



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BÁRBARA DOS SANTOS DIAS

AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE ALTERAÇÕES NO DNA MITOCONDRIAL DE  
LINHAGENS DE CARCINOMA GÁSTRICO.

BELÉM

2017

BÁRBARA DOS SANTOS DIAS

AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE ALTERAÇÕES NO DNA MITOCONDRIAL DE  
LINHAGENS DE CARCINOMA GÁSTRICO.

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Colegiado do Curso de  
Bacharelado em Ciências Biológicas,  
Modalidade Biologia da Universidade  
Federal do Pará, como requisito parcial para  
a obtenção do grau de Bacharel em  
Biologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Bárbara do Nascimento Borges.  
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará  
(ICB – UFPA)

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup> MsC Symara Rodrigues Antunes.  
Faculdade Metropolitana da Amazônia  
(FAMAZ)

BELÉM

2017

BÁRBARA DOS SANTOS DIAS

AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE ALTERAÇÕES NO DNA MITOCONDRIAL DE  
LINHAGENS DE CARCINOMA GÁSTRICO.

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Colegiado do Curso de  
Bacharelado em Ciências Biológicas,  
Modalidade Biologia da Universidade  
Federal do Pará, como requisito parcial para  
a obtenção do grau de Bacharel em  
Biologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Bárbara do Nascimento Borges  
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará  
(ICB – UFPA)

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> MsC Symara Rodrigues Antunes  
Faculdade Metropolitana da Amazônia  
(FAMAZ)

Avaliador: Prof MsC Danilo do Rosário Pinheiro  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade da Amazônia  
(CCBS – UNAMA)

Avaliador: Prof Dr Carlos Eduardo Matos Carvalho Bastos  
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará  
(ICB – UFPA)

BELÉM

2017

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à toda minha família e meus queridos amigos, Carmen Célia e Sylvio.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à professora Bárbara Borges que me acolheu no laboratório e sempre foi muito compreensiva, estando ao meu lado e sempre acreditando na minha capacidade mesmo quando eu duvidava que iria conseguir. Agradeço à professora Symara Rodrigues por se dedicar a me ensinar os procedimentos laboratoriais e pela oportunidade de exercer este trabalho. Também sou grata a equipe do laboratório de Biologia molecular pelo auxílio, principalmente à Raissa.

Agradeço ao professor Rommel Burbano por disponibilizar material para esse trabalho e ao professor Carlos Correa Junior por ceder os indicadores utilizados nessa pesquisa.

Agradeço a Universidade Federal do Pará e todos os funcionários do Instituto de Ciências Biológicas que me acompanharam nessa longa primeira jornada da minha vida acadêmica.

Agradeço à minha família que sempre me deu apoio e acreditou em mim, me suprindo financeiramente e emocionalmente durante este árduo período que é a graduação. Sou grata também aos meus queridos amigos Carmen Célia e Sylvio, por todo carinho e apoio.

Agradeço muitíssimo ao meu companheiro, Anderson Furtado, por me manter calma durante momentos de desespero e auxiliar nas formatações desse trabalho. Gostaria de agradecer aos meus amigos dos maratoneiros por me ajudar a diminuir meus níveis de estresse com as nossas reuniões. E agradeço as minhas amigas, Larissa Cardoso e Jessica Yoshino, por não me deixarem desistir e me auxiliarem a sobrepor todos os obstáculos durante o curso.

## RESUMO

Câncer é o nome dado a uma variedade de doenças que podem ocorrer em diferentes regiões do corpo, que se caracteriza principalmente pela proliferação desregulada de células. Uma organela muito importante, tanto em células normais quanto em células mutadas, é a mitocôndria, responsável pela maior parte da produção de ATP na célula. Mutações no DNA mitocondrial podem acarretar apoptose ou influenciar na eficiência da formação de ATP. Considerando diversas estimativas diferentes, o câncer gástrico sempre figura entre os cinco mais incidentes na população mundial, bem como na população brasileira e paraense. Dessa forma, entender o comportamento tumoral torna-se importante para o combate dessa patologia. Com isso, o objetivo do trabalho foi analisar a presença de alterações no DNA mitocondrial de linhagens de carcinoma gástrico implantadas em um modelo animal. Foram analisados quatro genes mitocondriais (*COI*, *ATPase 8*, *ND1* e *ND3*) de quatro linhagens de câncer gástrico (AGP01, ACP02, ACP03 e PG100) e uma controle (Carcinossarcoma 256 de Walker) para avaliar as possíveis mutações do DNA mitocondrial. Essas linhagens foram inoculadas em primatas não humanos da espécie *Sapajus apella*, sendo que alguns animais receberam concomitantemente com as linhagens a substância carcinogênica N-metil-N-nitrosurea (MNU). Os tumores gástricos que se desenvolveram nos animais foram retirados cirurgicamente, após isso foi feita a extração do DNA, amplificação e sequenciamento das sequências de interesse. Foram observadas alterações nos genes *ND1* e *ND3*. As duas transições encontradas em *ND1*, uma na posição 3594 (C→T) e 3693 (G→A) do DNA mitocondrial, não possuíam registro associado a nenhuma patologia, tendo sido relacionadas com marcadores populacionais. A transição A→G na posição 10398 do gene *ND3*, acarretou na mudança de uma treonina para alanina no aminoácido resultante, apenas em linhagens com comportamento mais agressivo ou após a administração do MNU. Também foram identificadas duas heteroplasmias no gene *ND1*, nas posições 3594 (C/T) e 3693 (A/G) apenas na linhagem PG100 após a utilização de MNU, sugerindo uma diferença no sistema de reparo do DNA desta linhagem em comparação com as demais. Os resultados sugerem que alterações nos genes codificadores de proteínas que participam do Complexo I da cadeia respiratória são mais frequentes que em outras porções do mtDNA nas linhagens de carcinoma gástrico analisadas.

Palavras-chave: Câncer gástrico, *Sapajus apella*, mtDNA, MNU, mutações

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figuras 1.</b> Marcas do câncer. Fonte (adaptado): Hanahan e Weinberg, 2011.....	2
<b>Figuras 2.</b> Evolução histológica do câncer gástrico de tipo intestinal. Fonte (adaptada): Fox & Wang, 2007.....	5
<b>Figura 3.</b> Possível cascata de eventos estimulados por infecção de <i>H. pylori</i> secretando VacA e CagA. Fonte (adaptada): Ajani, 2017.....	6
<b>Figura 4.</b> Estrutura do mtDNA humano. Fonte (adaptada): Mohamed Yusoff, 2015.....	9
<b>Figura 5.</b> Heterogeneidade metabólica em tumores. Fonte (adaptada): Martinez-Outschoorn <i>et al.</i> , 2017.....	12
<b>Figura 6.</b> Cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria de mamíferos. Fonte (adaptada): Sazonov, 2015.....	13
<b>Figura 7.</b> Alteração no gene <i>ND1</i> de citosina para timina, na posição 3594 do mtDNA. Cromatografia superior da amostra 10, sem a alteração e na parte inferior a amostra 15.....	24
<b>Figura 8.</b> Alteração no gene <i>ND1</i> de guanina para adenosina, na posição 3693 do mtDNA. Cromatografia superior da amostra 10, sem a alteração e na parte inferior a amostra 15.....	24
<b>Figura 9.</b> Alteração no gene <i>ND3</i> de guanina para adenosina, na posição 10398 do mtDNA. Cromatografia superior da amostra 10, sem a alteração e na parte inferior a amostra 15.....	25
<b>Figura 10.</b> Modelo das proteínas codificadas pelo gene <i>ND3</i> . A) Proteína normal, sem a alteração; B) Proteína alterada, com a alteração no penúltimo aminoácido (114Ala).....	27
<b>Figura 11.</b> Alteração no gene <i>ND3</i> de guanina para adenosina, na posição 10398 do mtDNA. Cromatografia superior da amostra 10, sem a alteração e na parte inferior a amostra 17, ambas correspondentes a linhagem PG100.....	28
<b>Figura 12.</b> Heretoplasmia no gene <i>ND1</i> na posição 3594 do mtDNA. Cromatografia superior da amostra 10, sem a alteração e na parte inferior a amostra 17.....	30
<b>Figura 13.</b> Heretoplasmia na posição 3698. Cromatografia superior da amostra 10, sem alteração e na parte inferior da amostra 17.....	30

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A - Adenina

ADP – Adenosina disosfato

Ala – Alanina

ATP – Trifosfato de adenosina

C – Citosina

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilendiamino tetra-acético

FADH<sub>2</sub> – Forma reduzida de Dinucleótido de Flavina e Adenina.

G - Guanina

INCA – Instituto Nacional do Câncer

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio

MNU – N-metil-N-nitrosurea

mtDNA – DNA mitocondrial

NADH – Forma reduzida de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina

O<sub>2</sub> – Oxigênio

O<sup>6</sup>MG - O<sup>6</sup>-metilguanina

OMS/WHO – Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

OXPHOS – Fosforilação Oxidativa

PCR – Reação em cadeia da polimerase

Pi – Fosfato inorgânico

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Espécies reativas de oxigênio

T – Timina

Thr – Treonina

Val – Valina

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	1
1.1. Considerações gerais.....	1
1.2. Câncer Gástrico.....	4
1.2.1. Epidemiologia.....	4
1.2.2. Fatores etiológicos.....	5
1.2.3. Genética do Câncer.....	7
1.3. Mitocôndria e o DNA mitocondrial.....	8
1.3.1. Cadeia respiratória mitocondrial .....	12
1.4. Modelo Animal.....	15
1.5. Químicos.....	15
1.6. Objetivos.....	16
1.6.1. Objetivo Geral.....	16
1.6.2. Objetivos Específicos.....	17
2. Material e Métodos.....	18
2.1. Amostras.....	18
2.2. Extração do DNA.....	19
2.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	19
2.4. Modelo da Alteração da Proteína.....	21
3. Resultados e Discussão.....	22
3.1. Modelo Animal.....	22
3.2. Alterações com Troca de Uma Única Base.....	22
3.3. Heteroplasmia.....	29
4. Conclusão.....	31
5. Referências.....	32

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Câncer engloba uma variedade de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células que podem ou não se espalhar e invadir outros tecidos, seja por proximidade ou levadas pela corrente sanguínea em um processo conhecido por metástase (INCA, 2016). Podendo ocorrer em qualquer órgão do corpo, essa doença muitas vezes assintomática, tem uma ampla epidemiologia e variados prognósticos dependendo de onde se manifesta. O registro mais antigo relacionado ao câncer foi correspondente ao câncer de mama no Papiro de Edwin Smith, escrito aproximadamente em 3000 a.C. Na Grécia antiga, Hipócrates já estudava o câncer levando em consideração seu início por causas naturais, separando a medicina da magia. Ele também cunhou o termo *καρκίνοσ* (caranguejo em grego) para descrever esta doença, devido à semelhança de tumores malignos vascularizados e um caranguejo com suas pernas (Hajdu, 2011).

Apesar de todas as pesquisas e avanços feitos na temática de estudo do câncer, não existe uma única causa para o desenvolvimento da doença. Dentre as possíveis causas para este conjunto de doenças, encontram-se fatores endógenos e exógenos, tais como hábitos alimentares, idade, obesidade, tabagismo, exposição a produtos químicos, radiação ionizante e fatores genéticos (Muller & Altenburg, 1930; Ames *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2016).

Hanahan e Weinberg (2000) postularam o que seria conhecido como as marcas do câncer, um conjunto de características que seriam pontos chaves para o desenvolvimento desta patologia. Primeiro eles descreveram seis características que a célula saudável teria para se transformar em uma célula cancerosa que são (1) manutenção do sinal proliferativo, ou seja a independência daquelas células em questão de sinais de crescimento, (2) evasão a supressores de crescimento (3) capacidade de replicação ilimitada (4) indução da angiogênese (5) evasão a apoptose, (6) invasão dos tecidos adjacentes e metástase. Porém em 2011, foram adicionadas novas marcas (Figura 1): (7) evasão a destruição pelo sistema imune, (8) promoção de inflamação tumoral, (9) desregulação energética da célula, (10) instabilidade genômica e mutação (Hanahan & Weinberg, 2011).



Figura 1. Marcas do câncer. Fonte (adaptado): Hanahan e Weinberg, 2011.

As alterações do material genômico em cada tipo de câncer variam, porém uma característica vista na maioria das células do câncer é a instabilidade genômica e mutações no DNA, que podem influenciar na expressão de proteínas dessas células. Uma das características mais interessantes das marcas do câncer, devido a sua importância na produção de energia das células do tumor é a desregulação energética da célula, onde na presença de oxigênio, células normais costumam utilizar a via da fosforilação oxidativa para produção de energia, porém células do câncer parecem reprogramar seu metabolismo e mesmo em condições aeróbicas utiliza a glicólise aeróbica, menos eficiente do que a via citada anteriormente quanto a produção de trifosfato de adenosina (ATP). Outra marca do câncer é a indução da angiogênese, conforme o tumor aumenta, suas necessidades de nutrientes e oxigênio, as células do câncer produzem substâncias e ativam vias capazes de estimular a angiogênese (Hanahan & Weinberg, 2011).

