

## **Análise molecular do Complexo V mitocondrial em gliomas de pacientes atendidos em um hospital de referência do Estado do Pará, Brasil**

**Molecular analysis of mitochondrial Complex V in gliomas of patients treated at a referral hospital in Pará State, Brazil**

**Análisis molecular del Complejo V mitocondrial en gliomas de pacientes atendidos en un hospital de referencia en el Estado de Pará, Brasil**

Recebido: 19/04/2022 | Revisado: 29/05/2022 | Aceito: 20/07/2022 | Publicado: 27/07/2022

**Taiana Andrade Freitas**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5924-1832>

Universidade do Estado do Pará, Brasil

E-mail: [taiana.freitas@hotmail.com](mailto:taiana.freitas@hotmail.com)

**Matheus Rubem Oliveira do Nascimento**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0548-7634>

Centro Universitário do Espírito Santo, Brasil

E-mail: [matheusnascimento2@gmail.com](mailto:matheusnascimento2@gmail.com)

**Carlos Antônio da Costa Junior**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4980-562X>

Universidade Federal do Pará, Brasil

E-mail: [costacajr@gmail.com](mailto:costacajr@gmail.com)

### **Resumo**

O objetivo do presente trabalho foi avaliar mutações e polimorfismos no Complexo V do DNA Mitocondrial e sua relação com o surgimento e progressão de tumores Gliais do Sistema Nervoso Central em pacientes atendidos em Hospital de Referência no Tratamento Oncológico em Belém, Estado do Pará, Brasil. Foram utilizadas 22 amostras tumorais do sistema nervoso humano, classificadas como astrocitomas de diferentes graus, onde apenas duas amostras apresentaram alterações nucleotídicas, sendo que a maioria dos pacientes acima de 50 anos estão relacionados com os tumores de alto grau e os abaixo de 50 anos estão relacionados com os tumores de baixo grau, fortalecendo a ideia que a maior parte dos astrocitomas de baixo grau são de origem hereditária e a maior parte do surgimento dos de alto grau, estão relacionados com a longa exposição a agentes carcinogênicos. As alterações parecem não interferir diretamente na função do gene. Apesar do mtDNA ser mais susceptível à mutações que o nDNA, os resultados deste estudo sugerem que o complexo V se mantém íntegro mesmo em ambiente reativo, sugerindo um mecanismo de proteção, garantindo a produção de energia na célula tumoral.

**Palavras-chave:** Gliomas; mtDNA; Câncer.

### **Abstract**

The objective of the present study was to evaluate mutations and polymorphisms in Complex V of the Mitochondrial DNA and its relationship with the emergence and progression of Glial tumors of the Central Nervous System in patients treated at a Reference Hospital for Oncological Treatment in Belém, Pará State, Brazil. Twenty-two tumor samples from the human nervous system were used, classified as astrocytomas of different degrees, where only two samples showed nucleotide alterations, and most patients over 50 years old are related to high-grade tumors and those below 50 years old are related to low-grade tumors, strengthening the idea that most low-grade astrocytomas are of hereditary origin and most of the emergence of high-grade ones are related to long-term exposure to carcinogenic agents. The alterations do not appear to interfere directly with the gene's function. Although mtDNA is more susceptible to mutations than nDNA, the results of this study suggest that the V complex remains intact even in a reactive environment, suggesting a protective mechanism, guaranteeing energy production in the tumor cell.

**Keywords:** Gliomas; mtDNA; Cancer.

### **Resumen**

El objetivo del presente estudio fue evaluar mutaciones y polimorfismos en el Complejo V del ADN Mitocondrial y su relación con la aparición y progresión de tumores Gliales del Sistema Nervoso Central en pacientes atendidos en un Hospital de Referencia en Tratamiento Oncológico de Belém, Pará, Brasil. Se utilizaron 22 muestras tumorales del sistema nervioso humano, clasificadas como astrocitomas de diferente grado, donde solo dos muestras presentaron alteraciones de nucleótidos, y la mayoría de los pacientes mayores de 50 años están relacionados con tumores de alto grado y los menores de 50 años están relacionados a tumores de bajo grado, lo que refuerza la idea de que la mayoría de

los astrocitomas de bajo grado son de origen hereditario y que la mayor parte de la aparición de los de alto grado está relacionada con la exposición a largo plazo a agentes cancerígenos. Las alteraciones no parecen interferir directamente con la función del gen. Aunque el mtDNA es más susceptible a mutaciones que el nDNA, los resultados de este estudio sugieren que el complejo V permanece intacto incluso en un entorno reactivo, lo que sugiere un mecanismo protector que garantiza la producción de energía en la célula tumoral.

