



U

C

# FACULDADE DE MEDICINA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## **Avaliação do número de cópias do DNA mitocondrial como biomarcador no cancro do pulmão**

Ana Catarina da Silva Bonifácio

2011



U

C

# FACULDADE DE MEDICINA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## **Avaliação do número de cópias do DNA mitocondrial como biomarcador no cancro do pulmão**

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Investigação Biomédica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Manuela Grazina (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra) e co-orientação da Professora Doutora Lina Carvalho (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra)

*Copyright©, 2011 todos os direitos reservados,  
Catarina Bonifácio e Manuela Grazina*

Ana Catarina da Silva Bonifácio

2011

Laboratório de Bioquímica Genética (LBG),  
Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC) -  
Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina da  
Universidade de Coimbra (FMUC).



## **Agradecimentos**

A realização desta tese de mestrado, a fim de concluir o Mestrado em Investigação Biomédica, apenas foi possível devido ao empenho e dedicação de um conjunto de intervenientes, aos quais pretendo felicitar e agradecer:

Quero expressar o meu agradecimento à Professora Doutora Manuela Grazina por me ter acolhido no seu grupo de trabalho, pela possibilidade de realização deste projecto e também por todo o apoio, conhecimentos, compreensão e amizade prestada ao longo de todo o trabalho, pois sem o seu apoio seria de todo impossível a realização deste trabalho.

A Professora Doutora Catarina Resende de Oliveira Directora do Instituto de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e Presidente do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra agradeço o acolhimento.

À Professora Doutora Lina Carvalho quero transmitir um sincero agradecimento pelo apoio, disponibilidade e ajuda durante a realização do projecto.

À Mestre Maria João por todo o apoio, ensinamentos, compreensão e pelo apoio laboratorial prestado ao longo de todo o trabalho.

Ao Doutor Paulo Calvinho, ao José Alberto e aos doentes e seus familiares, pela colaboração na cedência de amostras e dados sem os quais este estudo não seria realizado.

À Dra. Adriana Cabete pela ajuda disponibilizada para a análise estatística realizada neste estudo.

Gostaria ainda de agradecer à VWR pelo empréstimo do equipamento Maxwell e pela oferta de kits para teste.

À Carolina Ribeiro, Daniela Luís e a todos os colaboradores do Laboratório de Bioquímica Genética do CNC/UC, no Instituto de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela disponibilidade e companheirismo prestado ao longo do ano.

À Vera Baptista, Carla Pereira, Teresa Viegas e Ana Raposo quero agradecer toda a amizade, carinho, apoio e companheirismo prestado ao longo deste ano que foram essenciais para a alegria vivida durante todos estes meses.

A todos os meus amigos, em especial à Ângela Moreira e ao Rúben Sousa, quero agradecer todo o apoio e motivação que me têm dado ao longo deste percurso.

Aos meus pais e à minha irmã por terem tornado possível a concretização deste mestrado e pelo apoio incondicional, pela motivação e por todo o amor e carinho que me deram durante todos estes anos.

A todos, muito obrigado!

# Índice

<b>Abreviaturas</b> .....	xi
<b>Resumo</b> .....	xiii
<b>Abstract</b> .....	xv
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. Mitocôndria .....	2
1.1.1. Estrutura e Função .....	2
1.1.2. Características do DNA mitocondrial .....	4
1.2. Espécies reactivas de oxigénio e stresse oxidativo.....	7
1.3. Carcinoma bronco-pulmonar .....	11
1.3.1. Taxas de incidência e mortalidade.....	11
1.3.2. Factores de risco .....	13
1.3.3. Classificação histológica.....	14
1.3.4. Classificação TNM.....	16
1.4. DNA mitocondrial e Carcinogénese .....	18
1.4.1. Carcinoma bronco-pulmonar e número de cópias do mtDNA .....	20
1.5. Objectivos.....	23
<b>2. Metodologia</b> .....	24
2.1. Caracterização do grupo de estudo .....	25
2.2. Extracção de DNA .....	26
2.2.1. Extracção de DNA de sangue periférico .....	26
2.2.2. Extracção automática de DNA de sangue periférico .....	27

2.2.3.	Extracção automática de DNA de tecido pulmonar fixado .....	28
2.3.	Quantificação de DNA extraído e análise da pureza .....	30
2.4.	Quantificação relativa do número de cópias do mtDNA .....	30
2.4.1.	PCR quantitativo em tempo real (qPCR-RT).....	30
2.4.2.	Ensaio experimental .....	33
2.5.	Análise estatística.....	34
<b>3.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>35</b>
3.1.	Avaliação do número de cópias de mtDNA – influência do método de extracção .....	36
3.2.	Análise do número de cópias de mtDNA em amostras de sangue e de tecido pulmonar .....	38
3.3.	Análise do número de cópias do mtDNA em tecido pulmonar normal e tumoral.....	41
3.4.	Análise do número de cópias do mtDNA em amostras de tecido pulmonar tumoral primário e com metástases.....	44
3.5.	Análise da correlação entre o número de cópias do mtDNA e os parâmetros clínicos .....	45
3.5.1.	Idade .....	45
3.5.2.	Hábito tabágico.....	46
3.5.3.	Estádio da doença .....	49
3.5.4.	Tipo histológico.....	51
<b>4.</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>53</b>
4.1.	Análise da influência do método de extracção de DNA no número de cópias do mtDNA .....	54

4.2. Análise do número de cópias do mtDNA em amostras de sangue e de tecido de doentes com carcinoma bronco-pulmonar.....	55
4.3. Utilidade do número de cópias do mtDNA como possível biomarcador no cancro do pulmão.....	59
4.4. Correlação entre o número de cópias do mtDNA e parâmetros clínicos [(idade, hábito tabágico, estágio da doença e tipo histológico)].....	60
<b>5. Conclusões finais</b> .....	<b>64</b>
5.1. Perspectivas futuras .....	66
<b>6. Bibliografia</b> .....	<b>67</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Cadeia de transporte de electrões da mitocôndria .....	3
<b>Figura 2</b> – Genoma mitocondrial humano .....	5
<b>Figura 3</b> – Formação de espécies reactivas de oxigénio na cadeia respiratória mitocondrial .....	9
<b>Figura 4</b> – Reacção de Fenton .....	10
<b>Figura 5</b> – Reacção de Haber-Weiss .....	10
<b>Figura 6</b> – Estimativa de novos casos de cancro e óbitos em 2010 .....	13
<b>Figura 7</b> – Conteúdo dos cartuchos do <i>Maxwell® 16 DNA Purification Kits</i> .....	28
<b>Figura 8</b> – Conteúdo dos cartuchos do <i>Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit</i> .....	29
<b>Figura 9</b> – Processo de amplificação de DNA com <i>SYBR Green</i> , em PCR em tempo-real .....	32
<b>Figura 10</b> – Curva de amplificação de qPCR-RT.....	33
<b>Figura 11</b> – Número de cópias do mtDNA (% CT) em amostras de DNA extraídas com dois métodos de extracção .....	37
<b>Figura 12</b> – Número de cópias do mtDNA de amostras de sangue de doentes com carcinoma bronco-pulmonar e doença pulmonar inflamatória.....	38
<b>Figura 13</b> – Número de cópias do mtDNA (% CT) em amostras de sangue de doentes com doença pulmonar .....	39
<b>Figura 14</b> – Número de cópias do mtDNA (% CT) em amostras de doentes com carcinoma bronco-pulmonar .....	40
<b>Figura 15</b> – Número de cópias do mtDNA em amostras de tecido pulmonar .....	41
<b>Figura 16</b> – Número de cópias do mtDNA (% CT) de amostras de tecido pulmonar ..	43
<b>Figura 17</b> – Número de cópias do mtDNA em tecido pulmonar tumoral .....	44
<b>Figura 18</b> – Número de cópias do mtDNA em amostras de tecido pulmonar, com a idade.....	45

<b>Figura 19</b> – Número de cópias do mtDNA (% CT) em amostras de sangue (A) e de tecido pulmonar tumoral (B) de doentes com cancro do pulmão, de acordo com o hábito tabágico. Legenda: P25-P75 – Intervalo interquartil. ....	47
<b>Figura 20</b> – Número de cópias do mtDNA em amostras de tecido pulmonar de fumadores activos (A), passivos (B) e não fumadores (C) com cancro do pulmão.....	49
<b>Figura 21</b> – Número de cópias do mtDNA (% CT) em amostras de sangue (A) e tecido pulmonar (B) de doentes com carcinoma bronco-pulmonar em diferentes estádios da doença.....	50
<b>Figura 22</b> – Número de cópias do mtDNA (% CT) em amostras de sangue (A) e de tecido pulmonar tumoral (B) de doentes com cancro do pulmão.....	52

## Índice de Tabelas

<b>Tabela I</b> – Sistema de estadiamento TNM para carcinomas pulmonares .....	18
<b>Tabela II</b> – Dados relativos à idade e ao género dos doentes estudados .....	25
<b>Tabela III</b> – Caracterização dos doentes com carcinoma bronco-pulmonar .....	26
<b>Tabela IV</b> – Comparação dos valores do número de cópias do mtDNA em amostras de DNA extraídas por fenol-clorofórmio e com o método de extracção automática usando o <i>Maxwell® 16 Clinical Instrument</i> .....	36
<b>Tabela V</b> – Número e percentagem de cópias do mtDNA em amostras de tecido pulmonar, tumoral e normal .....	42

## Abreviaturas

<b>ATP</b>	adenosina trifosfato ( <i>adenosine triphosphate</i> )
<b>CO<sub>2</sub></b>	dióxido de carbono
<b>CRM</b>	cadeira respiratória mitocondrial
<b>Ct</b>	<i>cycle treshold</i>
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	ião cobre
<b>D-loop</b>	<i>displacement loop</i>
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico ( <i>deoxiribonucleic acid</i> )
<b>DO</b>	densidade óptica
<b>dp</b>	desvio-padrão
<b>FADH<sub>2</sub></b>	flavina-adenina dinucleótido reduzida
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	ião ferro
<b>H<sup>+</sup></b>	ião hidrogénio
<b>H<sub>2</sub>O</b>	água
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peróxido de hidrogénio
<b>HAP</b>	hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
<b>HC</b>	cadeia pesada do mtDNA ( <i>heavy chain</i> )
<b>INE</b>	Instituto Nacional de Estatística
<b>LBG</b>	Laboratório de Bioquímica Genética
<b>LC</b>	cadeia leve do mtDNA ( <i>light chain</i> )
<b>MEM</b>	membrana externa mitocondrial
<b>MIM</b>	membrana interna mitocondrial
<b>mtDNA</b>	genoma mitocondrial
<b>NADH</b>	nicotinamida-adenina dinucleótido reduzida
<b>nDNA</b>	genoma nuclear
<b>mtSSBP</b>	proteína estabilizadora da cadeia simples de mtDNA ( <i>mitochondrial single stranded binding-protein</i> )

<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>O<sub>2</sub></b>	oxigénio
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	anião superóxido
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	peroxinitrito
<b>•OH</b>	radical hidroxilo
<b>OXPHOS</b>	Fosforilação oxidativa ( <i>oxidative phosphorylation</i> )
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	reação da polimerase em cadeia ( <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>P<sub>H</sub></b>	promotor da HC
<b>P<sub>L</sub></b>	promotor da LC
<b>PMPs</b>	partículas de sílica paramagnéticas
<b>POLG</b>	polimerase gama mitocondrial
<b>Q</b>	ubiquinona
<b>•QH</b>	radical de semi-ubiquinona
<b>qPCR-RT</b>	PCR quantitativo em tempo-real
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico ( <i>ribonucleic acid</i> )
<b>ROS</b>	espécies reactivas de oxigénio ( <i>reactive oxygen species</i> )
<b>rRNA</b>	RNA ribossómico ( <i>ribosomal ribonucleic acid</i> )
<b>SOD</b>	superóxido dismutase
<b>Taq</b>	polimerase de DNA de <i>Thermus aquaticus</i>
<b>TE</b>	TRIS-EDTA
<b>TNM</b>	tumor, nódulos, metástases ( <i>tumour, nodes, metastasis</i> )
<b>TRIS</b>	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
<b>tRNA</b>	RNA de transferência ( <i>transfer ribonucleic acid</i> )
<b>β2M</b>	microglobulina-2-β
<b>ΔCt</b>	diferença entre o Ct do alvo e do controlo endógeno

## Resumo

O cancro do pulmão é a principal causa de morte por cancro, em particular nos Estados Unidos e na Europa. A taxa de sobrevivência global em 5 anos é de apenas 15%, sendo extremamente importante o desenvolvimento de métodos de detecção precoce que incluam estratégias de forma não invasiva.

O genoma mitocondrial é mais susceptível a lesões e, conseqüentemente, adquire mutações a uma taxa mais elevada do que o DNA nuclear, devido à ausência de histonas protectoras, à taxa elevada de produção mitocondrial de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e às limitações nos mecanismos de reparação conhecidos para o mtDNA. Foram identificados em tumores humanos primários, muitos tipos de alterações no mtDNA, incluindo deleções, mutações pontuais, inserções e alteração do número de cópias. Alguns tipos de cancro apresentam um aumento do conteúdo do mtDNA, enquanto outros têm sido associados à diminuição do número de cópias do mtDNA, relativamente ao tecido não tumoral do mesmo doente.

O objectivo principal deste estudo é avaliar o número de cópias do mtDNA em sangue e em tecido pulmonar, derivados de doentes com carcinoma bronco-pulmonar para averiguar a sua utilidade como possível biomarcador.

A análise relativa ao número de cópias do mtDNA permitiu verificar uma diferença estatisticamente significativa entre as amostras de sangue e as amostras de tecido dos doentes com carcinoma bronco-pulmonar. Observou-se que 66,7% das amostras de sangue apresentam uma diminuição do número de cópias do mtDNA relativamente ao controlo, enquanto 67,6% das amostras de tecido dos mesmos doentes apresentam um aumento no tecido tumoral relativamente ao tecido pulmonar normal. O estudo comparativo deste parâmetro em amostras de sangue de casos de doença pulmonar inflamatória permitiu identificar um comportamento semelhante ao obtido para as amostras de sangue dos doentes com carcinoma bronco-pulmonar.

Este estudo permitiu concluir que o número de cópias do mtDNA no sangue não pode ser utilizado como um biomarcador do cancro do pulmão. Para além disso, permitiu confirmar que o número de cópias do mtDNA está alterado no tecido tumoral comparativamente ao tecido normal, concluindo-se que ocorre diminuição nas amostras de sangue e um aumento nas amostras de tecido, relativamente ao controlo.

A análise de correlação entre os parâmetros clínicos e o número de cópias de mtDNA no tecido normal vs. tecido tumoral, revela que ocorre um aumento do conteúdo de mtDNA no tecido normal dos fumadores activos, comparativamente aos fumadores passivos.

O presente estudo é original e representa um contributo importante para a compreensão das alterações no número de cópias do mtDNA em células cancerígenas do cancro do pulmão e em tecido periférico.

## **Abstract**

Lung cancer is the leading cause of cancer deaths particularly in the United States and in Europe. The overall 5-year survival rate is only 15% and the development of early detection assays, which include noninvasive strategies, is extremely important.

The mitochondrial genome is more susceptible to DNA damage and, consequently, acquires mutations at a higher rate than nuclear DNA, due to lack of protective histones, high rate of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production and scarcity of repair mechanisms known for mtDNA. Many types of mtDNA alterations have been identified in primary human cancers, including deletions, point mutations, insertions, and copy number changes. Some types of cancer present increased mtDNA content, while others have been associated to mtDNA copy number decreased, compared to non-cancerous tissue from the same patient.

The main aim of this study is to evaluate the mtDNA copy number in blood and lung tissue, derived from patients with lung cancer, in order to determine its role as a possible biomarker.

The analysis on the mtDNA copy number has shown a statistically significant difference between the blood and tissue samples of patients with lung cancer. It was observed that 66.7% of blood samples show a decrease in the mtDNA copy number as compared with the control, while 67.6% of samples from the same patients show an increase in cancer lung tissue, compared to normal lung tissue. The comparative study of this parameter in blood samples from cases with inflammatory lung disease has show that the results are similar to that obtained for the blood samples of patients with lung cancer.

In conclusion, this study suggests that mtDNA copy number in the blood can not be used as a biomarker of lung cancer. In addition, we have confirmed that mtDNA copy number is altered in tumor tissue compared with normal tissue; there is a decrease in blood samples and an increase in tissue samples relative to control.

Correlation analysis between clinical parameters and mtDNA copy number in normal tissue vs. tumor tissue, shows that occurs an increase of mtDNA content in normal tissue of active smokers, compared to passive smokers.

This study is original and represents an important contribution to the understand of changes in mtDNA copy number in cells of lung cancer and peripheral tissue.

## 1. Introdução

---

## 1.1. Mitocôndria

### 1.1.1. Estrutura e Função

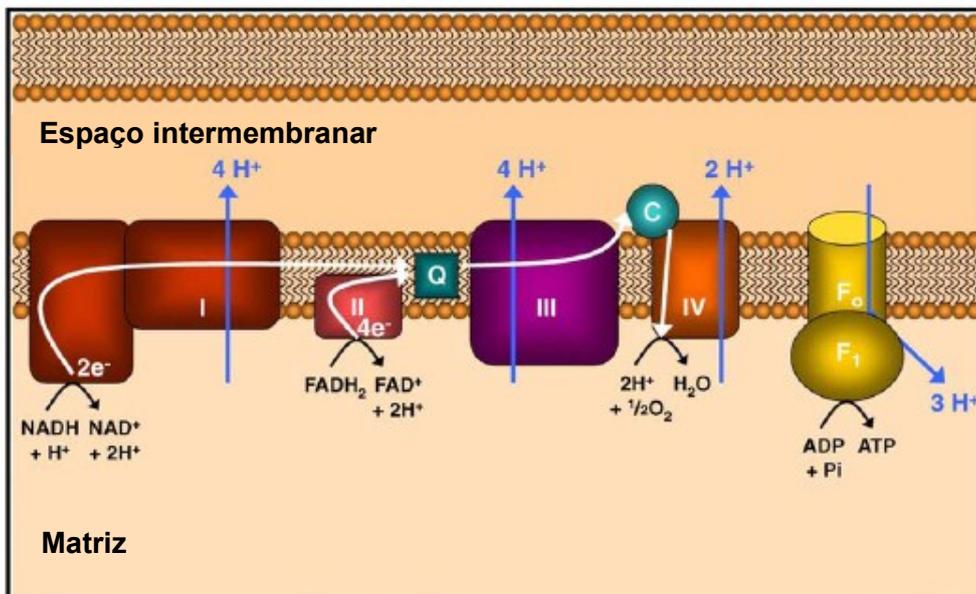
As mitocôndrias são organelos intracelulares presentes em todas as células eucarióticas e são responsáveis pela síntese de aproximadamente 90% de adenosina trifosfato (ATP), através do processo de fosforilação oxidativa (*oxidative phosphorylation*, OXPHOS) (Taanman, 1999). A mitocôndria é um organelo fundamental na célula: é constituída pela membrana externa (MEM), lisa e esférica, e interna (MIM) com numerosas cristas que delimitam o espaço intermembranar do espaço intra-mitocondrial, a matriz (Grazina, 2004).