Por ser uma doença que abrange subtipos diferentes e ocorrer tanto em homens e mulheres, o câncer tem sido uma das principais causas de morte no século XXI, sendo considerado um problema de saúde pública (INCA, 2015). Segundo o GLOBOCAN (2012),

estimativa feita pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o maior número de novos casos e mortes decorrentes de câncer se concentram nos países menos desenvolvidos (Tabela 1).

Tabela 1. Estimativa mundial de todos os tipos de câncer, excluindo câncer de pele não melanoma, para 2012 feito pela Organização Mundial da Saúde.

	Homens		Mulheres		Ambos os sexos	
	Casos	Mortes	Casos	Mortes	Casos	Mortes
Mundo	7.410	4.653	6.658	3.548	14.068	8.202
Regiões mais desenvolvidas	3.227	1.592	2.827	1.287	6.054	2.878
Regiões menos desenvolvidas	4.184	3.062	3.831	2.261	8.014	5.323
WHO África (AFRO)	265	205	381	250	645	456
WHO Américas (PAHO)	1.454	677	1.429	618	2.882	1.295
WHO Leste Mediterrâneo(EMRO)	263	191	293	176	555	367
WHO Europa (EURO)	1.970	1.081	1.744	852	3.715	1.933
WHO Sudeste Asiático (SEARO)	816	616	908	555	1.724	1.171
WHO Oeste Pacífico (WPRO)	2.642	1.882	1.902	1.096	4543	2.978
Estados Unidos da América	825	324	779	293	1.604	617
China	1.823	1.429	1.243	776	3.065	2.206
Índia	477	357	537	326	1.015	683
União Europeia (EU-28)	1.430	716	1.206	561	2.635	1.276

Fonte: GLOBOCAN, 2012.

De acordo com estimativas de casos realizadas em 2012, a maior incidência de câncer, independente de sexo e idade, seria no pulmão, seguido do câncer de mama, colorretal, próstata e de estômago. Para mulheres, os cinco tipos mais comuns de câncer são liderados pelo de mama, seguido do colorretal, pulmão, cervical e de estômago. Já no caso dos homens, entre os cinco tipos de câncer mais comuns estão o de pulmão, de próstata, colorretal, de estômago e fígado (GLOBOCAN, 2012; OMS, 2014). No cenário brasileiro, os cinco tipos mais frequentes de câncer estimados para o biênio de 2016-2017 foram o de mama, colorretal, colo do útero, traqueia juntamente com pulmão e estômago, para mulheres,

já entre os homens são próstata, traqueia e pulmão, colorretal, estômago e da cavidade oral (INCA, 2015).

## 1.2. CÂNCER GÁSTRICO

### 1.2.1. EPIDEMIOLOGIA

A grande maioria ( $\approx 90\%$ ) dos tumores malignos do estômago são adenocarcinomas, que se originam no tecido epitelial glandular ou na mucosa do estômago (Karimi *et al.* 2014). Em 2014, foram produzidos pela Organização Mundial da Saúde perfis ilustrando os tipos de câncer mais incidentes na maioria dos países do mundo. Essa lista constatou que no Brasil, entre os homens, o câncer de estômago é o terceiro câncer com maior taxa de mortalidade, enquanto que nas mulheres é o quinto (OMS, 2014). Segundo a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para 2016, foram esperados 7.600 novos casos de câncer de estômago em mulheres e 12.920 novos casos em homens no Brasil na região Norte. Sem considerar os tumores não melanoma, o câncer de estomago é o mais frequente entre os homens (11,62/100mil) e o quarto mais comum na população das mulheres (5,82/100mil) (Tabela 2) (INCA, 2015).

Tabela 2. Estimativa feita pelo INCA para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitante e número de casos novos de câncer no Estado do Pará e capital.

Estimativa dos casos novos							
Homem				Mulher			
Estado		Capital		Estado		Capital	
Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
460	11,38	160	22,54	230	5,84	100	12,71

\* Números arredondados para múltiplos de 10.  
Fonte: INCA, 2015.

De acordo com a classificação de Lauren, os adenocarcinomas gástricos são subdivididos em dois grupos histológicos: intestinal e o tipo difuso. O tipo intestinal é bem diferenciado, geralmente se originando de uma metaplasia intestinal (presença de epitélio com características de intestino na região do estômago). Já o tipo difuso é pouco diferenciado, sem conformação glandular tendendo a se infiltrar na camada submucosal e associado a um pior prognóstico (Lauren, 1965; Van Der Woude *et al.*, 2003; Berlth *et al.*, 2014).

O câncer do tipo intestinal geralmente se desenvolve a partir de estágios pré-neoplásicos, de forma lenta, iniciando com lesões na mucosa estomacal, podendo ser decorrente de um agente carcinogênico que proporciona alteração no material genético da célula. Os próximos estágios seriam a gastrite aguda, gastrite crônica, gastrite atrófica, metaplasia e displasia até chegar ao estágio do câncer (Fox & Wang, 2007) (Figura 2). Já o tipo difuso, não começa necessariamente com uma inflamação crônica, mas pode apresentar um forte componente hereditário com alterações nos genes *CDH1* e *RHOA* (Becker *et al.*, 1994; Machado *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2012; Corso *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2017).

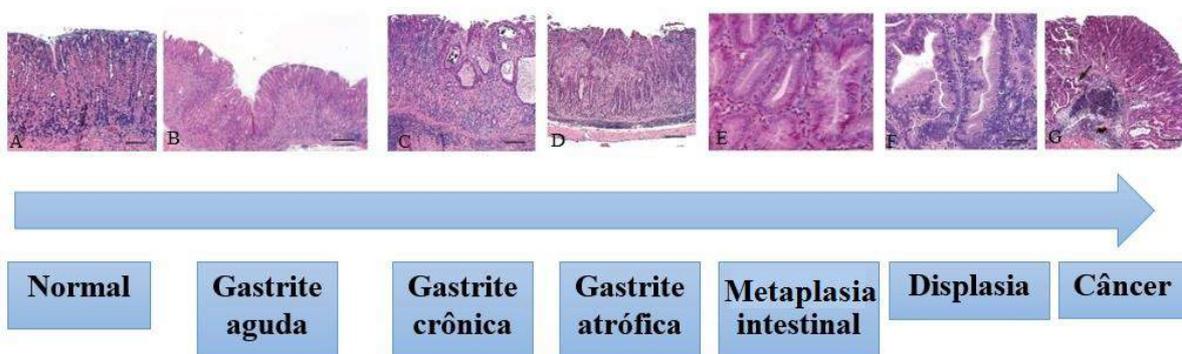


Figura 2. Evolução histológica do câncer gástrico de tipo intestinal. Fonte (adaptada): Fox & Wang, 2007.

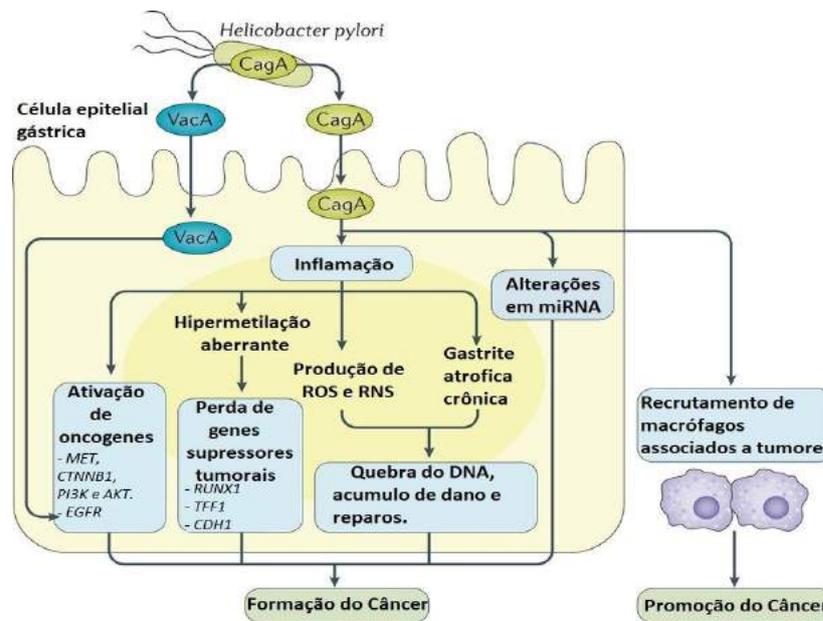
### 1.2.2. FATORES ETIOLÓGICOS

Para o aparecimento do câncer gástrico existem fatores exógenos (Fang *et al.*, 2015) específicos que já foram correlacionados com o aumento das chances de seu desenvolvimento, como a dieta (ingestão excessiva de sal e pimenta; baixo consumo de frutas e vegetais) (Bonequi *et al.*, 2013; D'Elia *et al.*, 2012), consumo de alimentos em conserva (Stefani *et al.*, 2012), infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (Polk & Peek Jr., 2010; Zhang *et al.*, 2014), consumo exacerbado de álcool e tabagismo (Nishimoto *et al.*, 2002; Ladeiras-Lopes *et al.*, 2008; Tramacere *et al.*, 2012; Nagini, 2012; Grando, 2014).

Vários desses hábitos, como fumar (Xue *et al.*, 2014), ingerir alimentos defumados ou em conserva juntamente com o baixo consumo de alimentos ricos em vitamina C, aumentam a exposição à compostos N-nitrosos pelo organismo. Esses compostos podem ser divididos em N-nitrosaminas e N-nitrosamidas, formados pela reação de um grupo nitroso com aminas ou amidas (Pobel *et al.*, 1995; Mirvish, 1995; Hernández-Ramírez *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2015). Estes compostos foram caracterizados como substâncias cancerígenas em animais e com potencial cancerígeno em humanos, não apenas para o câncer gástrico, mas

também para câncer do colorretal (Zhu *et al.*, 2013) e de bexiga (Catsburg *et al.*, 2014). Estudos correlacionam a presença de uma lesão preexistente, como uma inflamação ocasionada por *Helicobacter pylori* ou gastrite, o que propiciaria um ambiente adequado para a formação de compostos N-nitrosos que podem levar ao início do processo tumoral (Jakszyn *et al.*, 2006), porém outros pesquisadores acreditam que isso seja irrelevante para o início do processo tumoral em pacientes expostos a consideráveis níveis de nitrato, um precursor dos compostos N-nitrosos (Xu *et al.*, 2015).

A infecção por *Helicobacter pylori* é uma precursora de lesões no estômago e do próprio câncer gástrico visto que o processo inflamatório da infecção muitas vezes acarreta na iniciação do processo tumoral. Essa bactéria promove a liberação de citocinas e aumenta a acloridria (ausência de ácido clorídrico no suco gástrico) o que desencadeia reações em cascata transformando metaplasia em displasia que pode se desenvolver em um tumor maligno. Além disso, certas cepas de *H. pylori* podem produzir onco-proteínas, como a citotoxina vacuolizante A (VacA) e a citotoxina associada (CagA), sendo mais propensas a causar câncer gástrico devido ao poder de ativação de oncogenes, silenciamento de genes supressores tumorais e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Figura 3) (Zhang *et al.*, 2014; Yong *et al.*, 2015; Ajani *et al.*, 2017). Casos endêmicos de câncer gástrico são geralmente associados com infecção por *H. pylori* (de Martel *et al.*, 2012)



Nature Reviews | Disease Primers

Figura 3. Possível cascata de eventos estimulados pela infecção por *H. pylori* secretando VacA e CagA. Fonte (adaptada): Ajani, 2017.

### 1.2.3. GENÉTICA DO CÂNCER

Mutações podem ocorrer desde o nível cromossômico até mudanças em um único nucleotídeo no DNA. Essas mutações podem ocorrer de forma natural, decorrente de um erro durante algum processo de replicação da informação genética ou por exposição a agentes externos (Migliore & Coppedè, 2002).

As mutações podem ser classificadas como de sentido trocado (*missense*) caracterizadas pela mudança do códon que produz um aminoácido em outro códon codificando um aminoácido diferente; mutações sem sentido (*nonsense*) onde um códon para um aminoácido é modificado para um códon de parada, resultando na finalização prematura da proteína. Além das citadas acima, também existem as mutações que podem resultar em troca de quadro de leitura, onde a inserção ou deleção de nucleotídeos altera a leitura dos códons (White *et al.*, 1990), podendo acarretar no silenciamento ou mal funcionamento da proteína resultante (Polyak *et al.*, 1998).

