

**MESTRADO EM MEDICINA E ONCOLOGIA MOLECULAR  
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO**

*Mutações somáticas do DNA mitocondrial nas  
células oncocíticas de tumores de Warthin  
Comparação com tumores de células de Hürthle da tireóide*

SUSANA MARIA DE MELO PEREIRA GUIMARÃES

Porto, 2008



Dissertação de candidatura ao grau de Mestre apresentada à Faculdade  
de Medicina da Universidade do Porto

## Agradecimentos

Ao Professor Doutor Manuel Sobrinho Simões, coordenador do Mestrado em Medicina e Oncologia Molecular, agradeço o incentivo e entusiasmo que sempre demonstrou e transmitiu durante a execução deste trabalho.

Ao Professor Doutor Valdemar Máximo, os meus sinceros agradecimentos pela disponibilidade, empenho e apoio científico que depositou na execução deste trabalho.

À Professora Doutora Elsa Fonseca, orientadora desta tese de Mestrado, os meus sinceros agradecimentos pela amizade, incentivo, apoio científico e tranquilidade que sempre transmitiu na supervisão deste trabalho.

À Professora Doutora Fátima Carneiro, agradeço o exemplo diário que dá na Direcção do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de São João e ao qual, com muito orgulho, pertença.

À Mestre Noémia Leal, agradeço o apoio técnico e colaboração científica no estudo dos tumores oncocíticos.

À Mestre Raquel Portugal, colega do Internato Médico e do Mestrado, agradeço a amizade, incentivo e apoio científico no estudo dos tumores oncocíticos

À Paula Silva, técnica de Anatomia Patológica da FMUP no IPATIMUP, agradeço a excelente assistência técnica e conhecimentos técnicos que transmitiu.

Ao Joel, agradeço a fundamental assistência informática.

Aos meus pais e avós, agradeço o apoio, a amizade e o amor incondicionais.

Ao Jorge, agradeço o incentivo constante e a tranquilidade demonstrada em todos os momentos.

E a todos aqueles que, não podendo aqui ser nomeados, contribuíram, de uma forma ou de outra, para que este trabalho fosse realizado.

## Resumo

Os tumores oncocíticos são constituídos por células epiteliais grandes cujo citoplasma se encontra preenchido por um número elevado de mitocôndrias, morfológica e funcionalmente anormais (células oncocíticas, oxifílicas ou, quando na tireóide, células de Hürthle). Estes tumores ocorrem, preferencialmente, em tecidos com baixo índice proliferativo, como a tireóide e as glândulas salivares. A acumulação de mitocôndrias no citoplasma das células pode ser consequência de uma alteração primária no DNA mitocondrial (mtDNA), ou provocada por mutações do DNA nuclear (nDNA) que codifica muitas das proteínas mitocondriais.

Na tireóide foram identificadas alterações do mtDNA com diferenças significativas entre tumores com e sem células oncocíticas. Foi detectada a presença de uma deleção, designada por deleção comum (DC) do mtDNA, em todos os tumores oncocíticos estudados. No mesmo trabalho foi detectada uma associação significativa entre a existência de polimorfismos nos genes que codificam o complexo V da cadeia respiratória mitocondrial e a ocorrência de tumores oncocíticos. Também a presença de alterações na região não-codificante D-loop ocorreu com maior frequência nos tumores oncocíticos.

Os tumores de Warthin das glândulas salivares são constituídos por dois componentes: um epitelial, oncocítico, e outro linfóide, ambos policlonais, e muito se tem especulado acerca da sua histogénese. As duas teorias mais debatidas apontam para uma origem heterotópica ou para uma origem condicionada por um mecanismo imunopatológico.

Com a excepção de um artigo na literatura que descreve a presença da DC numa série de tumores de Warthin, não há, até à data, outros estudos que descrevam a ocorrência de alterações do mtDNA em tumores de Warthin.

Na tentativa de progredir na compreensão da relação das alterações do mtDNA com os tumores de células oncocíticas em geral, e com os tumores de Warthin em particular, estudámos 19 tumores de Warthin da glândula parótida, e o respectivo parênquima normal em 13 casos, relativamente a alterações do mtDNA. Efectuámos a revisão da informação clínica, macroscópica e

microscópica de todos os casos e procedemos à extracção de DNA dos tecidos, após microdissecção dos mesmos. Foram pesquisadas as seguintes alterações do mtDNA: DC, mutações na região da D-loop e nas subunidades 6 e 8 do complexo V (ATPase) da cadeia respiratória mitocondrial. Verificou-se instabilidade na região não-codificante da D-loop em 63,2% dos tumores e em 7,7% dos casos no parênquima não neoplásico. Foram identificadas mutações somáticas da ATPase 6 em 5,3% dos tumores, não tendo sido detectadas alterações na subunidade 8. Não foi possível detectar a presença/ausência da DC nos tecidos estudados por motivos de ordem técnica.

Os resultados mais expressivos foram os seguintes: a) As mutações da ATPase 6 parecem ocorrer preferencialmente em tumores de fenótipo oncocítico; b) Não parece haver um papel determinante da instabilidade na região não-codificante da D-loop no processo de transformação oncocítica dos tumores de Warthin.

Em conclusão, as alterações encontradas no mtDNA dos tumores de Warthin das glândulas salivares não se afastam substancialmente das encontradas previamente numa série de tumores de células de Hürthle da tireóide, tanto no que diz respeito ao tipo de alterações, quanto à sua frequência.

## Abstract

Oncocytic tumours are composed by large epithelial cells with a granular cytoplasm which is filled with a large number of morphological and functionally abnormal mitochondria (oncocytic cells, oxyphilic cells or, whenever in the thyroid, Hürthle cells). These tumours occur in parenchymas and organs with low proliferative index, like the thyroid and the salivary glands. The mitochondria accumulation in the cytoplasm of cells may be the result of a primary alteration in mitochondrial DNA (mtDNA), or it can be a consequence of mutations in nuclear DNA (nDNA) that encodes for mitochondrial proteins.

Alterations in the mtDNA, with significant differences between oncocytic and non-oncocytic thyroid tumours have been reported. In a previous study performed in thyroid tumours, the presence of a deletion, designated as common deletion (CD) of the mtDNA, was detected in all oncocytic cell tumours included in the series. In the same study, an association between the existence of polymorphisms in mitochondrial genes encoding complex V of the mitochondrial respiratory chain and the occurrence of oncocytic tumours was also detected. Finally, a higher frequency of alterations in displacement-loop (D-loop) was found in the oncocytic tumours.

Warthin tumours of the salivary glands consist in two components: an oncocytic epithelial component and a lymphoid component, being both polyclonal. The histogenesis of Warthin tumour remains controversial, and two theories are on the table: the so-called heterotopic theory and the theory that emphasizes the role played by immunological mechanisms.

Besides the study on record that describes the presence of the CD in Warthin tumours, there are no other publications, as far as we know, describing the occurrence/absence of alterations in mtDNA in Warthin tumours.

In an attempt to progress in the understanding of the relationship between alterations in mtDNA in oncocytic cell tumours in general, and Warthin tumours in particular, we studied 19 Warthin tumours of the parotid gland, and the respective non neoplastic parenchyma in 13 cases, regarding some mtDNA alterations. We performed a revision of the clinical information, macroscopic

and microscopic characteristics from all the cases; DNA extraction was performed from samples obtained using microdissection. We searched for the following mtDNA alterations: CD, mutations in the D-loop and in the subunits 6 and 8 of the complex V (ATPase) of the mitochondrial respiratory chain.

We detected the presence of instability in the D-loop region in 63.2% of the Warthin tumours and in one case in the adjacent normal tissue. We detected somatic mutations in ATPase 6 in 5.3% of the cases. Mutations in the 8 subunit were not found. We were not able to detect the presence/absence of the CD in the studied tissues because of technical problems.

Mutations in ATPase 6 show some preference by tumours with an oncocyctic phenotype. We did not obtain evidence favouring the existence of a determinant role for the instability of the non-codifying D-loop region in the process of oncocyctic transformation of Warthin tumours.

In conclusion, we observed that the alterations that we found in mtDNA of Warthin tumours do not differ substantially from those previously obtained in Hürthle cells tumours of the thyroid, both with respect to the type of alterations and to their frequency.

## Abreviaturas

ADP –difosfato de adenosina

ATP – trifosfato de adenosina

COX – citocromo C oxidase

Cyt b – citocromo b

Cyt c – citocromo c

DC – deleção comum

D-loop – displacement loop

DNA – ácido desoxirribonucleico

mtDNA – DNA mitocondrial

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

nDNA – DNA nuclear

NO – óxido nítrico

OXPPOS – fosforilação oxidativa

PCR – reacção da polimerase em cadeia

POLG – polimerase gama

ROS – espécies reactivas de oxigénio

RNA – ácido ribonucleico

rRNA – RNA ribossomal

tRNA – RNA de transferência

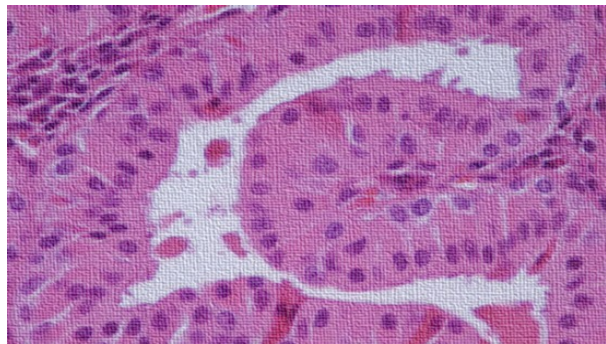
SDH – desidrogenase do succinato

## Índice

Agradecimentos	2
Resumo	3
Abstract	5
Abreviaturas	7
Índice	8
Introdução	10
A mitocôndria	11
Mutações do mtDNA	13
A mitocôndria e o cancro	15
A mitocôndria e a patologia degenerativa/envelhecimento	19
Os tumores de células ricas em mitocôndrias	20
Os tumores de células de Hürthle da tireóide	20
As alterações moleculares	21
Delecção comum	22
Mutações pontuais somáticas do mtDNA	23
D-loop	23
Genes codificantes/tRNA	24
Os tumores de Warthin das glândulas salivares	25
As alterações moleculares	25
Clonalidade	25
MtDNA	26
Outras alterações moleculares	27
O fumo do tabaco	27
Objectivos	29
Material e Métodos	31
Resultados	42
Discussão e Conclusões	51
Referências Bibliográficas	61

“The beginning of wisdom is found in doubting,  
by doubting we come to question, and by  
searching we may come upon the truth.”

Pierre Abelard



## **INTRODUÇÃO**

## A mitocôndria

As mitocôndrias são organelos de 0,5 – 1 µm de comprimento. Foram primeiro observadas há cerca de 118 anos por Altmann, que as denominou de “organismos elementares”.

A mitocôndria contém uma membrana interna e uma externa que definem a matriz e o espaço intermembranar. A membrana externa é permeável a pequenas moléculas, enquanto a membrana interna é livremente permeável ao oxigênio e dióxido de carbono. Esta diferença é essencial para manter um gradiente protônico necessário à síntese de ATP. A membrana interna tem cristas que aumentam a superfície disponível às enzimas da cadeia respiratória. A matriz contém moléculas do DNA mitocondrial (mtDNA), proteínas necessárias para a replicação e transcrição do mtDNA, ribossomas mitocondriais para a síntese proteica e enzimas com outras funções metabólicas<sup>1</sup>. A maioria das proteínas mitocondriais são codificadas pelo genoma nuclear.

As mitocôndrias são responsáveis pelo fornecimento da maior parte da energia de que a célula necessita (80%), mediante o processo de **fosforilação oxidativa (OXPHOS)**<sup>2</sup>. De uma forma simples, a mitocôndria queima as calorias da nossa dieta com o oxigênio que respiramos e transforma-as em energia química, produzindo trabalho e calor. Com este processo a mitocôndria gera espécies reativas de oxigênio (ROS) endógenas, que lesam a mitocôndria, o mtDNA e a célula<sup>3</sup>. O sistema da OXPHOS (figura 1) consiste em cinco complexos enzimáticos que contêm cerca de 100 subunidades proteicas diferentes e são responsáveis pela cadeia respiratória mitocondrial e pela produção de ATP. O mtDNA codifica subunidades em quatro dos cinco complexos<sup>1,3,4</sup>: sete (ND1, 2, 3, 4L, 4, 5, 6) no complexo I (NADH desidrogenase); uma (citocromo b) no complexo III (citocromo C redutase); três (COI, II, III) no complexo IV (citocromo C oxidase - COX) e duas (ATPase 6 e 8) no complexo V (ATP sintetase). O DNA nuclear (nDNA) codifica todas as restantes proteínas mitocondriais, nomeadamente todas as subunidades do complexo II (desidrogenase do succinato - SDH) e a polimerase gama (POLG)

do mtDNA. Os complexos I, III e IV bombeiam prótons para fora da matriz e a energia gerada por este gradiente electroquímico é utilizada pelo complexo V na síntese de ATP a partir do ADP.

Alguns dos métodos utilizados para o estudo da função da cadeia respiratória do mtDNA baseiam-se no estudo histoquímico enzimático para a SDH e a COX.