Para além de desempenharem um papel importante na respiração aeróbia e no fornecimento de substratos energéticos para vias metabólicas intracelulares, as mitocôndrias ainda apresentam uma função importante na sinalização celular, particularmente na regulação da morte celular por apoptose. Na mitocôndria ocorrem várias vias metabólicas importantes, incluindo a fosforilação oxidativa, o ciclo de Krebs,  $\beta$ -oxidação e a síntese de lípidos e colesterol. Devido ao seu papel fundamental no organismo humano, defeitos na função mitocondrial pode ter consequências desastrosas (Schapira, 2006).

A densidade de mitocôndrias varia de tecido para tecido e está relacionado com a dependência de energia desse tecido; assim as mitocôndrias são mais abundantes em tecidos ou órgãos metabolicamente mais activos. Os neurónios e células do músculo-esquelético e cardíaco têm uma alta densidade de mitocôndrias, o que, de certa forma, explica a sua sensibilidade a defeitos dependentes de energia, resultando em deficiências mitocondriais (Schapira, 2006).

O principal papel da mitocôndria é converter os produtos de oxidação de biomoléculas, como os hidratos de carbono, em dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e água

( $H_2O$ ), usando para isso enzimas-chave do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória mitocondrial (CRM). A CRM é constituída por cinco complexos enzimáticos, localizados na MIM, que permitem a síntese de ATP, pelo processo de OXPHOS, a partir da transferência de electrões entre os vários complexos: NADH desidrogenase (Complexo I), succinato desidrogenase (Complexo II), ubiquinol-citocromo *c* redutase (Complexo III), citocromo *c* oxidase (Complexo IV) e transportadores intermediários (coenzima Q e citocromo *c*). Durante estas reacções são bombeados protões ( $H^+$ ) para o espaço intermembranar, estabelecendo um gradiente de protões. A difusão de protões através de um canal formado pela enzima ATP sintase (Complexo V) fornece energia para a síntese de ATP, pelo processo de OXPHOS, em que há acoplamento desta síntese ao transporte de electrões derivados dos equivalentes redutores (nicotinamida-adenina dinucleótido reduzida - NADH e flavina-adenina dinucleótido reduzida -  $FADH_2$ ) produzidos na oxidação de substratos (**Figura 1**) (Grazina, 2004; Johannsen & Ravussin, 2009). A formação de ATP na mitocôndria tem um papel central para o bom funcionamento de uma variedade de tecidos e órgãos (Johannsem & Ravussin, 2009).



**Figura 1** – Cadeia de transporte de electrões da mitocôndria (adaptado de Johannsen & Ravussin, 2009).

### 1.1.2. Características do DNA mitocondrial

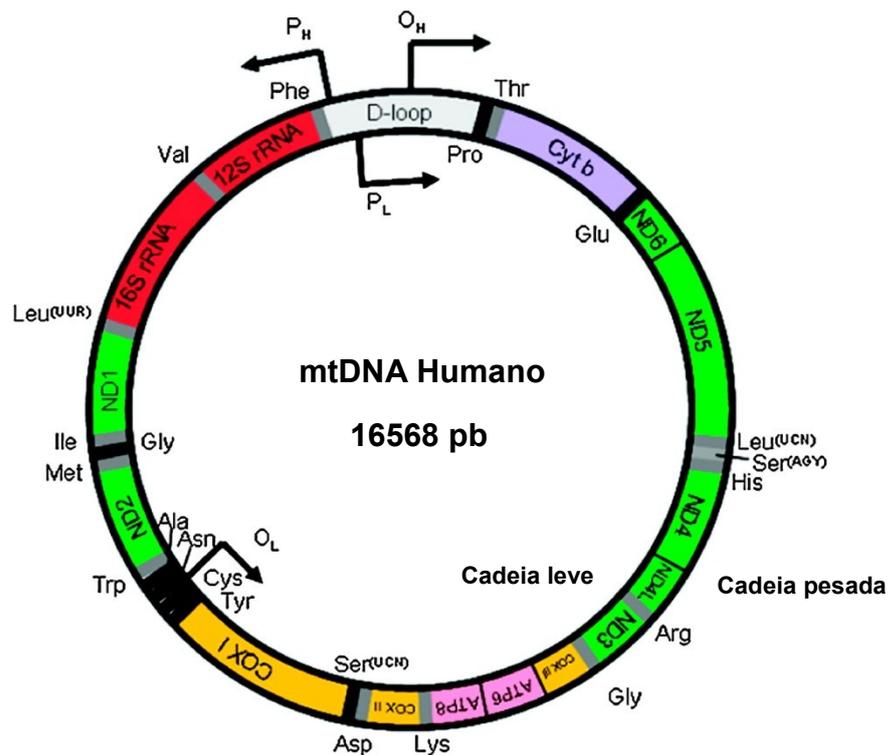
O DNA mitocondrial (mtDNA) encontra-se na matriz da mitocôndria, apresenta uma estrutura pequena, covalentemente fechada, circular e de cadeia dupla. É maioritariamente codificante e a sua replicação ocorre de forma semi-autónoma (Mao & Holt, 2009).

A replicação e a transcrição dependem de factores de origem nuclear, como a DNA polimerase gama (POLG), estando as sequências reguladoras essenciais localizadas no *D-loop* (*displacement loop*). O *D-loop* é uma região não codificante do mtDNA, localizada entre os nucleótidos, contendo um fragmento da cadeia pesada (HC) em tripla cadeia, que se encontra ligado de forma complementar à cadeia leve (LC) (Grazina, 2004). A replicação inicia-se na HC, na região *D-loop*, através da acção da POLG, que permite uma replicação fiel, constante e correcta do mtDNA e através das proteínas mtSSBP (*mitochondrial single stranded binding-protein*) que estabilizam o mtDNA aumentando a actividade da POLG (Schapira, 2006). Quando a replicação atinge o final da cadeia, a LC começa a replicar-se em sentido contrário à HC, motivo pela qual a replicação do mtDNA é mencionada como bi-direccional. Após a síntese das novas cadeias e da acção de uma DNA ligase, obtém-se uma molécula de mtDNA idêntica à cadeia molde (Grazina, 2004). Este processo permite que as mitocôndrias possuam o número de cópias do genoma mitocondrial adequado para manter a estrutura e função da CRM (Schapira, 2006).

A transcrição do mtDNA decorre de forma assimétrica, a partir dos promotores da cadeia leve ( $P_L$ ) e pesada ( $P_H$ ), localizados na região *D-loop*. Estes promotores funcionam em direcções contrárias, sendo a cadeia  $O_H$  transcrita no sentido contrário ao dos ponteiros do relógio (Grazina, 2004).

O genoma mitocondrial humano é composto por 16,568 pares de bases (pb) e codifica para 22 RNAs de transferência (tRNAs), 2 RNAs ribossomais (rRNAs) e 13

polipeptídeos do sistema enzimático da CRM (Grazina, 2004). As 13 proteínas codificadas pelo mtDNA humano são subunidades da CRM, que catalizam a OXPHOS; 7 são subunidades do complexo I, o citocromo b faz parte do complexo III, 3 são subunidades do complexo IV e 2 são subunidades do complexo V. Estas proteínas são essenciais para a OXPHOS (**Figura 2**) (Schapira, 2006; Spinazzola & Zeviani, 2009).



**Figura 2** – Genoma mitocondrial humano. Os genes que codificam as subunidades do complexo I (ND1-ND6 e ND4L) estão representados a verde; os genes que codificam subunidades do citocromo c oxidase (COI-COIII) estão representados a amarelo; o gene que codifica o citocromo b do complexo III encontra-se representado a roxo e os genes que codificam as subunidades da ATP sintase (ATP 6 e 8) estão representados a rosa. Os genes que codificam os dois rRNAs (12S e 16S) estão representados a vermelho e os genes que codificam os 22 tRNAs estão indicados pelas linhas pretas e cinzentas. A região não codificante D-loop contém sequências que são vitais para o início da replicação e transcrição do mtDNA (adaptado de Birch-Machin & Swalwell, 2010).

Em células normais, cada mitocôndria possui 2-10 cópias do mtDNA e cada célula humana pode conter entre 1000 a 10,000 cópias do mtDNA. Os genes que codificam os tRNAs e rRNAs estão distribuídos ao longo de todo o genoma, intercalados nas sequências que codificam os peptídeos da CRM (Grazina, 2004; Falkenberg *et al.*, 2007).

O mtDNA apresenta várias características particulares, uma dessas características é a presença de genoma haplóide, devido à hereditariedade do mtDNA ser estritamente por via materna. Para além disso, e ao contrário do DNA nuclear (nDNA), o mtDNA não contém intrões e histonas protectoras e encontra-se próximo da CRM, sendo mais susceptível a sofrer danos oxidativos (Singh *et al.*, 2005; Hosgood *et al.*, 2010). Devido à presença maioritária de sequências codificantes e ao sistema de reparação de DNA pouco eficiente, o mtDNA apresenta uma taxa de mutação substancialmente maior (10-20 vezes) do que o nDNA (Bonner *et al.*, 2009; Hosgood *et al.*, 2010). As moléculas de mtDNA mutadas e as moléculas de mtDNA *wild-type* podem coexistir na mesma célula, tecido ou órgão num estado chamado de heteroplasmia. Quando a mitocôndria contém apenas DNA mutado ou apenas DNA *wild-type*, ocorre homoplasmia (Penta *et al.*, 2001).

O estudo do mtDNA apresenta várias vantagens, quando comparado com o nDNA: para além de ser mais pequeno e estar mais bem caracterizado, apresenta um elevado número de cópias, sendo necessário menos tecido para análise. Além disso, o mtDNA é mais resistente aos danos provocados pelo isolamento e armazenamento, devido ao pequeno tamanho e à estrutura covalentemente fechada e circular (Jakupciak *et al.*, 2005).

A expressão normal do mtDNA é vital para a biogénese do sistema da CRM. A literatura refere que defeitos no genoma mitocondrial podem contribuir para uma ampla variedade de condições patológicas, incluindo doenças degenerativas, neurodegenerativas, envelhecimento e cancro (Jakupciak *et al.*, 2005). Os distúrbios clínicos têm uma prevalência de pelo menos 1:5,000 (Chinnery *et al.*, 2000), sendo de

5,4/100.000 na população pediátrica (Diogo *et al.*, 2009) e de 3,6/100.000 na população adulta da Região Centro de Portugal (Grazina, 2004).

## 1.2. Espécies reactivas de oxigénio e stresse oxidativo

As mitocôndrias não são só responsáveis pela produção de ATP através do ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa para manter a sobrevivência celular, mas também são responsáveis pela produção de cerca de 85% de espécies reactivas de oxigénio (ROS) intracelular durante o transporte de electrões, para promover a diferenciação celular e induzir a apoptose (Lin *et al.*, 2008).

As ROS são compostos que contêm oxigénio e são radicais livres, altamente reactivos, ou compostos facilmente convertíveis nestes radicais (Smith *et al.*, 2004). Podem ser definidos como moléculas que apresentam um ou mais electrões desemparelhados na sua órbita atómica ou molecular, o que lhe confere um elevado grau de reactividade (Valko *et al.*, 2007).

A produção de oxigénio ( $O_2$ ) nas células é uma ocorrência diária natural e é essencial para as reacções de oxidação nas vias de produção de ATP, desintoxicação e biossíntese. No entanto, através de uma série de processos enzimáticos e não enzimáticos, que existem normalmente na célula, o  $O_2$  pode receber um único electrão transformando-se em radical de oxigénio, altamente reactivo, que provoca danos nos lípidos celulares, proteínas e DNA. As principais ROS são o anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), sendo este último o mais lesivo (Smith *et al.*, 2004).

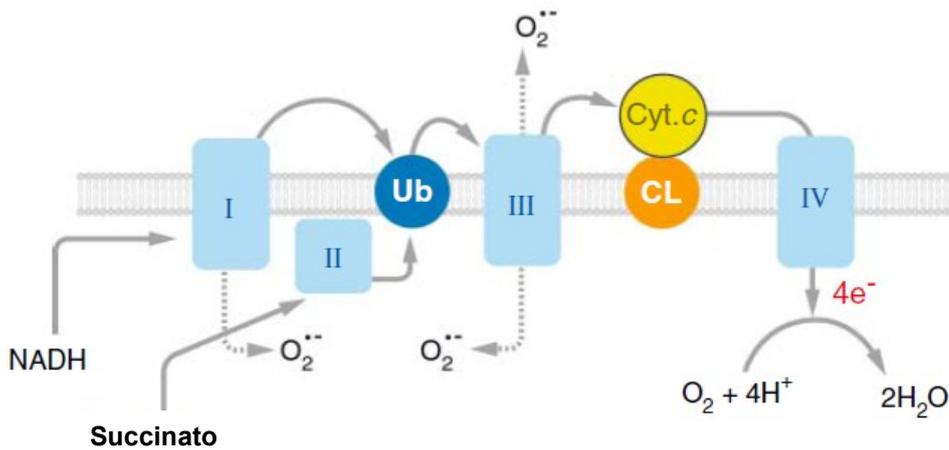
A literatura refere que cerca de 2-5% do oxigénio molecular consumido durante a respiração fisiológica normal é convertido em radicais superóxido. A redução de um electrão do oxigénio molecular produz um intermediário relativamente estável, o  $O_2^{\cdot-}$ , que pode ser considerado o precursor da maioria das ROS. A principal fonte de

produção de  $O_2^{\cdot-}$ , na maioria dos tecidos, é a cadeia de transporte de electrões mitocondrial, associada à OXPHOS, que contém vários centros redox que podem ceder electrões ao oxigénio molecular para a produção de  $O_2^{\cdot-}$ , sendo os dois locais principais de produção, a região ubiquinona – citocromo b do complexo III e o complexo I. No complexo III, a principal fonte do  $O_2^{\cdot-}$  é o radical de semi-ubiquinona ( $\bullet$ QH) que é obtido através da redução da ubiquinona (Q) por um electrão, que transfere esse electrão para o oxigénio molecular. No complexo I a produção do  $O_2^{\cdot-}$  é obtida através da auto-oxidação da  $FADH_2$  (Grazina, 2004; Brookes *et al.*, 2004; Orrenius *et al.*, 2007) (**Figura 3**). Os fármacos, a radiação natural, os poluentes do ar, os oxidantes ambientais, as toxinas, metais pesados e outras substâncias químicas também podem aumentar a formação de radicais livres nas células (Smith *et al.*, 2004; Schrader *et al.*, 2006).

Em 1956, Denham Harman propôs que os radicais livres, produzidos pelo metabolismo normal poderiam ser a causa do envelhecimento e de doenças degenerativas associadas. Em 1972 o mesmo autor verificou que as mitocôndrias são a principal fonte e o principal alvo dos radicais livres e a acumulação de danos ao longo do tempo leva ao envelhecimento (citação em Lee *et al.*, 2010).

As ROS são essenciais para a diferenciação celular; no entanto, o excesso de ROS pode danificar o DNA e levar posteriormente à carcinogénese (Lin *et al.*, 2008). Níveis elevados de ROS exercem um efeito tóxico em biomoléculas como o DNA, proteínas e lipídios, provocando acumulação de danos oxidativos em diversos locais celulares (Schrader *et al.*, 2006). A lesão celular de elementos estruturais, incluindo as membranas lipídicas das mitocôndrias, afecta a função mitocondrial, prejudicando a integridade do mtDNA e da CRM (Hosgood *et al.*, 2010). Com o tempo, o excesso de produção de ROS pode exceder a capacidade antioxidante da mitocôndria, provocando stresse oxidativo, que causa eventualmente dano ou morte celular (Johannsen & Ravussin, 2009).

As ROS têm a hipótese de contribuir para o desenvolvimento de uma ampla variedade de patologias, incluindo doenças cancerígenas, diabetes tipo II, aterosclerose, processo inflamatório crónico, isquémia e várias doenças neurodegenerativas (Droge, 2002; Orrenius *et al.*, 2007; Bonner *et al.*, 2009).



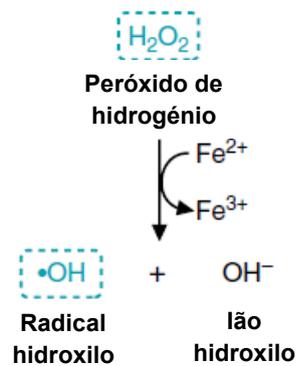
**Figura 3** – Formação de espécies reativas de oxigénio na cadeia respiratória mitocondrial. Cyt. c: citocromo c; Ub: ubiquinona (adaptado de Orrenius *et al.*, 2007).

O stresse oxidativo ocorre quando a taxa de produção de ROS ultrapassa a capacidade da célula para a sua remoção (Smith *et al.*, 2004).

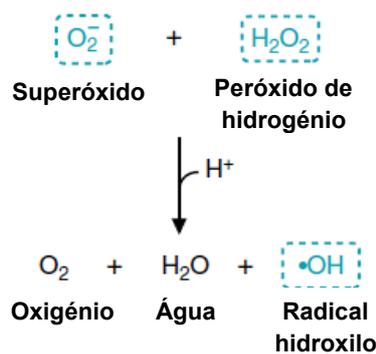
O  $O_2^{\bullet -}$  pode ser convertido em  $H_2O_2$  através de dismutação espontânea ou pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Brookes *et al.*, 2004). O  $H_2O_2$  é um agente oxidante fraco e, embora não seja um radical, é classificado como ROS, pois pode originar o  $\cdot OH$  (Smith *et al.*, 2004). Metais de transição, tais como o ião ferro ( $Fe^{2+}$ ) ou o ião cobre ( $Cu^+$ ), catalisam a formação do  $\cdot OH$  a partir de  $H_2O_2$ , através da reacção não enzimática de Fenton (**Figura 4**). Além disso, o  $O_2^{\bullet -}$  pode interagir com outras moléculas para originar ROS “secundárias”; pode produzir o  $\cdot OH$  através da interacção com o  $H_2O_2$ , pela reacção de Haber-Weiss (**Figura 5**) (Bandyopadhyay *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2007), podendo ainda originar o radical de nitrogénio

peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), altamente lesivo, por interacção com o óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) (Grazina & Oliveira, 2001).

O  $\cdot\text{OH}$  é, provavelmente, o mais reactivo das ROS; inicia reacções em cadeia, que formam peróxidos lipídicos e radicais orgânicos, apresenta um tempo de semi-vida curto, aproximadamente  $10^{-9}$ s. Quanto mais curto o tempo de semi-vida, maior é a instabilidade da sua configuração electrónica e, portanto, maior será a rapidez com que irá interagir com outras moléculas (Valko *et al.*, 2007).