**Palabras clave:** Gliomas; mtDNA; Cáncer.

## 1. Introdução

O câncer de Sistema Nervoso Central (SNC) em sua maioria origina-se no cérebro, nervos cranianos e meninges. A sua etiologia ainda é pouco conhecida, até agora a irradiação ionizante é a única causa confirmada, sendo mais associada a meningiomas e neurileiomas do que aos gliomas (Brasil, 2016).

Gliomas representam até 70% dos tumores primários do SNC, e destes, 75% são astrocitomas, os quais acometem mais comumente a faixa etária adulta. Os tumores gliais são os de maior prevalência e apresentam diversos graus de malignidade, diversidade nas características histológica e clínicas (Chiela, 2011). A denominação de gliomas, inclui diversas características clínico-patológicas que apresentam marcadores de diferenciação em células da glia, que podem acometer qualquer região do Sistema Nervoso (SBOC, 2011). Os gliomas são classificados conforme o tipo celular, com base nas características histológicas, levando em conta as similaridades das células tumorais com as células normais da glia. Estão segmentados em quatro grupos: astrocitomas, ependimomas, oligodendrogliomas e oligoastrocitomas (Chiela, 2011), e cada grupo é classificado em diferentes graus, conforme seu grau de diferenciação e anaplasia (SBOC, 2011).

A mitocôndria exerce funções fundamentais para o organismo como a produção de energia intracelular na forma de ATP, mediação da apoptose e fosforilação oxidativa. É uma organela esferoide localizada no citoplasma de todas as células eucarióticas, possui DNA próprio, o DNA mitocondrial (mtDNA), que é capaz de codificar proteínas-chaves que participam da produção de Adenosina Trifosfato (ATP) (Chinnery et al., 2012; Tam et al., 2013; Souza, 2005). O mtDNA é circular e de fita dupla com 16.569pb, o que inclui os genes que codificam a cadeia de transporte de elétrons, que são os complexos I, II, III, IV e o Complexo V (ATP sintase) de fosforilação oxidativa (Ghaffarpour, et al., 2014). É responsável por codificar 13 polipeptídios dos 83 que formam a cadeia de respiração mitocondrial, onde o complexo I recebe elétrons de NADH, o complexo II recebe elétrons de succinato, os complexos III e IV recebem elétrons de NADH, Succinato e FADH<sub>2</sub>. Os complexos I, II e IV vão gerar um gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial interna, bombeando prótons da matriz para o espaço intramembranar, esse fluxo de prótons entrará no complexo V para que então ocorra a síntese de ATP (Souza, 2005).

Os genes *ATPase6* e *ATPase8* do complexo V do DNA mitocondrial desempenham importante função na produção de ATP e nas vias de apoptose (Ghaffarpour, et al., 2014). Variantes da *ATPase6* e *ATPase8* participam da transformação de células, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e progressão tumoral (Amuthan et al., 2001). Estes genes estão localizados em regiões importantes das proteínas, e os polimorfismos que ocorrem nesses genes têm sido descritos em diversos tipos de cânceres, incluindo doenças neurodegenerativas (Ghaffarpour, et al., 2014).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar mutações e polimorfismos no Complexo V do DNA Mitocondrial e sua relação com o surgimento e progressão de tumores Gliais do Sistema Nervoso Central, em pacientes atendidos em um Hospital de referência no tratamento Oncológico em Belém, Estado do Pará, Brasil.

## 2. Metodologia

O presente trabalho faz parte de um projeto maior intitulado “Estudos Citogenéticos e Moleculares em Tumores do Sistema Nervoso Humano na População Paraense”, aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (025/06 CEP-CCS/UFPA), apreciado e aprovado em 30 de Março de 2006. Os

pacientes ou seus responsáveis legais foram informados sobre o estudo a ser realizado e, em caso de concordância em participar do mesmo, solicitou-se a assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram utilizadas 22 amostras tumorais do sistema nervoso humano, classificadas como astrocitomas de diferentes graus, tendo os pacientes, idades entre 2 e 71 anos, coletadas entre 2005 e 2012 durante procedimento cirúrgico realizado pela equipe de neurocirurgia do Hospital Ophir Loyola.