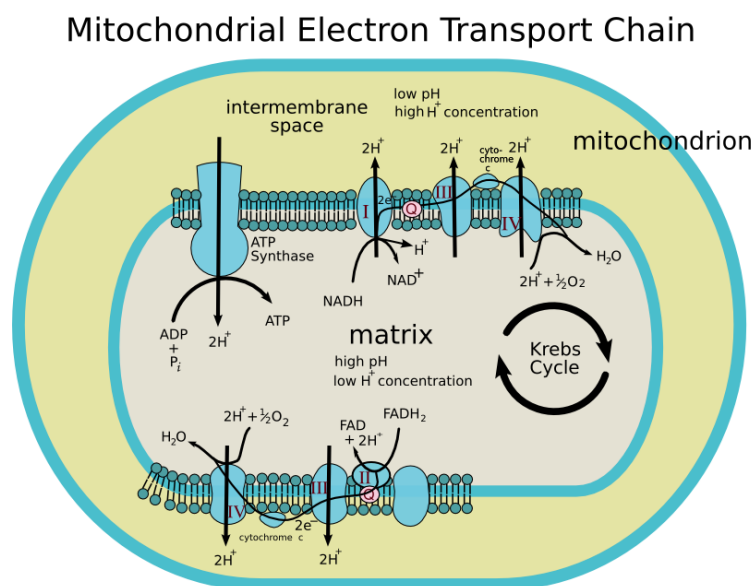


Figura 1 – Cadeia respiratória mitocondrial – a mitocôndria gera energia através da oxidação do hidrogénio fornecido pelo NADH e  $FADH_2$ , derivados dos carboidratos (ciclo dos ácidos tricíclicos) e gorduras ( $\beta$ -oxidação) da dieta, em associação ao oxigénio, produzindo ATP e calor <sup>adaptado de 5</sup>

O mtDNA humano é uma molécula circular e dupla de DNA, com 16 569 pares de bases, sequenciada pela primeira vez por Anderson et al<sup>6</sup>, que é replicada e transcrita na matriz mitocondrial. O mtDNA está presente em grande número de cópias por célula ( $10^3$ - $10^4$ ), sendo que o número varia com os diferentes tipos de células. O mtDNA contém 37 genes, 13 dos quais codificam 13 polipeptídeos envolvidos na OXPHOS, e os restantes 24 codificam RNAs (2 rRNAs e 22 tRNAs) essenciais para a síntese proteica na mitocôndria<sup>1</sup>. Para além disso, o mtDNA contém uma região não codificante –

D-loop, envolvida no controlo da replicação e transcrição do mtDNA. Os restantes cerca de 1500 genes que codificam proteínas mitocondriais estão distribuídos pelo nDNA, e as proteínas correspondentes são depois importadas para a mitocôndria por vários sistemas de transporte<sup>3,4</sup>.

O mtDNA tem certas características que o tornam único. Por exemplo, o mtDNA é unicamente transmitido pela mãe, e a sua taxa de mutação é cerca de 10-100 vezes superior à do nDNA. Para esta elevada taxa de mutação contribuem<sup>2,7</sup>:

- ☞ a ausência de histonas protectoras ou de proteínas que se liguem ao DNA;
- ☞ sistemas reparadores do mtDNA limitados;
- ☞ genes que consistem só em exões sem intrões;
- ☞ replicação rápida sem um sistema de verificação;
- ☞ o mtDNA está aderido ao lado da matriz na membrana interna da mitocôndria, colocando-o em proximidade com espécies reactivas lipofílicas e espécies reactivas da oxidação lipídica (geradas na membrana).
- ☞ cada indivíduo pode apresentar várias formas alélicas do mtDNA

### **Mutações do mtDNA**

Foi já na segunda metade do século XX que surgiu a primeira evidência que a disfunção do mtDNA estava associada a doenças<sup>1</sup>.

Há dois tipos de mutação do mtDNA<sup>1</sup>: “large rearrangements”, incluindo deleções e duplicações, e mutações pontuais. As mutações podem ocorrer espontaneamente nas células germinativas, permitindo a transmissão materna, ou nas células somáticas, levando a casos esporádicos de doença. Ao contrário do nDNA, o mtDNA não é replicado com sincronia absoluta aquando da divisão celular, e a segregação das moléculas de mtDNA para as células filhas é aleatória. Isto acontece tanto na linha germinativa como na somática, levando a que os níveis de mtDNA mutado variem dramaticamente de uma geração para outra. A gravidade sintomática causada por uma mutação do mtDNA pode variar enormemente devido, principalmente, a dois factores:



## A mitocôndria e o cancro

Warburg (1956) reconheceu o “dano respiratório” como uma característica única das células neoplásicas e colocou a hipótese que estas células teriam alterações da função mitocondrial<sup>8,9</sup>.

Com o advento da investigação do metabolismo energético das células malignas foi reconhecido que estas apresentam uma elevada taxa de glicólise, um aumento na taxa metabólica com consumo elevado de glicose, redução na oxidação do piruvato com aumento da produção de ácido láctico, aumento do glicerol e turnover dos ácidos gordos acompanhado pela redução na oxidação dos mesmos e aumento da actividade da via das pentoses-fosfato<sup>10</sup>.

Ao longo de muitos anos, as modificações moleculares implicadas nestes mecanismos não estavam definidas. Recentemente, essas alterações moleculares foram estudadas em vários tipos de neoplasias malignas, tendo-se identificado instabilidade, mutações genéticas ou expressão anormal do genoma mitocondrial<sup>10,11</sup>. As alterações na sequência do mtDNA são ainda acompanhadas pelo aumento da produção das espécies reactivas de oxigénio (ROS), e estão associadas a lesões dos complexos respiratórios mitocondriais e a fuga de electrões. As mutações do mtDNA que inibem a OXPHOS podem aumentar a produção de ROS e assim contribuir para a tumorigénese. As ROS podem induzir mutações e dano oxidativo não só no mtDNA, mas também nas proteínas, membranas celulares e nDNA. As ROS são, então, um sistema sinalizador da mitocôndria para o núcleo, que em excesso podem contribuir para a transformação neoplásica, quer como iniciadoras tumorais causando mutações no nDNA em proto-oncogenes ou genes supressores tumorais, quer como promotoras da proliferação celular<sup>11</sup>. Alterações do mtDNA são reconhecidas como tendo um papel importante na patogénese do cancro. As mutações do mtDNA são cerca de 220 vezes mais abundantes que as mutações do nDNA em células cancerosas<sup>10</sup>.

Vários estudos<sup>11,12</sup>, utilizando células deficitárias em mtDNA ( $\rho^0$ ), mostraram que estas células são mais resistentes à apoptose. Amuthan et al<sup>13</sup> demonstraram que este tipo de células têm fenótipos mais invasivos e sobre-

expressão dos marcadores específicos de tumor catepsina L e TGF $\beta$ , indicando que a perda do mtDNA poderia contribuir para a progressão tumoral e metastização.

A maioria das mutações do mtDNA encontradas em células cancerosas são acumuladas em células somáticas durante a vida do indivíduo. Quer as mutações herdadas, quer as somáticas, são causas conhecidas de várias doenças. A maioria das mutações que ocorrem em genes codificantes do tRNA e em genes estruturais do mtDNA, são descritas em tecidos afectados de pacientes com doenças mitocondriais<sup>10</sup>. Pelo contrário, muitas das mutações do mtDNA encontradas em neoplasias malignas estão localizadas na região da D-loop (1121pb). A D-loop foi mesmo reconhecida como sendo um local “hot-spot” para mutações na carcinogénese humana, particularmente a sequência homopolimérica “C”, entre as posições 303 e 309, onde inserções e/ou deleções são mais frequentes. Estando a D-loop envolvida na replicação e transcrição do mtDNA, mutações nesta região poderão causar uma diminuição no número de cópias ou alterações na expressão genética do genoma mitocondrial, o que irá ainda mais desregular o metabolismo da mitocôndria e a OXPHOS<sup>7</sup>.

Tabela 1 – Mutações encontradas em regiões codificantes/não codificantes do mtDNA em várias neoplasias malignas<sup>(adaptado de 9,10)</sup>

Tipo de cancro	Gene/região mutada	DC/outras alterações
Carcinoma da mama	D-loop, 16S rRNA, ND1, ND2, ND4, ND5, Cyt b, ATPase 6	DC
Carcinoma colo-rectal	D-loop, 12S rRNA, 16S rRNA, ND1, ND4L, ND5, Cyt b, COXI, COXII, COXIII	Não detectada
Carcinoma gástrico	D-loop, ND1, ND5, COXI	DC
Hepatocarcinoma	D-loop	Não detectada
Carcinoma pancreático	D-loop, 12S rRNA, 16S rRNA, ND1, ND2, ND4, ND4L, ND5, ND6, Cyt b, COXI, COXII, COXIII, ATPase6	Não detectada
Carcinoma esofágico	D-loop	
Carcinoma renal	ND1, ND3	Não detectada
Carcinoma da próstata	D-loop, 16S rRNA, ND1, ND4	Não detectada

Carcinoma da bexiga	D-loop	
Neoplasias da cabeça e pescoço	D-loop	Não detectada
Neoplasias da tireóide	D-loop, 12S rRNA, 16S rRNA, tRNA arginina, tRNA asparagina, tRNA leucina 2, ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6, Cyt b, COXI, COXII, COXIII, ATPase6	Não detectada
Neoplasias do ovário	D-loop, 12S rRNA, 16S rRNA, Cyt b	
Neoplasias uterinas e do colo do útero	D-loop	Não detectada
Neoplasias cerebrais	D-loop	Não detectada/Amplificação do mtDNA
Neoplasias hematológicas		
LLA	rRNA treonina, ND5, COXII, ATPase6	
SMD	Cytb, COXI, COXII, ATPase8	

Um estudo<sup>7</sup> que abrangeu um grande número e diferentes tipos de neoplasias malignas mostrou que a região D-loop é altamente susceptível ao dano oxidativo quando comparada com outras regiões do mtDNA, e que a incidência de mutações somáticas da D-loop aumenta com o aumento do estadio das neoplasias estudadas. O extenso dano oxidativo às sequências de policitidina podem resultar em “slipping” e/ou em incorporação errada durante a replicação ou a reparação do mtDNA pela polimerase gama (POLG) do mtDNA. A POLG é a única polimerase na mitocôndria e é responsável pela replicação e reparação do mtDNA. Foi demonstrado que a POLG é um alvo do dano oxidativo, capaz de inibir a sua actividade e diminuir a sua capacidade de ligação ao DNA, reduzindo assim, a sua capacidade, quer replicativa, quer reparadora<sup>7</sup>.

Foi então postulado que o dano oxidativo à região D-loop do mtDNA e/ou a menor eficácia na replicação do mtDNA, estariam envolvidos na instabilidade e depleção do mtDNA nos vários tecidos tumorais<sup>14</sup>.

Na maioria dos hepatocarcinomas, carcinomas gástricos e outros (carcinomas do pulmão e colo-rectais, por exemplo) estudados, a carcinogénese é acompanhada por repressão da replicação do mtDNA. No entanto, foram também encontradas, em percentagens variáveis nas várias neoplasias estudadas (por exemplo, em adenomas de células de Hürthle da tireóide), aumentos do número de cópias do mtDNA<sup>11</sup>. Este aumento, não acompanhado por um aumento na taxa de síntese de ATP, pode significar uma resposta compensatória à disfunção e depleção energética mitocondrial.

O aumento da actividade glicolítica das células neoplásicas reflecte a sua incapacidade de gerarem ATP via OXPHOS, o que parece contribuir para a resistência à apoptose destas células. Muitas proteínas pro-apoptóticas codificadas pelo nDNA, incluindo o cytc, factor inductor da apoptose (AIF), endonuclease G e smac/DIABLO, residem na mitocôndria onde desempenham funções ainda não totalmente esclarecidas<sup>2,9</sup>. Uma vez libertadas da mitocôndria, estes factores vão desencadear uma série de eventos bioquímicos que levam à activação da apoptose<sup>2,15</sup>. A resistência à apoptose por mutações no mtDNA permite-lhes uma sobrevida maior, podendo acumular alterações genéticas que contribuam para o aumento da taxa mutacional quer no mtDNA, quer no nDNA, bem como para a activação de proto-oncogenes e factores de transcrição, instabilidade genómica, resistência à quimioterapia, invasão e metastização<sup>7</sup>.

Outro factor que parece implicado no dano ao mtDNA é a p53. Mais de 50% das neoplasias malignas humanas apresentam mutações da p53. Esta proteína interage com o mtDNA e a POLG, aumentando a sua função replicativa<sup>11</sup>. A perda da p53 resulta num aumento significativo das lesões do mtDNA e, possivelmente, na depleção e delecção do mtDNA.

## A mitocôndria e a patologia degenerativa/envelhecimento

A primeira evidência de que as mutações do mtDNA podiam ser um factor chave no envelhecimento e doenças degenerativas relacionadas com a idade surgiu com a identificação de doenças sistémicas causadas por mutações do mtDNA<sup>3</sup>.

Manifestações clínicas que foram relacionadas a mutações do mtDNA (especificamente deleções) afectam o cérebro, o coração, o músculo esquelético, os rins e o sistema endócrino, ou seja, os mesmos tecidos afectados no envelhecimento<sup>3</sup>. Este facto, juntamente com a observação que as mutações do mtDNA se acumulam com a idade, suporta a teoria de que a redução progressiva na capacidade respiratória mitocondrial é um factor determinante no envelhecimento e nas doenças degenerativas relacionadas com a idade<sup>9</sup>.

A importância das mutações do mtDNA e de uma OXPHOS deficiente nas doenças cardiovasculares relacionadas com a idade e na patogénese de doenças neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson) tem sido reportada, mas os estudos publicados são ainda contraditórios<sup>1</sup>. Por outro lado, o conceito de que as espécies radicais de oxigénio são factores deletérios fundamentais que contribuem para o processo do envelhecimento, e de que a formação destas espécies pelas células, durante a sua função respiratória normal, é um processo tóxico contínuo que, com o tempo, se torna a principal causa do envelhecimento humano, está a mudar<sup>16</sup>. Estudos recentes demonstraram que mitocôndrias que respiram normalmente não produzem altas concentrações de espécies reactivas de oxigénio. Bjelakovic et al<sup>17</sup> estudaram a eficácia da toma de antioxidantes na prevenção e incidência do cancro gastrointestinal e não demonstraram a existência de qualquer benefício. O conceito central de Linnane et al<sup>16</sup> é que a geração de radicais livres, como o anião superóxido e NO, é essencial às funções fisiológicas saudáveis do organismo. Estes autores vêem o envelhecimento como um processo multissistémico e enfatizam que: 1) é um processo estocástico; 2) é específico da espécie; 3) é diferente para cada organismo dentro da mesma espécie; 4) é específico de órgão, tecido e célula.