**Figura 4** – Reacção de Fenton (adaptado de Smith *et al.*, 2004).



**Figura 5** – Reacção de Haber-Weiss (adaptado de Smith *et al.*, 2004).

Como as mitocôndrias são o principal local de produção de ROS, é provável que o mtDNA seja mais susceptível a danos do que o nDNA, acrescido ao facto de as mitocôndrias possuírem mecanismos de reparação de DNA menos eficientes do que o núcleo (Jakupciak *et al.*, 2005), no entanto, as células protegem-se contra os danos causados pelas ROS e outros radicais, através de sistemas de defesa anti-oxidante (enzimáticos e não enzimáticos). Nas defesas enzimáticas, destacam-se a SOD, que remove o anião superóxido, a catalase e a peroxidase do glutatião que actuam sobre o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, transformando-o em H<sub>2</sub>O. A vitamina E, vitamina C, entre outras, são defesas não enzimáticas que também protegem as células da lesão por ROS (Grazina, 2004; Smith *et al.*, 2004).

### **1.3. Carcinoma bronco-pulmonar**

#### **1.3.1. Taxas de incidência e mortalidade**

O carcinoma bronco-pulmonar é a principal causa de morte por tumor maligno em homens e mulheres, em particular nos Estados Unidos e na Europa, apesar de a sua incidência ser menor do que o cancro da próstata nos homens e o cancro da mama nas mulheres (**Figura 6**) (Pastorino *et al.*, 2010; Cagle *et al.*, 2011).

Esta patologia mata mais de 1 milhão de pessoas em todo o mundo tendo como principal factor de risco o tabagismo. Nos Estados Unidos havia mais de 215.020 casos de cancro do pulmão e 161.840 mortes em 2008 (Dasgupta *et al.*, 2009). Apesar da significativa melhoria nas terapêuticas disponíveis, incluindo cirurgia, quimioterapia e radioterapia, a taxa de sobrevivência global em 5 anos é de apenas 15%, variando de 6% a 14% para homens e de 7% a 18% nas mulheres. Desde 1985, o número

estimado de casos de cancro do pulmão aumentou mais 51% (Dasgupta *et al.*, 2009; Cagle *et al.*, 2011).

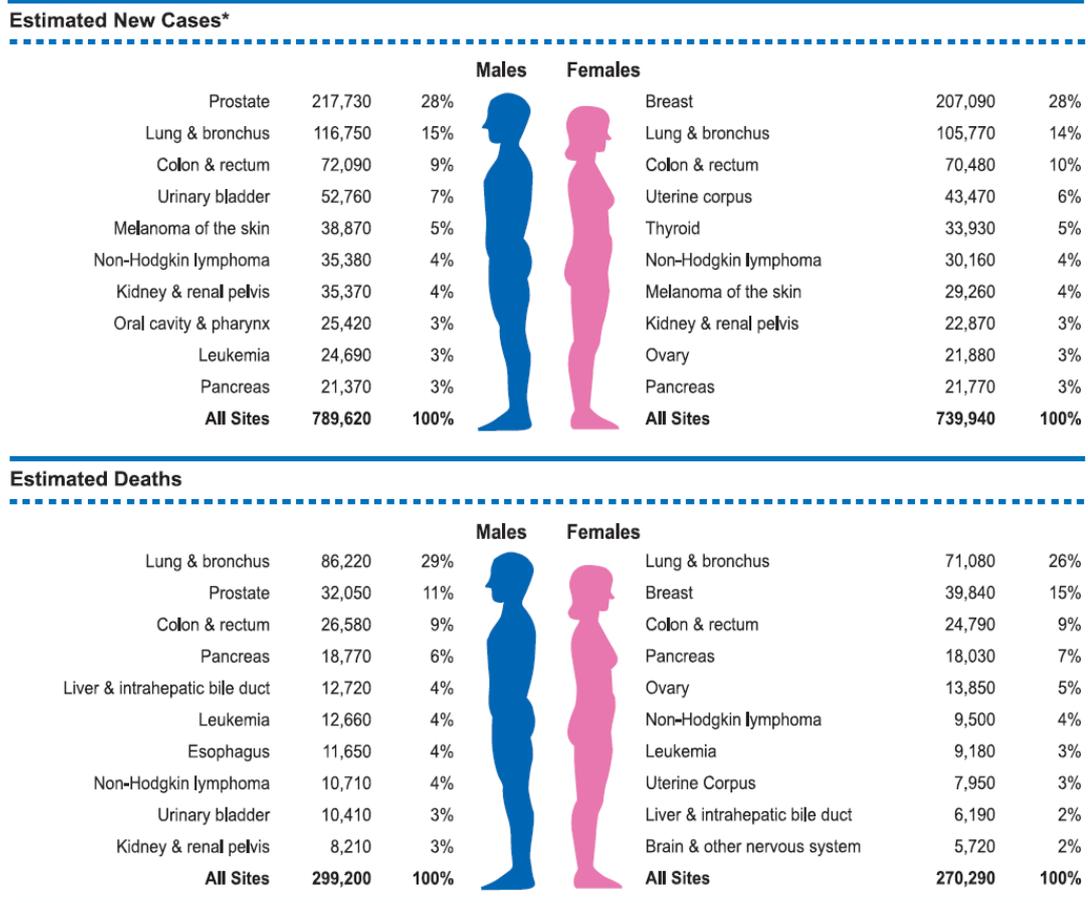
De acordo com o Instituto Nacional de Estatística (INE), em 2010, o cancro matou cerca de 30 mil pessoas em Portugal, um aumento de 20% relativamente a 2009 e deverá dentro de alguns anos tornar-se a principal causa de morte no país, ultrapassando as doenças cardiovasculares.

Em Portugal, o cancro do pulmão é a principal causa de morte nos homens portugueses, mas em termos de incidência, o cancro da próstata ocupa a primeira posição. Nos últimos anos, o número de pessoas com cancro do pulmão tem crescido em Portugal, devido ao aumento da incidência da doença nas mulheres.

O cancro do pulmão é considerado uma doença agressiva, implacavelmente progressiva com poucas opções de tratamento (Cagle *et al.*, 2011). Há várias explicações possíveis para a disparidade entre a sobrevivência no cancro do pulmão e de outros tumores comuns, incluindo a detecção tardia e a heterogeneidade histológica (Pastorino *et al.*, 2010).

Oitenta e cinco por cento dos casos de carcinoma bronco-pulmonar ocorrem em fumadores de tabaco. Além disso, doentes afectados permanecem em risco significativo para o desenvolvimento de um segundo tumor primário ao longo da sua vida. Assim, o desenvolvimento de métodos adequados para a detecção precoce da doença e que também permitam o acompanhamento e avaliação contínua da evolução da doença nos doentes com neoplasia primária de pulmão são de extrema importância (Dasgupta *et al.*, 2009).

Pode-se esperar reduções do número de casos de cancro se houver um melhor diagnóstico na população e implementação das tecnologias de rastreamento. A melhoria no prognóstico do cancro do pulmão pode ser conseguida principalmente através do desenvolvimento e validação da detecção precoce de ensaios, que incluem estratégias de forma não invasiva (Jakupciak *et al.*, 2005).



**Figura 6** – Estimativa de novos casos de cancro e óbitos em 2010 (Jemal *et al.*, 2010).

### 1.3.2. Factores de risco

Os principais factores de risco comportamentais e ambientais para a mortalidade no mundo por cancro estão relacionados com a dieta, inactividade física, uso de substâncias aditivas, exposição à poluição do ar, uso de água contaminada e predisposição genética (Weiderpass *et al.*, 2010).

Outros factores etiológicos relevantes são a exposição a hidrocarbonetos policíclicos, cromatos, arsénico e níquel. O radão, um gás radioactivo produto da desintegração do urânio, que varia de intensidade de região para região e está

presente nas minas de urânio, também é um factor etiológico relevante (Hammerschmidt *et al.*, 2009).

Sabe-se que 71% das mortes por cancro do pulmão têm como principal causa o consumo de tabaco (Weiderpass *et al.*, 2010). Os cigarros contêm vários componentes, incluindo potentes agentes cancerígenos, como o benzopireno, e uma quantidade significativa de radicais livres e estes radicais e agentes cancerígenos podem causar danos no DNA, nas proteínas e nos lípidos tornando-se assim o principal factor de risco (Lee *et al.*, 1998). O efeito combinado do uso do tabaco, baixo consumo de verduras e poluição atmosférica urbana são responsáveis por 76% das mortes por cancro do pulmão (Weiderpass *et al.*, 2010). Quinze por cento dos fumadores crónicos desenvolvem cancro do pulmão, mas 10% dos casos de cancro do pulmão ocorrem em não fumadores. Em não fumadores, a exposição ao fumo passivo ou a outras substâncias cancerígenas para o pulmão ou a poluição do ar contribuem para o cancro (Pastorino *et al.*, 2010).

A exposição a estes factores ambientais e comportamentais é evitável, através de modificações no estilo de vida que podem ter um grande impacto na redução da incidência do cancro no mundo inteiro (Weiderpass *et al.*, 2010).

### **1.3.3. Classificação histológica**

O sistema de classificação dos tumores fornece uma base para o diagnóstico do tumor e para a terapia a adoptar em cada doente e também fornece uma base crítica para estudos epidemiológicos e clínicos. A classificação é feita com base nas características histológicas dos tumores observados em cirurgia ou biopsia (Brambilla *et al.*, 2001).

De acordo com a classificação histológica da Organização Mundial de Saúde (OMS) o cancro do pulmão é dividido em quatro tipos histológicos principais:

carcinoma de células escamosas (também chamado de carcinoma epidermóide), adenocarcinoma, carcinoma do pulmão de grandes células e carcinoma do pulmão de pequenas células (Travis *et al.*, 2004).

O subtipo histológico actualmente mais comum de neoplasia de pulmão é o adenocarcinoma sendo predominante em muitos países, aumentando a incidência nos últimos anos e representa aproximadamente 28% dos casos em homens e 42% em mulheres. O carcinoma de células escamosas também é muito comum, compreende 44% dos casos de cancro do pulmão nos homens e 25% em mulheres; o carcinoma de pequenas células varia de 15 a 20% e o carcinoma de grandes células aproximadamente 10% (Travis *et al.*, 2004; Hammerschmidt *et al.*, 2009).

O adenocarcinoma é um tumor epitelial maligno com diferenciação glandular ou com produção de mucina. Os adenocarcinomas pulmonares são divididos em acinar, papilar, broncoalveolar e sólido com produção de mucina (Cagle *et al.*, 2011).

O carcinoma de células escamosas exhibe a maior correlação observada com o tabagismo (> 90%). É um tumor epitelial maligno que mostra queratinização e/ou pontes intercelulares que surge a partir do epitélio do brônquio.

O carcinoma de pequenas células é um tumor maligno constituído por células pequenas com escasso citoplasma e núcleos grandes com cromatina nuclear finamente granular, ausência ou discreta presença de nucleólos. As células são redondas, ovais e fusiformes. A necrose é tipicamente extensa e o índice mitótico é elevado.

O carcinoma de grandes células e os carcinomas pleomórficos têm ausência de características citológicas e arquitectónicas do carcinoma de pequenas células, constituindo grupos com tipos histológicos específicos e também morfologia heterogénea de sobreposição entre todos os padrões possíveis (Travis *et al.*, 2004).

### 1.3.4. Classificação TNM

O estágio da doença desempenha um papel crítico na orientação do tratamento, selecção e na determinação do prognóstico. Além disso, a avaliação da resposta ao tratamento e a pesquisa clínica do cancro são facilitados por um sistema universal. O estadiamento TNM oferece uma descrição clínica consistente e reproduzível do cancro do pulmão com base no grau de envolvimento anatómico. Isto é conseguido por definição das características do tumor primário (T), envolvimento de gânglios linfáticos (N) e metástases à distância (M). A sétima edição do estadiamento TNM foi publicada recentemente e compreende os parâmetros seguintes (Lababede *et al.*, 2011):

#### **T – Descrição do tumor primário:**

Tx – Carcinoma oculto, encontrado em células malignas no escarro ou lavado brônquio, sem visualização do tumor primário.

T0 – Nenhuma evidência do tumor primário.

Tis – Carcinoma “*in situ*”.

T1 – Tumor menor de 3 cm no seu maior diâmetro, rodeado por pulmão ou pleura visceral. Sem evidência broncoscopia da invasão do brônquio lobar. Subdivisões: T1a (tumor  $\leq$  2 cm) e T1b (2cm <tumor  $\leq$  3 cm).

T2 – Tumor > 3 cm mas  $\leq$  7 cm, envolvimento do brônquio principal (distância da carina  $\geq$  2cm) invasão da pleura visceral, presença de atelectasia ou pneumonia obstrutiva sem envolvimento de todo o pulmão. Subdivisões: T2a (3 cm <tumor  $\leq$  5cm) e T2b (5cm <tumor  $\leq$  7 cm).

T3 – Tumor > 7cm no brônquio principal (dentro de 2 cm da carina), ou tumor com atelectasia ou pneumonia obstrutiva de todo o pulmão, invasão directa da parede

torácica (incluindo tumor de sulco superior), diafragma, o nervo frénico, pleura mediastinal ou pericárdio parietal. Nódulos pulmonares no mesmo lobo do primário.

T4 – Tumor de qualquer tamanho que invade uma das seguintes estruturas: mediastino, coração, grandes vasos, traqueia, nervo laríngeo recorrente, esófago, corpo vertebral, ou carina, ou tumor com nódulo(s) num lobo diferente, ipsilaterais ao tumor primário

### **N – Envolvimento de gânglios linfáticos**

Nx – Os gânglios linfáticos não podem ser avaliados.

N0 – Sem metástase em gânglio linfático regional.

N1 – Metástase em gânglios linfáticos peribronquicos ipsilaterais e/ou hilares ipsilaterais e intrapulmonares, incluindo envolvimento por extensão directa.

N2 – Metástase em gânglio linfático mediastino ipsilateral e/ou sub-carinais.

N3 – Metástases em gânglios linfáticos hilares, mediastino contralateral; escalénico ipsilateral ou contralateral, ou supra-escalénico.

### **M – Metástases**

M0 – Ausência de metástase à distância.

M1 – Presença de metástase à distância.

Subdivisões: M1a – Derrame pleural maligno ou com nódulos neoplásicos contralaterais. M1b – Metástase à distância.

De acordo com a descrição TNM observada em cada doente, o estágio da doença é obtido através do sistema de classificação apresentado na **Tabela I** (Lababede *et al.*, 2011).

**Tabela I** – Sistema de estadiamento TNM para carcinomas pulmonares (adaptado de Lababede *et al.*, 2011).

Occult carcinoma	(TxN0M0)
Stage 0	(TisN0M0)
Stage IA	(T1a/bN0M0)
Stage IB	(T2aN0M0)
Stage IIA	(T1a/bN1M0, T2aN1M0, T2bN0M0)
Stage IIB	(T2bN1M0, T3N0M0)
Stage IIIA	(T(1-3)N2M0, T3N1M0, T4N(0-1)M0)
Stage IIIB	(T4N2M0, T(1-4)N3M0)
Stage IV	(Any T, any N, M1)

#### 1.4. DNA mitocondrial e Carcinogénese

Tem sido proposto que o mtDNA está envolvido na carcinogénese dada sua elevada susceptibilidade a mutações e a danos oxidativos, que se deve a vários factos, nomeadamente: reduzido número de sequências não codificantes e ineficiente sistema de reparação de DNA, não conseguindo, por isso, compensar os danos causados pelos erros normais de replicação ou pelos agressores externos, como a radiação ou as ROS (Penta *et al.*, 2001; Bonner *et al.*, 2009; Hosgood *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de tumores tem sido frequentemente associado a alterações na função do genoma mitocondrial e a mutações (Copeland *et al.*, 2002), que podem estar associadas a danos na CRM e produção de ATP deficiente. As mitocôndrias desempenham um papel fundamental na produção de energia e na OXPHOS, conforme descrito anteriormente, mas são produzidas ROS, como subprodutos desse processo, que provocam danos no DNA. Como as mitocôndrias são o local principal de produção de ROS, o mtDNA é mais propenso a sofrer esses danos (Jakupciak. *et al*, 2005). Todos os genes do mtDNA são essenciais para a biogénese e para a função bioenergética da mitocôndria, qualquer mutação no mtDNA

que leva à expressão alterada desses genes poderá causar uma deficiência na OXPHOS e aumento da produção de ROS no metabolismo aeróbio. Devido ao papel crucial do mtDNA na formação da CRM, mutações neste genoma podem afectar a produção de energia, o stresse oxidativo e a sobrevivência da célula contribuindo para o envelhecimento e/ou carcinogénese (Lee *et al.*, 2010).

Nas últimas duas décadas, foram identificados muitos tipos de alterações no mtDNA nos tumores humanos primários, incluindo deleções, mutações pontuais, inserções e, muito recentemente, alteração do número de cópias (Lee *et al.*, 2010).

As mutações no mtDNA têm sido descritas numa grande variedade de tumores, incluindo ovário, rim, fígado, pulmão, cólon, estômago, cérebro, cabeça e pescoço, mama e leucemia, entre outros (Singh, 2006; Mizumachi *et al.*, 2008).

Diversos estudos sugeriram que o conteúdo do mtDNA estava alterado em células tumorais em comparação com as células normais; no entanto, em algumas situações foi observado aumento do conteúdo do mtDNA e noutras situações diminuição (Bonner *et al.*, 2009). Alterações no número de cópias do mtDNA foram encontradas em vários tipos de cancro, nomeadamente da cabeça e pescoço, colo-rectal, do endométrio, do ovário, da próstata e carcinoma papilar da tiróide apresentam um aumento do número de cópias do mtDNA. Por outro lado, a maioria dos carcinomas renais, hepatocelular, cancro gástrico e cancro da mama apresentam diminuição do número de cópias do mtDNA. As alterações no número de cópias do mtDNA em tumores parecem depender do tipo de cancro, mas há ainda questões por esclarecer (Cuezva *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Mambo *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007; Mizumachi *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010).

### **1.4.1. Carcinoma bronco-pulmonar e número de cópias do mtDNA**

Em 1998, Lee *et al.* demonstraram pela primeira vez que o índice relativo do mtDNA no tecido pulmonar de doentes com doenças pulmonares e os danos oxidativos aumentavam com a idade, apoiando a ideia de que a função respiratória sofre um declínio com a idade. As células são capazes de compensar a redução da síntese de ATP induzindo a proliferação da mitocôndria e /ou aumentando a expressão de genes da OXPHOS. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, os autores propuseram que o stresse oxidativo e os danos oxidativos no DNA podiam provocar a activação da replicação e/ou a transcrição do mtDNA nos tecidos pulmonares (Lee *et al.*, 1998).

Em 2005, num estudo efectuado com amostras de tecido pulmonar de doentes com cancro do pulmão, observaram um aumento do número cópias do mtDNA em 48,4% dos casos, mas também observaram que, em 22,6% dos casos, havia diminuição do número de cópias. Neste estudo, referiram que o aumento do número de cópias do mtDNA poderia resultar de um processo de compensação devido à diminuição de energia necessária para a proliferação (Lee *et al.*, 2005). Por outro lado, a diminuição do conteúdo do mtDNA poderia resultar de mutações somáticas na região *D-loop*. Esta região controla, tanto a replicação, como a transcrição do mtDNA. Danos oxidativos e mutações somáticas nesta região podem interferir com a replicação e manutenção do mtDNA (Lee *et al.*, 2004).

