 147: 1105-1111

CAREW, S.J.; HUANG, P. **Mitochondrial defects in cancer.** Molecular Cancer. 2002. 1, 1-9 (Epub)

COLLER, H.A.; KHRAPKO, K.; BODYAK, N.D. **High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection.** Nature Genetics. 2001. 28: 147-150.

COOPER, G.M. **The Cell: A Molecular Approach.** 2nd ed, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2000. Inc. 14:596

DAVIES, KJ. **The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cell: a new paradigm for oxidative stress.** IUBMB Life. 1999. 48: 41-47.

DELSITE, R.; et al. **Nuclear genes involved in mitochondria-to-nucleus communication in breast cancer cells.** Molecular Cancer. 2002. 1: 6-12.

DELSITE, R.L.; et al. **Mitochondrial impairment is accompanied by impaired oxidative DNA repair in the nucleus.** Mutagenesis. 2003. 18: 497-503.

DENG, G.; et al. **Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas.** Science. 1996. 274: 2057-2059

DICKSON, R.S.; PESTELL, R.G.; LIPPMAN, M.E. **Molecular biology of breast cancer.** In: Cancer: principles and practice of oncology. Vol.1.. Vita, V. T.D.; Hellman, S.; Rosenberg, S.A.(eds.).Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, MA. 2005. pp 1399-1441.

DIPPLE, A. **DNA adducts of chemical carcinogens.** Carcinogenesis. 1995. 16, 437-441

FLISS MS ; et al. **Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids.** Science. 2000. 187(5460):2017-9

FRIDOVICH, I. **Superoxide radical and superoxide dismutases.** Annu. Rev. Biochem. 1995. 64, 97-112

FUKUSHIMA, S. et al. **The frequency of 4977 base pair deletion of mitochondrial DNA in various types of liver disease and in normal liver.** Hepatology. 1995. 21(6): 1547-51.

GAMA-SOSA, MA et al. **The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors.** 1983. Nucleic Acids Res 11(19):6883-94

GREGER, V; et al. **Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastoma.** Hum Genet. 1994. 94(5):491-6.

GROSSMAN, L.I.; SHOUBRIDGE, E.A. **Mitochondrial genetics and human disease Bioassays.** 1996. 18: 983-991.

HABANO, W.; et al. **Mitochondrial gene mutation, but not large-scale deletion, is a feature of colorectal carcinomas with mitochondrial microsatellite instability.** International Journal of Cancer. 1999. 83: 625-629.

HARTMAN, P.; et al. **Mitochondrial oxidative stress can lead to nuclear hypermutability.** Mechanisms of Ageing and Development. 2003. 6: 417-420.

HAUFEL, T.; BAUER, G. **Transformation of rat fibroblasts by TGF-beta and EGF induces sensitivity for intercellular induction of apoptosis.** Anticancer Res. 2001. 21, 2617-2628



HAYASHI J; et al. **Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction.** Proc Natl Acad Sci USA, 1991. 88(23):10614-8

HEERDT, B.T.; et al. **Polymorphisms, but lack of mutations or instability, in the promotor region of mitochondrial genome in human colonic tumors.** Cancer Research. 1994. 54: 3912-3915.

HELMAN, L.J.; MALKIN, D. **Molecular Biology of Childhood Cancers.** In: Cancer. 700. Philadelphia: Vila, V.T.D.; HeJlman, S.; Rosenberg, S.A., 2005. pp1889-1897.

HLAVATA, L.; et al. **The oncogenic RAS2(va119) mutation locks respiration, independently of PKA, in a mode prone to generate ROS.** EMBO J. 2003. 22,3337-3345

HOLLIDAY, R. Mechanisms for the control of gene activity during development. **Biol Rev Camb Philos Soc**, 1990. 65(4):431-71.