O DNA das amostras foi extraído no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará pelo método de Sambrook (2001).

Foi realizada a amplificação das subunidades *ATPase6* (256pb) e *ATPase8* (102pb) do mtDNA, utilizando iniciadores descritos na tabela 1, nas seguintes condições: reação contendo 0,05mM de dNTP; tampão de reação 1x (10x = KCL 500mM, 200mM Tris-HCL, pH 4.8); 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, aproximadamente 100ng de DNA total, 10pM de cada iniciador e 1U da enzima *Taq DNA* polimerase. A amplificação procedeu com 35 ciclos, consistindo em uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos caindo logo em seguida para 30 segundos, anelamento à 56 °C por 50 segundos e extensão à 72 °C por 1 minuto e 30 segundos e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os iniciadores da *ATPase 6* conseguiram amplificar ambas as subunidades, dessa forma, não houve necessidade da utilização de iniciadores da *ATPase 8*.

Para testar a eficiência da amplificação, foram utilizados 2µL do produto da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), juntamente com 1µL do corante da marca *GelRed* e 2µL de corante de visualização (5 mL glicerol, 1 mL de azul de bromo fenol 0,1%, 1 mL de xileno-cianol 0,1%, 2 mL de EDTA 0,5M), que foi submetido à eletroforese horizontal em gel de agarose em elevado ponto de fusão a 1,0%, realizado em Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE), em uma corrente de 100V por 20 minutos, e logo em seguida, visualizado por meio de uma luz ultravioleta. Foi utilizado NC\_012920.1 como fragmento padrão para os estudos neste trabalho, obtido no *MegaBlast* (NCBI, 2015).

**Tabela 1** - Iniciador utilizado nas PCR das subunidades *ATPase6* e *ATPase8* do mtDNA.

Iniciador	Sequencia	Sentido	Produto
ATP6F	GCCCTAGCCCCTTCTTACC	<i>Forward</i>	358pb
ATP6R	TTAAGGCGACAGCGATTCT	<i>Reverse</i>	

Fonte: Autores.

A purificação do produto da PCR foi realizada utilizando o Kit comercial *PureLink® PCR Purification* (Invitrogen), de acordo com recomendações do fabricante. Após a purificação, o produto foi sequenciado, pelo método de terminação de cadeia descrito por Sanger, Nicklen e Coulson (1977), utilizando o kit *Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) para realizar a reação de sequenciamento.

As amostras foram submetidas a 25 ciclos onde ocorreu a desnaturação inicial a 96°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 30 segundos. Após o término dos ciclos, a temperatura foi estabilizada em 18°C. Ao final da reação, as amostras foram precipitadas com isopropanol a 65%. Os precipitados foram sequenciados utilizando o aparelho *ABI 3130* (Applied Biosystems®). As sequências foram alinhadas e editadas com o auxílio do *software BioEdit* e *Polyphen*, utilizando como base a sequência padrão NC\_012920.1 e o MITOMAP (2012) e *GenBank* como banco de dados de referência para as alterações que foram encontradas.

Foram definidas como variáveis preditoras o gênero, idade e o grau tumoral das amostras estudadas. As variáveis foram testadas de duas a duas, sendo independentes entre si, e utilizaram-se os testes estatísticos de *Mann-Whitney* (MW) e estatística descritiva. O teste de *Mann-Whitney* (MW) teve por finalidade testar a diferença entre medianas, assim como a possibilidade na obtenção de observações mais presentes em uma população contra a outra, no qual a significância é obtida

através do valor de  $p$  ( $p \leq 0,05$ ). Foi exigido que as amostras deste teste fossem independentes. A Estatística Descritiva foi utilizada com a finalidade de verificar o desvio padrão dos graus tumorais das amostras com idade maior e menor que 50 anos.

### 3. Resultados

Após a realização do sequenciamento, as 22 amostras demonstraram alta similaridade quando comparadas com o fragmento padrão, sendo observado, apenas duas alterações nucleotídicas (Tabela 2) no gene *ATPase6*. As alterações encontradas foram duas transições, no qual em uma amostra ocorreu mudança no aminoácido e em outra o aminoácido permaneceu o mesmo. Nenhuma alteração nucleotídica foi observada no gene *ATPase8*.