Anos mais tarde, Bonner e seus colaboradores efectuaram um estudo com amostras de expectoração de doentes com cancro do pulmão. Observaram um aumento do conteúdo do mtDNA em doentes com cancro do pulmão, comparativamente a uma população controlo. Estes resultados forneceram a evidência de que existem alterações no conteúdo do mtDNA entre amostras de doentes com

cancro do pulmão e controlos. No referido estudo, o número de cópias do DNA mitocondrial foi associado positivamente ao risco de cancro do pulmão, em doentes com idade superior a 57 anos (Bonner *et al.*, 2009).

Um estudo realizado em 2008 demonstrou que a progressão do cancro do pulmão após quimioterapia, provocava uma diminuição do número de cópias do mtDNA e do stresse oxidativo, e que o stresse oxidativo estava significativamente associado ao número de cópias de mtDNA (Lin *et al.*, 2008). A diminuição do número de cópias do mtDNA tem sido observada em cancro do pulmão, carcinoma hepatocelular e cancro gástrico, em situações em que o cancro se encontra em progressão após quimioterapia (Lee *et al.*, 2005). Uma diminuição no número de cópias do mtDNA pode ser um índice de agressividade ou progressão da doença. Como nas células humanas as mitocôndrias são os principais organelos responsáveis pela produção endógena de ROS, a quantidade de ROS endógeno é proporcional à abundância de mitocôndrias nas células dos tecidos. Assim, o baixo dano oxidativo do mtDNA pode ser resultado de uma diminuição do número de mitocôndrias com menos formação de ROS endógeno (Lin *et al.*, 2008).

Um estudo muito recente realizado por Hosgood e colaboradores (2010) demonstrou, tal como os estudos anteriores, que o risco de desenvolver cancro do pulmão pode estar associado ao número de cópias do mtDNA. Neste estudo, foram analisadas amostras de sangue de doentes com cancro de pulmão, que englobava um grupo de fumadores de elevado consumo de tabaco e outro de fumadores de baixo consumo. O fumo do cigarro é uma mistura complexa de mais de 4000 substâncias, e muitas dessas substâncias químicas podem levar à produção de níveis elevados de ROS no organismo humano. Estudos anteriores mencionaram que fumadores apresentavam maiores concentrações de ROS (Asami *et al.*, 1996), apoiando os resultados deste estudo em que fumadores com elevado consumo tinham um maior número de cópias do mtDNA, como resposta compensatória. Além do aumento da expressão das defesas antioxidantes, que eliminam as ROS, as mitocôndrias

respondem ao stresse oxidativo, aumentando o número de cópias do mtDNA. Os autores deste estudo sugeriram que o número de cópias do DNA mitocondrial é particularmente importante e é biologicamente plausível avaliar a sua relevância para prever o risco futuro de cancro do pulmão entre os fumadores de elevado consumo (Hosgood *et al.*, 2010).

Embora o número de estudos que avaliaram o conteúdo de cópias do mtDNA em cancro do pulmão seja limitado, os resultados obtidos, embora controversos, mostraram evidências de que este é um parâmetro importante a avaliar e nós pretendemos contribuir, com o presente estudo, para uma melhor compreensão das alterações quantitativas do genoma mitocondrial no cancro do pulmão.

## **1.5. Objectivos**

O objectivo principal deste estudo foi avaliar o número de cópias do mtDNA em sangue e em tecido pulmonar fixado, derivados de doentes com cancro do pulmão, no sentido de averiguar a sua utilidade como biomarcador nesta patologia.

No entanto, para além de correlacionar o número de cópias do mtDNA no sangue e no tecido pulmonar de doentes com cancro do pulmão, este estudo permite ainda comparar o número de cópias do mtDNA obtido nas amostras de sangue dos doentes com cancro do pulmão com o respectivo controlo, e no tecido pulmonar vai ser possível comparar o número de cópias do tecido tumoral com o tecido normal do mesmo doente.

A disponibilidade de alguns dados clínicos relativos aos doentes (tipo de fumador, idade, estágio da doença, tipo histológico) vão permitir correlacionar estes dados com o número de cópias do mtDNA.

Este estudo é de grande importância uma vez que o cancro do pulmão é responsável por mais de 1 milhão de mortes em todo o mundo e a taxa de sobrevivência global em 5 anos é de apenas 15%. Assim, é importante que sejam efectuados estudos que futuramente possam contribuir para melhorar o diagnóstico e compreender os mecanismos moleculares subjacentes a esta patologia.

## **2. Metodologia**

---

## 2.1. Caracterização do grupo de estudo

Neste trabalho foram analisadas 55 amostras de sangue e 91 amostras de neoplasias e parênquima pulmonar, fixado em formol e incluídas em parafina, provenientes de 55 doentes dos Hospitais da Universidade de Coimbra, que deram o seu consentimento informado, nos anos de 2010 e 2011 (**Tabela II**).

Os 55 casos estudados correspondem a doenças pulmonares inflamatórias e a carcinomas bronco-pulmonares; o primeiro grupo inclui 13 doentes portadores de bronquiectasias e tuberculose. Neste grupo foram estudadas as amostras de sangue de todos os doentes. Nos carcinomas bronco-pulmonares de 42 doentes estão incluídos adenocarcinomas, carcinomas epidermóides, carcinomas neuroendócrinos, carcinomas adenoescamosos, carcinomas pleomórficos e carcinomas bronquioloalveolares; em cada caso, foram estudadas amostras de sangue, tecido neoplásico, parênquima pulmonar colhido de peça cirúrgica e distante da neoplasia, e ainda células neoplásicas de metástases, quando presentes. Na altura da recolha das amostras os doentes não tinham efectuado qualquer tipo de tratamento.

Na **tabela III** apresentam-se os dados clínicos dos doentes com carcinoma bronco-pulmonar em estudo.

**Tabela II** – Dados relativos à idade e ao género dos doentes estudados.

	Número de indivíduos	Mulheres	Homens	Idade
<b>Grupo 1 (doença pulmonar inflamatória)</b>	13	1 (2%)	12 (22%)	59±8
<b>Grupo 2 (carcinoma bronco-pulmonar)</b>	42	10 (18%)	32 (58%)	65±10
<b>Total</b>	55	11 (20%)	44 (80%)	64±10 (45-87)

**Tabela III** – Caracterização dos doentes com carcinoma bronco-pulmonar.

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
<b>Idade média (anos) ± desvio-padrão</b>	65±10
<b>Género (Masculino/Feminino)</b>	32/ 10
<b>Estádio (IA/IIA/IIIA/IB/IIB)</b>	9/ 9/ 7/ 13/ 4
<b>Fumador (Activo/Passivo/Ausente/Desconhecido)</b>	22/ 4/ 12 /4

## 2.2. Extracção de DNA

### 2.2.1. Extracção de DNA de sangue periférico

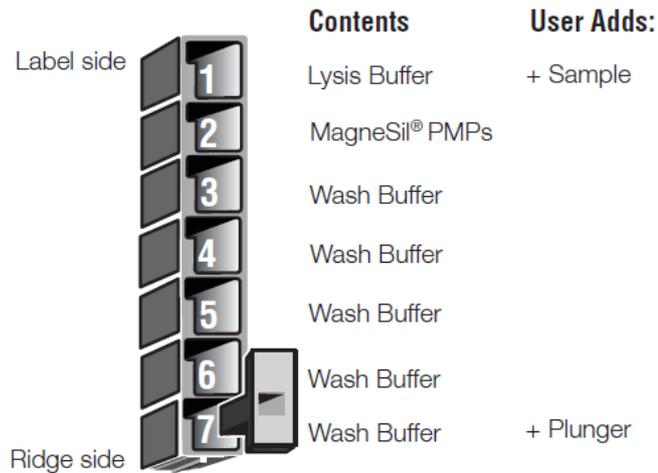
A extracção de DNA das 55 amostras de sangue periférico foi previamente efectuada por método padronizado para a extracção com fenol-clorofórmio (Grazina, 2004), tendo sido posteriormente quantificadas, (secção 2.3). As amostras são incubadas com proteinase K, procedendo-se à separação de fases com fenol-clorofórmio e precipita-se o DNA com etanol. O sedimento de DNA é dissolvido em tampão TRIS pH 8,0.

### 2.2.2. Extracção automática de DNA de sangue periférico

A extracção de DNA total de algumas amostras de sangue, foi efectuada também por outro método, recorrendo ao *Maxwell<sup>®</sup> 16 Clinical Instrument* (Promega, Hannover, Alemanha) usando o *Maxwell<sup>®</sup> 16 DNA Purification Kits* (Promega, Madison, USA).

O *Maxwell<sup>®</sup> 16 Clinical Instrument* com o kit respectivo, permite uma abordagem simples, eficiente e automatizada para a purificação de DNA genómico de sangue, células ou tecidos. Este método permite a purificação de DNA, usando partículas de sílica paramagnéticas (PMPs), que fornecem uma fase sólida móvel que otimiza a captura, lavagem e eluição do material alvo.

Cada cartucho do *Maxwell<sup>®</sup> 16 DNA Purification Kits* é composto por 7 compartimentos (**Figura 7**): o primeiro contém tampão de lise, o segundo contém PMPs e os restantes compartimentos contêm solução de lavagem. Adicionam-se, no máximo, 400 µl de sangue periférico ao primeiro compartimento e coloca-se um *Plunger* (pistão) no sétimo compartimento. Posteriormente, colocaram-se os cartuchos no *Maxwell<sup>®</sup> 16 Clinical Instrument*, juntamente com os tubos de eluição, onde previamente foi adicionado 350 µl de tampão de eluição. Após o processo de extracção automática, o conteúdo de DNA extraído é transferido para um *Eppendorf*, devidamente identificado, e é guardado no frigorífico para quantificação posterior (secção 2.3).



**Figura 7** – Conteúdo dos cartuchos do *Maxwell® 16 DNA Purification Kits*, de acordo com as instruções do fabricante. Conteúdo dos compartimentos: 1 – tampão de lise, 2 – partículas de sílica paramagnéticas, 3 a 7 – tampão de lavagem (Manual Técnico do *Maxwell® 16 DNA Purification Kits*).

### 2.2.3. Extração automática de DNA de tecido pulmonar fixado

A partir das amostras de tecido pulmonar fixado em formol e incluído em blocos de parafina foram feitos 6 cortes (10µM) de cada um dos blocos através de microdissecção manual. Depois, extraiu-se o DNA total recorrendo ao *Maxwell® 16 Clinical Instrument* e ao *Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit* (Promega, Madison, USA), segundo as instruções do fabricante.

O *Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit* permite uma abordagem simples e eficiente de purificação automática de DNA genómico de secções de tecidos fixados, o que é difícil de conseguir pelos métodos tradicionais conhecidos.

Aos 6 cortes de 10µM de tecido pulmonar foram adicionados 20 µl de proteinase K (20mg/ml) e 180 µl de tampão de incubação. Incubaram-se as amostras durante toda a noite a 70°C com agitação ligeira, seguidamente foram adicionados 400 µl de tampão de lise.

Cada cartucho do *Maxwell<sup>®</sup> 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit* é composto por 8 compartimentos (**Figura 8**): o primeiro e o terceiro contêm tampão de lise, o segundo contém PMPs, o quarto, quinto e sexto contêm solução de lavagem e os restantes compartimentos estão vazios. Adicionaram-se, no máximo, 750 µl da amostra no primeiro compartimento e colocou-se um *Plunger* no oitavo compartimento. Posteriormente colocaram-se os cartuchos no *Maxwell<sup>®</sup> 16 Clinical Instrument* juntamente com os tubos de eluição onde previamente foi adicionado tampão de eluição (75 µl). Após o processo de extracção automática o DNA extraído foi guardado a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ .



Well	Contents	User Adds
1.	Lysis Buffer	Sample
2.	Paramagnetic Silica Particles	
3.	Lysis Buffer	
4.	Wash Buffer	
5.	Wash Buffer	
6.	Wash Buffer	
7.	Empty	
8.	Empty	Plunger

**Figura 8** – Conteúdo dos cartuchos do *Maxwell<sup>®</sup> 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit*, de acordo com as instruções do fabricante. Conteúdo dos compartimentos: 1 – tampão de lise, 2 – partículas de sílica paramagnéticas, 3 – tampão de lise, 4 a 6 – tampão de lavagem, 7 e 8 – vazios (Manual Técnico do *Maxwell<sup>®</sup> 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit*).

### **2.3. Quantificação de DNA extraído e análise da pureza**

A concentração e a pureza do DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotómetro, com o equipamento *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific, Wilmington, USA) e com o auxílio do *Software® V3.5* respectivo.

O procedimento usado para quantificar as amostras de DNA consistiu em calibrar o aparelho usando 2 µl de Branco (TE no caso de amostras extraídas pelo método padronizado e tampão de eluição no caso de amostras extraídas pelo método automático). Posteriormente, usaram-se 2 µl das amostras de DNA a quantificar. A leitura da absorvância é efectuada a 260 nm e 280 nm. O quociente entre a densidade óptica a 260 nm e 280 nm ( $DO_{260}/DO_{280}$ ) fornece uma estimativa da pureza de DNA. Valores próximos de 1,8 são indicativos de elevado grau de pureza. Valores de razão inferiores a 1,6 são indicativos de contaminação com proteínas, e valores superiores a 2 indicam possível contaminação com RNA ou solventes (Desjardins & Conklin, 2010).

### **2.4. Quantificação relativa do número de cópias do mtDNA**

#### **2.4.1. PCR quantitativo em tempo real (qPCR-RT)**

A PCR em tempo real (qPCR-RT) revolucionou a área de diagnóstico molecular apresentando rapidamente um número crescente de aplicações. Permitiu a mudança do diagnóstico molecular para uma abordagem de alto rendimento, sendo uma tecnologia automatizada com menores tempos de retorno (Arya *et al.*, 2005).

A PCR em tempo real associa a metodologia de PCR convencional a um sistema de detecção e quantificação de fluorescência produzida durante os ciclos de

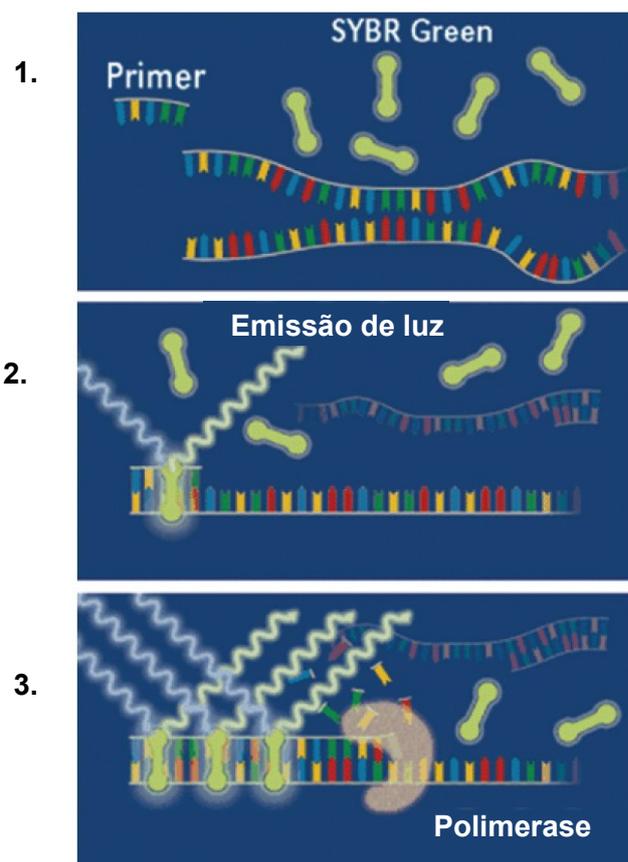
amplificação. A possibilidade de monitorar, ao longo da reacção, a quantidade de produto formado a cada ciclo e de quantificar este produto durante a sua fase óptima de formação, confere maior precisão e reprodutibilidade à PCR em tempo real em comparação com a PCR convencional. Esta metodologia permite a amplificação, detecção e quantificação do DNA em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados e minimizando o risco decorrente de possíveis contaminações (Arya *et al.*, 2005).

No presente estudo, usa-se o qPCR-RT para quantificar o número de cópias do mtDNA. Este método baseia-se no uso da *Taq DNA polimerase*, uma enzima com actividade de exonuclease 5'→ 3', e no uso de *primers* específicos para a sequência alvo. A detecção dos produtos de PCR é possível devido ao uso de fluorocromos intercalados nas cadeias de DNA; neste caso, o corante utilizado é o SYBR<sup>®</sup> Green. Estas moléculas são *DNA-binding dye* e incorporam-se nas cadeias duplas de DNA, que se formam durante a reacção de PCR, emitindo fluorescência proporcional à quantidade de produto sintetizado (**Figura 9**) (Giulietti *et al.*, 2001; Sherrill *et al.*, 2004).

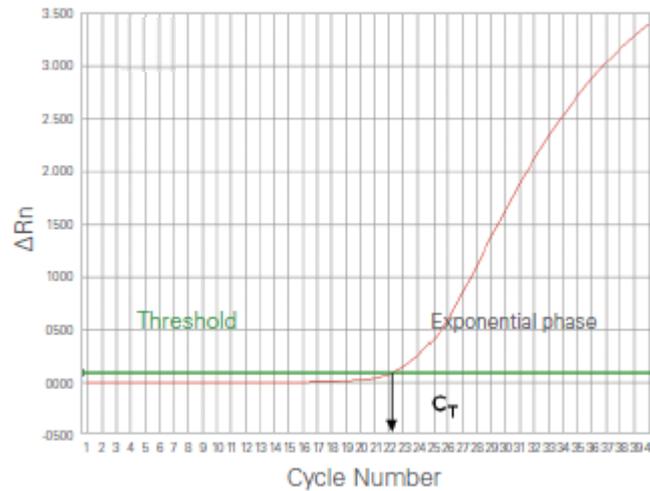
Este método apresenta várias vantagens, nomeadamente: o facto de se poder usar o SYBR<sup>®</sup> Green com qualquer par de *primers* e qualquer sequência alvo; é um método económico e permite observar um aumento do sinal de fluorescência com o aumento da amplificação do produto. A principal desvantagem deste método é o facto do SYBR<sup>®</sup> Green não ser específico, uma vez que o corante se liga a todas as cadeias duplas de DNA formadas durante a reacção de PCR, detectando também produtos de PCR inespecíficos e dímeros de *primers*, se os houver (Giulietti *et al.*, 2001; Arya *et al.*, 2005).

Os sinais de fluorescência são detectados por um sistema óptico e analisados pelo *software* do aparelho, à medida que o produto é amplificado, e o gráfico típico resultante encontra-se na **Figura 10**. Esta metodologia permite monitorizar, em tempo real, o momento da reacção em que a quantidade de fluorescência ultrapassa um limiar definido, que é indicado como Ct (*cycle treshold*) (Arya *et al.*, 2005).