HOU, JH.; WEI, YH. **AT-rich sequences flanking the 5'-end breakpoint of the 4977-bp deletion of human mitochondrial DNA are located between two bent-inducing DNA sequences that assume distorted structure in organello.** Mutat Res. 1998. 403(1-2):75-84

HOUTEN, S.V.; WOSHNER, V.; SANTOS, J.H. **Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress.** DNA Repair. 2005. 1

HUSSAIN, S.P.; HOFSETH, L.J.; HARRIS, C.C.. **Radical causes of cancer.** Nat. Rev. Cancer 3. 2003. 276-285

ISAACS, C.; et al. **Detection of LOH and mitochondrial DNA alterations in ductal lavage and nipple aspirate fluids from high-risk patients.** Breast Cancer Research and Treatment. 2004. 84: 99-105.

JESSIE BC. ; et al. **Accumulation of mitochondrial DNA deletions in the malignant prostate of patients of different ages.** Exp Gerontol 2001, 37:169-174

JUNG, K.; et al. **Antioxidants enzymes in malignant prostate cell lines and in primary cultured prostatic cells.** Free Radic, Biol. Med. 1997. 23, 127-133

KANG, D.; HAMASAKI, N. **Alterations of mitochondrial DNA in common diseases and diseases states: aging, neurodegeneration, heart failure, diabetes and cancer.** Current Medicinal Chemistry. 2005. 12: 429-441.

KLAUNIG, J.E.; KAMENDULIS, L.M. **The role of oxidative stress in carcinogenesis.** Annual. 2004.

KNUDSEN, T.; GREEN, M.L. **Response characteristics of the mitochondrial DNA genome in developmental health and disease.** Birth Defects Research. 2004. 72: 313-329.

KONSTANTINOV, A.A.; et al. **Superoxide generation by the respiratory chain of tumor mitochondria.** Biochem. Biophys. Acta, 1987. 8941 1-10

KROEMER, G.; et al. **The biochemistry of apoptosis.** Faseb J. 9. 1277-1287

LARSEN, N.B.; RASMUSSEN, M.; RASMUSSEN, L.J. **Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways?** Mitochondrion. 2005. 5: 89-108.

LEE, D.Y.; CLAYTON, D.A. **Initiation of mitochondrial DNA replication by transcription and R-loop processing.** Journal of Biological Chemistry. 1998. 273: 30614-30621.

LEWIN, B. **Oncogenes e cancer.** In: Genes VII. Lewin, B. 700. Porto Alegre: Artmed, 2001. a. Pp837-874.

MACHIN, B. **Using mitochondrial DNA as a biosensor of early cancer development.** British Journal of Cancer. 2005. 93: 271-272.

MARTIN , K.R.; BARRET. J.C. **Reactive oxygen species as double óedged swords in cellular processes: low-dose cell signaling versus high dose toxicity.** Hum. Exp. Toxicol. 2002. 21, 71-75

MARTINDALE, J.L.; HOLBROKK, N.J. **Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival.** J.Cell Physiol. 2002. 192, 1-15

MASHAL, R.D.; LESTER, S.C.; SKLAR, J. **Clonal analysis by study of X chromosome inactivation in formalin-fixed paraffin-embedded tissue.** Cancer Research. 1993. 53: 4676-4679.

MAXIMO V.; et al. **The common deletion of mitochondrial DNA is found in goiters and thyroid tumors with and without oxiphil cell change.** Ultrastruct pathol 1998; 22(3):271-3

MAXIMO,V.; SOBRINHO, S.M. **Hurthle cell turnoUTS of the thyroid.** A review with emphasis on mitochondrial abnormalities with clinical relevance. Virchows Archives 2000. 437: 107-115.

MIKI, Y.; et al. **A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1.** Science. 1994. 266: 66-71.

MURREL, G.A., FRANCIS, M.J. BROMLEY, L. **Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals.** Biochem. J. 1990. 265, 659-665

NAPOLITANO, J.S.M.; SINGH, K.K. **Mitochondrial as targets for detection and treatment of cancer.** Expert Reviews in Molecular Medicine. 2002. 1-19.