O envelhecimento pode ser considerado como a “doença” mais comum, afectando 100% do mundo animal. Décadas de evolução na teoria mitocondrial do envelhecimento ainda não clarificaram os mecanismos pelos quais o envelhecimento está ligado à acumulação de mutações do mtDNA. A associação entre variantes de mtDNA e a longevidade parece ser altamente geográfico-dependente.

O futuro permitirá definir cada indivíduo segundo a associação por haplogrupos do mtDNA/factores de risco para determinadas doenças<sup>17</sup>.

## **Os tumores de células ricas em mitocôndrias**

O suporte para o envolvimento das mitocôndrias nas neoplasias é encontrado nos tumores cujas células acumulam grandes quantidades de mitocôndrias – células oncocíticas, oxífilicas ou, quando na tireóide, células de Hürthle. São células epiteliais grandes, com citoplasma acidófilo e granular preenchido por um grande número de mitocôndrias anormais e núcleos com nucléolos proeminentes. Estas células existem numa variedade de tecidos (nomeadamente tireóide, paratireóide, rim, glândula salivar), associadas ou não a patologia tumoral.

### **Os tumores de células de Hürthle da tireóide**

Os tumores oncocíticos da tireóide, também chamados tumores de células de Hürthle, são, provavelmente, os mais bem estudados em termos de mtDNA.

Na tireóide, as células de Hürthle não estão restritas às células foliculares ou tumores destas derivados, podendo também ocorrer em carcinomas medulares. Isto sugere que estas células estão, predominantemente, restritas a tecidos e tumores com baixo índice proliferativo e turnover reduzido, isto é, restritas a células estáveis com intervalo intermitótico longo, por forma a permitir a sua acumulação<sup>19</sup>.

As células de Hürthle que ocorrem no contexto de uma neoplasia, benigna ou maligna, não diferem morfológicamente das encontradas no contexto de uma tireoidite de Hashimoto ou de um bócio multinodular, assim como não diferem das células oncocíticas observadas noutros órgãos, por exemplo na glândula salivar<sup>19,20</sup>.

Ainda hoje há controvérsias quanto ao possível pior prognóstico dos carcinomas de células de Hürthle (papilares ou foliculares) relativamente aos carcinomas da tireóide sem células de Hürthle. No entanto, parece haver uma maior prevalência de malignidade nos tumores de células de Hürthle e uma maior agressividade dos carcinomas de células de Hürthle. Está também descrita uma maior agressividade dos meningiomas oncocíticos.

A diminuição da sobrevivência de doentes com carcinomas oncocíticos da tireóide pode ser devida a uma redução da capacidade da captação de iodo pelas células tumorais, resultando numa má resposta ao tratamento com iodo radioactivo<sup>19</sup>.

### **As alterações moleculares**

Como já foi referido, alterações no mtDNA foram demonstradas em vários tipos de carcinomas primários e incluem grandes deleções, mutações missense, mutações frameshift e pequenas inserções/deleções em regiões repetitivas<sup>21</sup>.

A maioria dos tumores de células de Hürthle da tireóide são esporádicos e ocorrem frequentemente associados à tireoidite auto-imune<sup>22</sup>.

A DC é frequentemente encontrada nos tumores de células de Hürthle da tireóide e foi proposta como um marcador dos tumores oncocíticos nesta localização. Esta deleção remove sete genes OXPHOS (ATPase 6, ATPase 8, COIII, ND3, ND4, ND5) e cinco tRNA (glicina, arginina, histidina, serina e leucina), levando a uma disfunção grave do sistema OXPHOS<sup>22</sup>.

Máximo et al<sup>22</sup> procuraram alterações do mtDNA numa série de tumores benignos e malignos da tireóide (79 casos), com e sem células de Hürthle e no parênquima tiroideu adjacente às lesões, e obtiveram os resultados a seguir reportados.

### ***Delecção comum***

A DC do mtDNA está presente em todos os tumores de células de Hürthle (100%) independentemente do subtipo histológico, em 33.3% dos adenomas, em 0% dos carcinomas foliculares, e em 18,8% dos carcinomas papilares sem células de Hürthle. A DC foi também encontrada, em percentagens variáveis, no parênquima adjacente de alguns casos de tumores com células de Hürthle. A ocorrência da DC estava estatisticamente associada ( $P < 0.001$ ) aos tumores de células de Hürthle.

A quantidade da DC do mtDNA foi significativamente maior ( $P < 0,0001$ ) nos tumores de células de Hürthle (intervalo: 2.7 – 9.6%) que nos tumores sem células de Hürthle (intervalo: 0 – 1.2%), independentemente de serem malignos ou benignos. A percentagem da DC foi significativamente superior nos carcinomas de células de Hürthle, comparativamente com os adenomas de células de Hürthle e os carcinomas papilares de células de Hürthle.

Será conveniente introduzir aqui o conceito de oxifilia primária e secundária. Katoh et al<sup>23</sup> sugeriram que, na ausência de qualquer factor ambiental que possa afectar as células tumorais, a oxifilia nos tumores de células de Hürthle da tireóide podia ser devida a mutações somáticas em genes que intervissem, directa ou indirectamente, no número de mitocôndrias e que fossem codificados quer pelo mtDNA, quer pelo nDNA. Sugeriram também, que a oxifilia dos tumores da tireóide poderia ser “primária”, devido a mutações somáticas, ou “secundária”, devido a alterações induzidas pelo dano oxidativo ou outras agressões ambientais. Em trabalhos realizados anteriormente, em tumores de células de Hürthle da tireóide<sup>4,22</sup> e em tumores de Warthin<sup>24</sup>, verificou-se a presença da DC no parênquima adjacente ao tumor, tendo sido assumida a hipótese de que a DC poderá estar presente na células antes da transformação oxifílica. Foi ainda sublinhado pelos autores<sup>19</sup> que a altura em que as mutações do DNA ocorrem, em relação com o processo iniciador da neoplasia, pode resultar em oxifilia primária ou secundária – se o factor que leva ao aumento das mitocôndrias ocorre numa célula normal que depois se irá transformar em célula neoplásica após uma série de mutações, o resultado

final será um tumor de células de Hürthle com oxifilia “primária”; se ocorrer numa célula já iniciada no processo neoplásico, então o produto final vai ser diferente do parênquima normal e o tumor vai ter oxifilia “secundária”.

### ***Mutações pontuais somáticas do mtDNA***

#### *D-loop*

A maioria das mutações encontradas nesta região, estavam localizadas em regiões repetitivas, classificadas como lesões com instabilidade da D-loop<sup>22</sup>. Estas foram detectadas em 48,5% dos casos. A percentagem de tumores com instabilidade da D-loop, é semelhante entre as lesões benignas (50,0%) e as malignas (47,2%). A percentagem de tumores de células de Hürthle com instabilidade do D-loop é maior, embora não estatisticamente significativa ( $P = 0,069$ ), que a de tumores sem células de Hürthle.

#### *Genes codificantes/tRNAs*

Foram detectadas 57 mutações somáticas em 51,5% dos tumores: três mutações “frameshift”, três mutações pontuais somáticas em três tRNA (serina, alanina e isoleucina) e 51 mutações pontuais somáticas nos genes do sistema OXPHOS<sup>22</sup>. Destas, 49% eram mutações silenciosas, 51% eram mutações “missense”. De todas as mutações pontuais somáticas, 81,5% eram transições.

Embora sem significado estatístico, detectou-se uma maior prevalência de mutações missense no complexo V dos tumores de células de Hürthle; todas as mutações missense encontradas no complexo V envolviam o gene da ATPase 6<sup>22</sup>.

## Os tumores de Warthin das glândulas salivares

O tumor de Warthin das glândulas salivares é uma neoplasia constituída por dois componentes<sup>20</sup>:

Componente epitelial: compreende uma camada luminal de células oncocíticas, colunares, com núcleos ovalados dispostos em paliçada, e cuja superfície apical pode apresentar decapitação apócrina e cílios, e uma camada interna de células basais, cubóides ou achatadas, pequenas, também oncocíticas. Este epitélio pode sofrer alterações do tipo metaplasia escamosa.

Componente linfóide: localiza-se no estroma da neoplasia e é constituído por tecido linfóide, com vários tipos de reactividade, sendo os centros germinativos frequentes. Ocasionalmente podem ser vistos plasmócitos e mastócitos.

O tumor de Warthin apresenta-se normalmente com um padrão papilar, associado a áreas císticas e sólidas. Os cistos variam em forma e em tamanho, e as estruturas papilares projectam-se para o lúmen. Os espaços císticos contêm material de secreção eosinofílico, com formação ocasional de cristais de colesterol e corpos laminados.

Na maioria dos países é o segundo tumor mais frequente das glândulas salivares, em percentagens de frequência variáveis de país para país. A idade média na altura do diagnóstico é de 62 anos, sendo raro antes dos 40. Dos dados conhecidos da relação entre os sexos, há uma ligeira predominância masculina<sup>20,25</sup>.

A quase totalidade destes tumores surge no pólo inferior da glândula parótida e, ocasionalmente, nos gânglios linfáticos adjacentes. É multicêntrico em cerca de 12-20% dos casos, e bilateral em cerca de 5-14%<sup>20</sup>.

## As alterações moleculares

### Clonalidade

Há muita controvérsia quanto à histogénese dos tumores de Warthin. São duas as teorias principais<sup>25,26</sup>. Segundo uma delas, o componente linfóide

representa gânglios linfáticos residuais associados às glândulas salivares (gânglios linfáticos intra e paraparotídeos), nos quais o componente epitelial prolifera (teoria heterotópica). De acordo com a outra teoria, o abundante tecido linfóide resulta de uma resposta do sistema imune a um epitélio neoplásico (teoria imunopatológica). Estudos<sup>27, 28</sup> que utilizaram metodologias variadas (imuno-histoquímica e citometria de fluxo) mostraram que o componente linfóide é constituído por uma mistura de linfócitos B e T (razão: 0.8:1), sem evidência de restrição de cadeias leves, ou seja, policlonal. No componente T, a proporção entre linfócitos helper e supressores é de 5.7:1. A utilização de técnicas moleculares (PCR, por exemplo)<sup>27</sup> demonstrou que, apesar de policlonal, a população linfóide apresenta expansões oligoclonais, sem evidência de translocações no proto-oncogene Bcl2. A presença destas expansões é indicadora de uma intensa e restrita resposta imune, mas sem apontar para o antigénio(s) implicado(s). Alguns autores<sup>29</sup> defendem um sistema semelhante ao tecido linfóide associado às mucosas (MALT), embora o tecido linfóide dos tumores de Warthin não apresente a mesma capacidade de transformação neoplásica, que é bem conhecida no MALT. Também neste último há um agente directamente relacionado com a sua transformação maligna (*Helicobacter pylori*), o que não acontece no tecido linfóide associado aos tumores de Warthin. No entanto, o vírus Epstein-Barr (EBV) foi encontrado numa grande percentagem de tumores de Warthin, embora ainda nenhum estudo tenha distinguido se o EBV está presente no componente epitelial, linfóide ou ambos.

Estudos realizados no componente epitelial dos tumores de Warthin mostraram que, tal como o componente linfóide, era constituído por uma população policlonal<sup>30</sup>.

### MtDNA

Lewis et al<sup>24</sup> estudaram 14 tumores de Warthin e mostraram, utilizando o “two-colour FISH” e PCR, que todas as células oncocíticas destes tumores continham mitocôndrias com uma redução no sinal normal do mtDNA, e que as células oncocíticas tinham populações mistas de mtDNA normal e delectado (heteroplasmia), mas nenhuma célula tinha exclusivamente mtDNA mutado

(estas células não produziram ATP e não teriam capacidade de sobrevivência). Os tumores de Warthin apresentavam uma média de 2,54% (0,23 – 6,41%) da presença da DC, enquanto os controlos (glândula parótida normal) apresentavam uma média de 0,10% (0,08 – 0,16%), sendo esta diferença estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ )<sup>24</sup>. A presença de baixos níveis de mtDNA em células epiteliais parotídeas normais, suportaria a teoria de que estas deleções precedem o fenótipo oncocítico.

### Outras alterações moleculares

Estudos realizados em culturas celulares a partir de células de tumores de Warthin<sup>31</sup>, demonstraram a presença de alterações estruturais e/ou numéricas em 58% dos casos: alterações numéricas com perda dos cromossomas Y e X, translocações complexas t(11;19;16); translocações recíprocas t(6;8) e t(6;15) e alterações do tipo 1p22, 3p26, 11p13. Trabalhos mais recentes, por Fehr et al<sup>32</sup>, mostraram que os tumores de Warthin clássicos eram negativos para a translocação t(11;19) (q21;p13) e sugerem que qualquer tumor de Warthin não clássico e nos metaplásicos, em que esta translocação esteja presente, devem ser estritamente vigiados e, possivelmente, tratados como carcinomas mucoepidermóides.

### O fumo do tabaco

A etiologia dos tumores das glândulas salivares ainda não bem definida, sendo que a radiação ionizante é o único factor em que uma associação positiva com estes tumores foi bem estabelecida.

O fumo do tabaco está hoje estabelecido como um carcinogénio potente, envolvido na etiologia de muitas neoplasias, nomeadamente orofaríngeas e pulmonares. Tan et al<sup>33</sup> demonstraram que o fumo do cigarro aumenta as mutações do mtDNA e o número de cópias por célula, em células da mucosa oral de fumadores e vários outros estudos<sup>34, 35, 36</sup> revelaram aumentos nos níveis de deleções do mtDNA em tecido pulmonar e em folículos pilosos de fumadores, relativamente a não fumadores.