A quantificação relativa de produto amplificado é realizada através da diferença entre os valores de Ct para a amostra alvo e para o controlo endógeno (Bernard & Wittwer, 2002; Arya *et al.*, 2005).



**Figura 9** – Processo de amplificação de DNA com *SYBR Green*, em PCR em tempo-real. Legenda: 1. desnaturalização; 2. *annealing*; 3. Extensão (adaptado de <http://www.gene-quantification.de/chemistry.html>).



**Figura 10** – Curva de amplificação de qPCR-RT. Legenda:  $\Delta Rn$  – Emissão de fluorescência do produto em cada momento,  $C_T$  – *Cycle threshold* (adaptado de [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_053906.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_053906.pdf)).

#### 2.4.2. Ensaio experimental

A quantificação do número de cópias do mtDNA das amostras estudadas foi realizada por PCR quantitativo em tempo real recorrendo ao aparelho *7500 Fast-Real time PCR system* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Para a realização deste método, utilizou-se *SYBR<sup>®</sup> Green* (Bio-Rad, Foster City, CA). Foram amplificados os genes *Microglobulina-2-β (β2M)* (nuclear, de cópia única) e *tRNA leucine 1* (gene mitocondrial), com primers específicos e *Taq polimerase* (Bai & Wong, 2005), no equipamento *7500 Fast-Real time PCR system*.

As condições de PCR incluíram a aplicação de um programa de 30-35 ciclos de três temperaturas (95°C; ~60°C; 72°C).

Os resultados foram analisados com o *Software 7500*<sup>®</sup> V.2.0.4. A quantificação relativa do número de cópias do mtDNA da amostra alvo é obtida através da fórmula  $2^{-\Delta Ct}$ , onde  $\Delta Ct = (Ct \text{ alvo} - Ct \text{ controlo})$ .

## **2.5. Análise estatística**

Os resultados foram analisados através de testes estatísticos: *t-student*, *Kruskal-Wallis* ou *Mann-Whitney*, com recurso ao *Software GraphPad Prism*<sup>®</sup> v5.0 e *SPSS*<sup>®</sup> 19.0. As diferenças são consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## **3. Resultados**

---

### 3.1. Avaliação do número de cópias de mtDNA – influência do método de extracção

Das 55 amostras de sangue periférico, cujo DNA foi extraído previamente pelo método padronizado de fenol-clorofórmio, 10 amostras (sequenciais) foram também submetidas a extracção por um segundo método (*Maxwell<sup>®</sup> 16 DNA Purification Kits*).

Esta abordagem teve como objectivo a análise da influência do método de extracção do mtDNA na avaliação do número de cópias do mtDNA.

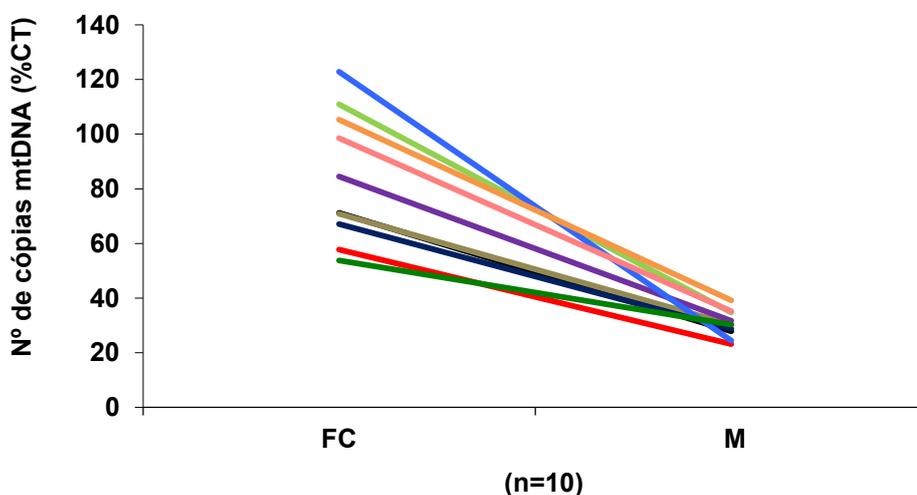
Na **tabela IV** mostra-se que o número de cópias é sempre mais elevado nas amostras cuja extracção foi feita pelo método de fenol-clorofórmio. Através da análise da razão do número de cópias entre os dois métodos, verifica-se que a extracção automática apresenta um rendimento em média 2,8x inferior à extracção por fenol-clorofórmio. O cálculo da diferença entre os valores obtidos com os dois métodos demonstrou que existe uma grande dispersão entre as diferenças observadas, tendo sido a diferença mais pequena de 23,5% e a maior de 98,5%.

**Tabela IV** – Comparação dos valores do número de cópias do mtDNA em amostras de DNA extraídas por fenol-clorofórmio e com o método de extracção automática usando o *Maxwell<sup>®</sup> 16 Clinical Instrument*.

Amostra	Nº cópias mtDNA* (% CT) Fenol-clorofórmio	Nº cópias mtDNA* (% CT) Maxwell <sup>®</sup>	Diferença	Razão número cópias
1	71,2	27,8	43,4	2,56
2	70,8	30,3	40,5	2,34
3	84,5	31,7	52,8	2,66
4	110,9	34,7	76,2	3,2
5	57,7	23,1	34,6	2,49
6	67,1	28,7	38,4	2,34
7	122,9	24,4	98,5	5,05
8	105,3	39,2	66,1	2,69
9	98,5	35,2	63,3	2,8
10	53,8	30,3	23,5	1,77

Nota: \* Os valores são apresentados em percentagem do controlo (CT).

No gráfico da **Figura 11** estão representados os valores obtidos com os dois métodos e sendo a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). Os valores do número de cópias (% CT) em amostras de DNA extraídas com fenol-clorofórmio são sempre mais elevados, em relação ao método de extracção automática. Em média, as diferenças observadas são de  $53,7 \pm 22,5$  com intervalo de confiança 37,6 - 69,8 a 95%.

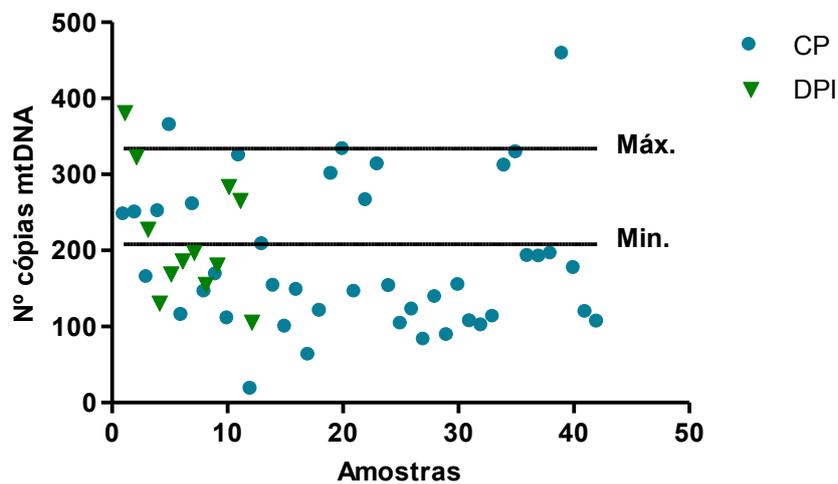


**Figura 11** – Número de cópias do mtDNA (% CT) em amostras de DNA extraídas com dois métodos de extracção. Legenda: FC - Método de extracção por fenol-clorofórmio; M – Método de extracção automática através do *Maxwell® 16 Clinical Instrument*; % CT – percentagem relativa ao controlo.

### 3.2. Análise do número de cópias de mtDNA em amostras de sangue e de tecido pulmonar

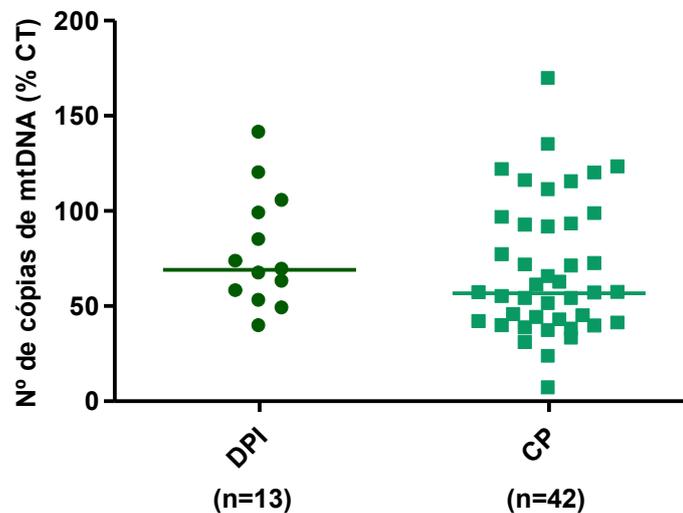
Comparou-se o número de cópias do mtDNA de amostras de sangue dos doentes com carcinoma bronco-pulmonar e doença pulmonar inflamatória com o valor controlo. O valor controlo para amostras de sangue no LBG é  $271 \pm 63$  (média  $\pm$  dp).

O gráfico da **Figura 12** mostra que 66,7% das amostras de sangue de doentes com carcinoma bronco-pulmonar apresentam uma diminuição significativa ( $p < 0,0001$ ) do número de cópias em comparação com o controlo, e 4,8% apresentam um aumento. Os restantes valores encontram-se na gama de referência (28,5%). As amostras relativas à doença pulmonar inflamatória apresentam um comportamento idêntico (61,5% apresentam diminuição do número de cópias).



**Figura 12** – Número de cópias do mtDNA de amostras de sangue de doentes com carcinoma bronco-pulmonar e doença pulmonar inflamatória. Legenda: CP – Cancro do pulmão (n=42); DPI – Doença pulmonar inflamatória (n=13); Min. – Valor de referência mínimo; Máx. – Valor de referência máximo.

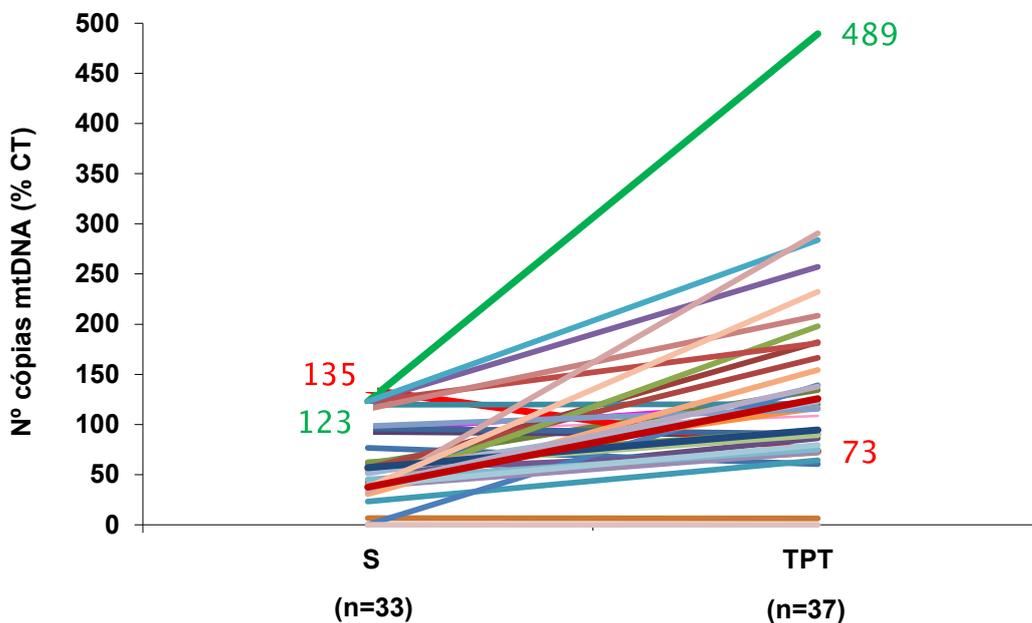
Para analisar a utilidade do número de cópias do mtDNA como possível biomarcador no cancro do pulmão, comparou-se, em primeiro lugar, os resultados do estudo das amostras dos dois grupos em estudo. Os valores obtidos para as amostras de doença pulmonar inflamatória apresentam uma mediana de 69, enquanto as amostras de cancro do pulmão apresentam uma mediana de 57 (**Figura 13**), não sendo a diferença estatisticamente significativa ( $p=0,1944$ ).



**Figura 13** – Número de cópias do mtDNA (% CT) em amostras de sangue de doentes com doença pulmonar. Legenda: DPI – Doença pulmonar inflamatória; CP – Cancro do pulmão; % CT – percentagem relativa ao controlo; o traço horizontal representa o valor da mediana.

Por outro lado, pretende-se comparar o número de cópias do mtDNA (% CT) em amostras de sangue e de tecido pulmonar tumoral do mesmo doente. Observa-se que, das 37 amostras estudadas, 32 (86,5%) apresentam um valor superior no tecido pulmonar tumoral enquanto 5 (13,5%) apresentam um valor superior nas amostras de sangue (**Figura 14**), sendo as diferenças estatisticamente significativas, ( $p < 0,0001$ ). Os valores das diferenças observadas variam muito, sendo o valor máximo observado

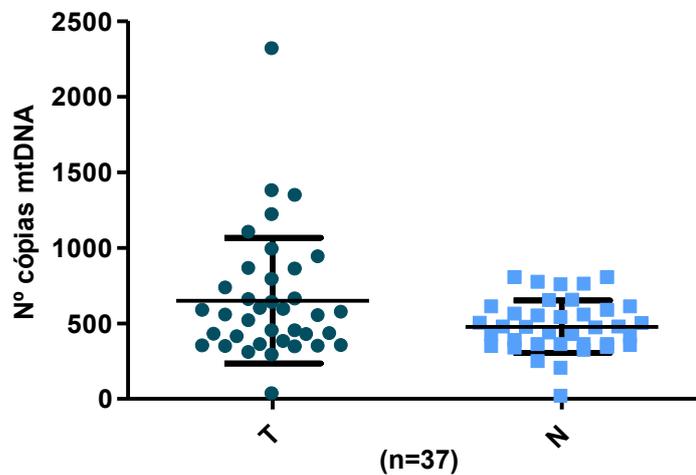
de 366,5. Através da mediana das diferenças entre as duas amostras, observa-se que metade das amostras apresentam uma diferença igual ou superior a 40,1 e 25% das amostras apresentam uma diferença igual ou superior a 104. Através destes resultados é possível afirmar que o número de cópias do mtDNA (% CT) é superior nas amostras de tecido pulmonar tumoral.



**Figura 14** – Número de cópias do mtDNA (% CT) em amostras de doentes com carcinoma bronco-pulmonar. Legenda: S – amostras de sangue; TPT - amostras de tecido pulmonar tumoral; % CT – percentagem relativa ao controlo; Linha verde – maior aumento do número de cópias (% CT); Linha vermelha – maior diminuição do número de cópias (% CT).

### 3.3. Análise do número de cópias do mtDNA em tecido pulmonar normal e tumoral

Através do gráfico da **Figura 15**, observa-se que as amostras de tecido pulmonar tumoral apresentam um número de cópias mais elevado quando comparado com o tecido normal, apresentando respectivamente uma média  $\pm$  desvio-padrão de  $650 \pm 416$  e  $476 \pm 174$ .



**Figura 15** – Número de cópias do mtDNA em amostras de tecido pulmonar.  
Legenda: T – Tecido pulmonar tumoral; N – Tecido pulmonar normal.

Para confirmar essas diferenças calculou-se a percentagem do número de cópias do mtDNA (% CT), que relaciona o número de cópias do tecido pulmonar tumoral com o tecido pulmonar normal do mesmo doente (**Tabela V**). Considerando que 100% corresponde à inexistência de diferença entre o tecido pulmonar tumoral e normal, calculou-se a média da percentagem do número de cópias,  $153,2\% \pm 116,5$ , e verificou-se que a média é diferente de 100%, e essa diferença é estatisticamente significativa ( $p=0,008$ ). O valor mais baixo observado é 47% e o mais elevado é 651,4% (**Tabela V**). Assim, fica provado que as diferenças entre os dois tipos de tecido são

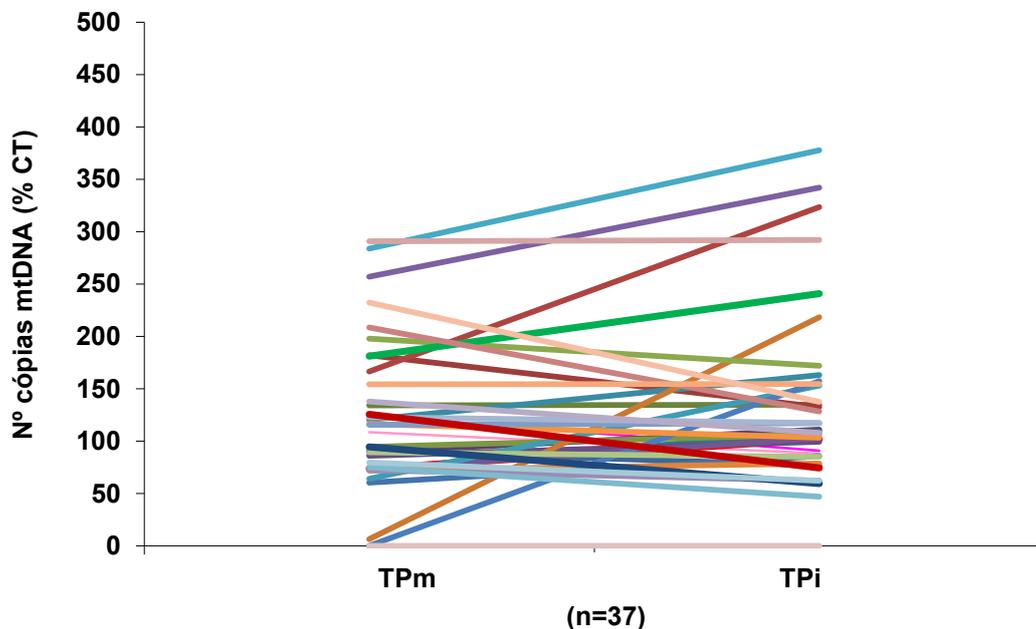
estatisticamente significativas e que 67,6% dos doentes apresentam valores mais elevados no tecido pulmonar tumoral em comparação com o tecido normal.