NAVIAUX, R.K. **Mitochondrial DNA disorders.** European Journal of Pediatrics. 2000. 159: 219-226.

NISHIKAWA, M.; et a. **Accumulation of mitochondrial DNA mutation with colorectal carcinogenesis in ulcerative colitis.** British Journal of Cancer. 2005. 93: 331-337.

NISHIURA, T.; et al. **Elevated serum manganese superoxide dismutase in acute leukemias.** Cancer Lett. 1992. 62, 211-215

PARRELLA, P.; et al. **Detection of mitochondrial DNA mutations in primary breast cancer and fine-needle aspirates.** Cancer Research. 2001. 61: 7623-7626

PARRELLA, P.; et al. **Mutations of the D310 mitochondrial mononucleotide repeat in primary tumors and cytological specimens.** Cancer Letters. 2002. 190: 73-77.

PELICANO, H.; CARNEY, D.; HUAND, P. **ROS stress in cancer cells and therapeutic implications.** Drug Resistance Updates. 2004.7: 97- I 10.

PREUSS, M.; **Role of antioxidant enzyme expression in the selective cytotoxic response of glioma cells to gamma-linolenic acid supplementation.** Free Radic. Biol. Med. 2000. 28, 1143-1156

PUNNONEM, K.; et al. **Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in human breast cancer.** J. Cancer Res. Clin Oncol. 1994. 120, 374-377

REED, S.I. **Cell cycle.** In: Cancer: principles and practice of oncology. Vol.1 Vita, V.T.D.; Hellman, S.; Rosenberg, SA (eds.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, MA, 2005. pp 83-94.

RICHARD, S.M.; et al. **Nuclear and mitochondrial genome instability in human breast cancer.** Cancer Research. 2000. 60(15): 4231-4237.

RICHTER, C.; **Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases.** Biochim. Biophys. Acta, 1995. 1271:67-74

ROGOUNOVITCH, T.R.; et al. **Large deletions in mitochondrial DNA in radiation-associated human thyroid tumors.** Cancer Research. 2002. 62: 7031-7041.

ROSSON, D.; KESHGEGIAN, A.A. **Frequent mutations in the mitochondrial control region DNA in breast tissue.** Cancer Letters. 2004. 215: 89-94

SALVADOR, M.; et al. **Estresse oxidativo e doenças.** In: Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. Salvador, M. E Henriques, JAP. (eds.), Editora da Ulbra, Canoas. 2004. pp. 69-110.

SANCHEZ, C.M.; PARRELLA, P.; NOMOTO, S. **Identification of a mononucleotide repeat as a major target for mitochondrial DNA alterations in human tumors.** *Cancer Res.* 2001. 61 (19): 7015-7019.

SAYABASIL, H.; et al. **Effect of mitochondrial electron transport chain inhibitors on superoxide radical generation in rat hippocampal and striatal slices.** *Antioxid. Redox Signal.* 2001. 3, 1099-1104

SHARP, M.G.; et al. **Differential expression of the mitochondrial gene cytochrome oxidase II in benign and malignant breast tissue.** *J. Pathol.* 1992. 168: 163-168

SHAULIAN, E, KARIN. M. **AP-1: linking hydrogen peroxide and oxidative stress to the control of cell proliferation and death.** *IUBMB Life,* 2001. 52(1-2):17-24

SHAY, J.W.; WERBIN , H. **New Device for the insertion of mitochondrial DNA into the human genome: significance for cancer and aging.** *Mutat. Res.* 1992. 275: 227-235

SHIBUTANI, S.; TAKESHITA, M.; GROLLMAN, A.P. **Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG.** *Nature.* 1991. 349, 431-434

SIGURGARDOTTIR, S.; HELGASON, A.; GULCHER, J.R. **The mutation rate in the human mtDNA control region.** *Am. J. Hum. Genet.* 2000. 66(5): 1599-1609.