O fumo do cigarro é uma mistura complexa de mais de 3800 componentes, incluindo altas concentrações, quer de radicais livres, quer de compostos químicos (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, nitrosaminas e hidroquinonas) que rapidamente vão reagir para formar outras substâncias reactivas<sup>33,37</sup>. Como já foi referido, as espécies reactivas de oxigénio, como o peróxido de hidrogénio e o peroxinitrito, causam vários efeitos nomeadamente, danos preferenciais no mtDNA, níveis de transcrição e de síntese proteica mitocondriais alterados, e potenciais redox mitocondriais diminuídos nas células vasculares. Foi demonstrado, na patologia cardiovascular<sup>38</sup>, que o dano mitocondrial, para além de efeitos na taxa energética, causa desregulação da produção de oxidantes na mitocôndria, alterando assim os efeitos de certos factores de sinalização, mudando um sinal “citoprotector” em um “citotóxico”. É já um facto que o mtDNA é um alvo preferencial para derivados dos hidrocarbonetos aromáticos e das nitrosaminas, sugerindo um potencial para a elevação na taxa de mutação do mtDNA em fumadores.

Um estudo recente<sup>39</sup> com o objectivo de estabelecer o papel do fumo do tabaco no desenvolvimento de tumores benignos e malignos das glândulas salivares, demonstrou um aumento significativo de 66% no risco de desenvolver tumores de glândulas salivares em pessoas que tinham fumado durante a sua vida. Foi também detectada uma associação significativa dependente da dose, em que os fumadores de mais de 40 cigarros/dia tinham mais que duas vezes o risco de desenvolver tumores das glândulas salivares, que aqueles que nunca fumaram. Para além disso, demonstraram também que 48% e 53% dos doentes com adenomas pleomórficos ou tumores malignos, respectivamente, já tinham fumado, resultado que não demonstrou associação estatisticamente significativa. No entanto, relativamente aos tumores de Warthin, 94% dos doentes eram ou tinham sido fumadores.

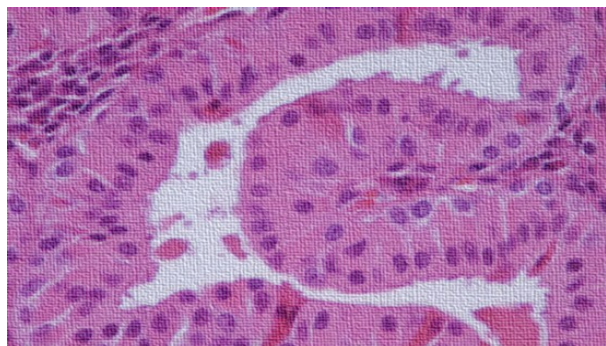
A forte associação entre o fumo do tabaco e o risco de desenvolver tumores de Warthin basea-se, segundo alguns autores<sup>39</sup> em: Odds ratio muito elevados; relações dose-resposta estatisticamente significativas observadas para a intensidade, duração e unidades-maço-ano dos fumadores e a relação inversa observada entre a idade de início de consumo de tabaco e o risco.

Estima-se que os fumadores apresentam seis vezes mais lesões do mtDNA que os não fumadores e um risco oito vezes superior em desenvolver tumores de Warthin.

Lewis et al<sup>40</sup>, estudaram glândulas parótidas normais de fumadores e não fumadores, com os objectivos de estimarem o nível da DC em ambos os grupos, e a presença de mutações pontuais específicas das células dos fumadores que servissem de marcadores biológicos para os efeitos do tabaco. Demonstraram não haver diferenças significativas no nível da DC em ambos os grupos (ao contrário do que foi visto noutros tecidos – mecanismos diferentes?), mas uma correlação forte entre estes níveis e a idade dos indivíduos, em ambos os grupos. Em 21,7% dos fumadores foi encontrada a presença de substituições de bases no gene ND2, sugerindo susceptibilidade ao dano mitocondrial neste grupo.

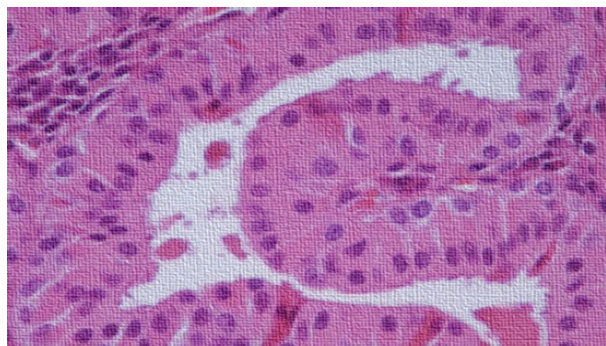
Estes autores concluíram que os factores que levam ao aumento significativo no nível da DC nos tumores de Warthin, ocorrerão após a cascata de eventos que leva à tumorigénese. É provável que o aumento destes níveis nos tumores de Warthin seja uma consequência do mtDNA estar contido em mitôcondrias grandes e anormais, sujeitas a níveis muito elevados de stress oxidativo. No entanto, outras mutações ocorrem antes da presença do tumor e mais estudos serão necessários para estabelecer marcadores de progressão da doença.

Prior et al<sup>37</sup>, tendo por base os trabalhos de Lewis<sup>40</sup>, estudaram as mtDNA no carcinoma escamoso da cavidade oral, uma neoplasia muito associada a fumadores, mostrando que, embora as mutações encontradas previamente no ND2 não estivessem presentes nesta neoplasia, havia outras mutações “hotspot”, quer no ND2, quer na D-loop, reforçando assim a relação do tabaco com mutações do mtDNA.



## OBJECTIVOS

Tentando evoluir na compreensão da tumorigénese dos tumores de células oncocíticas, decidimos comparar as alterações do mtDNA (mutações pontuais e deleção comum) encontradas em 19 tumores de Warthin da glândula parótida com as previamente detectadas numa série de tumores oncocíticos da tireóide<sup>22</sup>. Foi ainda estudado, para as mesmas alterações do mtDNA, o parênquima normal adjacente aos tumores de Warthin.



## **MATERIAL E MÉTODOS**

## Amostras

As amostras estudadas correspondem a material histológico incluído em parafina, de uma série de 19 tumores de Warthin consecutivos, de 17 doentes, diagnosticados no Serviço de Anatomia patológica do Hospital de São João, entre os anos 1998 e 2006.

## Métodos

### Revisão da informação clínica e estudo morfológico

Procedeu-se à recolha de dados referentes ao género, idade, hábitos tabágicos e história prévia de outras patologias relevantes, recorrendo à consulta dos processos clínicos dos doentes.

Foi realizada a recolha das características macroscópicas das neoplasias e sua lateralidade, recorrendo à consulta das requisições anátomo-patológicas.

### Processamento das amostras

#### Coloração com hematoxilina e eosina

A técnica de coloração com hematoxilina e eosina (H&E) é a mais utilizada em histologia e permite obter informações sobre as características morfológicas do tecido, diferenciando as porções basófilas e acidófilas do mesmo.

A hematoxilina, sendo um corante básico, tem afinidade para as regiões basófilas da célula como o núcleo e o retículo endoplasmático rugoso, conferindo-lhes cor azul. A eosina é acidófila e tem afinidade pelo citoplasma, conferindo-lhe cor rosa.

Para esta técnica realizaram-se cortes de 3µm dos blocos de parafina, que em seguida são submetidos a diversos tratamentos:

Desparafinação e hidratação – três lavagens consecutivas com xilol, intercaladas por três lavagens com etanol a 100%, 90% e 70%, durante dez

minutos cada. No final deste processo são lavados em água corrente durante dez minutos.

Coloração – os cortes são imersos na solução de hematoxilina durante um minuto, lavados em água corrente durante dez minutos, passados por banho de etanol a 100% e corados com eosina alcoólica durante três minutos.

Desidratação – uma lavagem em etanol a 70% e outra em etanol a 100%, seguidas por três lavagens em xilol.

Dado não dispormos de lâminas arquivadas, para cada um dos blocos de parafina dos 19 casos foi obtida uma lâmina corada com H&E, e procedeu-se à observação do material anátomo-patológico. Foram seleccionados um ou dois blocos representativos de cada um dos tumores de Warthin e parênquima adjacente. Nas lâminas controlo foram assinaladas as regiões correspondentes ao tecido tumoral e ao parênquima normal adjacente, que foram utilizadas como referência para se proceder à microdissecção manual/laser.

#### Corte dos blocos e microdissecção

As amostras de tecido incluídas em parafina foram cortadas num micrótomo. Para cada bloco foram efectuados 5 a 6 cortes de 10µm de espessura. Cada um dos blocos foi microdissecado à lupa, sendo recolhidos em tubos “ependorf” diferentes, para o tecido tumoral e o tecido não tumoral. No caso do parênquima normal foi realizada microdissecção a laser, uma vez que não seria possível separar com acuidade o tecido dos ductos das glândulas com observação à lupa e microdissecção manual. Para a microdissecção a laser foram utilizados cortes com 3 µm de espessura, corados com hematoxilina e eosina. As lâminas foram observadas num microscópio de microdissecção a laser (PALM, Bernried, Germany) de modo a seleccionar as células de interesse, que são então excisadas pelo feixe de laser UV e catapultadas para um microtubo em que são recolhidas e prontas a ser utilizadas nas aplicações seguintes.

#### Extracção do DNA

##### Tecidos microdissecados manualmente

O DNA foi extraído utilizando o Kit de isolamento de DNA da Puragene (GENTRA Systems, Minneapolis, Minn., USA), segundo as instruções do fabricante.

#### Tecidos microdissecados a laser

O DNA foi extraído utilizando o Kit QIAamp DNA Micro Kit da Quiagem, seguindo as instruções do fabricante.

#### Análise da qualidade do DNA extraído por electroforese em gel de agarose

A avaliação da qualidade do DNA genómico extraído foi efectuada por separação electroforética em gel de agarose a 0,8%. A preparação dos géis de agarose e a corrida das amostras efectuou-se da seguinte forma:

#### Preparação do gel

Medição do volume de tampão TBE1x (45 mM Tris (pH 8.0), 45 mM de ácido bórico e 2mM EDTA) e pesagem da agarose. Adição da agarose ao tampão e aquecimento da mistura em microondas até atingir a ebulição.

Arrefecimento da solução até aproximadamente 50°C e adição de brometo de etídio. O brometo de etídio é uma substância mutagénica que se intercala nas cadeias de DNA e permite a visualização do DNA quando os géis são expostos a radiação UV (emissão de radiação laranja).

Polimerização do gel em suporte com os pentes adequados, de modo a permitir a formação dos poços onde posteriormente são carregadas as amostras.

Remoção cuidadosa dos pentes e transferência do suporte contendo o gel para a tina de electroforese. Adição do tampão TBE até o gel ficar completamente imerso.

#### Preparação das amostras

Utilizou-se para carregar nos géis um volume de 5 µl de amostra ao qual se adicionou 3 µl de azul de bromofenol, um corante que migra com fragmentos de DNA de 300pb, servindo este como tampão de “loading” e também para visualizar a evolução da frente da corrida. Para servir como referência foi

sempre carregado, juntamente com as amostras, um marcador de peso molecular conhecido.

Após a aplicação das amostras, os géis foram sujeitos a uma voltagem entre os 100v e os 120v, dependendo do tamanho da tina de electroforese. No final da corrida, foi feita a observação e registo fotográfico dos géis num transiluminador.

## Reacções de PCR

### Amplificação por PCR das regiões ATPase e D-loop

Para a análise molecular das regiões de interesse do genoma mitocondrial procedeu-se à amplificação dos fragmentos por PCR (“polymerase chain reaction”). Esta técnica baseia-se no processo de replicação de DNA que ocorre *in vivo* e consiste no isolamento e amplificação de um segmento de DNA, envolvendo a produção *in vitro* de milhões de cópias do segmento pretendido.

A temperatura óptima de hibridização para cada um dos fragmentos a amplificar foi determinada inicialmente realizando um PCR de gradientes de temperaturas.

As reacções de PCR foram realizadas num termociclador Biorad (Bio-Rad Gene, Hercules, CA, USA) segundo as condições da tabela 2 e utilizando as concentrações de reagentes descritas na tabela 3.

Tabela 2 – Parâmetros otimizados da reacção de PCR para a amplificação das regiões D-loop e ATPase

I. Desnaturação inicial	94°C	5'	1x
II.			
Desnaturação	94°C	30''	
“Annealing”	Temperatura específica de “annealing”.	30''	
	Primers D-loop – 58°C		D-loop – 35x
	Primers ATPase – 60°C		ATPase – 40x
Extensão	72°C	30''	
III. Extensão final	72°C	5'	1x

As sequências dos primers utilizados para a amplificação dos diferentes fragmentos foram as apresentadas nas tabelas 4 e 5. Em cada reacção foram sempre incluídos um controlo inicial e final para avaliar a ocorrência de contaminação anterior à preparação da reacção de PCR ou durante esta. Nos controlos o DNA foi substituído por água.

Tabela 3 – Composição da mistura de reagentes de PCR para uma amostra em 25 µl de volume final

Reagentes PCR	Volumes/Concentrações
H2O (autoclavada e tratada com DEPC)	17,4 µl – 18,4 µl
[dNTP's]	200 µM
[primers]	0,2 µM
1x Buffer	10mM Tris-HCl (pH 8,8) 50mM de KCl 1,5 mmol/L MgCl
DNA genómico	1-500ng (1 a 2 µl)

Tabela 4 – Sequências dos primers utilizados na amplificação por PCR da região da D-loop

Primer forward	5'-ctctagagcccactgtaaagcta-3'	ATPase 1
Primer reverse	5'-aacaaccgactaatcaccaccca-3'	nt8285-nt8663
Primer forward	5'-ctctattgatcccaccccaaaa-3'	ATPase 2
Primer reverse	5'-ttctaccacaaggcacactac-3'	nt8609-nt8930
Primer forward	5'-cagtgattataggcttctcct-3'	ATPase 3
Primer reverse	5'-tgaccaccaatcacatgcctat-3'	nt8861-nt9230

Tabela 5 – Sequências dos primers utilizados na amplificação por PCR da região da ATPase

Primer forward	5'-cctccactcccataactactaa-3'	D-LOOP rep
Primer reverse	5'-tgtttagacgggctcacatcac-3'	nt458-nt637
Primer forward	5'-tcccacagacatcataaca-3'	D-LOOP
Primer reverse	5'-ctttggcggtatgcacttt-3'	Nt267-nt423

Após as reacções de PCR todas as amostras foram sujeitas a uma electroforese em gel de agarose a 2% (procedimento anteriormente descrito para gel a 0,8%), de modo a avaliar a eficácia da amplificação. Utilizou-se um

volume de 5µl de produtos de PCR e 3µl de azul de bromofenol para correr a electroforese. Após observação do gel num transiluminador, as amostras que apresentavam a banda do tamanho esperado foram sujeitas a sequenciação.