Ao que se trata em mutações para o surgimento do câncer existem duas classificações principais dos tipos de genes, referindo-se ao seu papel no ciclo celular, os oncogenes e os genes supressores tumorais. As proteínas codificadas pelos proto-oncogenes podem ser classificadas em: fatores de transcrição, remodeladores de cromatina, reguladores de apoptose, transdutores de sinais, fatores de crescimento e receptores de fator de crescimento (Croce, 2008). Oncogenes são as formas alteradas de proto-oncogenes que favorecem a proliferação de sinais favoráveis ao crescimento celular, codificando proteínas de forma desregulada (Lee & Muller, 2010). Um exemplo de oncogenes são o *MET* (Umeki *et al.*, 1999; Morozov *et al.*, 2008), *MYC* (Calcagno *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010; Calcagno *et al.*, 2013) e *RHOA* (Kakiuchi *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

Já os genes supressores tumorais são aqueles que em seu estado normal tem função de corrigir erros de replicação, regular processos, tais como o ciclo celular, a adesão celular, a apoptose e a inibição da proliferação descontrolada das células. Porém, quando esses genes se encontram mutados e não realizam sua função de forma adequada podem levar a iniciação do processo tumoral. Exemplos dessa classe de genes são *TP53* (Hollstein *et al.*, 1991; Tahara *et al.*, 2016), *CDHI* (Jeanes *et al.*, 2008; El-Husny *et al.*, 2016) e genes da família RAS. Genes supressores tumorais podem ser classificados em dois tipos: *gatekeepers* e *caretakers*. Os *gatekeepers* são aqueles genes supressores tumorais envolvidos na regulação do crescimento tumoral, codificando proteínas que agem como inibidores de crescimento e/ou promovendo apoptose. Os *caretakers* são responsáveis por manter a estabilidade genômica na

célula diminuindo a quantidade de mutações (Kinzler & Vogelstein, 1997; Macaluso *et al.* 2003; Oliveira *et al.* 2005).

Em seu estudo sobre retinoblastoma, Knudson em 1971 formulou a chamada hipótese de dois eventos, propondo que o câncer é o resultado do acúmulo de mutações nos genes. No caso dos genes supressores tumorais seriam necessárias duas mutações, sendo uma inativando cada alelo do gene (Tomasetti *et al.*, 2015). Em alguns casos além do silenciamento dos genes supressores tumorais é necessária a ativação de um oncogene, como no modelo proposto por Fearon e Vogelstein em 1990 (Knudson, 2001; Vogelstein *et al.*, 2013).

### 1.3. MITOCONDRIA E O DNA MITOCONDRIAL

Vários processos que ocorrem nas células necessitam de energia para serem realizados. Na grande maioria dos eucariontes essa energia é principalmente fornecida pelas mitocôndrias através de um processo aeróbico chamado fosforilação oxidativa (OXPHOS). Essas organelas possuem duas membranas lipoproteicas, sendo uma externa e outra interna com invaginações chamadas de cristas voltadas para a matriz da organela, além de um genoma próprio (McCarron *et al.*, 2013).

Uma célula de mamífero contém aproximadamente  $10^3 - 10^4$  cópias de DNA mitocondrial (Lightowlers *et al.*, 1997). O genoma mitocondrial humano foi primeiro sequenciado e organizado em 1981 por Anderson e colaboradores, desde então vem sendo foco de vários estudos por seu papel na produção de energia das células. Em humanos, o DNA mitocondrial (mtDNA) tem tamanho de 16.6 kb, sendo composto por duas fitas de DNA circular, uma denominada pesada (*heavy strand*) e outra leve (*light strand*). O DNA mitocondrial (Figura 4) é responsável por codificar dois RNA ribossomais (rRNA), 22 RNA transportadores (tRNA) 13 proteínas ligadas ao processo de fosforilação oxidativa na produção de ATP, onde sete são subunidades do complexo I (NADH-desidrogenase), três subunidades do complexo IV (Citocromo c oxidase), duas subunidades do complexo V (ATP sintase) e a Citocromo b (subunidade do complexo III). Outra característica importante do DNA mitocondrial é que ele está altamente suscetível a mutações devido a ausência de histonas, estruturas proteicas com função de proteção do DNA (Alexeyev *et al.*, 2013).

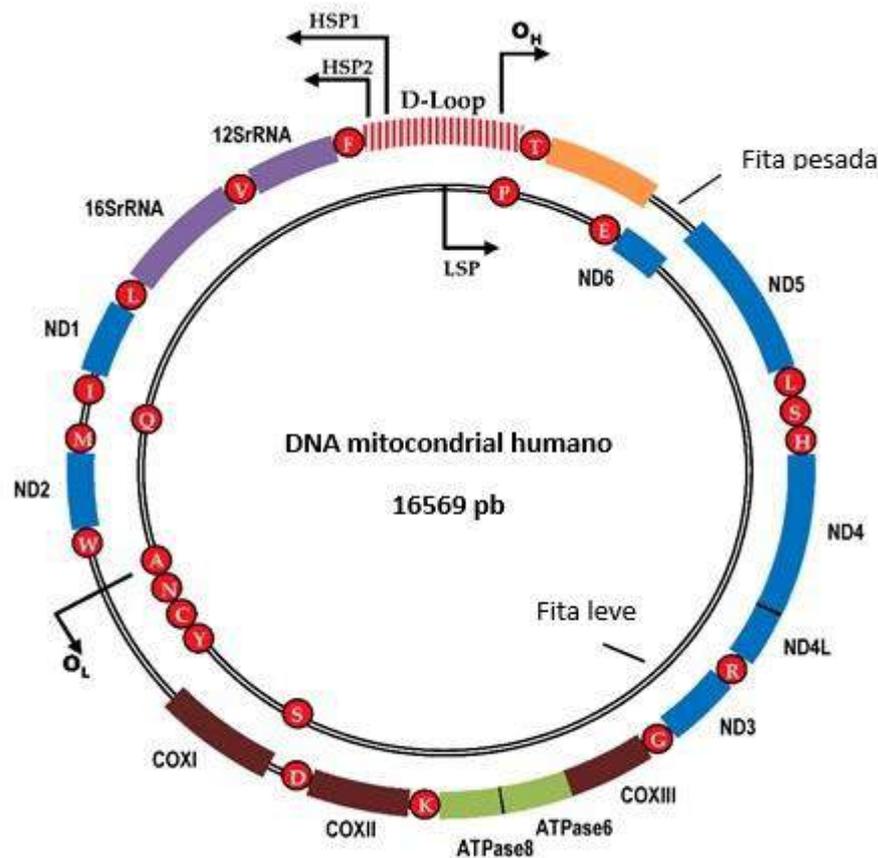


Figura 4. Estrutura do mtDNA humano. Nele são encontrados 13 genes que codificam subunidades essenciais para a cadeia respiratória, dois RNA ribossomais (12S rRNA e 15S rRNA), e 22 RNAs transportadores (representados por letras dentro dos círculos vermelhos). A única região não codificante é a Alça-D (*D-loop*), que funciona como uma região controle onde estão os promotores de transcrição da fita leve (LSP), da fita pesada (HSP1 e HSP2) e a região de iniciação da replicação da fita pesada ( $O_H$ ). A origem de replicação da fita leve é representada por  $O_L$ . Fonte (adaptada): Mohamed Yusoff, 2015.

Como células que dividem em uma alta velocidade, os tumores enfrentam problemas correspondentes ao seu rápido crescimento, como alta demanda por ATP e macromoléculas importantes para reações metabólicas. Outro problema enfrentado pelo tumor em desenvolvimento é a eminente área de hipóxia que pode ser formada conforme seu tamanho vai aumentando e a oxigenação não é mais suficiente para toda a massa celular. Para o sucesso da proliferação tumoral é interessante que as células utilizem caminhos metabólicos mais eficientes de acordo com a disponibilidade de recursos em seu microambiente (Lehuédé *et al.*, 2016).

A célula pode obter energia através de OXPHOS ou da glicólise anaeróbica (fermentação). Essas duas formas de obtenção de energia são importantes devido a possível

variação da concentração de oxigênio disponível no ambiente. Em 1926, Warburg e colaboradores chegaram à conclusão que as células tumorais apresentam um alto nível de glicólise seguida de fermentação e produção de ácido láctico (processo anaeróbico) mesmo em presença de oxigênio. Essa hipótese vai contra o “Efeito de Pasteur”, que defende que a fermentação é inibida na presença de oxigênio (Lloyd *et al.*, 1983). Para eles, isso se dava devido a prováveis danos ocorridos no DNA mitocondrial que incapacitariam o processo de fosforilação oxidativa, levando a conclusão que a OXPHOS era suprimida em células de câncer.

Mais tarde, Weinhouse (1951) demonstrou que em comparação com tecidos normais, tumores demonstram maior taxa de acúmulo de ácido láctico através de fermentação, porém quando se trata da utilização da fosforilação oxidativa, a taxa é muito similar para ambos tecidos. Isso corroboraria para a hipótese de que as células tumorais se utilizam dos dois processos para suprir sua alta demanda energética (Hay, 2016; DeBerardinis & Chandel, 2016).

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são produtos decorrentes do processo de fosforilação oxidativa tanto em células normais como em transformadas, sendo a mitocôndria a principal origem dessas substâncias (Shadel & Horvath, 2015). Exemplos de espécies reativas de oxigênio são ânion superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (Idelchik *et al.*, 2017). Os maiores produtores desses compostos na mitocôndria são os complexos NADH-desidrogenase, succinato:ubiquinona oxidoredutase e ubiquinol:citocromo c oxidoredutase. Para sobrevivência celular é importante que a célula mantenha um equilíbrio chamado Redox, que é o equilíbrio entre as reações de redução e oxidação com capacidade do sistema antioxidante da célula de eliminar as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em excesso (Zorov *et al.*, 2014).

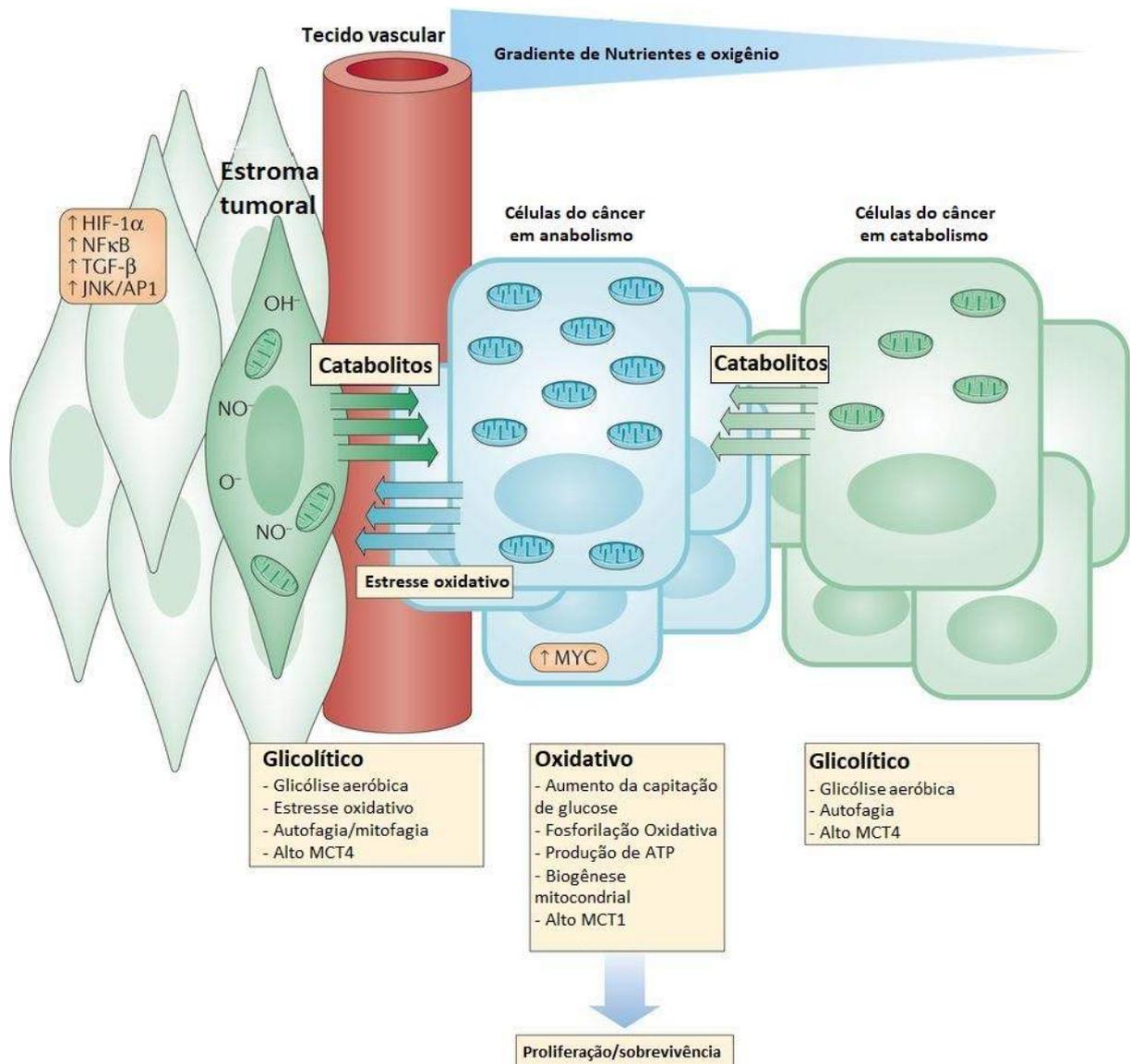
Como Chattopadhyay e Roy (2017) resumizam em sua revisão, altos níveis de ROS podem ativar a via do fator induzível de hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ), que tem a capacidade de desencadear a mudança na utilização de OXPHOS como fonte de ATP para glicólise anaeróbica, devido a sua capacidade de ativar enzimas glicolíticas. Níveis elevados de ROS também podem acarretar em um aumento de mutações no DNA mitocondrial (He *et al.*, 2013). Como qualquer estado de equilíbrio, tanto em excesso quanto em baixos níveis ROS podem acarretar problemas para o organismo (Chen *et al.*, 2016).