SINGH, K.V. **Mitochondrial dysfunction is a common phenotype in aging and cancer.** *Ann. N.Y. Acad Sci.* 2004. 1019: 260-264.

STANIEK, K.; et al. **Mitochondrial superoxide radical formations is controlled by electron bifurcation to the high and low potentials pathways.** *Free Radic. Res.* 2002. 36, 381-387.

STEVENSON, W.G.S. **Invasion and metastasis. In: Cancer: principles and practice of oncology.** Vol.1. Vita, V.T.D.; Hellman, S.; Rosenberg, SA (eds.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, MA, 2005. pp 113-126

STRACHAN, T.; READ, A.P. Organização do genoma humano. In: **Genetica Molecular Humana.** Strachan, T.; Read, A.P. 2ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002. pp139-444.

SUZUKI, M.; et al. **Alterations in the mitochondrial displacement loop in lung cancers.** Clinical Cancer Research. 2003. 9: 5636-5641.

SWARTZ. HM; GUTTIERREZ. PL. **Free radical increases in cancer:** evidence that there is not a real increase. Science. 1997. 198(4320):936

SZIBOR, R.; et al. **Mitochondrial D-loop 3' (CA)<sub>n</sub> repeat polymorphism:** optimization of analysis and population data. Electrophoresis. 1997. 18(15): 2857-2860.

TAKAI, D.; ISOBE, K.; HAYASHI, J. **Transcomplementation between different types of respiration-deficient mitochondria with different pathogenic mutant mitochondrial DNAs.** J Biol Chem. 1999. 274 (16): 11199-11202

TAN, D.J.; BAI, R.K.; WONG, L.1. **Comprehensive scanning of mitochondrial DNA mutations in breast cancer.** Cancer Research. 2001. 62: 972-976

VAFA, O.; et al. **c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species and mitigate p53 function:** a mechanism for oncogene-induced genetic instability. Mol Cell. 2002. 9, 1031 -1044

VAN DER BOGERT, C.; et al. **Mitochondrial biogenesis and mitochondrial activity during the progression of the cell cycle of human leukemic cells.** Exp. Cell Res. 1988. 178:143-53

VAN DRIEL, B.E.; et al. **Expression of CuZn- and Mn-superoxide dismutase in human colorectal neoplasms.** Free Radic. Biol. Med. 1997. 23, 435-444

WANG JC. **Good cells gone bad: the cellular origins of cancer.** Trends Mol Med 2010;16:145. [PMID: 20149745]

WANG, E. WONG, E., CORTOPASSI, G. **The rate of mitochondrial mutagenesis is faster in mice than in humans.** Mutat. Res. 1997. 377:157-166

WEITZMAN, SA.; et al. **Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation.** Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(4):1261-4.

WELCH DRM; WEI LL: **Genetic and epigenetic regulation of human breast cancer progression and metastasis.** Endocr Rel Cancer 1998, 5:155-197

WHEELHOUSE, N.M.; et al. **Mitochondrial D-loop mutations and deletion profiles of cancerous and noncancerous liver in hepatitis B virus-infected liver.** British Journal of Cancer. 2005. 92: 1268-1272.

ZAMZAMI, N.; et al. **Mitochondrial control of nuclear apoptosis.** Journal of Experimental Medicine. 1996. 183: 1533-1544.

ZHU, W.; QIN, W.; SAUTER, E.R. . **Large-scale mitochondrial DNA deletion mutations and nuclear genome instability in human breast cancer.** Cancer Detection and Prevention. 2005. 28: 119-126



ZINKEL, S.; KORSMEYER, S.1. **Molecular biology of cancer: apoptosis**. In: *Cancer: principles and practice of oncology*. Vol.1. Vita, V.T.D.; Hellman, S.; Rosenberg, S.A. (eds.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, MA, 2005. pp 95-104.

ZINKEL, SS; et al. **A role for proapoptotic BID in the DNA-damage response**. *Cell*. 2005. 122(4):579-91

- Petit e Kroemer, 1998