### PCR Multiplex – Detecção da “delecção comum”

A técnica de Multiplex é uma variante do PCR clássico, que permite a amplificação simultânea, numa só reacção, de várias sequências alvo, através da utilização de diversos pares de “primers”. Neste trabalho foi utilizado o kit Multiplex PCR (QIAGEN) para detectar a presença da delecção “comum” ( $\Delta 4977$ mtDNA). O conjunto de primers utilizados, as concentrações de reagentes e as condições do ciclo de PCR encontram-se descritos nas seguintes tabelas.

Tabela 6 - Sequências dos primers utilizados na detecção da “delecção comum” do DNA mitocondrial

Primer forward	5'-CTGAGCCTTTTACCACTCCAG-3'	MITIN
Primer reverse	5'-GGTGATTGATACTCCTGATGCG-3'	
Primer forward	5'-AAATACTACCGTATGGCCACCA-3'	MITOUT 1
Primer reverse	5'-GGCTCAGGCGTTTGTGTATGATA-3'	
Primer forward	5'-CCCAACTAAATACTACCGTATGG-3'	MITOUT 2
Primer reverse	5'-GGTTTCGATGATGTGGTCTTTG-3'	
Primer forward	5'-CTGAGCCTTTTACCACTCCAG-3'	MITOUT 3
Primer reverse	5'-GGTGATTGATACTCCTGATGCG-3'	

Tabela 7 - Concentrações dos reagentes do kit “PCR Multiplex”

Reagente	Volume	Concentração final
2x QIAGEN Multiplex	10	1x
PCR Master Mix		
5x Q solution	2µl	1x
Primer	0.8µl	0.2µM
	(cada primer)	
H2O	Variável	-
	(dependente nº primers)	
DNA	1µl	≈0.4µg DNA/20µl
Volume Total	20µl	-

Tabela 8 - Parâmetros otimizados da reacção de "PCRMultiplex"

I. Desnaturação inicial	95°C	15'	1x
II.			
Desnaturação	94°C	30"	
"Annealing"	Temperatura específica de "annealing"	90"	40x
Extensão	72°C	60"	
III. Extensão final	72°C	10'	1x

### Purificação do DNA amplificado por PCR

Foram utilizados dois métodos de purificação de DNA, dependendo da eficácia da amplificação do DNA. Isto é, as amostras que correspondiam a bandas de maior intensidade foram purificadas enzimaticamente, enquanto que nas que possuíam bandas de menor intensidade se utilizou um método de purificação a partir das bandas do gel de agarose.

#### Purificação do DNA com enzimas

Neste método adicionou-se a cada microtubo contendo o produto de PCR 1µl de enzima Exonuclease (Fermentas) e 1µl da enzima Shrimp Alkaline Phosphatase (New England Biolabs INc., Beverly, USA) por cada 10µl de amostra. As amostras foram depois sujeitas a um ciclo no termociclador de 20 minutos a 37°C e 20 minutos a 80°C. Nos primeiros 20 minutos, a 37°C, ocorre degradação dos primers e os dNTPs que não foram incorporados, e a 80°C as enzimas são destruídas.

#### Purificação do DNA por excisão de bandas

Nesta técnica o produto de PCR (20µl) foi sujeito a uma electroforese num gel de agarose a 2%. Os pentes utilizados para preparar estes géis são de maior dimensão de modo a permitir a pipetagem de um maior volume de amostra e encontram-se mais espaçados para que se obtenham bandas bem separadas.

Após a electroforese, as bandas são excisadas com um bisturi (um para cada amostra para não ocorrer contaminação) e colocadas em microtubos devidamente identificados. O DNA é então purificado utilizando um kit comercial (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit). Este Kit utiliza um agente caotrópico para desnaturar as proteínas, dissolver a agarose e promover a ligação do DNA de cadeia dupla à matriz de fibra de vidro que se encontra na coluna de purificação. As proteínas e contaminantes salinos são então eliminados por uma lavagem com uma solução tampão à base de etanol e o DNA purificado é eluído com um tampão de baixa força iónica.

### Sequenciação

A sequenciação automática é um método que permite identificar mutações na cadeia de DNA. Este método utiliza bases alteradas quimicamente, denominadas didesoxi, uma vez que não possuem o grupo hidroxilo terminal que permitiria a ligação da base seguinte. A reacção de síntese termina sempre que é incorporada na cadeia uma destas bases, uma vez que não se podem formar ligações fosfodiéster com o nucleotídeo seguinte. Estes fragmentos de DNA são então separados por electroforese em função do tamanho e a sequência pode ser lida.

O método de sequenciação automática assenta nestes mesmos princípios, com algumas diferenças resultantes da evolução técnica. Os didesoxirribonucleótidos terminadores da reacção de sequenciação são marcados com fluorocromo na extremidade 3', que emite radiação quando é atingido por uma fonte de luz de excitação. Os fragmentos são separados em função do tamanho numa electroforese capilar durante a qual o aparelho regista a intensidade de fluorescência que é detectada na janela de leitura para cada um dos canais correspondentes aos terminadores utilizados. Os dados recolhidos durante a electroforese são posteriormente analisados pelo software e no final obtém-se um electrofluorograma da sequência.

### Reacção de sequenciação

As reacções de PCR de sequenciação foram realizadas segundo as condições da tabela X, num termociclador Biorad (Bio-Rad Gene, Hércules, CA, USA) utilizando o kit BigDye Terminator (Applied Biosystems). Para um

volume final de 10  $\mu\text{L}$  utilizou-se 0.6  $\mu\text{L}$  de “BigDye Terminator” (Applied Biosystems), 3,4  $\mu\text{L}$  de “Sequencing Buffer” (Applied Biosystems), 0,3  $\mu\text{L}$  de “primer reverse” ou “primer forward” (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) (Invitrogen, UK), 3  $\mu\text{L}$  de produto de PCR purificado e água desionizada até perfazer o volume. Em alguns casos em que a quantidade/qualidade de DNA amplificado era baixa não foi utilizada água na reacção e utilizou-se 5,7  $\mu\text{L}$  de DNA.

Tabela 9 - Parâmetros otimizados da reacção de sequenciação

I. Desnaturação	94°C	30''	1x
II.			
Desnaturação	94°C	10''	
“Annealing”	Temperatura específica de “annealing”	5''	D-loop 35x ATPase 40x
	Primers D-loop – 58°C Primers ATPase – 60°C 30''		
Extensão	60°C	4'	

### Purificação dos produtos de sequenciação

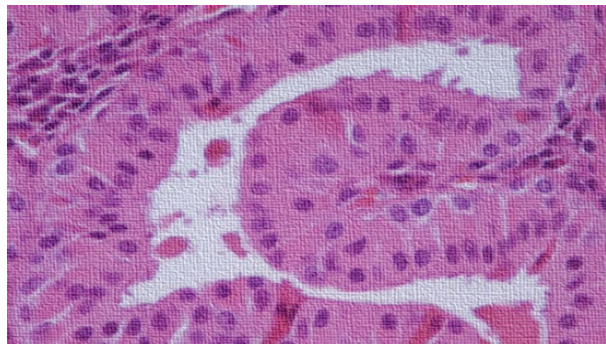
O produto de sequenciação foi purificado por cromatografia em colunas, utilizando como meio de filtração um gel de dextran (Sephadex™). Este gel é composto por esferas microscópicas que formam uma rede tridimensional em que ficam retidos os primers dos nucleótidos não incorporados na reacção de PCR, sendo eluído o DNA livre de contaminantes.

Em cada coluna utilizou-se um volume de 1ml de solução de Sephadex (6,66g por cada 100ml de água), sendo estas posteriormente centrifugadas a 2800rpm de modo a desprezar a água em excesso. As amostras foram então pipetadas para o centro da coluna e precedeu-se a nova centrifugação a 3200 rpm. O DNA purificado obtido após este procedimento foi então colocado num bloco de aquecimento à temperatura de 95°C. Após esta secagem o DNA foi ressuspenso em formamida e analisado no sequenciador automático “ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems).

Após a sequenciação das amostras, os electrofluorogramas obtidos foram analisados manualmente por comparação com a base de dados genoma mitocondrial humano (MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. <http://www.mitomap.org>, 2006).

### Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi efectuada utilizando o teste do Qui-quadrado com correcção de Yates, teste exacto de Fisher e teste t-student. Sempre que necessário utilizou-se um teste não paramétrico (Mann-Whitney). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para valores de  $p < 0.05$ .



## **RESULTADOS**

## Características clínicas, macroscópicas e histológicas

As características clínicas, macroscópicas e histológicas relevantes dos tumores de Warthin e parênquima adjacente, estão resumidas nas tabelas 10, 11 e 12.

Os 19 casos de tumores de Warthin estudados ocorreram predominantemente no gênero masculino, sendo que três doentes desenvolveram tumores bilaterais. Oito doentes eram fumadores, todos eles do gênero masculino. Os tumores bilaterais ocorreram em doentes fumadores.

Os doentes com idades acima dos 70 anos em que ocorreram os tumores de Warthin (3/17), não eram fumadores.

Tabela 10 – Características clínicas e macroscópicas dos tumores de Warthin (n=19)

Gênero - masculino/feminino	14/3
Idade - média/mediana - intervalo	58 anos/56 anos 42 - 79 anos
Fumador/Não fumador/ND	8/6/3
Maior dimensão - média - intervalo	2,9 0,9-8 cm
Lateralidade - D/E/B/ND	7/5/3/2

ND – não disponível; D – direito; E – esquerdo; B - bilateral

Grande parte dos tumores de Warthin (12/19) não apresentava características particulares, para além daquelas necessárias para o diagnóstico da lesão. Duas neoplasias apresentavam áreas de necrose de tipo isquêmico/enfarte, muito provavelmente associadas à realização de citologia aspirativa prévia. Três das lesões apresentavam metaplasia pavimentosa do revestimento epitelial e duas apresentavam esclerose/fibrose de parte do tumor.

Tabela 11 – Características microscópicas dos tumores de Warthin (n=19)

Enfarte/necrose	2
Metaplasia pavimentosa	3
Esclerose	2
Sem características particulares	12

O parênquima da glândula parótida adjacente aos tumores de Warthin apresentava principalmente lesões de substituição adiposa, fenômeno que ocorre naturalmente nas glândulas salivares ao longo do envelhecimento. Só três apresentavam lesões de sialoadenite crônica.

Tabela 12 – Características microscópicas do parênquima normal adjacente (n=19)

Substituição adiposa	5
Sialoadenite crônica	3
Sem alterações relevantes/ND	11

ND – não disponível

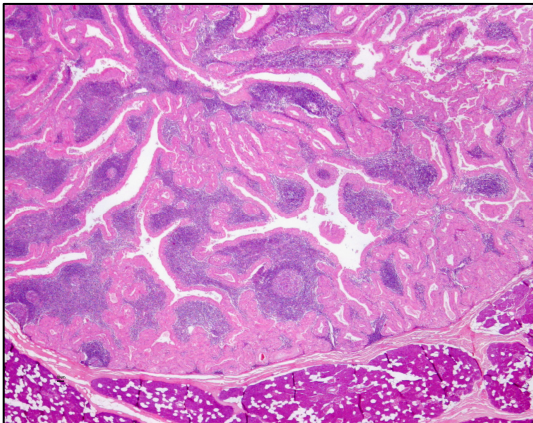


Figura 3 – Tumor de Warthin (caso 3; HE;x20)

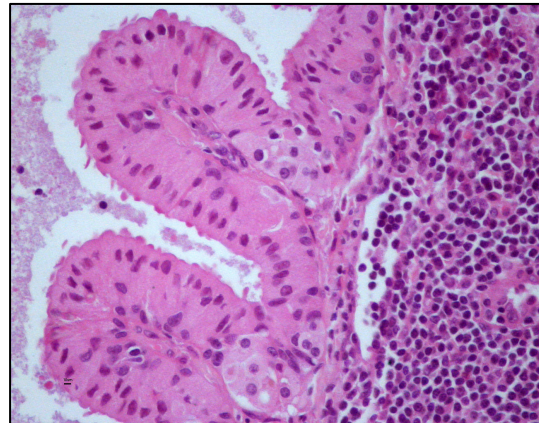


Figura 4 – Tumor de Warthin – componente epitelial (caso 6; HE;x400)

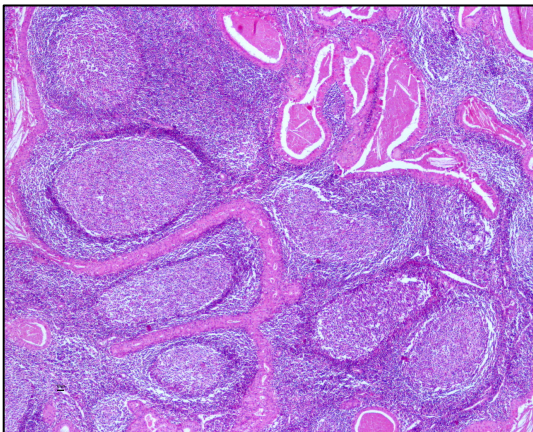


Figura 5 – Tumor de Warthin – comp linfóide (caso 3; HE; x 200)