**Tabela V** – Número e percentagem de cópias do mtDNA em amostras de tecido pulmonar, tumoral e normal.

Amostras de tecido	Nº de cópias de tecido pulmonar tumoral	Nº de cópias de tecido pulmonar normal	Percentagem do nº cópias mtDNA (tumor/normal, %)
1	513	583	88,0
2	589	647	91,0
3	635	471	134,9
4	423	381	111,0
5	346	317	109,0
6	349	342	101,9
7	429	557	77,0
8	860	649	132,6
9	448	421	106,3
10	407	410	99,4
11	569	349	163,0
12	30	14	218,4
13	286	333	85,8
14	787	243	323,3
15	936	545	172,0
16	346	336	103,0
17	304	198	153,0
18	340	432	78,8
19	658	418	157,3
20	2314	355	651,4
21	856	355	240,9
22	1215	355	342,0
23	1342	355	377,7
24	551	534	103,3
25	547	467	117,1
26	986	768	128,5
27	423	496	85,2
28	343	551	62,1
29	355	755	47,0
30	730	472	154,7
31	581	495	117,4
32	1375	471	291,9
33	447	750	59,6
34	652	604	107,9
35	376	604	62,2
36	1098	798	137,6
37	594	798	74,4

Os resultados do número de cópias de tecido pulmonar, tumoral e normal (% CT), foram analisados de duas formas diferentes. Por um lado, foi efectuado o cálculo individual, TPi, com base na fórmula: [(número cópias do tecido tumoral/ número cópias do tecido normal do mesmo doente) x 100]. Por outro lado, foi também efectuado o cálculo através da média, TPm, com base na fórmula: [(número cópias do tecido tumoral/ número cópias médio dos tecidos normais) x 100].

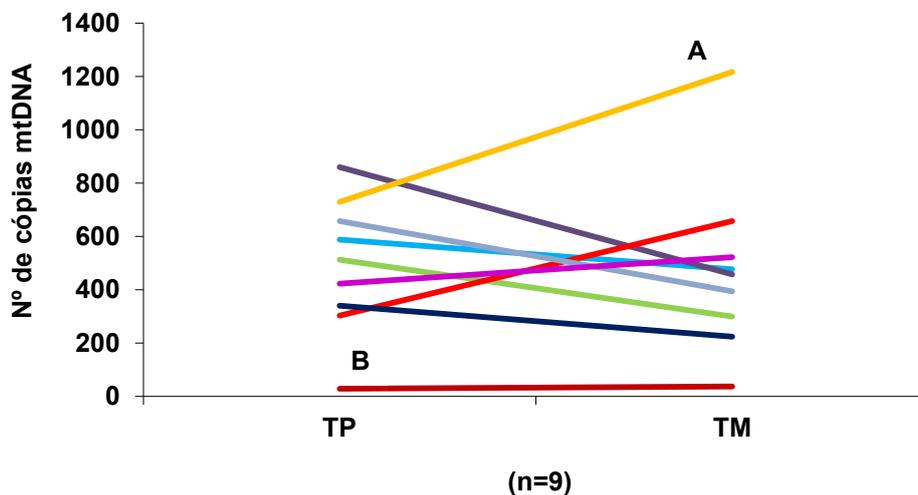
No gráfico da **Figura 16** estão representados os valores obtidos pelas duas abordagens de cálculo. Assim, analisando as diferenças, observou-se que 16 casos (43,2%) apresentam um número de cópias do mtDNA (% CT) mais elevado, no cálculo feito com a média, enquanto 21 (56,8%) apresentam valores mais elevados com o cálculo individual, comparativamente ao respectivo controlo. No entanto, as diferenças observadas entre os dois métodos de cálculo não são estatisticamente significativas (p=0,1424).



**Figura 16** – Número de cópias do mtDNA (% CT) de amostras de tecido pulmonar. Legenda: TPm – resultado calculado através da média dos controlos; TPi – resultado calculado através do controlo individual; % CT – percentagem relativa ao controlo.

### 3.4. Análise do número de cópias do mtDNA em amostras de tecido pulmonar tumoral primário e com metástases

Para verificar se existem diferenças no número de cópias do mtDNA em amostras de tecido tumoral primário e em tecido tumoral com presença de metástase, do mesmo doente, analisaram-se os resultados das amostras dos doentes que possuíam estes dois tipos de tecidos (n=9). A partir da análise do gráfico da **Figura 17**, verifica-se que, em 5 doentes (55,6%), o número de cópias do mtDNA é mais elevado no tumor primário. No entanto, em 4 doentes (44,4%) é mais elevado no tumor com presença de metástases. As diferenças não são consistentes para todos os doentes. A maior diferença observada entre os dois tecidos é de 354,4 (ponto A da **Figura 17**) e a menor diferença é de 8,4 (ponto B da **Figura 17**). As diferenças entre os dois tecidos pulmonares não são estatisticamente significativas (p=0,8629).

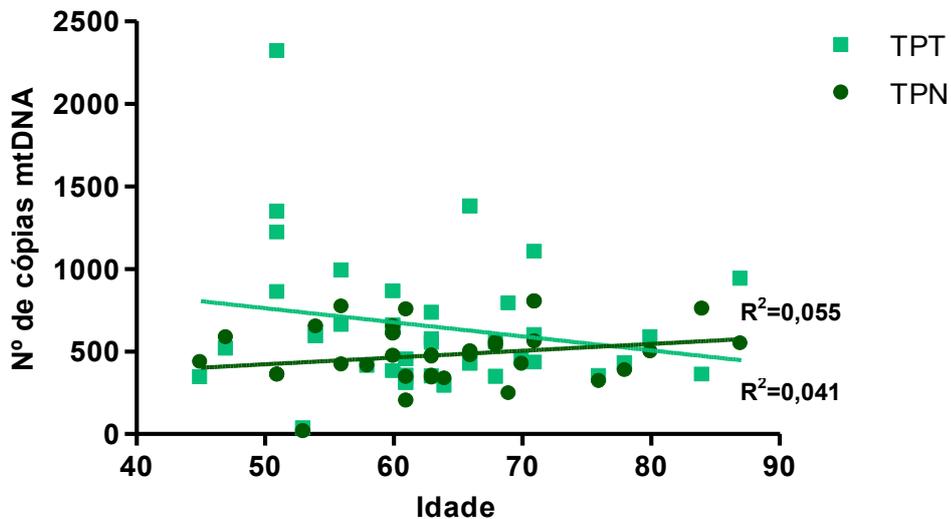


**Figura 17** – Número de cópias do mtDNA em tecido pulmonar tumoral. Legenda: TP – Tumor primário; TM – Tumor com presença de metástases; A – maior diferença observada no número de cópias dos dois tecidos; B – menor diferença observada no número de cópias dos dois tecidos.

### 3.5. Análise da correlação entre o número de cópias do mtDNA e os parâmetros clínicos

#### 3.5.1. Idade

Pela análise do gráfico da **Figura 18** verifica-se que o número de cópias do mtDNA no tecido pulmonar normal apresenta um pequeno aumento com a idade e o tecido pulmonar tumoral apresenta uma pequena diminuição ao longo da idade. No entanto, estas diferenças não são estatisticamente significativas,  $p=0,1633$  e  $p=0,2270$  respectivamente.

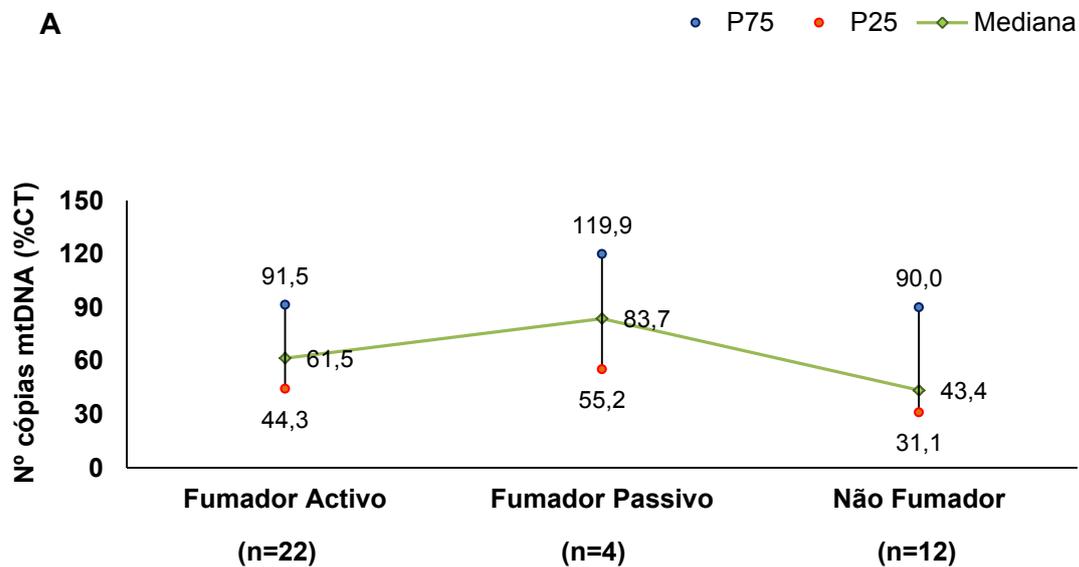


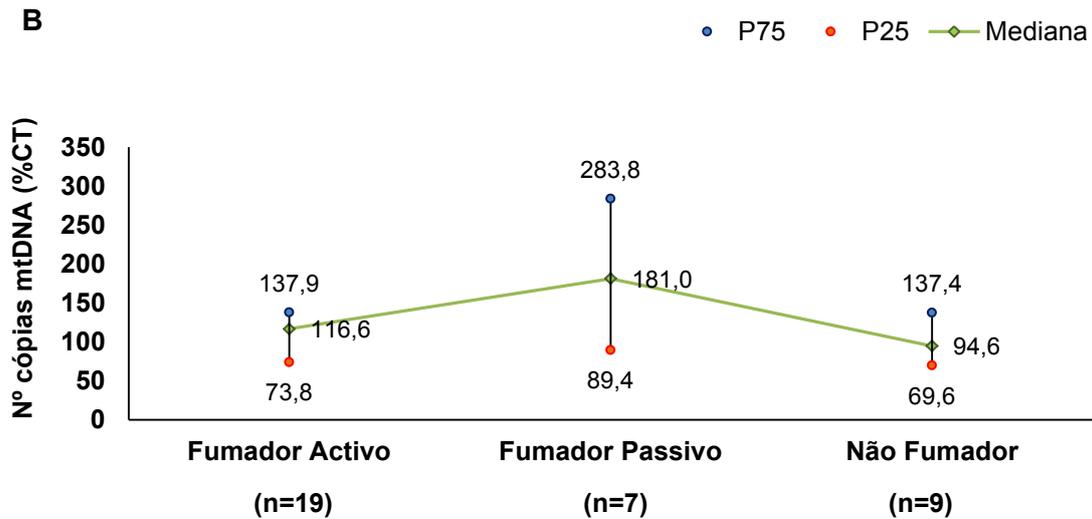
**Figura 18** – Número de cópias do mtDNA em amostras de tecido pulmonar, com a idade. Legenda: TPT – Tecido pulmonar tumoral; TPN – Tecido pulmonar normal.

### 3.5.2. Hábito tabágico

A amostragem é, na sua maioria (57,9%), composta por fumadores activos, sendo os restantes fumadores passivos (10,5%) e não fumadores (31,6%).

Verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,187$ ) entre os três grupos no número de cópias do mtDNA (% CT) do sangue (**Figura 19-A**), bem como do tecido pulmonar ( $p=0,157$ ) (**Figura 19-B**). Em ambos os casos os intervalos interquartil não variam muito e as medianas não apresentam diferenças estatisticamente significativas, indicando que os resultados não são influenciados pelo hábito tabágico, tanto no sangue como no tecido pulmonar, relativamente aos controlos respectivos.

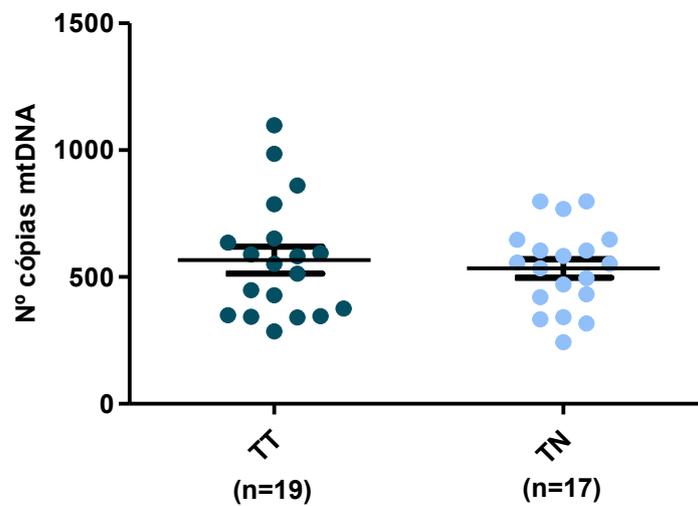




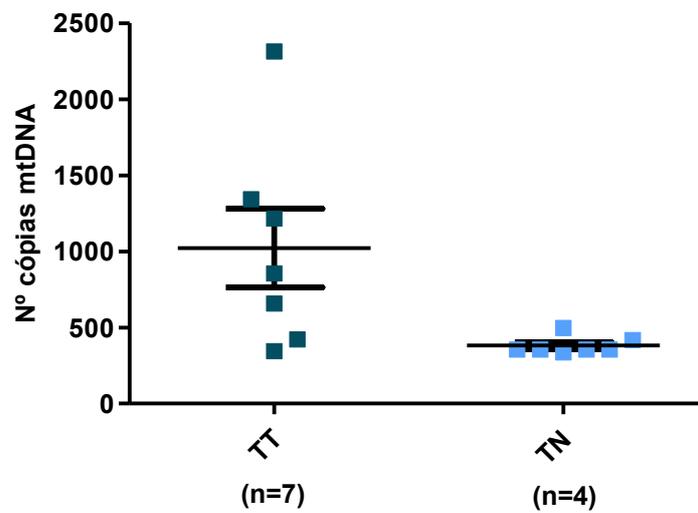
**Figura 19** – Número de cópias do mtDNA (% CT) em amostras de sangue (A) e de tecido pulmonar tumoral (B) de doentes com cancro do pulmão, de acordo com o hábito tabágico. Legenda: P25-P75 – Intervalo interquartil.

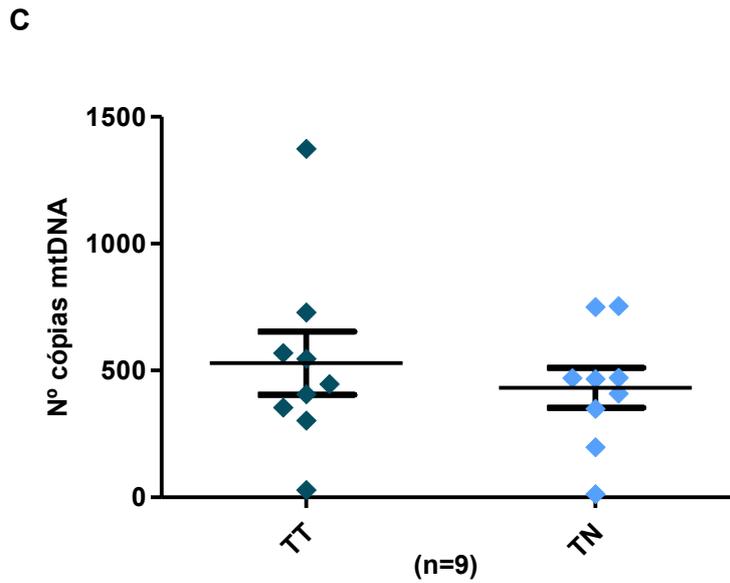
Outro aspecto importante é comparar o número de cópias do mtDNA entre amostras de tecido pulmonar tumoral e tecido pulmonar normal nos diferentes grupos. Verificou-se que, nos fumadores activos, não havia uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,535$ ) no número de cópias entre os dois tipos de tecido (**Figura 20-A**). Pelo contrário, nos fumadores passivos, observa-se uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,048$ ) no número de cópias do mtDNA entre o tecido tumoral e o tecido normal, apresentando respectivamente uma média  $\pm$  desvio-padrão de  $1000 \pm 680$  e  $380 \pm 57$ . O tecido normal apresenta, na maioria dos casos, valores inferiores aos obtidos no tecido tumoral (**Figura 20-B**). Nas amostras de não fumadores (**Figura 20-C**) não se verificam diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,456$ ); no entanto, verifica-se que a média das amostras de tecido tumoral é mais elevada ( $530 \pm 370$ ) em comparação com o tecido normal ( $430 \pm 240$ ).

A



B



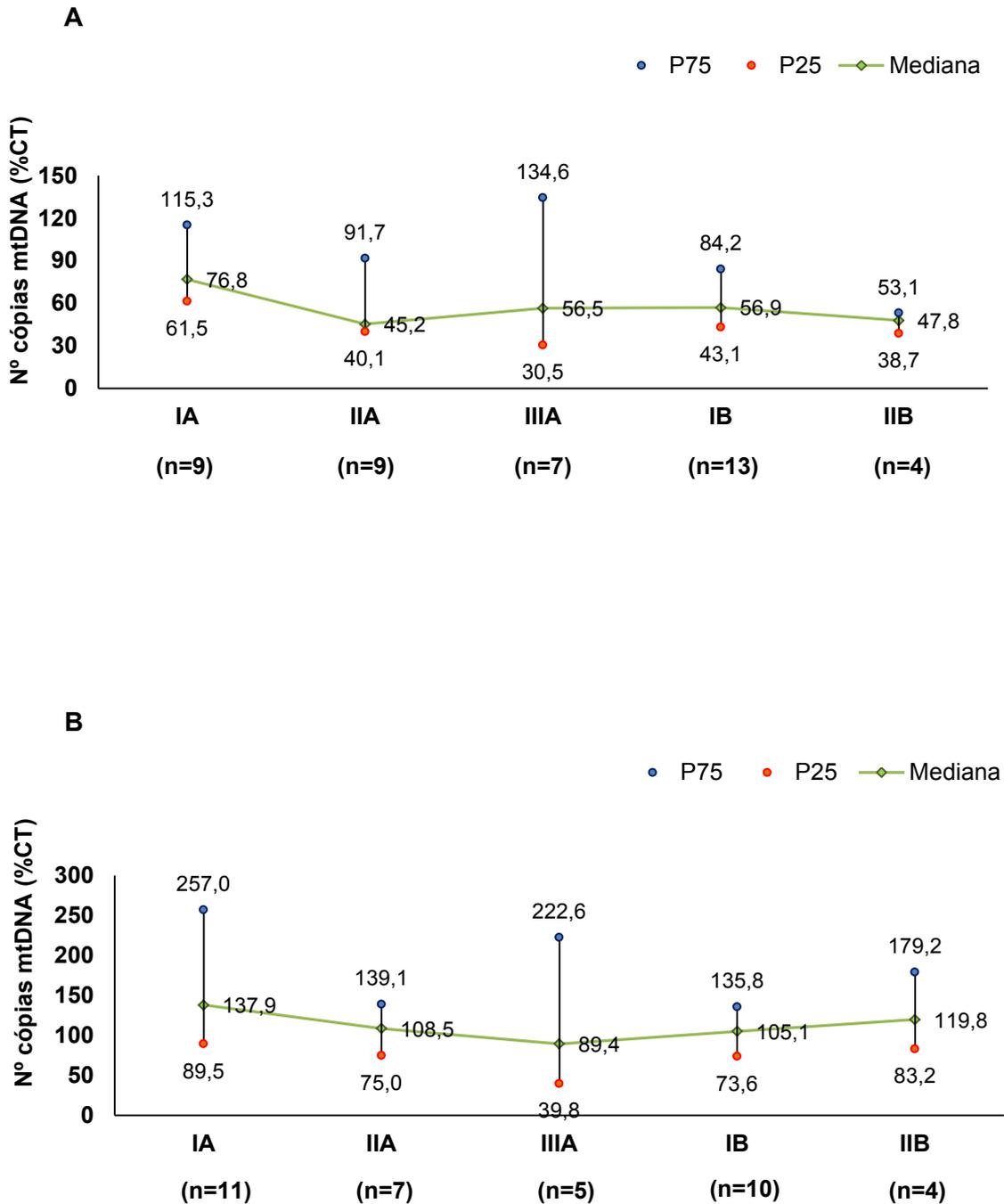


**Figura 20** – Número de cópias do mtDNA em amostras de tecido pulmonar de fumadores activos (A), passivos (B) e não fumadores (C) com cancro do pulmão. Legenda: TT – Tecido tumoral; TN – Tecido normal.