Uma consequência interessante da preferência das células do câncer por utilizar a via da glicólise anaeróbica é o aumento da concentração de lactato nas células. Através da ativação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seu receptor, receptor de fator

de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2), o lactato induz a angiogênese (Hunt *et al.*, 2007; Porporato *et al.*, 2012). Além desse mecanismo, o lactato também ativa células endoteliais através do transportador de monocarboxilato (MCT-1) que provoca uma cascata de processos que estimula migração celular e formação de vasos (Vegran *et al.*, 2011; Romero-Garcia *et al.*, 2016).

Com o desenvolvimento do tumor, há um aumento da heterogeneidade celular e cada região começa a utilizar diferentes formas de produção de ATP dependendo das condições do seu ambiente (Figura 5). Recentemente, a hipótese de que as regiões com presença de oxigênio e em hipóxia do tumor tem um relacionamento simbiótico, e utilizam as substâncias resultantes dessas reações para fazer outros processos, foi postulada (Nakajima & Van Houten, 2013). No caso do câncer de mama, essa simbiose possivelmente seria controlada pelas variadas expressões de diferentes transportadores de lactato (Baenke *et al.*, 2015), células de câncer em hipóxia que fazem glicólise expressam altos níveis de ativação de MCT4, que promovem a exportação de lactato, enquanto que células em presença de oxigênio expressam MCT1, que promove influxo de lactato (Yoshida, 2015). Modelos *in vivo* de carcinoma cervical e de cólon demonstraram que regiões em hipóxia onde prevalece o processo anaeróbico de glicólise têm seu lactato resultante utilizado por outras células que o utilizam como substrato para OXPHOS nas mitocôndrias (Sonveaux *et al.*, 2008; Martinez-Outschoorn *et al.*, 2017). Este mesmo processo também pode ocorrer entre as células tumorais e as células do estroma, dependendo da sua proximidade com os vasos sanguíneos (Kucharzewska *et al.*, 2013; Webber *et al.*, 2015).

Outro fenômeno interessante é o Efeito de Warburg Reverso: Nele, as células do tumor provocam um estado de “pseudo hipóxia”, resultante de estresse oxidativo, tornando as células preferencialmente glicolíticas, resultando na exportação de lactato, cetona e/ou piruvato para que as células do câncer utilizem no seu metabolismo oxidativo (Doherty & Cleveland, 2013). As células do câncer, mais próximas de células em anabolismo e mais afastadas da fonte de oxigênio e nutrientes, utilizam uma alternativa catabólica, como autofagia, também produzindo catabólitos para as células em anabolismo (Figura 5) (Martinez-Outschoorn *et al.*, 2017).



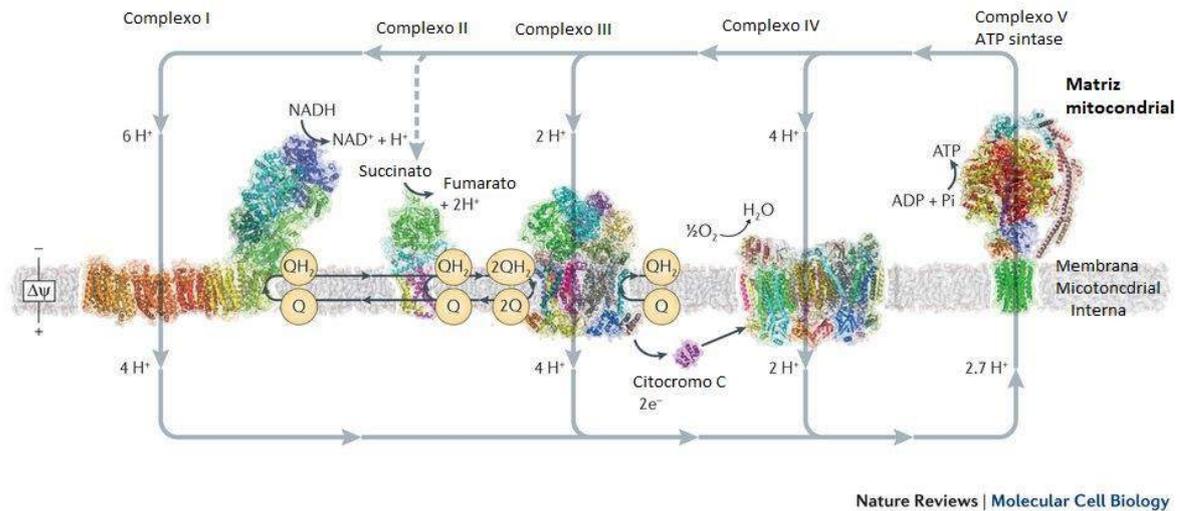
Nature Reviews | Clinical Oncology

Figura 5. Heterogeneidade metabólica em tumores. Fonte (adaptada): Martinez-Outschoorn *et al.*, 2017.

### 1.3.1. CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

A membrana interna da mitocôndria possui complexos proteicos que formam a cadeia transportadora de elétrons, que tem como objetivo produzir trifosfato de adenosina (ATP) acoplada a fosforilação oxidativa. Isto consiste, basicamente, na transferência de elétrons do NADH e FADH<sub>2</sub> para o O<sub>2</sub>, o que gera o bombeamento prótons para o espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria, tornando a matriz mitocondrial mais negativa e conseqüentemente gerando uma força próton-motriz. Quando estes prótons entram

novamente na matriz mitocondrial para balancear o gradiente geram a mudança de conformação de outro complexo chamado ATP-sintase que utiliza adenosina difosfato (ADP) e fosforo inorgânico ( $P_i$ ) para formar ATP, a energia da célula (Figura 6) (Chaban *et al.*, 2014; Mailloux, 2015).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 6. Cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria de mamíferos. Fonte (adaptada): Sazonov, 2015.

O complexo I, também conhecido como complexo NADH-desidrogenase, em mamíferos é formado por 45 subunidades, sendo 14 principais e 31, tendo peso molecular de aproximadamente 1MDa (Carroll *et al.*, 2006). É o primeiro passo da cadeia de transporte de elétrons, oxidando o NADH e liberando elétrons para o espaço entre membranas da mitocôndria, e auxiliando na formação de um gradiente de prótons (Brandt, 2006). Apresenta uma forma de L, tem suas unidades principais formando dois domínios juntamente com suas subunidades acessórias. O domínio redox que está voltado para a matriz mitocondrial é formado por sete subunidades principais hidrofílicas e sete subunidades principais hidrofóbicas formam o outro domínio, voltado para a área entre as membranas mitocondriais (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 4L) que são codificadas por genes mitocondriais conhecidos como *ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND5*, *ND6* e *ND4L* (Chomyn *et al.*, 1986; Hirst, 2013).

O complexo II, ou succinato:ubiquinona oxidoredutase, catalisa a oxidação do succinato para fumarato (succinato  $\rightarrow$  fumarato +  $2H^+$  +  $2e^-$ ), doando elétrons para a ubiquinona (Crane *et al.*, 1957). Este complexo é formado por quatro subunidades que juntas com peso molecular variando de 91 – 110kDa. Um domínio é voltado para a matriz, composto por uma subunidade de flavoproteína e uma proteína ferro-enxofre, possuindo o ponto de ligação com dicarboxilato (por exemplo succinato e fumarato). O outro domínio se encontra

integrado na membrana interna da mitocôndria, podendo conter um ou dois peptídeos hidrofóbicos com presença ou não de um grupo heme (Lemos *et al.*, 2002; Lancaster, 2002; Sun *et al.*, 2005) A ubiquinona, ancorada na membrana, é reduzida e serve de transporte dos elétrons do complexo I e II para o complexo III.

O passo seguinte desta cadeia é o complexo III (também chamado ubiquinol:citocromo c oxidoreductase ou citocromo  $bc_1$ ), que transfere elétrons da ubiquinona para o citocromo c. Tem peso molecular aproximado de 240KDa com 11 proteínas com três subunidades, uma citocromo b com dois grupos heme  $b_H$  e  $b_L$ , uma Citocromo c com um grupo heme e uma proteína ferro-enxofrede (Zhang *et al.*, 1998; Iwata *et al.*, 1998; Crofts, 2004).

O complexo IV, citocromo C oxidase, possui três subunidades codificadas por genes mitocondriais (*MT-COI*, *MT-COII* e *MT-COIII*), mais 10 subunidades provenientes de genes nucleares, dois grupos heme e dois átomos de cobre, tendo peso molecular de 204 kDa. Elétrons são doados para a citocromo c e repassados para o  $O_2$ , formando conseqüentemente  $H_2O$ . Juntamente com esse processo prótons são transportados da matriz da membrana interna mitocondrial para o espaço intermembranar, aumentando o gradiente de iônico (Capaldi, 1990; De Paepe, 2012).

O ATP é finalmente formado pelo complexo V, também chamado de ATP sintase. Esse complexo apresenta dois domínios, o  $F_1$  (na matriz mitocondrial) e o  $F_0$  (ancorada na membrana interna da mitocôndria). Ele funciona como um motor, se utilizando do fluxo de prótons gerado pelo gradiente iônico que foi formado desde o complexo I, para transformar o ADP e gerar ATP. Dois genes mitocondriais estão envolvidos na produção de proteínas para esse complexo, a *ATPase 6* e *ATPase 8* (Jonckheere *et al.*, 2012; Ghaffarpour *et al.*, 2014).

Mutações em genes mitocondriais que expressam subunidades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons já foram relacionados com vários tipos diferentes de câncer, como de mama, pâncreas, próstata, tireoide e bexiga (Chatterjee *et al.*, 2006). Defeitos em qualquer um desses genes mitocondriais são potencialmente preocupantes devido a importância das suas proteínas na formação dos complexos da cadeia respiratória. Alguns autores acreditam que mutações no DNA mitocondrial responsáveis pela expressão de complexos da cadeia transportadora de elétrons não seriam promotoras do processo de iniciação do câncer (Ju *et al.*, 2014), mas teriam sim um papel na diminuição da utilização dessa via nas células tumorais e também seriam associadas com tipos mais agressivos de câncer e metástase. (Bonora *et al.*, 2006; He *et al.*, 2013; Birsoy *et al.*, 2014)

O câncer é uma doença muito complexa que apresenta diferentes estratégias metabólicas para alcançar sucesso na sua proliferação. Dessa forma estudar mais profundamente as mutações mitocondriais, uma vez que esses genes expressam proteínas essenciais para a cadeia transportadora de elétrons, apresenta importância para desenvolvimento de novos alvos para terapias e diagnósticos mais eficientes.

#### 1.4. MODELO ANIMAL

Estudos xenográficos são importantes devido ao seu valor na adição de conhecimento quanto ao espécime utilizado e sua característica de previsão em outros organismos similares. Existem vários modelos animais que podem ser utilizados para fins de estudos e desenvolvimentos de tecnologia, como roedores, peixes, e primatas não humanos. No Brasil, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) juntamente com o Ministério da Ciência e tecnologia organizam os caracteres normativos para a utilização desses recursos vivos de maneira respeitosa e consciente (CONCEA, 2015).

Entre os animais mais utilizados nesses trabalhos são o peixe-zebra (*Danio rerio*) (Langenau *et al.*, 2003; Howe *et al.*, 2013; Yen *et al.*, 2014), murinos (como ratos e camundongos) (Pantaleao & Luchs, 2010) e primatas não humanos.

*Sapajus apella* é uma espécie pertencente aos macacos do Novo Mundo, bastante utilizada em estudos como modelo animal devido sua flexibilidade, adaptabilidade e tamanho em comparação a outros primatas não humanos, o que facilita a criação em viveiros de primatas (Borges da Costa *et al.*, 2011).