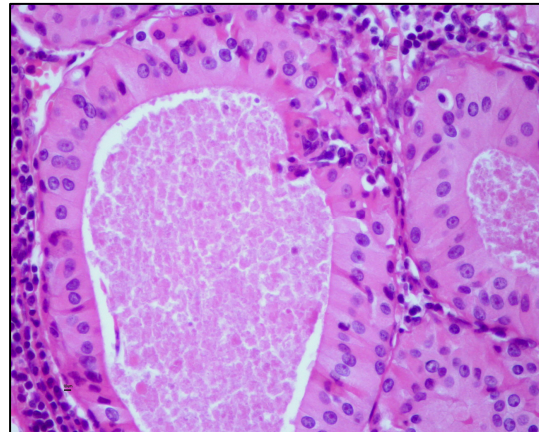


Figura 6 – Áreas císticas preenchidas por material granular (caso 3; HE; x 400)

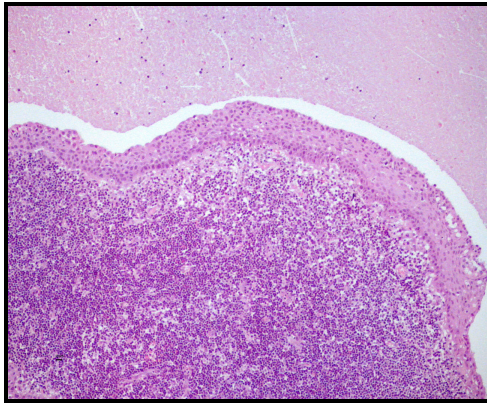


Figura 7 – Metaplasia pavimentosa  
(caso 14; HE; x100)

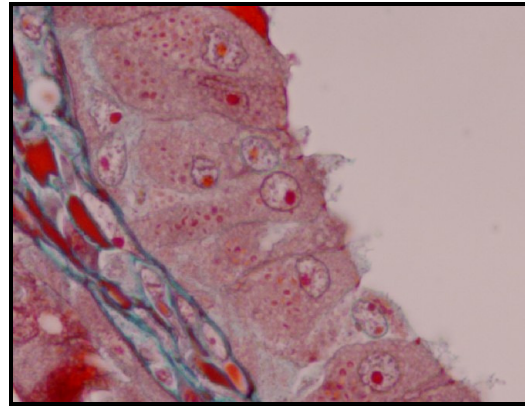


Figura 8 – coloração de Gomori (caso 7; x1000)  
(as mitocôndrias aparecem coradas de laranja)

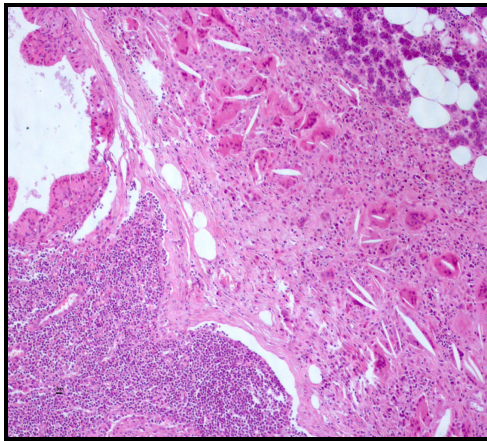


Figura 9 – Reação giganto-celular de corpo  
estranho (caso 6; HE; x200)

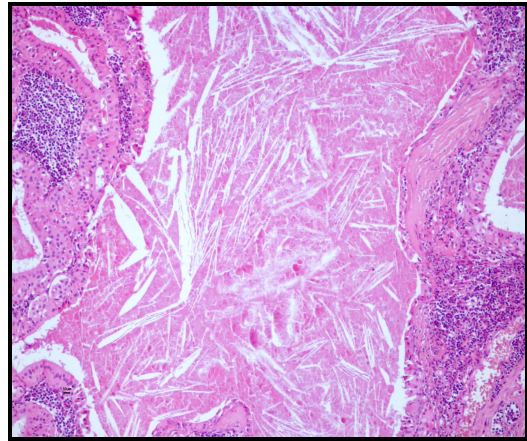


Figura 10 – Fendas colesterínicas  
(caso 6; HE; x200)

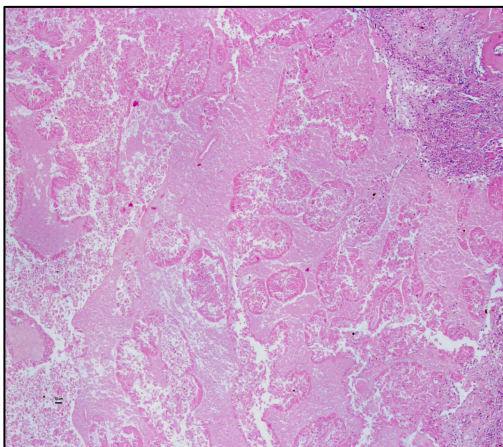


Figura 11 Necrose/isquemia (caso 2; HE; x200)

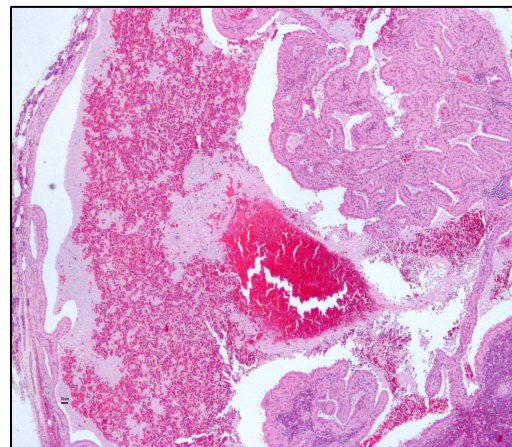


Figura 12 – Hemorragia (caso 17; HE; x20)

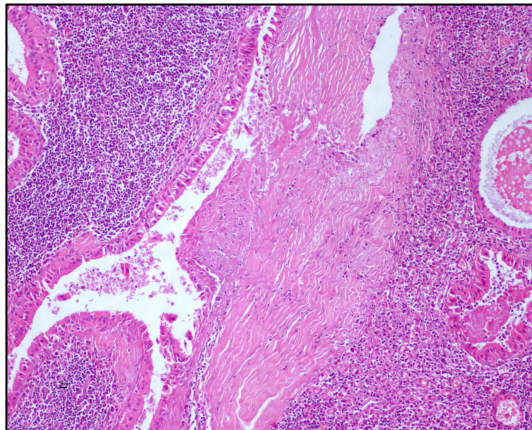


Figura 13 – Fibrose (caso 5; HE; x200)

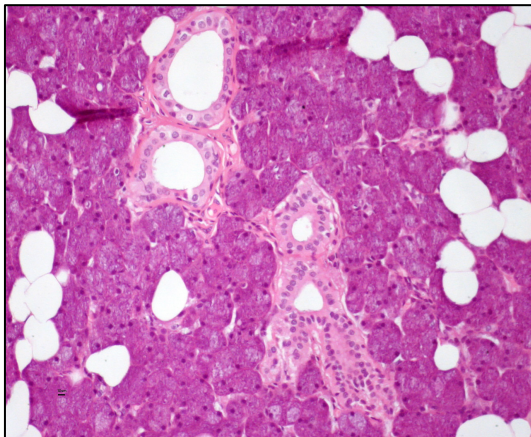


Figura 14 – Parênquima parotídeo normal (caso 13; HE; x400)

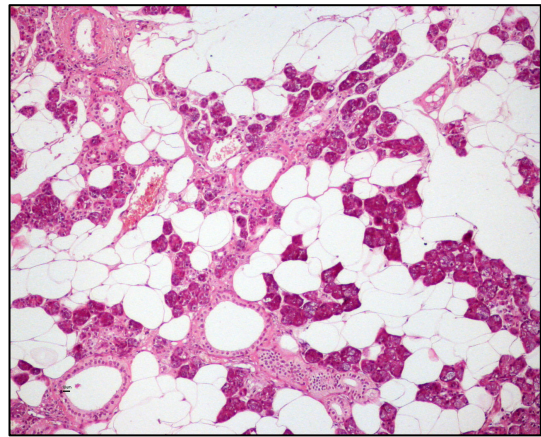


Figura 15 – Parênquima parotídeo com substituição adiposa (caso 1; HE; x200)

## Mutações somáticas do mtDNA

## Região da D-Loop

Os resultados obtidos da detecção de mutações somáticas na região não codificante da D-loop são sumarizados na tabela 13.

Tabela 13 – Alterações do mtDNA na região da D-loop em tumores de Warthin

Caso nº	Posição do nucleótido	Alteração do nucleótido
<b>1</b>		
T	—	—
N	340	C→T
<b>2</b>		
T	310	(C) <sub>7</sub> →(C) <sub>8</sub>
N	—	—
<b>3</b>		
T	—	—
N	—	—
<b>4</b>		
T	310	(C) <sub>7</sub> →(C) <sub>8</sub>
<b>5</b>		
T	310	(C) <sub>7</sub> →(C) <sub>8</sub>
N	—	—
<b>6</b>		
T	310	(C) <sub>7</sub> →(C) <sub>8</sub>
N	—	—
<b>7</b>		
T	310	(C) <sub>7</sub> →(C) <sub>8</sub>
<b>8</b>		
T	514	(CA) <sub>5</sub> →(CA) <sub>6</sub>
N	310	(C) <sub>7</sub> →(C) <sub>8</sub>
<b>9</b>		
T	514	(CA) <sub>5</sub> →(CA) <sub>6</sub>
N	—	—
<b>10</b>		
T	—	—

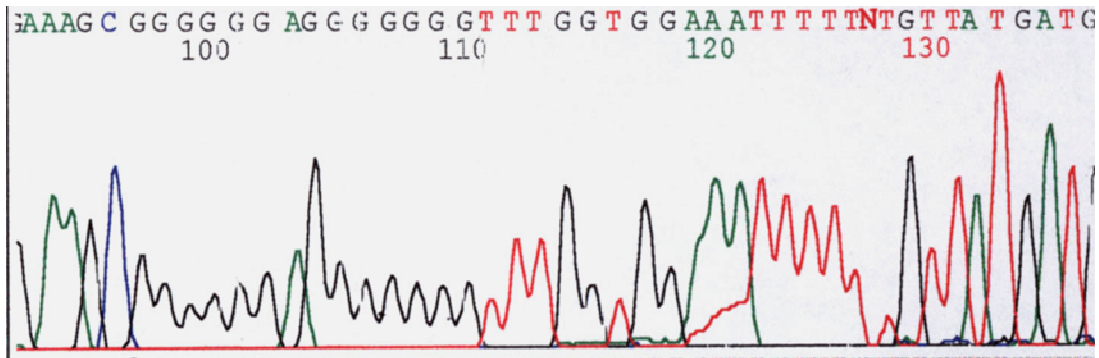
<b>11</b>		
T	—	—
N	—	—
<b>12</b>		
T	—	—
N	—	—
<b>13</b>		
T	318	(T) <sub>2</sub> →(T) <sub>3</sub>
N	—	—
<b>14</b>		
T	—	—
<b>15</b>		
T	514 310	(CA) <sub>5</sub> →(CA) <sub>6</sub> (C) <sub>7</sub> →(C) <sub>8</sub>
<b>16</b>		
T	514	(CA) <sub>5</sub> →(CA) <sub>6</sub>
N	—	—
<b>17</b>		
T	310	(C) <sub>7</sub> →(C) <sub>8</sub>
<b>18</b>		
T	310	(C) <sub>7</sub> →(C) <sub>8</sub>
N	—	—
<b>19</b>		
T	—	—
N	—	—

T – tumor; N – parênquima adjacente; — - não foram encontradas alterações na D-loop

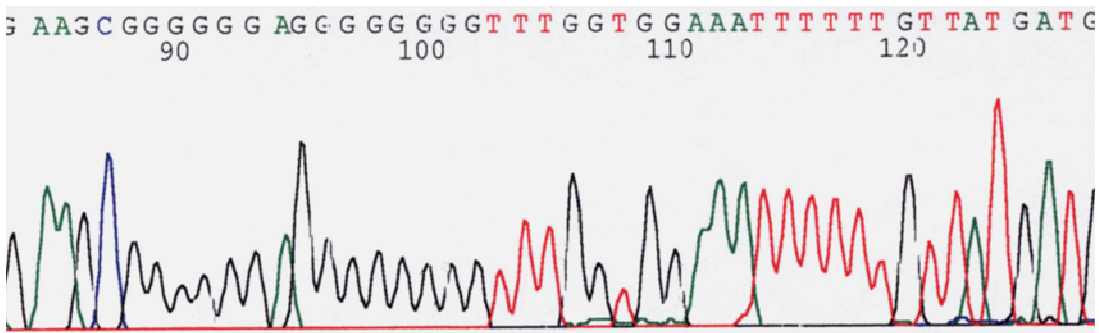
Foi detectada instabilidade no genoma mitocondrial dos tumores de Warthin em 12 dos 19 casos (63,2%). Esta instabilidade ocorreu na região D310 em oito casos (42,1%) – ver gráfico 1 como exemplo, na região D514 em quatro casos (21,1%) e na região D318 em um caso (5,3%). Em um dos casos (5,3%), foram identificadas duas alterações, na região D310 e na região D514.

Foi detectada instabilidade no genoma mitocondrial do parênquima adjacente em um dos 13 casos (7,7%), na região D310.