**Tabela 2** – Alterações nucleotídicas encontradas.

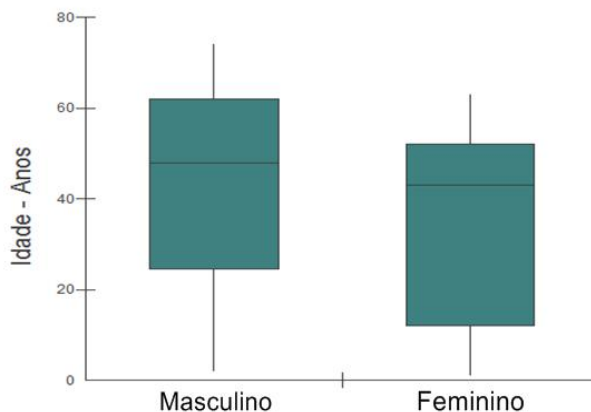
Amostra Alterada	Alterações nucleotídicas	CÓDON	Aminoácido	Tipo de alteração
CSN - 47	A 9.069 G	TCA TCG	Serina → Serina	Transição
CSN - 193	C 8.932 T	CCC TCC	Prolina → Serina	Transição

Fonte: Autores.

Com o auxílio dos *softwares BioEstat e Microsoft office Excel 2010*, obteve-se a mediana etária das amostras analisadas, que apresentou entre os pacientes do gênero masculino mediana de 48 anos e do gênero feminino de 43 anos (Figura 1). Ao ser realizada a estatística descritiva nos graus tumorais sendo eles separados em maiores e menores que 50 anos, a média observada nos pacientes com idades acima de 50 anos tiveram um resultado de 3,3 e os pacientes com idades inferiores a 50 anos tiveram um resultado de 2,3 (Figura 2).

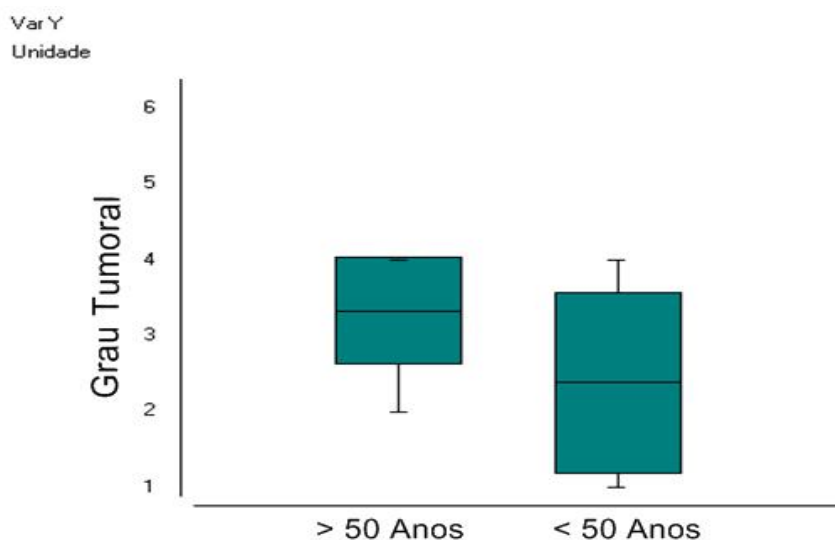
Considerando os valores observados das medianas entre os pacientes de gênero feminino e masculino, não foi observada diferença significativa entre as medianas nos dois gêneros, e também apresentaram desvio padrão semelhante.

**Figura 1** - *Bloxplot* utilizando o teste de *Mann-Whitney* ilustrando as medianas etárias e o desvio padrão entre os dois gêneros dos pacientes ( $p > 0.05$ ).



Fonte: Autores (2022).

**Figura 2** - *Bloxplot* ilustrando a média e o desvio padrão entre os graus tumorais dos pacientes maiores e menores que 50 anos.



Fonte: Autores (2022).

#### 4. Discussão

Considerando o resultado da média dos graus tumorais dos pacientes com idades maiores e menores de 50 anos, foi observado que a maior parte dos pacientes acima de 50 anos estão relacionados com os tumores de alto grau (III e IV), enquanto que os menores de 50 anos estão relacionados com os tumores de baixo grau (I e II). Fortalecendo a ideia que a maior parte dos astrocitomas de baixo grau são de origem hereditária, enquanto que a maior parte do surgimento dos de alto grau, estão relacionados com a longa exposição a agentes carcinogênicos (OMS, 2008).