Além dessas características, primatas apresentam um ciclo de vida mais longo, o que permite estudos de carcinogênese de longa duração, se assemelhando ao que acontece com humanos, além de apresentarem homologia genética, fisiológica e comportamental. Outro ponto positivo na utilização dessa espécie, é o tamanho dos seus órgãos, que facilita a realização de exames periódicos de imagem e retirada de amostras (Takayama *et al.*, 2008; Messaoudi *et al.*, 2011).

#### 1.5. QUÍMICOS

Em estudos de modelo animal são geralmente utilizadas substâncias para induzir mutagênese e iniciação do processo tumoral. A N-metil-N-nitrosurea (MNU) é apontada

como um agente alquilante capaz de interagir com o DNA podendo causar mutações e por este motivo ele tem sido utilizado para provocar a carcinogêneas em modelos animais (Faustino-Rocha *et al.*, 2013; Soares-Maia *et al.*, 2013).

Por ser um produto nitrogenado resultante do metabolismo de creatina, formado na presença de nitrito do ácido gástrico, ele pode reagir com a guanina do DNA levando a produção de O<sup>6</sup>-metilguanina. Durante a replicação, esse último composto pode ser pareado erroneamente causando mutações ou até mesmo lesões e quebras no DNA (nesse caso a DNA polimerase acaba pareando a O<sup>6</sup>MG com uma timina, levando ao erro de leitura de O<sup>6</sup>MG:T para A:T) (Doniger *et al.*, 1985; Sen *et al.*, 2001; Quiros *et al.*, 2010; Herzig *et al.*, 2016).

O reparo de O<sup>6</sup>MG para um guanina novamente é geralmente feito pelo O<sup>6</sup>-metilguanina DNA metiltransferase (*MGMT*), porém quando este reparo falha antes da replicação resultando no pareamento de O<sup>6</sup>MG:T, o mecanismo de reparo de pareamento errôneo (MMR – *mismatch repair*) é ativado para retirar a timina desse pareamento. Quando o O<sup>6</sup>MG permanece na fita a timina é adicionada novamente e o mecanismo de reparo continua tentando corrigir o pareamento, entrando em um ciclo de reparo fútil (*futile repair loop*), podendo levar a quebra da dupla fita e posteriormente a apoptose (Kondo *et al.*, 2010).

Esse composto é interessante principalmente para estudos de cancer gástrico pois induz lesões pré-neoplásicas semelhantes às que ocorrem anteriormente ao desenvolvimento de adenocarcinomas gástricos do tipo intestinal (Tsukamoto *et al.*, 2007)

Considerando que o câncer gástrico ainda é um dos tipos mais frequentes e mortais de câncer no mundo, torna-se importante o entendimento do comportamento deste tipo de tumor. Assim, a comparação *in vivo* das possíveis mutações no DNA mitocondrial em linhagens de câncer gástrico em modelos xenográficos de câncer humano, bem como a avaliação do efeito mutagênico de MNU sobre estas pode ajudar no entendimento desta dinâmica tumoral. A utilização do modelo animal é importante devido a interação de diferentes ácidos e enzimas presentes no órgão que é objeto do estudo, o estômago, com as linhagens utilizadas.

## 1.6. OBJETIVOS

### 1.6.1. Objetivo Geral

Avaliar, *in vivo*, a integridade do genoma mitocondrial em linhagens de câncer gástrico implantadas em um modelo animal.

### 1.6.2. Objetivos específicos

- Avaliar alterações nucleotídicas dos genes do complexo I (*ND1* e *ND3*), complexo IV (*COI*) e complexo V (*ATPase8*) do DNA mitocondrial em linhagens de câncer gástrico humano implantadas em primatas da espécie *Sapajus apella*
- Avaliar as possíveis alterações no DNA mitocondrial causadas pelo agente carcinogênico MNU, que causa mutações semelhantes as lesões causadas pelo câncer gástrico naturalmente

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. AMOSTRAS

O projeto contou com 13 espécimes de primatas da espécie *Sapajus apella* criados conforme exigido por lei e aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal do Pará (Parecer MED002-10) no Centro Nacional de Primatas, localizado em Belém, na rodovia BR-316 – Km 7. Os animais foram avaliados por veterinários e apresentavam bom estado de saúde. Todos os animais foram identificados com *microchips* e seguiam uma dieta balanceada sem adição de sódio. Os indivíduos tinham entre sete e seis anos, pesando entre 2,7 e 3,6 kg. As amostras estão descritas na tabela a seguir:

Tabela 3. Descrição das amostras.

Amostra	Linhagem	Tempo*	MNU
AGP01-7		7 dias	--
AGP01-14	AGP01	14 dias	--
AGP01-MNU		7 dias	16 mg/Kg
ACP02-7		7 dias	--
ACP02-14	ACP02	14 dias	--
ACP02-MNU		7 dias	16 mg/Kg
ACP03-7		7 dias	--
ACP03-14	ACP03	14 dias	--
ACP03-MNU		7 dias	16 mg/Kg
PG100-7	PG100	7 dias	--
PG100-MNU		7 dias	16 mg/Kg
CS256-7	Carcinossarcoma 256 de Walker	7 dias	--
CS256-14		14 dias	--

\*tempo desde a inoculação das linhagens nos animais até a retirada cirúrgica dos tumores.

Alguns animais receberam, concomitantemente com as linhagens, MNU (16mg/kg) por via oral. Após 72 horas, as linhagens causaram crescimento tumoral e após uma semana ou quatorze dias os tumores foram recuperados por meio de cirurgia. Em dois animais foram implantadas células do carcinossarcoma 256 de Walker, uma linhagem de câncer de mama de rato albino (*Wistar rats*) que se prolifera em uma grande variedade de

animais e órgãos, com objetivo de ser o controle positivo (McEuen & Thomson, 1933; Lewis *et al.*, 2013; Shenoy *et al.*, 2016).

AGP01 é uma linhagem originária de células tumorais obtidas de um aspirado de líquido ascítico e classificada como do tipo intestinal. As linhagens ACP03 e ACP02 foram isoladas de adenocarcinomas gástricos primários, sendo o primeiro classificado como tipo intestinal e o último como difuso. As três linhagens foram retiradas de pacientes do norte do Brasil e estabelecidas pela equipe do laboratório de Citogenética Humana do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. Elas apresentam cariótipo com alterações cromossômicas, sendo a mais comum a trissomia dos cromossomos 7, 8 e deleção do braço pequeno do cromossomo 17. Adicionalmente, foi detectada também a trissomia do cromossomo 17 em ACP03 e AGP01 (Leal, 2009, 2011).

A linhagem PG100 foi obtida do Banco de células do Rio de Janeiro, sendo um adenocarcinoma gástrico primário que compartilha das principais alterações genéticas encontradas em câncer gástricos, como a trissomia do cromossomo 8 e deleção do braço curto do cromossomo 17 (Ribeiro *et al.*, 2010).

## 2.2. EXTRAÇÃO DO DNA

As amostras de tecido gástrico foram coletadas e submetidas à biopsia, sendo posteriormente submetidas ao processo de extração do DNA pelo laboratório de Biologia Molecular, com utilização do *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen, Mainz, Rheinland-Pfalz, Alemanha) e concedido para este estudo pelo Professor Doutor Rommel Rodríguez Burbano.

## 2.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

As sequências genômicas utilizadas para os iniciadores desse estudo, se encontram descritas na Tabela 4. As reações de cadeia de polimerase foram feitas com o volume final de 25 µl, sendo 50 ng de DNA, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 10xPCR buffer, 0,20mM de dNTP, 10pM de cada um dos indicadores específicos e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (*ThermoFisher Scientific*). Os tempos, temperaturas e número de ciclos utilizados na ciclagem estão especificados na Tabela 5.

Tabela 4. Iniciadores utilizados nas PCR deste trabalho.

Região	Iniciador	Seqüência (5' – 3')	Tam pb	Referência
<i>COI</i>	COI – F	GTTGTAGCCCACTTCCAC	222	Li <i>et al.</i> (2002)
	COI – R	CATCGGGGTAGTCCGAGTAA		
<i>ATPase 8</i>	ATPase 8 – F	CCCACCATAATTACCCCAT	102	Li <i>et al.</i> (2002)
	ATPase 8 – R	TTTTATGGGCTTTGGTGAGG		
<i>ND1</i>	ND1F	GACGCCATAAAACTCTTCAC	390	Maximo <i>et al.</i> (2001)
	ND1R	GGTTGGTCTCTGCTAGTGTG		
<i>ND3</i>	ND3F	CCTGCCACTAATAGTTATGTC	210	Maximo <i>et al.</i> (2001)
	ND3R	GATATGAGGTGTGAGCGATA		

Tabela 5. Temperaturas, tempos e ciclos.

Região	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Ciclos
<i>COI</i>	94°C/3min	57°C/35seg	72°C/4min	35
<i>ATPase 8</i>	94°C/5min	58°C/30seg	72°C/5min	35
<i>ND1</i>	95°C/4min	54°C/30seg	72°C/10min	35
<i>ND3</i>	95°C/4min	54°C/30seg	72°C/10min	35

Para visualização das amplificações, foram utilizados 3µl do produto da PCR, 2 µl GelRed™ (Biotium) e 2µl de corante de visualização (5 mL glicerol, 1 mL de azul de bromofenol 0,1%, 1 mL de xileno-cianol 0,1%, 2 mL de EDTA 0,5M) em gel de agarose a 2%, eletroforese horizontal e tampão (Tris-Borato-EDTA 1x), com corrente de 100V por aproximadamente 15 minutos. Por fim, as confirmações das bandas positivas foram feitas em transiluminador com luz ultravioleta.

Após a PCR, os fragmentos amplificados foram sequenciados utilizando o sequenciador ABI3130 (*ThermoFisher Scientific*), a reação de sequenciamento foi realizada utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (*ThermoFisher Scientific*).

As sequencias foram alinhadas e analisadas utilizando o programa BioEdit 7.2.6.1 (Hall, 2013), com uma sequência de referência do DNA mitocondrial humano, retirada do banco de dados NCBI (*NCBI Reference Sequence*: NC\_012920.1).

#### 2.4. MODELO DA ALTERAÇÃO DA PROTEÍNA

Quando identificada uma alteração que resultasse em mudança de aminoácido, a estrutura da proteína resultante foi analisada através de modelagem 3D com o auxílio do software SWISS-MODEL (Biasini *et al.*, 2014).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. MODELO ANIMAL

Todas as diferentes linhagens utilizadas no presente estudo tiveram sucesso em causar crescimento tumoral nos animais mesmo após um curto período de tempo (de uma a duas semanas). A utilização de primatas em modelos de estudo do câncer humano se apresenta eficiente devido à complexidade fisiológica e a homologia genética desses animais com a espécie humana, o que habilita a produção de estudos sem ser necessária restrição do sistema imune dos animais para o sucesso de estudos xenográficos. No estudo de câncer gástrico é importante se escolher uma espécie que tenha maior similaridade com os seres humanos, o que conseqüentemente é um ponto relevante na utilização de modelos com primatas em vez de roedores. Por exemplo, o estômago de ratos é dividido em duas regiões, a glandular e não glandular, enquanto que o de humanos é linear, sendo todo constituído por mucosa glandular (Kararli, 1995). Adicionalmente, também ocorrem diferenças no pH estomacal dos ratos e humanos (Tennant *et al.*, 2008) sendo o de primatas mais semelhantes.

#### 3.2. ALTERAÇÕES COM TROCA DE UMA ÚNICA BASE

A mitocôndria é uma organela de grande importância na célula, devido ao seu papel na formação de ATP, conseqüentemente sendo conhecida como a usina de energia celular de inúmeras espécies de organismos. Durante o processo de formação de energia a mitocôndria acaba produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem contribuir para mutações no DNA mitocondrial.

Neste trabalho não foram encontradas alterações nos genes *COI* e *ATP8*, o que corrobora os resultados de Luo *et al.* (2010) em tumores gástricos. A Citocromo oxidase I é uma das subunidades codificadas pelo mtDNA que formam o complexo IV da cadeia respiratória, e alterações neste gene foram encontradas em diferentes tipos de câncer, como câncer de mama (Ghatak *et al.*, 2014) e próstata (Ray *et al.*, 2009; Scott *et al.*, 2012). Já o gene *ATPase8* é uma das subunidades da ATP sintase, e mutações nesse gene já foram relacionadas ao câncer de mama (Grzybowska-Szatkowska *et al.*, 2014).