### 3.5.3. Estádio da doença

Neste estudo foi possível relacionar o número de cópias do mtDNA (% CT) em amostras de sangue e tecido com os vários estádios da doença (IA, IIA, IIIA, IB e IIB).

Não existem diferenças estatisticamente significativas entre o número de cópias do mtDNA (% CT) e o estágio da doença (**Figura 21 e 22**), tanto nas amostras de sangue ( $p=0,222$ ), como nas amostras de tecido ( $p=0,627$ ). O intervalo interquartil varia ligeiramente em ambas as amostras. Nas amostras de sangue, a maior dispersão dos dados é observada no estágio IIIA e a menor no estágio IIB; nas amostras de tecido, as maiores dispersões são observadas nos estádios IA e IIIA e as menores nos estádios IIA e IB. No entanto estas diferenças não são estatisticamente significativas.



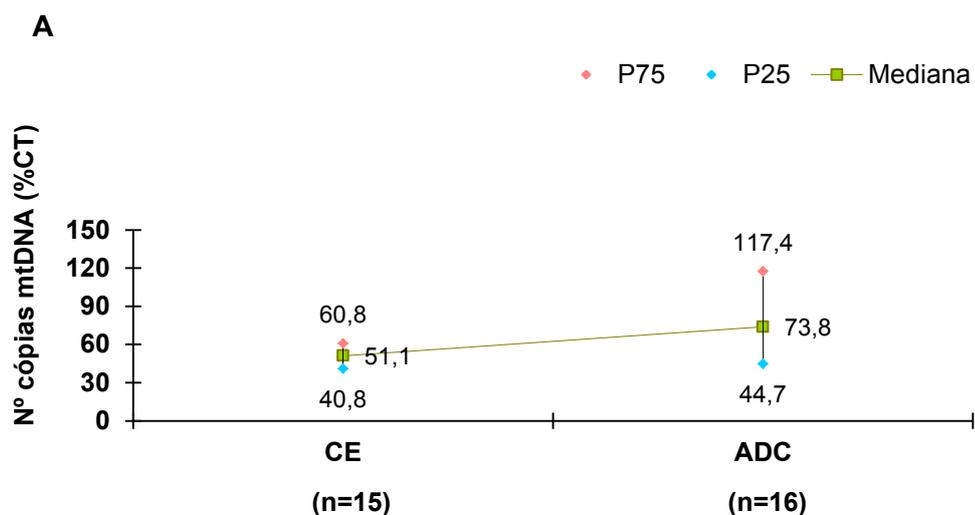
**Figura 21** – Número de cópias do mtDNA (% CT) em amostras de sangue (A) e tecido pulmonar (B) de doentes com carcinoma bronco-pulmonar em diferentes estádios da doença. Legenda: IA, IIA, IIIA, IB e IIB – Diferentes estádios do carcinoma bronco-pulmonar; P25-P75 – Intervalo interquartil.

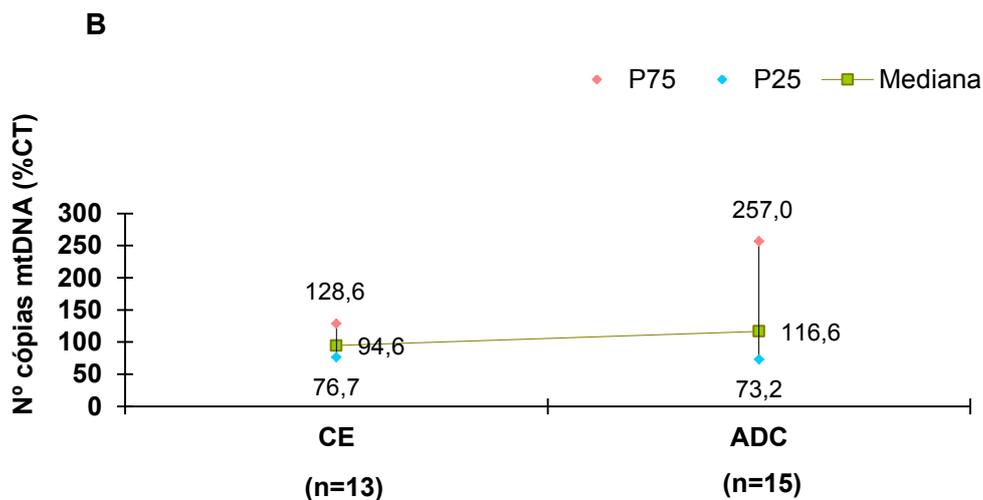
### 3.5.4. Tipo histológico

As amostras de tecido pulmonar tumoral estudadas neste trabalho são, na sua maioria, derivadas de adenocarcinomas e carcinomas epidermóides.

Para verificar se o número de cópias varia de acordo com o tipo histológico, analisou-se o número de cópias do mtDNA (% CT) entre os dois tipos histológicos mais comuns (adenocarcinoma e carcinoma epidermóide).

O número de cópias de mtDNA (% CT) no sangue é superior nas amostras de adenocarcinoma (**Figura 22-A**), mas a diferença não é estatisticamente significativa entre os dois tipos histológicos ( $p=0,086$ ), no tecido (**Figura 22-B**) verifica-se a mesma situação. A diferença no número de cópias do mtDNA (% CT) em tecido pulmonar tumoral entre os dois tipos histológicos não é estatisticamente significativa ( $p=0,555$ ). No entanto, verifica-se que, tanto nas amostras de sangue, como nas de tecido tumoral, derivadas de casos com adenocarcinoma, apresentam uma mediana mais elevada (73,8 e 116,6) em comparação com o carcinoma epidermóide (51,1 e 94,6), especialmente no sangue.





**Figura 22** – Número de cópias do mtDNA (% CT) em amostras de sangue (A) e de tecido pulmonar tumoral (B) de doentes com cancro do pulmão. Legenda: CE – carcinoma epidermóide; ADC – adenocarcinoma; P25-P75 – Intervalo interquartil.

## **4. Discussão**

---

#### **4.1. Análise da influência do método de extracção de DNA no número de cópias do mtDNA**

A extracção automática de DNA realizada através do *Maxwell<sup>®</sup> 16 Clinical Instrument* com o *Maxwell<sup>®</sup> 16 Purification Kits*, é um método simples e eficiente para a purificação de DNA genómico de sangue, células ou amostras de tecidos. No entanto, verificaram-se diferenças no número de cópias do mtDNA (% CT) de amostras extraídas pelos dois métodos, observando-se valores mais elevados para as amostras extraídas pelo método de fenol-clorofórmio.

Os resultados indicam que o método de extracção automática é menos eficiente na extracção de mtDNA. A menor eficiência da extracção de mtDNA através do *Maxwell<sup>®</sup> 16 Clinical Instrument* e do *Maxwell<sup>®</sup> 16 Purification Kits* pode ser justificada pelo facto do genoma mitocondrial apresentar uma estrutura bastante diferente do nDNA, que é pequena e circular (Mao & Holt, 2009). Devido a estas características, as partículas paramagnéticas utilizadas neste método não conseguem captar o mtDNA de forma eficiente, alterando, assim, o número de cópias de mtDNA obtido na análise.

Outro aspecto a ter em conta é o facto dos valores de referência serem provenientes de amostras extraídas com o método de fenol-clorofórmio. Dados os resultados obtidos com os dois métodos, para se poderem considerar os dados do método de extracção automática, seria necessário estabelecer valores de referência com amostras extraídas pelo mesmo método. Esta premissa é válida para qualquer método que se use, tendo em conta a avaliação do número de cópias do mtDNA.

#### **4.2. Análise do número de cópias do mtDNA em amostras de sangue e de tecido de doentes com carcinoma bronco-pulmonar**

Alguns estudos realizados ao longo dos anos demonstraram que o número de cópias do mtDNA estava alterado em células tumorais, quando comparado com células normais em vários tipos de cancro. A literatura refere que a maioria dos casos de cancro da cabeça e pescoço, tiróide, colo-rectal, endométrio, ovário e próstata apresentam aumento do número de cópias do mtDNA, relativamente ao tecido não tumoral correspondente. Pelo contrário, a maioria dos casos de carcinomas renais, carcinoma hepatocelular, cancro gástrico e cancro da mama apresentavam diminuição do número de cópias (Cuezva *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Mambo *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007; Mizumachi *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010).

Apesar de existirem resultados na literatura em diferentes tipos de cancros, os dados do conteúdo em mtDNA no carcinoma bronco-pulmonar são escassos. Assim, o presente estudo é de grande importância para a obtenção de novos resultados relativamente à alteração do número de cópias do mtDNA em amostras de sangue e de tecido de doentes com cancro do pulmão.

No presente estudo, 66,7% das amostras de sangue de doentes com cancro do pulmão apresentam uma diminuição do número de cópias do mtDNA relativamente ao controlo, enquanto 4,8% apresentam um aumento, diferenças estas que são estatisticamente significativas ( $p < 0,0001$ ).

Em relação às amostras de tecido, também foram observadas alterações no número de cópias do mtDNA entre tecido pulmonar tumoral e normal. Das amostras analisadas, 67,6% apresentam um número de cópias mais elevado no tecido pulmonar tumoral, comparativamente ao tecido pulmonar normal, sendo estas diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,008$ ). Os resultados obtidos no tecido pulmonar

estão de acordo com o observado no estudo de Lee *et al.* (2005) onde constataram um aumento do número cópias do mtDNA em 48,4% dos 31 casos de cancro do pulmão analisados neste estudo. Os autores verificaram também que, em 22,6% dos casos, ocorria uma diminuição do número de cópias; no entanto, observaram uma maior percentagem de casos com aumento do número de cópias do mtDNA (Lee *et al.*, 2005). A diminuição do número de cópias foi justificada por Lin *et al.* (2008) que demonstraram, num estudo efectuado em amostras de 29 doentes, que a progressão do cancro do pulmão, após a quimioterapia, provoca uma diminuição do número de cópias do mtDNA e do stresse oxidativo no tecido pulmonar (Lin *et al.*, 2008). Contudo todas as amostras incluídas no presente estudo foram obtidas antes do tratamento, na fase de diagnóstico.

Através da análise dos resultados do presente estudo, pode depreender-se que o número de cópias do mtDNA sofre alterações em doentes com cancro do pulmão. Tanto as amostras de sangue como as amostras de tecido pulmonar apresentam valores significativamente diferentes, comparativamente ao controlo. No entanto, verifica-se que, no sangue, o número de cópias diminui em relação ao controlo e no tecido tumoral acontece o oposto, parecendo existir uma relação inversamente proporcional entre os dois tecidos.

Sabe-se que o número de cópias do mtDNA pode variar em células tumorais; no entanto, as razões para este facto ainda não estão totalmente esclarecidas. Alguns estudos efectuados em casos de doentes com carcinoma bronco-pulmonar referem que o aumento do número de cópias do mtDNA poderá resultar de um processo de compensação para aumentar a energia necessária e/ou diminuição da capacidade de fosforilação oxidativa (Lee *et al.*, 2005; Bonner *et al.*, 2009). Estes resultados são justificados com outros estudos anteriormente realizados, noutros tipos de tumores. Um estudo efectuado em 22 casos de cancro da tiróide demonstrou a diminuição da taxa da síntese de ATP e aumento do conteúdo do mtDNA (Savagner *et al.*, 2001). Estas observações são consistentes com os factos demonstrados por Cuezva *et al.*

(2002), (n=104), em que observaram uma diminuição na expressão de algumas proteínas envolvidas na função respiratória mitocondrial, mas não detectaram alteração na replicação do mtDNA (Cuezva *et al.*, 2002). Assim, o aumento do número de cópias do mtDNA em células cancerígenas pode resultar da compensação pela disfunção mitocondrial e escassez de energia (Lee *et al.*, 2005).

Lee *et al.* (2000) demonstraram que o stresse oxidativo poderia ser responsável pelo aumento do conteúdo do mtDNA em células humanas (Lee *et al.*, 2000) e há na literatura evidências crescentes de que as células cancerígenas apresentavam aumento do stresse oxidativo, em parte devido ao aumento da actividade metabólica e disfunção mitocondrial, o que pode justificar o aumento do número de cópias do mtDNA nestas células (Birch-Machin & Swalwell, 2010).

Por outro lado, em alguns tipos de cancro, a diminuição do conteúdo do mtDNA poderá ocorrer devido à presença de mutações somáticas na região *D-loop* do mtDNA, disfunção da biogénese mitocondrial ou devido a mutações no gene *POLG* (Lee *et al.*, 2010). Em 2004, Lee *et al.* demonstraram, num estudo efectuado com amostras de 61 doentes, que o número de cópias do mtDNA diminuiu significativamente, em amostras de doentes com cancro hepatocelular que apresentavam mutações na região *D-loop*. Como a região *D-loop* é responsável pelo controlo da replicação e transcrição do mtDNA, mutações nessa região podem interferir com a replicação e manutenção do mtDNA, provocando uma diminuição do número de cópias (Lee *et al.*, 2004). Foram obtidos resultados semelhantes num estudo efectuado em 59 pares de amostras de tecido tumoral e normal de doentes com cancro da mama (Yu *et al.*, 2007).

No entanto, a replicação do mtDNA para além de ser regulada pela integridade do mtDNA também é regulada por proteínas envolvidas na biogénese mitocondrial. Assim, danos na biogénese poderiam provocar diminuição do número de cópias (Lee *et al.*, 2004). Um estudo de Yin *et al.* realizado em amostras de 18 casos de cancro hepatocelular, demonstrou que a expressão alterada de genes envolvidos na

biogénese mitocondrial está relacionada com a diminuição do número de cópias do mtDNA (Yin *et al.*, 2004).

Sing *et al.* (2009) demonstraram que 63% dos 19 casos de cancro da mama que apresentavam mutações no gene *POLG* continham diminuição do número de cópias do mtDNA (Sing *et al.*, 2009). Tem sido referido que a polimerase gama do mtDNA é um alvo de dano oxidativo. Foi demonstrado anteriormente que o stresse oxidativo inibia significativamente a actividade da DNA polimerase e diminui a sua eficiência de ligação ao DNA, que pode resultar numa diminuição da eficiência da replicação e na reparação do DNA (Graziewicz *et al.*, 2002).

O estudo realizado por Lin *et al.* (2008) justifica a diminuição do número de cópias com a progressão da doença. Demonstraram que a progressão do cancro após a quimioterapia provoca uma diminuição do número de cópias do mtDNA e do stresse oxidativo, e este está significativamente associado ao número de cópias do mtDNA. Esta diminuição pode ser justificada devido ao facto de haver uma possível diminuição do número de mitocôndrias e respectivamente uma diminuição de ROS endógeno, visto que as mitocôndrias são os principais organelos responsáveis pela produção endógena de ROS (Lin *et al.*, 2008). Yu e colaboradores (2007) obtiveram resultados semelhantes, em amostras de cancro da mama e associaram positivamente a diminuição do número de cópias do mtDNA à progressão do cancro (Yu *et al.*, 2007).

Sabe-se que o número de cópias não é aleatório e é específico para o tipo de tecido. No entanto, ainda não é claro como ocorre o processo de aumento ou diminuição do número de cópias. Montier & Bai, em 2009, propuseram um modelo em que existe um limite inferior do número de cópias do mtDNA, que provoca uma activação da replicação, e um limite superior que desencadeia o mecanismo que leva à degradação do mtDNA. Assim, estes limites permitem regular o número de cópias do mtDNA presente em cada célula, mas ainda não se conhecem os factores que regulam o processo (Montier & Bai, 2009).

Outro aspecto importante no presente trabalho é a comparação do número de cópias do mtDNA em amostras de tecido pulmonar primário e em tecido pulmonar com presença de metástases. Apesar de todas as amostras estudadas apresentarem alterações no número de cópias do mtDNA, os valores observados são muito heterogéneos, algumas amostras apresentam aumento do número de cópias em amostras com presença de metástases, enquanto outras apresentam diminuição, mas estas diferenças não são estatisticamente significativas. Assim, podemos referir que alterações no número de cópias do mtDNA não são correlacionadas com a presença de metástases na amostragem estudada.

#### **4.3. Utilidade do número de cópias do mtDNA como possível biomarcador no cancro do pulmão**

O cancro do pulmão representa uma das neoplasias mais frequentes a nível mundial sendo responsável pela maior taxa de mortalidade em ambos os sexos. Apesar dos avanços registados no diagnóstico, estadiamento e tratamento do cancro do pulmão, a taxa de sobrevivência não aumentou significativamente durante as últimas duas décadas (Dasgupta *et al.*, 2009). É importante que sejam desenvolvidos métodos adequados para a detecção precoce da doença.

O presente estudo tem como principal objectivo verificar se existe uma correlação positiva entre os dois tecidos (sangue e tecido) analisados, de doentes com cancro do pulmão, o que não se comprova.

A comparação do número de cópias do mtDNA (% CT) nos dois tipos de amostras (sangue e tecido de doentes com carcinoma bronco-pulmonar), demonstra diferenças estatisticamente significativas entre os dois tecidos: 89,5% dos doentes estudados apresentam um número de cópias significativamente mais elevado nas amostras de tecido relativamente às amostras de sangue. Este resultado permite-nos concluir que

não existe uma correlação positiva entre os dois tecidos, pois os valores obtidos nos dois tecidos não são concordantes.

Por outro lado, a análise do número de cópias do mtDNA (% CT) de amostras de sangue de doentes com doença pulmonar inflamatória, e a sua comparação com os resultados obtidos nas amostras de sangue de doentes com cancro do pulmão, mostra que não há uma diferença estatisticamente significativa entre os dois tipos de amostras. Assim, podemos concluir que o número de cópias obtido nas amostras de sangue de doentes com cancro do pulmão não é específico desta patologia, pois os valores são semelhantes para as duas patologias.