As mutações relacionadas com a mudança de nucleotídeo são comuns, e podem ser classificadas em dois tipos de substituições, a transição, que consiste na mudança de uma purina por outra purina ou a mudança de uma pirimidina por outra pirimidina, e a transversão, que é menos comum e consiste na mudança de uma purina por uma pirimidina e vice-versa (Berg et al., 2002). Vale ressaltar que, apesar da mudança no nucleotídeo, a transição nem sempre altera o aminoácido da estrutura primária resultante da tradução. Já a transversão, geralmente, só altera o aminoácido quando ocorrerem no primeiro ou no

segundo nucleotídeo do códon. Nesse contexto as mutações encontradas não foram consideradas significativas, ou seja, não interferem diretamente na função do gene.

Na amostra CSN – 47, ocorreu alteração de uma adenina por uma guanina no sítio 9.069, não modificando o aminoácido. No caso da amostra CSN – 193, a alteração nucleotídica ocorreu no sítio 8.932, substituindo uma Citosina por uma Timina, ocorrendo dessa forma mudança do aminoácido Prolina por Serina (Figura 3).

**Figura 3** - Ilustração da substituição do aminoácido ocorrido na amostra CSN-193.



Legenda: a. Ilustração da sequência padrão. b. Ilustração da sequência da amostra CSN – 193. Fonte: Autores (2022).

Apesar da mudança de aminoácido ocorrida na amostra CSN – 193 aparentar alteração significativa para o gene levando em consideração a diferença estrutural dos aminoácidos alterados, essa alteração faz parte de uma substituição normal e sem efeito deletério que ocorre no haplogrupo L3f1b1 em gliomas (Oven & Kayser, 2009). Os haplogrupos são grupos de haplótipos que apresentam polimorfismos de um antepassado comum, sendo os antepassados relacionados ao grupo étnico e a origem geográfica da linhagem (Caderna, 2013). O haplogrupo L3f1b1 (Figura 4) pertence à origem afro americana (Soares et al., 2012).

**Figura 4** - Grupo populacional relacionado ao Haplogrupo L3f1b1.

	L3f1b1a C8410T C10070T G16129A		
3.	DQ305032	(Afr Amer)	Parsons
4.	DQ305033	(Afr Amer)	Parsons
5.	DQ305034	(Afr Amer)	Parsons
6.	DQ305035	(Afr Amer)	Parsons
7.	DQ305036	(Afr Amer)	Parsons
8.	EU092696	(L330 Mozambique)	Behar
9.	JQ704670	(Ethiopia)	Behar
10.	KC622073	(Khoisan)	Barbieri
11.	KC622242	(Khoisan)	Barbieri
12.	KC622269	(Khoisan)	Barbieri
13.	KF055329	(GLA 612 117 BC15)	Collins

Fonte: Autores.

O DNA mitocondrial, diferentemente do DNA nuclear, não contém íntrons, não possui proteção contra histonas e está exposto a espécies reativas de oxigênio gerados pela fosforilação oxidativa (Mondica-Napolitano et al., 2007). Nesse contexto, observa-se que o DNA mitocondrial é mais propício ao surgimento de mutações, quando comparado ao DNA nuclear (nDNA), levando em consideração que, ele contém íntrons, apresenta proteções contra histonas, e não está exposto por espécies reativas de oxigênio, tornando-se menos propício ao surgimento de mutações, o que não foi evidenciado no nosso estudo.

Warburg (1956), sugeriu que o câncer é originado a partir de uma célula não neoplásica que se adaptou ao metabolismo anaeróbico após uma lesão ao seu sistema respiratório para conseguir sobreviver e que os tumores se iniciam em decorrência de um dano constante às mitocôndrias. Dessa forma as células cancerosas são capazes de regular positivamente o metabolismo da glicose, mesmo na presença de oxigênio, esse tipo celular sintetiza ATP através da glicólise, uma reação aeróbica que está ligada a um alto consumo de glicose e produção abundante de lactato, e vem sendo sugerida como marcador

de desenvolvimento tumoral. Este mecanismo de adaptação ficou conhecido como Efeito Warburg. Desde sua descoberta, esta alteração já foi relatada em vários tipos de cânceres, atingindo a forma e função das mitocôndrias (Lu et al., 2009).