Em seu estudo sobre carcinomas colorretais, Araujo e colaboradores (2015) identificaram uma alta taxa de mutações nos genes mitocondriais do complexo I neste tipo tumoral. No presente estudo, no gene *NDI* foram observadas duas alterações. A primeira foi

uma transição C→T na posição 3594 do DNA mitocondrial, localizada na posição 3 do códon 96 do gene *ND1* (Tabela 6; Figura 7). Essa mudança não altera a transcrição do aminoácido (mutação sinônima), que continua sendo uma valina (Val). Algo semelhante ocorre na transição encontrada na posição 3693 (G→A), que não acarreta uma mudança de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *ND1* (Leu→Leu), sendo, portanto, sinônima (Tabela 6; Figura 8) (Maca-Meyer *et al.*, 2001; Herrnstadt *et al.*, 2002; Brandon *et al.*, 2006). Essas alterações não parecem apresentar relação com o desenvolvimento do câncer gástrico. A posição 3594T é associada ao perfil do haplogrupo mitocondrial L1/L2 (Wallace, 2007; MITOMAP, 2017), relacionado a descendência africana. A população brasileira é bastante miscigenada e apresenta descendência europeia, africana e indígena. A população do norte do Brasil tem a maior taxa de marcadores de descendência indígena em comparação com outras regiões do país, devido ao processo de colonização sofrido nessa região, tendo maior ancestralidade europeia, seguida de indígena e africana na população do Norte (Santos *et al.*, 1999; Alves-Silva *et al.*, 2000; Pena *et al.*, 2011). Apesar de ser relacionada à ancestralidade genética, a presença desses marcadores nas amostras analisadas parece ser resultado do acaso, uma vez que não temos como confirmar a descendência do paciente que originou essas amostras.

Tabela 6. Alterações de uma única base identificadas nas amostras.

Gene	Troca de nucleotídeo	Posição da alteração	Aminoácido	Amostras alteradas
<i>ND1</i>	C→T	3594	Val→Val	ACP03-14, ACP03-MNU, CS256-7, CS256-14
<i>ND1</i>	G→A	3693	Leu→Leu	ACP03-14, ACP03-MNU, CS256-7, CS256-14
<i>ND3</i>	A→G	10398	Thr→Ala	ACP03-14, ACP03-MNU, PG100-MNU, CS256-7, CS256-14

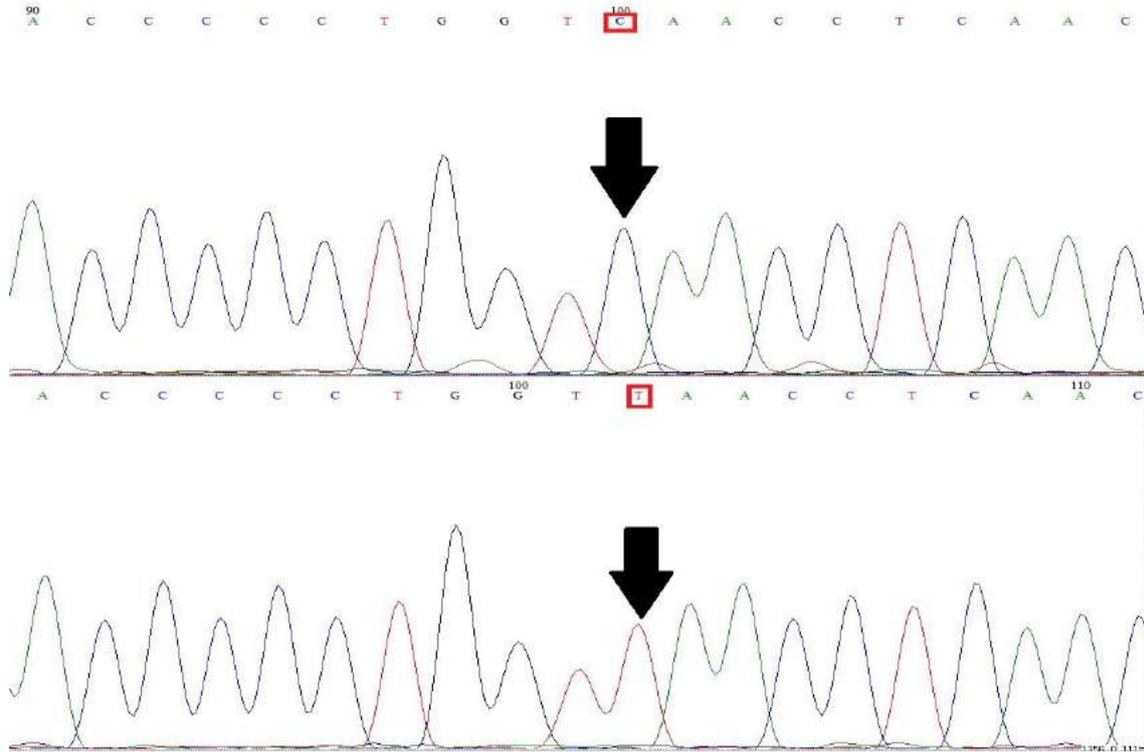


Figura 7. Alteração no gene *NDI* de citosina para timina, na posição 3594 do mtDNA. Cromatograma superior da amostra PG100-7, sem a alteração e na parte inferior a amostra ACP03-14, com alteração.

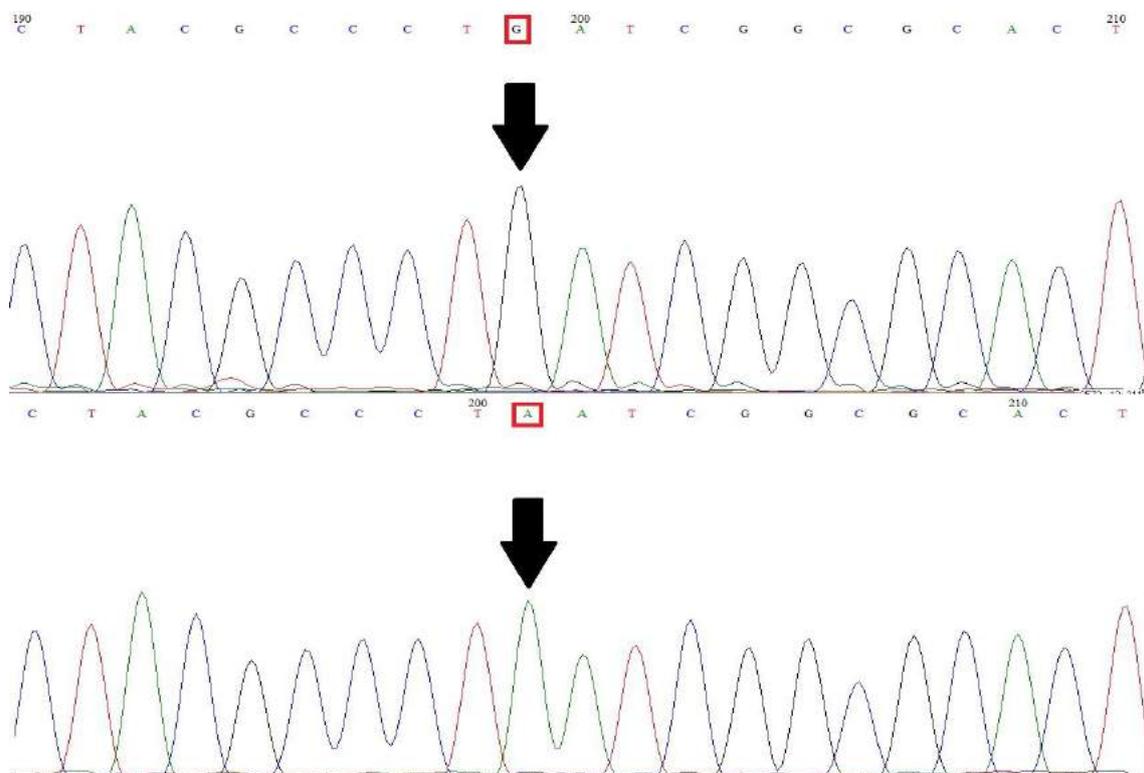


Figura 8. Alteração no gene *NDI* de guanina para adenosina, na posição 3693 do mtDNA. Cromatograma superior da amostra PG100-7, sem a alteração, e na parte inferior a amostra ACP03-14, alterada.

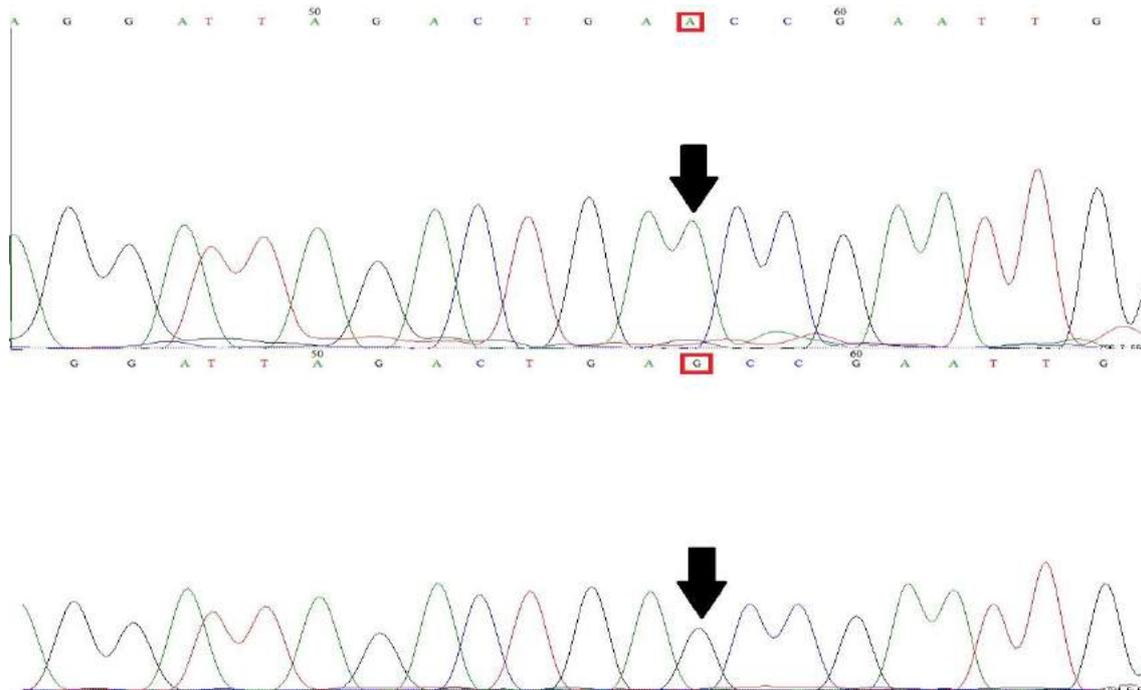


Figura 9. Alteração no gene *ND3* de guanina para adenosina, na posição 10398 do mtDNA. Cromatograma superior da amostra PG100-7, sem a alteração, e na parte inferior a amostra ACP03-14, alterada.

Na região responsável pela transcrição da unidade ND3 do Complexo I, foi detectada a transição de uma adenina para guanina na posição 10398 do DNA mitocondrial (Tabela 6; Figura 9), já descrita na literatura como altamente polimórfica (Czarnecka *et al.*, 2010; Mao *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2015). Essa alteração do DNA mitocondrial acarreta na mudança de treonina (Thr) para alanina (Ala), na posição 114 localizada na extremidade carboxi-terminal da subunidade ND3 do complexo I da cadeia respiratória (Fang *et al.*, 2010).

Canter e colaboradores (2006) detectaram uma associação inversa do polimorfismo 10398G e o câncer de mama invasivo em uma população afro-americana, sendo o alelo 10398A ligado a esse tipo de tumor. Apesar disso, essa relação ainda não é bem compreendida, ocorrendo discordâncias na literatura (Setiawan *et al.*, 2008; Mosquera-Miguel *et al.*, 2008). Esse mesmo padrão também foi observado em um estudo de câncer de mama na Índia (Darvishi *et al.*, 2007). Os alelos A e G parecem ter diferentes correlações dependendo do grupo étnico ao qual ele é relacionado, sendo que em populações afro-americanas o polimorfismo 10398A estaria relacionado ao câncer de mama e próstata (Canter *et al.*, 2006; Mims *et al.*, 2006), enquanto que em populações europeias a alteração 10398G foi correlacionada ao câncer de mama (Bai *et al.*, 2007; Czarnecka *et al.*, 2010). Apesar de ser mais estudado em câncer de mama, o polimorfismo na posição 10398 também já foi

identificado em doenças neurodegenerativas (Chu *et al.*, 2015), desordens psiquiátricas (Hwang *et al.*, 2017) e outros tipos de câncer, como o de tireoide (Yeh *et al.*, 2000) e próstata (Arnold *et al.*, 2015).

Sabe-se que o metabolismo tumoral é prioritariamente glicolítico visto que parte de suas células carregam mitocôndrias disfuncionais. Dessa forma, a troca de aminoácido A114T já foi objeto de diversos estudos *in vitro* sobre sua função. No entanto, não há ainda consenso na literatura sobre a funcionalidade desta alteração. Um estudo associou um maior pH da matriz mitocondrial nas células com polimorfismo 10398G em comparação com células portadoras do polimorfismo 10398A. Com isso, foi levantada a hipótese de que o pH mitocondrial teria papel na produção de ATP, apoptose e na mudança na permeabilidade de poros na membrana da mitocôndria. Quando a atividade do complexo I foi avaliada, observou-se, também, que células com o alelo A tiveram menor atividade deste complexo em comparação com as com o alelo G, suportando a hipótese de que o pH influenciaria nas funções da mitocôndria. Além disso, no alelo A também foi constatado o aumento da concentração de cálcio no interior da mitocôndria e a resposta à histamina (Kazuno *et al.*, 2006; Stafford & Chen-Quin, 2010).