Gráfico 1 – Mutação na região não codificante da D-loop (caso 7), na região repetitiva D310 com inserção somática de 1pb (C7 → C8)



Sequência normal



Sequência alterada

### Genes codificantes/tRNA

Tabela 14 – Mutações somáticas do mtDNA em regiões codificantes

Caso nº	Posição do nucleótido	Gene/Região
11	G9055A	ATPase6/CpV
T	—	—
N	—	—

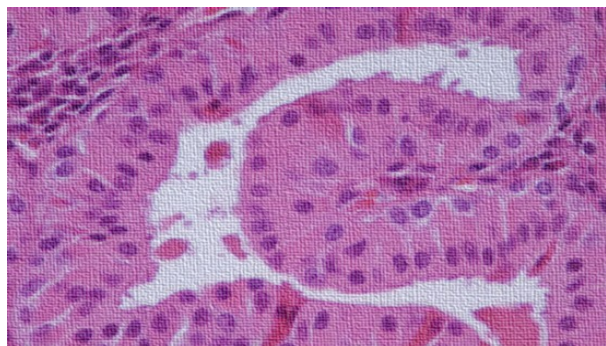
A presença de mutações somáticas em genes codificantes foi detectada em um dos 19 casos (5,3%) dos tumores de Warthin, no gene da ATPase 6 do complexo V da cadeia respiratória mitocondrial. Não foram encontradas alterações na subunidade 8 deste complexo.

Não foram encontradas alterações no parênquima normal adjacente (13 casos).

Em seis casos (casos 4, 7, 10, 14, 15 e 17) não foi possível, por motivos de escassez de tecido/dificuldades técnicas, estudar o parênquima adjacente quando à existência ou não de mutações.

#### Presença da deleção comum

Não foi possível detectar a presença/ausência da deleção comum por diversas razões, a serem analisadas no Capítulo da Discussão e Conclusões.



## **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

Uma grande quantidade de recursos tem vindo a ser utilizada no combate às doenças relacionadas com a idade, nomeadamente a diabetes e a síndrome metabólica, a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, as doenças cardiovasculares e o cancro. No entanto, as causas destas doenças permanecem um mistério, enquanto a sua incidência e morbilidade ou se mantêm constantes, ou estão a aumentar<sup>4</sup>.

Durante o século passado, dois paradigmas constituíram os pilares da Ciência Biomédica Ocidental:

- paradigma anatómico da Medicina – fundado com o trabalho de Vesalius e que se regia por vários corolários: os sintomas órgão-específicos são o resultado de problemas órgão-específicos; os problemas órgão-específicos são o resultado de defeitos proteicos/genéticos específicos de tecido; estes defeitos devem ser tratados com químicos que intervenham directamente nas proteínas defeituosas.

- paradigma mendeliano da Medicina – fundado com as leis de Mendel: se um determinado traço clínico é transmitido segundo estas leis, é genético, se não for assim transmitido, deve ser determinado por factores ambientais.

Hoje em dia estes dois paradigmas, motores poderosos no entendimento das relações médico-clínicas no passado, falham na tentativa de dar respostas satisfatórias para o conhecimento etiopatogénico e prognóstico de várias doenças relacionadas com a idade, o envelhecimento e o cancro.

Foi no fim dos anos 80, com o aparecimento na literatura de três artigos que estudaram e relacionaram as mutações do mtDNA como causa de certas doenças, que a biologia e a genética da mitocôndria surgiram como excelentes candidatas à expansão dos dois paradigmas acima definidos, e à compreensão das complexidades associadas às doenças relacionadas com a idade, o envelhecimento e o cancro<sup>4</sup>.

A relação da mitocôndria com a doença e o envelhecimento traduziu-se no surgimento da designada “Medicina mitocondrial”. Esta área da medicina está, actualmente, dividida em dois ramos<sup>18</sup>:

- identificação de mutações francamente patogénicas que poderão ser responsáveis, em última análise, pela doença, nomeadamente o cancro;

- estudos populacionais em que o conceito é o de que as substituições comuns no mtDNA (polimorfismos) podem constituir um factor de risco para o desenvolvimento de certas doenças, nomeadamente diabetes, doenças cardiovasculares, doença de Parkinson e doença de Alzheimer. Alguns destes polimorfismos desempenham um papel importante no envelhecimento.

A vida envolve um equilíbrio entre estrutura e energia. Ao longo de milhões de anos, desenvolveu-se um compromisso em que a mitocôndria se tornou especializada na produção de energia e o núcleo-citoplasma se tornou especializado na estrutura. Deste entendimento surgiu, provavelmente, a possibilidade da multicelularidade e a evolução para organismos complexos como o ser humano. O facto de o nDNA ter “absorvido” cerca de 1500 genes da mitocôndria, e nesta terem permanecido 13 proteínas, mostra que esta permanência e redundância deve ser extremamente importante para a vida dos organismos superiores.

O mtDNA é transmitido só por uma via – a materna, na maioria das espécies, o que, em última análise, impede a recombinação génica mitocondrial. Pensa-se que a possível recombinação entre duas linhagens de mtDNA resultaria num fracasso energético e teria efeitos deletérios nas espécies por várias razões: as alterações do mtDNA são muito comuns; ao longo de várias gerações iniciou-se uma divergência nas sequências do mtDNA; desenvolveram-se novas estratégias metabólicas para otimizar a integração em novos ambientes; e, finalmente, porque todos os polimorfismos genéticos para as proteínas do mesmo mtDNA têm que ser intercompatíveis<sup>4</sup>. No entanto, a falta desta recombinação limita a capacidade da mitocôndria em gerar um conjunto de combinações de que poderiam resultar soluções energéticas mais favoráveis. A forma de contornar este obstáculo foi através da elevada taxa mutacional adquirida pelas mitocôndrias, por forma a criar soluções energéticas *de novo* em cada geração. Possivelmente, a taxa mutacional do mtDNA é regulada através da modulação da produção de ROS e das taxas de desintoxicação e reparação do mtDNA.

A variação do mtDNA humano é extensa, e a sua adaptação constante é demonstrada pela análise de variações regionais do mtDNA em populações indígenas de diferentes partes do mundo, surgindo assim o conceito de

haplogrupos. A população humana foi dividida em vários haplogrupos, cada um fundado por uma ou mais variantes funcionais do mtDNA. Actualmente, há já vários trabalhos em que se demonstra a associação de certos haplogrupos com o aumento do risco para o desenvolvimento de certas doenças<sup>4</sup>.

Enquanto que a elevada taxa de mutação do mtDNA tem um enorme sucesso na geração de variações adaptativas do mtDNA, mutações ao acaso terão um efeito nas proteínas que, provavelmente, é mais adverso que benéfico. Neste contexto, as doenças que resultariam de mutações do mtDNA deveriam ser muito comuns e, de facto, são-no (frequência estimada em 1,65/10.000). É importante salientar que mutações no mtDNA têm, cada vez mais, sido relacionadas com um largo espectro de doenças que afectam o sistema nervoso central, o aparelho cardiovascular, o sistema musculoesquelético e os sistemas renal e endócrino, também eles afectados pelo envelhecimento e doenças relacionadas com a idade.

A elevada taxa de mutações do mtDNA não se faz só sentir na linhagem germinativa, mas ocorre também nas células somáticas, originando acumulação de rearranjos e mutações pontuais do mtDNA em vários tecidos. Há alguma evidência de que a acumulação destas mutações e o declínio na função mitocondrial são a causa do envelhecimento nos mamíferos.

Das proteínas codificadas pelo mtDNA sabe-se que interagem para a geração, manutenção, ou utilização de uma só entidade – o gradiente electroquímico da membrana interna da mitocôndria. É fácil imaginar, então, que mutações em qualquer um dos polipeptídeos do mtDNA teriam consequências fisiológicas para todos os outros polipeptídeos naquele mtDNA, transformando o balanço energético do circuito. A presença de defeitos genéticos em certos genes do mtDNA codificados pelo nDNA foram associados a cancros hereditários<sup>3,4,41</sup>:

- mutações heterozigóticas na hidratase do fumarato mitocondrial foram associadas a formas familiares de leiomiomas uterinos e cutâneos e ao tipo II do carcinoma papilar do rim (síndrome HLRCC)<sup>42</sup> ; mutações homozigóticas resultam em disfunção neurológica grave ;

- mutações em subunidades (SDHD, SDHC e SDHB) do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, codificados pelo nDNA, foram associadas a paragangliomas familiares<sup>43,44,45</sup> ;

- mutações da SDHB estão também associadas à formação de feocromocitomas e carcinomas de células renais;

- mutações na SDHA causam o síndrome de Leigh mas não são conhecidas associações de mutações deste gene a paragangliomas<sup>46</sup>.

Esta diferença entre as alterações na SDHA e as subunidades B, C e D da SDH realça a importância das ROS na morte celular e na carcinogénese.

Otto Warburg foi, há mais de 50 anos, pioneiro na investigação do papel da mitocôndria no processo de carcinogénese, através da identificação de um defeito na cadeia respiratória mitocondrial<sup>8</sup>. Foi o primeiro a observar uma elevada produção de lactato pelas células cancerosas na presença de oxigénio. Estudos posteriores demonstraram que as mutações do mtDNA aumentam as ROS, impedindo o funcionamento adequado da cadeia respiratória, o que leva à acumulação de NADH e piruvato. Este excesso irá ser convertido em lactato pela lactato desidrogenase.

Também nos últimos anos, diversos autores debruçaram-se na pesquisa de alterações no mtDNA e tentaram descortinar qual o mecanismo por detrás da acumulação aberrante de mitocôndrias em alguns tipos de tumores, passando a ser objecto de maior interesse o papel da mitocôndria na apoptose. Foram descritas alterações do mtDNA em vários tumores humanos, nomeadamente deleções/inserções de pequena dimensão, mutações “missense”, mutações “frameshift” e grandes deleções. Na glândula tireóide a DC foi encontrada em todos os tumores com características oncocíticas, independentemente do subtipo histológico, e em baixas percentagens em tumores da tireóide não oncocíticos. Também o número de moléculas de mtDNA com deleções foi significativamente superior nos tumores oncocíticos da tireóide. A associação entre a presença da DC e o fenótipo oncocítico tem sido explicada através de um mecanismo de “feedback” positivo: a disfunção grave do sistema OXPHOS, consequência da presença desta deleção, irá activar genes do nDNA que controlam o número de mitocôndrias, resultando num aumento da massa mitocondrial. Os mesmos autores mostraram também, que o tracto homopolimérico C da região da D-loop apresentava uma elevada frequência de mutações somáticas (48,5%), em níveis semelhantes em todos os tipos de tumores. Outro tipo de mutações encontradas nos tumores de

células de Hürthle da tireóide (51,5% dos casos), incluem mutações “frameshift” e mutações pontuais (silenciosas e missense), presentes em todos os genes que codificam as proteínas da OXPHOS (excepto a ATPase 8), assim como mutações nos tRNAs. As mutações missense nos genes do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial parecem ser mais frequentes nos tumores malignos.

No nosso trabalho, encontramos **mutações somáticas na região não-codificante da D-loop** em 63,2% dos tumores de Warthin, nas regiões repetitivas D310, D514 e D318. Este valor é superior (embora sem significado estatístico) ao encontrado em tumores da tireóide em geral (48,5%) e ligeiramente superior ao encontrado em tumores de células de Hürthle (57,5%). Como a região da D-loop está envolvida no controlo da replicação e transcrição do mtDNA, as mutações nesta região poderiam condicionar uma diminuição no número de cópias e/ou alteração da expressão génica no genoma mitocondrial. Poder-se-ia pensar que o aumento do número de mitocôndrias traduziria uma tentativa de compensação da deficiente função mitocondrial condicionada pelas alterações na região da D-loop. No entanto, a instabilidade nesta região não-codificante foi já descrita em diversas neoplasias, com origem em vários órgãos e com diferentes fenótipos, não parecendo por isso estar relacionada directamente com o fenótipo oncocítico dos tumores, mas possivelmente com a instabilidade do mtDNA durante o processo de desenvolvimento neoplásico.

O local do genoma mitocondrial dos tumores de Warthin em que verificámos maior incidência de instabilidade foi a região de repetição mononucleotídica D310 (42,1%), valor que é superior ao encontrado em tumores da tireóide (30,3%), mas que se aproxima do encontrado em adenomas da tireóide (40%), embora sem significado estatístico.

Outra das regiões de repetição atingidas foi a D514 (21,1%), valor próximo do encontrado em tumores da tireóide (22,7%). Encontrámos ainda, mutações na região D318 em um caso de tumor de Warthin (5,3%), região esta não atingida em tumores da tireóide.

Foi ainda detectada instabilidade no parênquima salivar adjacente em 1 caso (7,7%), numa região repetitiva diferente da encontrada no tumor de Warthin correspondente. A instabilidade encontrada no parênquima adjacente

poderá sugerir que a desregulação da biogénese mitocondrial nos tumores de Warthin é precoce e parece surgir ainda antes da transformação neoplásica. Noutra caso foi identificada uma mutação pontual na região do D-loop (caso 1), levando à substituição de uma citosina por uma timina.

Mutações na região da D-loop são, então, frequentes em tumores benignos e malignos, pelo que não deverão ser consideradas como marcadores de malignidade, mas sim resultantes da produção aumentada de ROS pelas células tumorais e/ou da elevada taxa de replicação das células neoplásicas. Tal como na tireóide, duas regiões repetitivas (D310 e D514) parecem mais susceptíveis a mutações nos tumores de Warthin.

Na **região codificante do complexo V**, e envolvendo o gene da ATPase 6, foi encontrada, no nosso trabalho, uma mutação somática (silenciosa) em 1 caso (7,7%) dos tumores de Warthin estudados. Este valor é inferior ao encontrado em tumores de células de Hürthle da tireóide (12,5%), sendo que 10% destes apresentavam mutações missense, as quais não estavam presentes em nenhum dos outros tumores da tireóide<sup>22</sup>. Sendo o número dos nossos casos relativamente pequeno, seria importante estudar esta associação num número de tumores de Warthin maior e em outros tumores oncocíticos das glândulas salivares. No entanto, estes dados sugerem que as mutações na ATPase 6 ocorrem preferencialmente nos tumores de células oncocíticas, o que está de acordo com a ideia de que o crescimento deste tipo de tumores está parcialmente dependente da inibição da apoptose.

A maioria das mutações detectadas no nosso trabalho e em estudos anteriores em tumores de células de Hürthle da tireóide, são transições. Este tipo de mutações é característico do dano celular causado pelas ROS<sup>24</sup>.