Assim, com os resultados obtidos, podemos constatar que o número de cópias do mtDNA não pode ser usado como um biomarcador no cancro do pulmão.

No entanto, o presente trabalho é de grande relevância, uma vez que, na literatura, não foi encontrado qualquer estudo que compare o número de cópias do mtDNA em amostras de sangue, tecido pulmonar tumoral e normal do mesmo doente, usando adicionalmente um grupo controlo com patologia pulmonar não tumoral.

#### **4.4. Correlação entre o número de cópias do mtDNA e parâmetros clínicos [(idade, hábito tabágico, estágio da doença e tipo histológico)]**

Analisando a relação entre a idade dos doentes e o número de cópias do mtDNA em amostras de tecido pulmonar tumoral e normal, verifica-se que não existe uma relação significativa. No entanto, observa-se que, no tecido pulmonar tumoral, existe uma pequena diminuição com a idade e no tecido pulmonar normal existe um ligeiro aumento do número de cópias com a idade.

Vários estudos publicados relacionaram a idade com o número de cópias do mtDNA. Num estudo realizado por Lee *et al.* (1998), (n=49), foi demonstrado pela

primeira vez que o índice relativo do mtDNA e os danos no DNA em tecido de pulmão humano aumentava com a idade (Lee *et al.*, 1998). Outro estudo realizado por Bonner *et al.* (2009), (n=244), referiu uma associação positiva entre o conteúdo do mtDNA e o risco de desenvolver cancro, e essa associação é modificada com a idade. Doentes de cancro do pulmão com idade superior a 57 anos apresentavam um aumento do conteúdo de mtDNA relativamente ao controlo (Bonner *et al.*, 2009). Os resultados obtidos no presente estudo, apesar de demonstrarem um pequeno aumento do número de cópias no tecido pulmonar normal e uma ligeira diminuição no tecido pulmonar tumoral, não apresentam significância estatística.

Outro ponto importante do presente estudo é a análise do número de cópias do mtDNA nos diferentes grupos de fumadores (fumadores activos, fumadores passivos e não fumadores). A análise do número de cópias no tecido pulmonar tumoral e normal demonstrou que o número de cópias é semelhante nos dois tecidos nos fumadores activos. No entanto, para os fumadores passivos, observou-se uma diferença significativa entre os dois tecidos: o tecido normal apresenta um número de cópias inferior ao tecido tumoral. Este resultado pode ser explicado pelo aumento de ROS em fumadores activos, que podem ser responsáveis pelo aumento do número de cópias do mtDNA em tecido pulmonar normal. Como tal, fumadores activos apresentam elevado número de cópias em tecido pulmonar normal e tumoral, o mesmo não sucedendo em fumadores passivos.

Num estudo realizado por Hosgood *et al.* (2010) os autores observaram que fumadores, que consomem mais de 20 cigarros por dia, apresentavam um aumento do número de cópias do mtDNA, em relação a fumadores de baixo consumo (< 20 cigarros por dia). Estes resultados foram obtidos a partir de 229 amostras de sangue. A hipótese colocada foi de que existia um efeito compensatório como resposta à taxa elevada de ROS, que foi detectado em amostras de 30 fumadores em estudos anteriores (Asami *et al.*, 1996). O tabagismo é referido como o factor etiológico *major* do cancro do pulmão, sendo responsável pela maioria dos casos detectados. O fumo

do tabaco apresenta na sua composição mais de 4000 substâncias químicas, das quais cerca de 100 são mutagêneas e carcinogêneas comprovadas, sendo exemplo as nitrosaminas ou os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP). Muitas dessas substâncias químicas podem levar à produção de níveis elevados de ROS no organismo humano (Weiderpass *et al.*, 2010). O aumento do número de cópias pode ser devido a uma resposta compensatória, embora os mecanismos envolvidos ainda não estejam esclarecidos. Além do aumento da expressão das defesas antioxidantes, que eliminam as ROS, as mitocôndrias respondem ao stresse oxidativo, aumentando o número de cópias do mtDNA (Hosgood *et al.*, 2010).

Os restantes dados clínicos analisados, estágio da doença e tipo histológico, não permitiram retirar conclusões relevantes. No nosso estudo não foi possível relacionar os vários estádios da doença com alterações no número de cópias do mtDNA. Estudos realizados em diferentes tipos de cancro por outros autores não são totalmente concordantes. Num estudo efectuado em 37 casos de cancro da tiróide, não foi encontrada qualquer correlação entre o estágio da doença e o aumento do número de cópias do mtDNA, sugerindo que as alterações no conteúdo do mtDNA possam ser um evento precoce na formação do carcinoma (Mambo *et al.*, 2005). No entanto, Jiang *et al.* (2005), num estudo efectuado em amostras de 94 casos de cancro da cabeça e pescoço, demonstraram que o aumento do número de cópias do mtDNA é associado com o estágio avançado do tumor (Jiang *et al.*, 2005).

Relativamente à análise do tipo histológico de cancro do pulmão, efectuado no presente estudo, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os dois tipos mais comuns de cancro do pulmão (adenocarcinoma e carcinoma epidermóide). Apesar de se verificar, tanto nas amostras de sangue como nas de tecido, que o adenocarcinoma apresenta uma mediana mais elevada essa diferença não é estatisticamente significativa. Assim, conclui-se que não existem alterações significativas do número de cópias do mtDNA (% CT) de acordo com o tipo histológico. Contudo, é de notar que, no sangue, o valor de  $p=0,086$  é borderline, o que pode

indicar que, se se aumentar o número de casos na amostragem, poder-se-à atingir a significância estatística.

## **5. Conclusões finais**

---

Este trabalho foi pioneiro no estudo da investigação da utilidade do número de cópias do mtDNA como possível biomarcador no cancro do pulmão. Apesar de já existirem estudos publicados nesta área e de analisarem o número de cópias do mtDNA em diferentes tipos de cancro e em diferentes amostras (sangue, tecido, expectoração, etc), não encontramos na literatura nenhuma referência em que tenha sido realizado um estudo que permitisse comparar o número de cópias em amostras de sangue e de tecido pulmonar tumoral e normal do mesmo doente.

Como já foi referido anteriormente, uma correlação positiva entre estes dois tipos de amostras permitiria um avanço a nível do diagnóstico, sendo possível actuar de forma preventiva, contribuindo para reduções do número de mortes por cancro do pulmão. No entanto, não foi obtida uma correlação positiva entre estes dois tipos de amostra (sangue e tecido pulmonar), concluindo-se assim, que o número de cópias do mtDNA no sangue não pode ser utilizado como um biomarcador do cancro do pulmão.

Este estudo permitiu ainda confirmar que o número de cópias do mtDNA está alterado em células tumorais de pulmão. Foram observadas diferenças no número de cópias do mtDNA, tanto nas amostras de sangue como nas amostras de tecido pulmonar comparativamente aos valores controlo. Na literatura existem algumas hipóteses para explicar esta ocorrência; no entanto, as razões para este facto ainda não estão totalmente clarificadas. Este estudo permitiu ainda verificar que ocorre um aumento do conteúdo de mtDNA no tecido normal dos fumadores activos, comparativamente aos fumadores passivos, o que pode indicar um maior risco no desenvolvimento de cancro.

Para se obterem resultados mais conclusivos, seria necessário alargar este estudo a um número maior de casos e fazer uma análise prospectiva, com dados clínicos adicionais, que poderiam ser relevantes, como por exemplo amostras de doentes que efectuaram algum tipo de tratamento e duração da doença.

### **5.1. Perspectivas futuras**

As mitocôndrias são essenciais para a manutenção de um organismo saudável, apresentam um sistema genético único, que inclui várias cópias do mtDNA por célula e a alteração da regulação do número de cópias pode resultar em doença (Montier & Bai, 2009).

Assim é particularmente importante e é biologicamente plausível continuar a avaliar a relevância do número de cópias do DNA mitocondrial para prever o risco futuro de cancro do pulmão. Para além disso é importante o conhecimento do processo de regulação do número de cópias do mtDNA, que, por sua vez, permitirá o desenvolvimento de novas abordagens para a manutenção saudável das mitocôndrias.

## **6. Bibliografia**

---

- Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel H RH (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Ver. Mol. Diagn.*, 5 (2): 209-219.
- Asami S, Hirano T, Yamaguchi R, Tomioka Y, Itoh H, Kasai H (1996). Increase of a Type of Oxidative DNA Damage, 8-Hydroxyguanine, and Its Repair Activity in Human Leukocytes by Cigarette Smoking. *Cancer Research*, 56: 2546-2549.
- Bai R & Wong LC (2005). Simultaneous Detection and Quantification of Mitochondrial DNA Deletion(s), Depletion, and Over-Replication in Patients with Mitochondrial Disease. *Journal of Molecular Diagnostics*, 7 (5): 613-622.
- Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK (1999). Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Current Science*, 77 (5): 658-666.
- Bernard PS & Wittwer CT (2002). Real-Time PCR Technology for Cancer Diagnostics. *Clinical Chemistry*, 48: 1178-1185.
- Birch-Machin MA & Swalwell H (2010). How mitochondria record the effects of UV exposure and oxidative stress using human skin as a model tissue. *Mutagenesis*, 25 (2): 101-107.
- Bonner MR, Shen M, Liu C, DiVita M (2009). Mitochondrial DNA content and lung cancer risk in Xuan Wei, China. *Lung Cancer*, 63: 331-334.
- Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y (2001). The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir*, 18: 1059-1068.
- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW Sheu S (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 278: C817-C833.
- Cagle PT, Allen TC, Dacic S, Beasley MB, Borczuk AC, Chirieac LR, Laucirica R, Ro JY, Kerr KM (2011). Revolution in Lung Cancer. *Arch Pathol Lab Med.*, 135: 110-116.

Chinnery PF, Johnson MA, Wardell TM, Singh-Kler R, Hayes C, Brown DT, Taylor RW, Bindoff LA, Turnbull DM (2000) The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann Neurol*, 48 (2): 188-193.

Copeland WC, Wachsman JT, Johnson FM, Penta JS (2002). Mitochondrial DNA Alterations in Cancer. *Cancer Investigation*, 20 (4): 557-569.

Cuezva JM, Krajewska M, Heredia ML, Krajewski S, Santamaría G, Kim H, Zapata JM, Marusawa H, Chamorro M, Reed JC (2002). The Bioenergetic Signature of Cancer: A Marker of Tumor Progression. *Cancer Research*, 62: 6674-6681.

Dasgupta S, Yung RC, Westra WH, Rini DA, Brandes J, Sidransky David (2009). Following Mitochondrial Footprints through a Long Mucosal Path to Lung Cancer. *PLoS ONE*, 4 (8): 1-9.

Desjardins P & Conklin D (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments*, 1-4.

Diogo L, Grazina M, Garcia P, Rebelo O, Alte Veiga M, Cuevas J, Vilarinho L, Tavares Almeida I, Oliveira CR (2009). Pediatric Mitochondrial Respiratory Chain Disorders in the Centro Region of Portugal. *Pediatr Neurol.*, 40 (5): 351-356.

Droge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Ver.*, 82: 47-95.

Falkenberg M, Larsson NG, Gustafsson CM (2007). DNA Replication and Transcription in Mammalian Mitochondria. *Annu. Ver. Biochem.*, 76: 679-699.

Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25: 386-401.

Graziewicz MA, Day BJ, Copeland WC (2002). The mitochondrial DNA polymerase as a target of oxidative damage. *Nucleic Acids Research*, 30 (13): 2817-2824.

Grazina M (2004). Genoma mitocondrial e défice energético no diagnóstico das doenças da cadeia respiratória mitocondrial. Tese de Doutoramento, UC.

Grazina MMM & Oliveira CR (2001). Aspectos Bioquímicos do Envelhecimento, in: Envelhecer Vivendo. Quarteto, Mota Pinto A (coord), Coimbra, Cap 7.

Hammerschmidt S, Wirtz H (2009). Lung Cancer: Current Diagnosis and Treatment. Dtsch Arztebl Int., 106 (49): 809-820.

Hosgood HD, Liu C, Rothman N, Weinstein SJ, Bonner M, Shen M, Lim U, Virtamo J, Cheng W, Albanes D, Lan Q (2010). Mitochondrial DNA copy number and lung cancer risk in a prospective cohort study. Carcinogenesis, 31: 847-849.

Jakupciak JP, Maragh S, Markowitz ME, Greenberg AK, Hoque MO, Maitra A, Barker PE, Wagner PD, Rom WN, Srivastava Sudhir, Sidransky D, O'Connell CD (2008). Performance of mitochondrial DNA mutations detecting early stage cancer. BMC Cancer, 8 (285): 1-11.

Jakupciak, JP, Wang W, Markowitz ME, Ally D, Coble M, Srivastava S, Maitra A, Barker PE, Sidransky D, O'Connell CD (2005). Mitochondrial DNA as a Cancer Biomarker. Journal of Molecular Diagnostic, 7 (2): 258-267.

Jemal A, Siegel R, Xu Ji, Ward E (2010). Cancer Statistics, 2010. CA Cancer Journal for Clinicians, 60 (5): 277-300.

Jiang WW, Masayeva B, Zahurak M, Carvalho AL, Rosenbaum E, Mambo E, Zhou S, Minhas K, Benoit N, Westra WH, Alberg A, Sidransky D, Koch W, Califano J (2005). Increased mitochondrial DNA content in saliva associated with head and neck cancer. Clin. Cancer Res., 11: 2486-2491.

Johannsen DL & Ravussin E (2009). The role of mitochondria in health and disease. Current Opinion in Pharmacology, 9: 780-786.

Kim MM, Clinger JD, Masayeva BG, Ha PK, Zahurak ML, Westra WH, Califano JA (2004). Mitochondrial DNA Quantity Increases with Histopathologic Grade in

Premalignant and Malignant Head and Neck Lesions. *Clinical Cancer Research*, 10: 8512-8515.

Lababede O, Meziane M, Rice T (2011). Seventh Edition of the Cancer Staging Manual and Stage Grouping of Lung Cancer: Quick Reference Chart and Diagrams. *Chest*, 139 (1): 183-189.

Lee H, Lu C, Fahn H, Wei Y (1998). Aging and smoking associated alteration in the relative content of mitochondrial DNA in human lung. *Federation of European Biochemical Societies*, 441: 292-296.

Lee HC, Chang CM, Chi CW (2010). Somatic mutations of mitochondrial DNA in aging and cancer progression. *Ageing Research Reviews*, 9S: S47-S58.

Lee HC, Li SH, Lin JC, Wu CC, Yeh DC, Wei YH (2004). Somatic mutations in the D-loop and decrease in the copy number of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Mutat Res.*, 547: 71-78.

Lee HC, Yin PH, Lin JC, Wu CC, Chen CY, Wu CW, Chi CW, Tam TN, Wei YH (2005). Mitochondrial genome instability and mtDNA depletion in human cancers. *Ann NY Acad Sci.*, 1042: 109-22.

Lee HC, Yin PH, Lu CY, Chi CW, Wei YH (2000). Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem. J.*, 348: 425-432.

Lin C, Wang L, Tsai C, Wei Y (2008). Low copy number and low oxidative damage of mitochondrial DNA are associated with tumor progression in lung cancer tissues after neoadjuvant chemotherapy. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, 7: 954-958.

Mambo E, Chatterjee A, Xing M, Tallinis G, Haugen BR, Yeung SCJ, Sukumar S, Sidransky D (2005). Tumor-specific changes in mtDNA content in human cancer. *Int. J. Cancer*, 116: 920-924.

- Mao CC & Holt IJ (2009). Clinical and Molecular Aspects of Diseases of Mitochondrial DNA Instability. *Chang Gung Med J.*, 32: 354-69.
- Mizumachi T, Muskhelishvili L, Naito A, Furusawa J, Fan C, Siegel ER, Kadlubar FF, Kumar U, Higuchi M (2008). Increased distributional variance of mitochondrial DNA content associated with prostate cancer cells as compared with normal prostate cells. *Prostate*, 68 (4): 408-417.
- Montier L & Bai J (2009). Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *Journal of Genetics and Genomics*, 36: 125-131.
- Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B (2007). Mitochondrial Oxidative Stress: Implications for Cell Death. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47: 143-183.
- Pastorino U (2010). Lung cancer screening. *British Journal of Cancer*, 102: 1681-1686.
- Penta JS, Johnson FM, Wachsman JT, Copeland WC (2001). Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutation Research*, 488: 119-133.
- Savagner F, Franc B, Guyetant S, Rodien P, Reynier P, Malthiery Y (2001). Defective Mitochondrial ATP Synthesis in Oxyphilic Thyroid Tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86 (10): 4920-4925.
- Schapira AH (2006). Mitochondrial disease. *Lancet*, 386: 70-82.
- Schrader M, Fahimi HD (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763: 1755-1766.
- Sherrill CB, Marshal DJ, Moser MJ, Larsen CA, Daudé-Snow L, Prudent JR (2004). Nucleic Acid Analysis Using an Expanded Genetic Alphabet to Quench Fluorescence. *J. Am. Chem. Soc.*, 126: 4550-4556.
- Singh KK (2006). Mitochondria Damage Checkpoint, Aging, and Cancer. *New York Academy of Sciences*, 1067: 182-190.

- Singh KK, Ayyasamy V, Owens KM, Koul MS, Vujcic M (2009). Mutations in mitochondrial DNA polymerase-gamma promote breast tumorigenesis. *J. Hum. Genet.*, 54: 516-524.
- Singh KK, Kulawiec M, Still I, Desouki MM, Geradts J, Matsui S (2005). Inter-genomic cross talk between mitochondria and the nucleus plays an important role in tumorigenesis, *Gene*, 354: 140-146.
- Smith C, Marks AD, Lieberman M (2004). Oxygen Toxicity and Free Radical Injury. *Mark's Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*, 2nd Edition, Cap.24.
- Spinazzola A & Zeviani M (2009). Disorders from perturbations of nuclear-mitochondrial intergenomic cross-talk. *Journal of Internal Medicine*, 265: 174-192.
- Taanman JW (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1410: 103-123.
- Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Harris CC (2004) *Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart*. 3rd ed. Lyon France: IARC Press. *World Health Organization Classification of Tumours*; vol 10.
- Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin M, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39: 44-84.
- Wang Y, Liu VWS, Xue WC, Cheung ANY, Ngan HYS (2006). Association of decreased mitochondrial DNA content with ovarian cancer progression. *British Journal of Cancer*, 95: 1087-1091.
- Weiderpass E (2010). Lifestyle and Cancer Risk. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, 43 (6): 459-471.

Yin PH, Lee HC, Chau GY, Wu YT, Li SH, Lui WY, Wei YH, Liu TY, Chi CW (2004). Alteration of the copy number and deletion of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer*, 90: 2390-2396.

Yu M, Zhou Y, Shi Y, Ning L, Yang Y, Wei X, Zhang N, Hao X, Niu R (2007). Reduced mitochondrial DNA copy number is correlated with tumor progression and prognosis in Chinese breast cancer patients. *IUBMB Life*, 59 (7): 450-457.