Ainda em relação ao metabolismo celular, um estudo comparativo com os dois alelos em linhagens de câncer de mama isoladas de pacientes afro-americanas, demonstrou que o alelo A apresentava um atraso no ciclo celular em comparação com o alelo G, devido a uma maior atividade do complexo I, um dos maiores produtores de ROS da cadeia respiratória. Essas linhagens também apresentaram maior resistência a apoptose mediada por etopósido e maior capacidade de metástase, em comparação com a linhagem do alelo G (Kulawiec *et al.*, 2009). Além do aumento da produção de ROS, também foram observadas em linhagens com a alteração 10398G a diminuição da atividade da enzima glicolítica Piruvato Cinase M2, o aumento da captação de glicose e da produção de lactato (Singh *et al.*, 2014).

Outro estudo feito em uma população malaia, também sugeriu não só que o alelo G, mais frequente em pacientes com câncer de mama, seria um marcador para essa doença, mas também que esse polimorfismo aumentaria a produção de ROS, alterando a função do complexo I e inibindo a apoptose através do alto nível de expressão do gene anti-apoptótico *BCL-2* (Nadiyah *et al.*, 2012). Além disso, foi também sugerido que células portadoras deste polimorfismo sensibilizariam as células normais ao seu redor, induzindo a apoptose dessas, enquanto as células tumorais com alterações no Complexo I da Cadeia de Transporte de

Elétrons, estariam protegidas da indução da morte celular, tornando-se as dominantes sobreviventes da massa tumoral (Baharudin *et al.*, 2012).

A análise da molécula proteica nos permitiu identificar as diferenças entre a ND3 selvagem e ND3 com a alteração do penúltimo aminoácido (Figura 10), resultante da alteração A10398G. Foi possível identificar um menor índice de solvatação (1,68) e maior índice de torção (-4,0) da proteína resultante da alteração em comparação com a normal (respectivamente 1,75 e -3,63). Como Costa Junior (2016) bem resumiu em seu trabalho “O índice de solvatação, que é o índice de dissolução de composto iônico polar em substância polar, reflete uma menor interação da molécula com o meio, no caso a membrana interna mitocondrial. Vale lembrar que o gradiente iônico existente no espaço intermembranar mitocondrial pode ser comprometido pelo índice de solvatação”. Neste trabalho foi concluído que isso possa ter sido causado pela troca de um aminoácido polar (Thr) por um apolar (Ala). Apesar disso, as consequências do aumento na torção na função proteica ainda não estão bem esclarecidas. Sabe-se que a diminuição da torção da proteína ND1 em gliomas, causado por uma inserção na posição 3883, pode comprometer a seletividade de poros para hidrogênio, acarretar na redução do pH do espaço intermembranar, comprometendo a cadeia de transporte de elétrons (Costa Junior, 2016). Neste estudo o aumento da torsão pode estar corroborando com o estudo de Kazuno *et al.* (2006) e Canto *et al.* (2016), que sugerem que células com o alelo G tem seu Complexo I com atividade mais aumentada do que células com o alelo A.

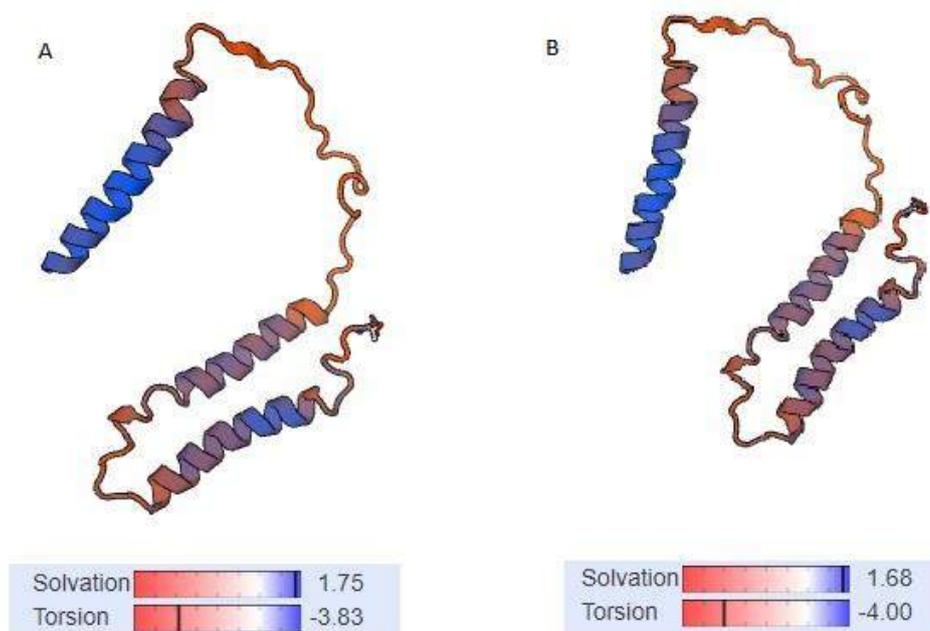


Figura 10. Modelo das proteínas codificadas pelo gene *ND3*. A) Proteína normal, sem a alteração; B) Proteína alterada, com a alteração no penúltimo aminoácido (114Ala).

Apesar de não se ter muitas informações sobre o tumor de onde a linhagem PG100 foi isolada, sabe-se que a linhagem ACP03 foi isolada de um tumor gástrico do tipo intestinal em estágio mais avançado (T4N1M0) do que o observado nas linhagens AGP01 (T3N2M1) e ACP02 (T3N2M0) (Leal *et al.*, 2009). A alteração 10398G foi observada na linhagem controle de Carcinossarcoma 256 de Walker, conhecida por ter um comportamento extremamente agressivo, crescimento muito rápido e pequeno período de latência (Moraes *et al.*, 2000). Essa mesma alteração só foi observada em ACP03 após 14 dias de implantação no modelo xenográfico, o que pode indicar o aumento da agressividade da mesma com o passar do tempo, devido as alterações no Complexo I. Da mesma forma, o MNU parece atuar aumentando a agressividade das linhagens, visto que ACP03-MNU e PG100-MNU também apresentaram esta alteração (Figura 11), mesmo com um tempo menor de implantação (7 dias).

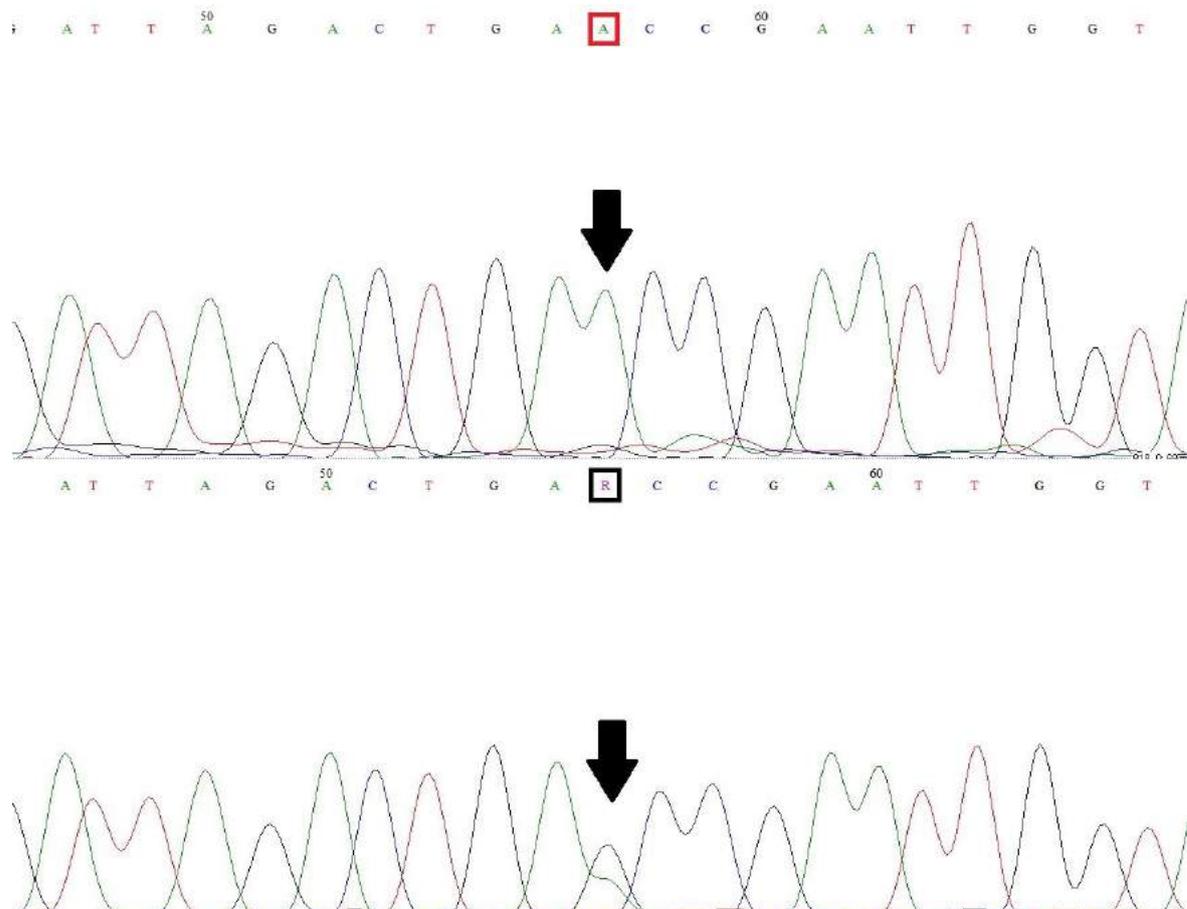


Figura 11. Alteração no gene *ND3* de guanina para adenosina, na posição 10398 do mtDNA. Cromatograma superior da amostra PG100-7, sem a alteração e na parte inferior a amostra PG100-MNU.

### 3.3. HETEROPLASMIA

O DNA mitocondrial existe em abundância nas células, uma vez que cada mitocôndria possui mais de cinco cópias de DNA. Isso abre uma maior possibilidade para que mutações ocorram nessas moléculas, resultando em uma heterogeneidade. Quando alguma posição do mtDNA apresenta dois “alelos” diferentes, pode-se dizer que a população de mitocôndrias daquela célula não é exatamente idêntica, e que o mtDNA selvagem e o alterado coexistem em um estado chamado de heteroplasmia (He *et al.*, 2010). Neste estudo foram identificados dois sítios heteroplásmicos em apenas uma amostra (PG100-MNU), nas posições 3594 e 3693 (Tabela 7; Figuras 12, 13).

A heteroplasmia pode não causar nenhuma alteração grave, bem como também pode levar a patogenicidade (Elliott *et al.*, 2008). Esse estado pode ser decorrente da simples divisão celular, por exemplo no caso da segregação vegetativa, onde uma célula com mitocôndrias em estado de heteroplasmia se divide em duas, resultando em uma célula filha com o mtDNA selvagem e outra com o alterado, com a seleção ocorrendo em nível celular (Stewart & Chinnery, 2015). Estudos recentes têm relacionado o valor de heteroplasmia para prognósticos em diferentes doenças (Qi *et al.*, 2016; Sequeira *et al.*, 2015).

Um estudo de câncer de pulmão, demonstrou que tumores induzidos por MNU apresentam maior número de mutações de apenas um nucleotídeo em comparação com outro modelo de camundongos com o proto-oncogene *Kras* geneticamente ativado (Westcott *et al.*, 2015). Kurowska e colaboradores (2012) demonstraram mutações induzidas em plantas por MNU se apresentaram em sua maioria como transições. Isso também foi visto tanto nos casos de troca de nucleotídeo e heteroplasmia ocorridas na amostra PG100-MNU. Esse tipo de alteração, observado apenas nessa linhagem, pode ser indicativo de um melhor funcionamento do O<sup>6</sup>-metilguanina DNA metiltransferase (*MGMT*), principal gene que faz o reparo de O<sup>6</sup>-metilguanina para uma guanina novamente, nas outras linhagens em comparação com a PG100 (Shiraishi *et al.*, 2000; Fahrer *et al.*, 2013).

Tabela 7. Heteroplasmias identificadas na amostra PG100-MNU de adenocarcinoma gástrico.