Os resultados deste estudo entram em concordância com o mecanismo do efeito Warburg (1956), visto que, as *ATPase6* e *ATPase8* estão localizadas em regiões estruturalmente e funcionalmente importantes. Caso ocorresse mutações em algum destes dois genes, tanto a fosforilação oxidativa quanto a glicólise, como fontes de obtenção de energia, estariam comprometidas. Portanto, a integridade desses genes é de grande importância para garantir o suprimento energético nas células tumorais. Considerando que o DNA nuclear de uma célula neoplásica pode apresentar diversas mutações, seria esperada a presença de mutações no complexo V do mtDNA, dada sua ausência de proteção e conseqüentemente maior exposição a um ambiente altamente reativo. Todavia, não foram observadas alterações significativas nos genes, e sim uma alta similaridade com a sequência padrão.

## 5. Conclusão

Apesar do mtDNA ser bastante suscetível à mutações, os resultados deste estudo demonstraram um complexo V mitocondrial íntegro, podendo sugerir uma espécie de “mecanismo de proteção”, ainda desconhecido, capaz de manter a integridade genômica mitocondrial destas subunidades, mesmo em ambiente altamente reativo, o que assegura um aporte energético para as células neoplásicas.

## Referências

- Amuthan, G., Biswas, G., Zhang, S. Y., Klein-Szanto, A., Vijayasathy, C., & Avadhani, N. G. (2001). Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *The EMBO journal*, 20 (8), 1910–1920.
- Berg, J., Tymoczko, J. & Stryer L. (2002). *Biochemistry: Mutations Involve Changes in the Base Sequence of DNA*, Nova York: University School of Medicine.
- BRASIL. (2016). *Carcinogênese: mecanismo de desenvolvimento de tumores*.
- Caderna M. (2013). *Avaliação da relação entre haplogrupos mitocondrial e ancestralidade genômica no desenvolvimento de insuficiência cardíaca em amostra brasileira (Dissertação de Mestrado)*. Universidade de São Paulo.
- Chiela E. (2011). *A Autofagia e o ciclo celular desempenham papel central no mecanismo de ação do Resveratro e do Co-Tratamento com Temozolomida em células de linhagens de glioblastoma humano (Dissertação de Mestrado)*. Universidade do Rio Grande do Sul.
- Chinnery, P. F, Elliott, H. R. & Relton, C. L. (2012). Epigenetics, epidemiology and mitochondrial DNA diseases. *Int. J. Epidemiol*, 41 (1): 177-87.
- Ghaffarpour, M., Mahdian, R., Fereidooni, F., Kamalidehghan, B., Moazami, N., & Houshmand, M. (2014). The mitochondrial ATPase6 gene is more susceptible to mutation than the ATPase8 gene in breast cancer patients. *Cancer cell international*, 14 (1), 21.
- Lu, J., Sharma, L. K., & Bai, Y. (2009). Implications of mitochondrial DNA mutations and mitochondrial dysfunction in tumorigenesis. *Cell research*, 19 (7), 802–815.
- Modica-Napolitano, J. S., Kulawiec, M., & Singh, K. K. (2007). Mitochondria and human cancer. *Current molecular medicine*, 7 (1), 121–131.
- OMS. (2008). *Relatório Mundial de Câncer 2008*.
- Oven, M., & Kayser, M. (2009). Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human mutation*, 30(2), E386–E394.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74 (12), 5463–5467.
- Sambrook, Joseph. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Soares, P., Alshamali, F., Pereira, J. B., Fernandes, V., Silva, N. M., Afonso, C., Costa, M. D., Musilová, E., Macaulay, V., Richards, M. B., Cerny, V., & Pereira, L. (2012). The Expansion of mtDNA Haplogroup L3 within and out of Africa. *Molecular biology and evolution*, 29 (3), 915–927.
- SBOC. (2011). *Manual de Condutas*.
- Souza C. (2005). *Um estudo clínico, bioquímico, histoquímico e genético-molecular de pacientes com doenças do DNA mitocondrial (Tese de Doutorado)*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Tam Z. Y., Gruber J., Halliwell B. & Gunawan R. (2013). Mathematical Modeling of the Role of Mitochondrial Fusion and Fission in Mitochondrial DNA Maintenance. *PLoS One*, 8(10), 1-10.
- Warburg O. (1956). On the origin of cancer cell. *Science*, 123, 309–314.