A mutação G9055A encontrada (caso 11) está descrita como um polimorfismo associado a uma população sub-fértil da Nova Zelândia<sup>47</sup>

Nos tumores de Warthin não foi detectada a **presença da DC**. No entanto, tendo em consideração o estudo prévio realizado por Lewis et al<sup>24</sup>, pensamos que esta poderia estar presente, só que em percentagens demasiado baixas para serem detectadas. Lewis et al<sup>24</sup> detectaram, em

tumores de Warthin, a presença da DC em 0,06% do DNA em não fumadores e em 0,074% em fumadores. Contudo, a técnica utilizada no nosso trabalho para avaliar a presença da DC tem como limite inferior de detecção a presença da DC em pelo menos 0,5% das moléculas de DNA, o que pode explicar a diferença de resultados. A utilização, no nosso material, de outra técnica mais sensível, foi posta de lado devido à escassez do material histológico disponível. Diferenças nas técnicas de fixação e preservação dos tecidos, e o intervalo de tempo decorrido desde a inclusão em parafina e a utilização das amostras, podem também ter contribuído para a dificuldade na detecção da DC.

Aumentos no conteúdo em mtDNA e o declínio na função mitocondrial estão associados ao envelhecimento, e são observados em resposta a agentes que lesam o DNA, incluindo o fumo do tabaco. Lewis et al<sup>40</sup> estudaram as alterações do mtDNA em glândulas parótidas de fumadores e não fumadores e, ao contrário do que foi detectado em tecido pulmonar, não detectaram aumento do nível da DC em fumadores relativamente a não fumadores. Estes achados, juntamente com outros reportados na literatura, sugerem que o aumento do nível da DC nos tumores de Warthin ocorra após a iniciação de eventos que leva à tumorigénese. Os autores encontraram, sim, uma correlação, estatisticamente significativa, entre a presença da DC e a idade dos indivíduos. Nos nossos casos, os três doentes com tumores de Warthin que tinham idade acima dos 70 anos não eram fumadores, o que parece indicar que estes tumores se relacionam com o envelhecimento e que o fumo do tabaco promove o seu aparecimento precoce. Estes resultados não têm, no entanto, significado estatístico. Vários mecanismos podem explicar a associação entre os tumores de Warthin e os hábitos tabágicos: o já reconhecido aumento nos níveis de ROS que lesam o mtDNA, o contacto directo entre os ductos parotídeos e as substâncias inaladas, resposta imune de hipersensibilidade retardada, e metaplasia dos tecidos glandulares retidos nos gânglios linfáticos intraparotídeos em resposta a antigénios ou irritantes químicos do fumo do tabaco. Segundo vários autores, a DC pode tornar-se um biomarcador importante na determinação das alterações relacionadas com a idade nos diferentes tecidos.

Os resultados obtidos no nosso trabalho, no que respeita às alterações do mtDNA nos tumores de Warthin, não diferem substancialmente dos encontrados previamente noutros tumores oncocíticos, particularmente nos tumores de células de Hürthle da tireóide. O fenótipo oncocítico parece ter uma via comum nos vários tipos de tumores, independentemente de serem benignos ou malignos. Os tumores das glândulas salivares são neoplasias pouco frequentes e, por isso, é difícil obter um grande número de casos para estudo. Seria muito interessante analisar as alterações do mtDNA nos oncocitomas das glândulas salivares, e compará-las com oncocitomas de outros órgãos (rim, por exemplo), mas, mais uma vez, a raridade destas lesões torna este projecto difícil de realizar. Num estudo que analisou as alterações do mtDNA numa série de oncocitomas renais, foi encontrada instabilidade na região do D-loop em 42,9% dos tumores e na ATPase 6 do complexo V em 14,3% dos casos.

Os detalhes da patogénese dos tumores de Warthin ainda estão por esclarecer. Uma vez que ambos os componentes que o constituem são policlonais, poder-se-ia encarar estes tumores não como verdadeiras neoplasias mas antes como processos pseudo-tumorais. As mitocôndrias só se acumulam em células tumorais que não se dividem activamente, pois em neoplasias com elevada taxa proliferativa a divisão do citoplasma das células neoplásicas impede a acumulação das mitocôndrias. O mecanismo de formação dos tumores ricos em mitocôndrias, ainda não é bem conhecido. Uma hipótese é que as alterações no mtDNA possam bloquear o processo apoptótico, aumentando a sobrevivência das células e/ou funcionar como estímulo hipóxico, levando a níveis aumentados de HIF, e consequentemente, a estimulação da angiogénese e da proliferação celular, tendo deste modo, um papel indirecto na tumorigénese.

A comparação entre um tumor oncocítico maligno da tireóide e a lesão pré-neoplásica correspondente permitiu detectar a presença de mutações oncogénicas nas lesões malignas (rearranjos RET/PTC ou mutações do BRAF em carcinomas papilares da tireóide com fenótipo oncocítico, por exemplo),<sup>49,50</sup> as quais estão ausentes nas hipotéticas lesões precursoras (bócio multinodular com características oncocíticas, por exemplo)<sup>51</sup>. Nos raros casos de tumores de Warthin malignos ou carcinomas oncocíticos deles derivados, assim como

nas variantes oncocíticas de outros carcinomas das glândulas salivares reportados na literatura, seria interessante verificar que mutações estariam presentes, e qual o papel que poderiam desempenhar na aquisição de potencial maligno.

Resumidamente, as mutações do mtDNA em tumores podem ser separadas em duas categorias:

- mutações graves, que inibem o OXPHOS, aumentam a produção de ROS e promovem a proliferação celular tumoral;
- mutações ligeiras, que permitem a adaptação dos tumores a novos ambientes.

É, provavelmente, do equilíbrio/desequilíbrio entre estes dois tipos diferentes de mutação, de que resultam consequências diferentes, que as neoplasias oncocíticas se originam, proliferam e, eventualmente vêm a desenvolver um processo de transformação maligna.

Segundo Wallace<sup>3</sup>, são os desequilíbrios entre o mtDNA e o moderno excessivo consumo energético, que estão a mudar a epidemiologia de doenças como a obesidade, a diabetes, as doenças neurodegenerativas, as doenças cardiovasculares e, em última análise, o cancro.

## Referências Bibliográficas

1. Graff C, Clayton DA, Larsson NG. Mitochondrial medicine--recent advances. *J Intern Med.* 1999;246:11-23.
2. Glick E, Loeb L. Mitochondrial DNA and cancer. *Am Assoc Cancer Res.* 2005;22:267-270.
3. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet.* 2005;39:359-407.
4. Wallace DC. Mitochondria as chi. *Genetics.* 2008;179:727-735.
5. [http://commons.wikipedia.org/File:Mitochondrial\\_electron\\_transport\\_chain](http://commons.wikipedia.org/File:Mitochondrial_electron_transport_chain)
6. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 1981;290:457-465.
7. Lee HC, Yin PH, Lin JC, et al. Mitochondrial genome instability and mtDNA depletion in human cancers. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1042:109-122.
8. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123:309-314.
9. Carew JS, Huang P. Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer.* 2002;1:9.
10. Czarnecka AM, Golik P, Bartnik E. Mitochondrial DNA mutations in human neoplasia. *J Appl Genet.* 2006;47:67-78.
11. Higuchi M. Regulation of mitochondrial DNA content and cancer. *Mitochondrion.* 2007;7:53-57.
12. Chomyn A, Attardi G. MtDNA mutations in aging and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;304:519-529.
13. Amuthan G, Biswass G, Zhang SY, Klein-Szanto A, Vijayasarathy C, Avadhani NG. Mitochondria-to-nucleus stress signalling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *EMBO J.* 2001;20:1910-1920.
14. Lee HC, Hsu LS, Yin PH, et al. Heteroplasmic mutation of mitochondrial DNA D-loop and 4977-bp deletion in human cancer cells during mitochondrial DNA depletion. *Mitochondrion.* 2007;7:157-163.
15. Singh KK. Mitochondrial dysfunction is a common phenotype in aging and cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1019:260-264.

16. Linnane AW, Kios M, Vitetta L. The essential requirement for superoxide radical and nitric oxide formation for normal physiological function and healthy aging. *Mitochondrion*. 2007;7:1-5.
17. Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Gluud C. Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2004;364:1219-1228.
18. Raule N, Sevini F, Santoro A, et al. Association studies on human mitochondrial DNA: methodological aspects and results in the most common age-related diseases. *Mitochondrion*. 2007;7:29-38.
19. Maximo V, Sobrinho-Simoes M. Hurthle cell tumours of the thyroid. A review with emphasis on mitochondrial abnormalities with clinical relevance. *Virchows Arch*. 2000;437:107-115.
20. Simpson RH, Eveson JW. Warthin tumour. In: Pathology and Genetics - Head and Neck tumours, eds. IARC: Lyon 2005:263-265.
21. Maximo V, Lima J, Soares P, et al. Mitochondrial D-Loop instability in thyroid tumours is not a marker of malignancy. *Mitochondrion*. 2005;5:333-340.
22. Maximo V, Soares P, Lima J, et al. Mitochondrial DNA somatic mutations (point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variants in human thyroid pathology: a study with emphasis on Hurthle cell tumors. *Am J Pathol*. 2002;160:1857-1865.
23. Kato R, Harach HR, Williams ED. Solitary, multiple, and familial oxyphil tumours of the thyroid gland. *J Pathol*. 1998;186:292-299.
24. Lewis PD, Baxter P, Paul Griffiths A, et al. Detection of damage to the mitochondrial genome in the oncocytic cells of Warthin's tumour. *J Pathol*. 2000;191:274-281.
25. Teymoortash A, Werner JA. Tissue that has lost its track: Warthin's tumour. *Virchows Arch*. 2005;446:585-588.
26. Aguirre JM, Echebarria MA, Martinez-Conde R, et al. Warthin tumor. A new hypothesis concerning its development. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85:60-63.
27. Takezawa K, Jackson C, Gnepp DR, et al. Molecular characterization of Warthin tumor. *Oral Surg oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85:569-575.
28. Chin KW, Billings KR, Ishiyama A, Wang MB, Wackym PA. Characterization of lymphocyte subpopulations in Warthin's tumor. *Laryngoscope*. 1995;105:928-933.

29. Segatto o, Giacomini P, Santoro L, Perrino A, Natali PG. Lymphoid stroma of Warthin's tumor: phenotypic analogies with gut-associated lymphoid tissue. *Clin Immunol Immunopathol.* 1985;34:39-47.
30. Honda K, Kashima K, Daa T, et al. Clonal analysis of the epithelial component of Warthin's tumor. *Hum Pathol.* 2000;31:1377-1380.
31. Martins C, Fonseca I, Roque L, Soares J. Cytogenetic characterisation of Warthin's tumor. *Oral Oncol.* 1997;33:344-347.
32. Fehr A, Roser K, Belge G, et al. A closer look at Warthin tumors and the t(11;19). *Cancer Genet Cytogenet.* 2008;180:135-139.
33. Tan D, Goerlitz DS, Dumitrescu RG, et al. Associations between cigarette smoking and mitochondrial DNA abnormalities in buccal cells. *Carcinogenesis*; 2008:1170-1177.
34. Lee HC, et al. Aging-and smoking-associated alterations in the relative content of mitochondrial DNA in human lung. *FEBS Lett.* 1998;441:292-296.
35. Ballinger SW, Boudier TG, Davis GS, Judice SA, Nicklas JA, Albertini RJ. Mitochondrial genome damage associated with cigarette smoking. *Cancer Res.* 1996;56:5692-5697.
36. Liu CS, Kao SH, Wei YH. Smoking-associated mitochondrial DNA mutations in human hair follicles. *Environ Mol Mutagen.* 1997;30:47-55.
37. Prior SL, Griffiths AP, Baxter JM, et al. Mitochondrial DNA mutations in oral squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*; 2006; 27:945-950.
38. Yang Z, Harrison CM, Chuang GC, et al. The role of tobacco smoke induced mitochondrial damage in vascular dysfunction and atherosclerosis. *Mutat Res.* 2007;621:61-74.
39. Sadetzki S, Oberman B, Mandelzweig L, et al. Smoking and risk of parotid gland tumors: a nationwide case-control study. *Cancer.* 2008;112:1974-1982.
40. Lewis PD, Fradley SR, Griffiths AP, et al. Mitochondrial DNA mutations in the parotid gland of cigarette smokers and non-smokers. *Mutat Res.* 2002;518:47-54.
41. Zanssen S, Schon EA. Mitochondrial DNA mutations in cancer. *PLoS medicine.* 2005;2:e401.
42. Eng C, Kiuru M, Fernandez MJ, Aaltonen LA. A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:193-202.

43. Chen X, Prosser R, Simonetti S, Sadlock J, Jagiello G, Schon EA. Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. *Am J Hum Genet.* 1995;57:239-247.
44. Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, et al. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science.* 2005;309:481-484.
45. Bergstrom CT, Pritchard J. Germline bottlenecks and the evolutionary maintenance of mitochondrial genomes. *Genetics.* 1998;149:2135-2146.
46. Manfredi G, Thyagarajan D, Papadopoulou LC, Pallotti F, Schon EA. The fate of human sperm-derived mtDNA in somatic cells. *Am J Hum Genet.* 1997;61:953-960.
47. McHugh P, Sin F. Mitomap mtDNA sequence data. 1999. <http://www.mitomap.org/cgi-bin/tb/15gen.pl#19991118005>
48. Portugal R.
49. Sobrinho-Simões M, Maximo V, Castro IV, Fonseca E, Soares P, Garcia-Rostan G, Oliveira MC. Hürthle (oncocytic) cell tumors of thyroid: etiopathogenesis, diagnosis and clinical significance. *Int J Surg Pathol.* 2005;13:29-35.
50. Trovisco V, Soares P, Preto A, de Castro IV, Lima J, Castro P, et al. Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness. *Virchows Arch.* 2005;446:589-595.
51. Sobrinho-Simões M, Maximo V. Warthin's tumour. *Virchows Arch.* 2006;448:877-878.