Amostra	Nucleotídeo	Posição alteração	Gene
PG100-MNU	C/T	3594	<i>NDI</i>
PG100-MNU	A/G	3693	<i>NDI</i>

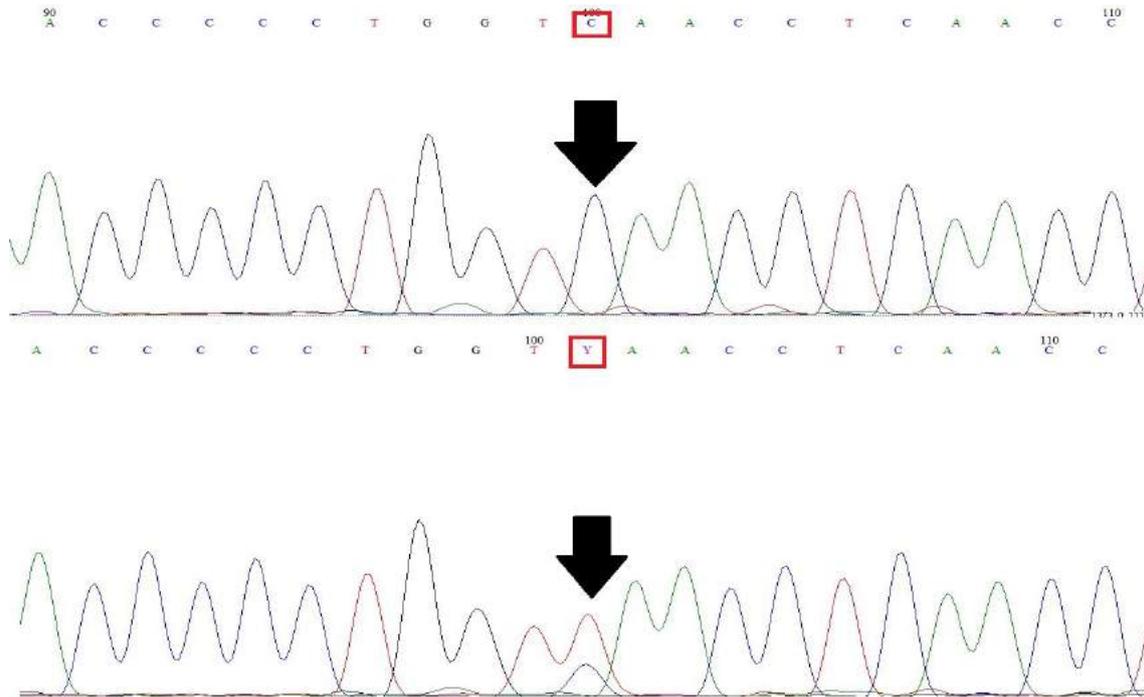


Figura 12. Heteroplasmia no gene *ND1* na posição 3594 do mtDNA. Cromatograma superior da amostra PG100-7, sem a alteração e na parte inferior a amostra PG100-MNU.

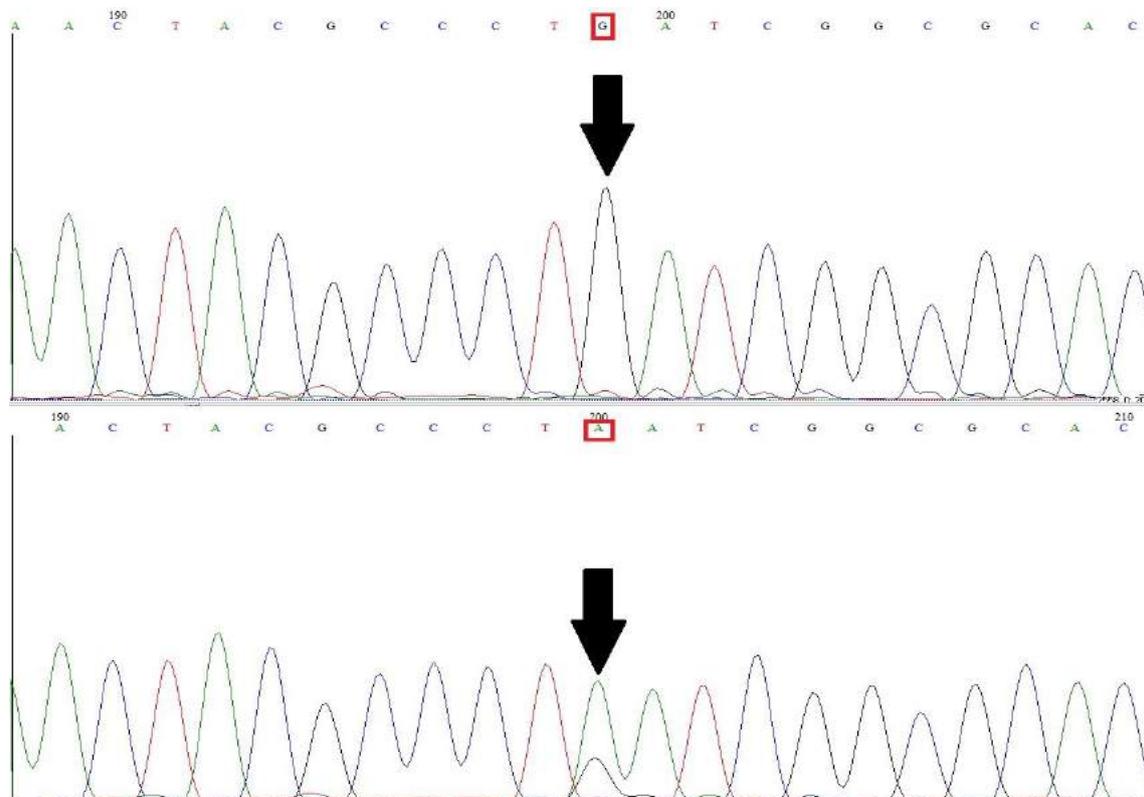


Figura 13. Heteroplasmia na posição 3698. Cromatograma superior da amostra PG100-7, sem alteração e na parte inferior da amostra PG100-MNU.

#### 4 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível se ver a capacidade de linhagens de câncer preestabelecidas em causar crescimento tumoral em *Sapajus apella*. De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

\*Alterações em genes codificadores de proteínas que fazem parte do Complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (*ND1* e *ND3*) podem ser mais presentes em outras porções do mtDNA nas linhagens de carcinoma gástrico analisadas;

\*Amostras com maior grau de agressividade (CS256-7 e CS256-14) apresentaram mudança de aminoácido (A10398G, p. T114A) relacionada com alterações na função do gene *ND3*. Esta mesma alteração só foi observada em amostras tratadas com MNU (ACP03-MNU e PG100-MNU) e em uma amostra retirada de um tumor invasivo (ACP03-14) com tempo maior de implantação, o que pode ser sugestivo de um aumento da agressividade destas linhagens;

\*O MNU agiu como indutor de heteroplasmias apenas na linhagem PG100, o que pode sugerir uma diferença no sistema de reparo do DNA nesta linhagem em comparação com as demais

## 5 REFERÊNCIAS

- AJANI, J.A.; LEE, J.; SANO, T.; JAJIGIAN, Y.Y.; FAN, D. & SONG, S. Gastric adenocarcinoma. **Nature Reviews**, **3**: 17036. 2017.
- ALEXEYEV, M.; SHOKOLENKO, I.; WILSON, G. & LEDOUX, S. The maintenance of mitochondrial DNA integrity--critical analysis and update. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, **5(5)**: a012641. 2013.
- ALVES-SILVA, J.; SANTOS, M.S.; GUIMARÃES, P.E.M.; FERREIRA, A.C.S.; BANDELT, H-J., PENA, S.D.J. & PRADO, V.F. The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. **Am J Genet**, **67**: 444-461, 2000.
- AMES, B.N.; GOLD, L.S. & WILLETT, W.C. The causes and prevention of cancer. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **92**:5258-5265. 1995.
- ANDERSON, S.; BANKIER, A. T.; BARRELL, B. G.; DE BRUIJN, H. L.; COULSON, A. R.; DROUIN, J.; EPERON, I. C.; NIERLICH, D. P.; ROE, B. A.; SANGER, F.; SCHREIER, P. H.; SMITH, A. J. H.; STADEN, R. & YOUNG, I. G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, **290**:457-465. 1981.
- ARAUJO, L.F.; FONSECA, A.S.; MUYS, B.R.; PLAÇA, J.R.; BUENO, R.B.; LORENZI, J.C.; SANTOS, A.R.; MOLFETTA, G.A.; ZANETTE, D.L.; SOUZA, J.E.; VALENTE, V.; SILVA JR, W.A. Mitochondrial genome instability in colorectal adenoma and adenocarcinoma. **Tumour Bio** **36(11)**:8869-8879. 2015.
- ARNOLD, R. S.; FEDEWA, S. A.; GOODMAN, M.; OSUNKOYA, A. O.; KISSICK, H. T.; MORRISSEY, C. & PETROS, J. A. Bone metastasis in prostate cancer: Recurring mitochondrial DNA mutation reveals selective pressure exerted by the bone microenvironment. **Bone**: 78, 81-86. 2015.
- BAENKE, F.; DUBUIS, S.; BRAULT, C.; WEIGELT, B.; DANKWORTH, B.; GRIFFITHS, B.; JIANG, M.; MACKAY, A.; SAUNDERS, B.; SPENCER-DENE, B.; ROS, S.; STAMP, G.; REIS-FILHO, J.S.; HOWELL, M.; ZAMBONI, N. SCHULZE, A. Functional screening identifies MCT4 as a key regulator of breast cancer cell metabolism and survival. **Journal of Pathology**, **237**:152-165. 2015.
- BAHARUDIN, N. T.; JAAFAR, H. & ZAINUDDIN, Z. Association of mitochondrial DNA 10398 polymorphism in invasive breast cancer in malay population of peninsular Malaysia. **The Malaysian journal of medical sciences: MJMS**, **19(1)**: 36. 2012.
- BAI, R. K.; LEAL, S. M.; COVARRUBIAS, D.; LIU, A. & WONG, L. J. C. Mitochondrial genetic background modifies breast cancer risk. **Cancer research**, **67(10)**: 4687-4694. 2007.
- BECKER, K.; ATKINSON, M.J.; REICH, U.; BECKER, I.; NEKARDA, H.; SIEWERT, J.R. & HÖFLER, H. E-Cadherin Gene Mutations Provide Clues to Diffuse Type Gastric Carcinomas. **Cancer Research**, **54**:3845-3852. 1994.

BERLTH, F.; BOLLSCHWEILER, E.; DREBBER, U.; HOELSCHER, A.H. & MOENIG, S. Pathohistological classification systems in gastric cancer: Diagnostic relevance and prognostic value. **World J Gastroenterol**, (19):5679-5684. 2014.

BIASINI, M; BIENERT, S; WATERHOUSE, A; ARNOLD, K; STUDER, G; SCHMIDT, T; KIEFER, F; CASSARINO, TG; BERTONI, M; BORDOLI, L; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: modeling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, 42(1): 252-258. 2014.

BIRSOY, K.; POSSEMATO, R.; LORBEER, F.K.; BAYRAKTAR, E.C.; THIRU, P.; YUCEL, B.; CHEN, W.W.; CLISH, C.B. & SABATINI, D.M. Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. **Nature**, 508(7494):108-112. 2014.

BONEQUI, P.; MENESES-GONZÁLEZ, F.; CORREA, P.; RABKIN, C. S.; CAMARGO, M. C. Risk factors for gastric cancer in Latin-America: a meta-analysis. **Cancer Causes and Control**, 24(2):217-231. 2013.

BONORA, E.; PORCELLI, A.M.; GASPARRE, G.; BIONDI, A.; GHELLI, A.; CARELLI, V.; BARACCA, A.; TALLINI, G.; MARTINUZZI, A.; LENAZ, G.; RUGOLO, M. & ROMEO, G. Defective Oxidative Phosphorylation in Thyroid Oncocytic Carcinoma Is Associated with Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations Affecting Complexes I and III. **Cancer Research**, 66(12):6087-6096. 2006.

BORGES DA COSTA, J.D.F.F.; LEAL, M.F.; SILVA, T.C.R.; ANDRADE JUNIOR, E.F.; REZENDE, A.P.; MUNIZ, J.A.P.C.; LACRETA JUNIOR, A.C.C.; ASSUMPÇÃO, P.P.; CALCAGNO, D.Q.; DEMACHKI, S.; RABENHORST, S.H.B.; SMITH, M.D.A.C. & ROMMEL, R.R. Experimental Gastric Carcinogenesis in *Cebus apella* Nonhuman Primates. **PLoS ONE**, 6(7): e21988. 2011.

BRANDON, M.; BALDI, P. & WALLACE, D.C. Mitochondrial mutations in cancer. **Oncogene**, 25: 4647-4662. 2006.

BRANDT, U. Energy Converting NADH:Quinone Oxidoreductase (Complex I). **Annual Review of Biochemistry**, 75:69-92. 2006.

CALCAGNO, D. Q.; LEAL, M. F.; SEABRA, A. D.; KHAYAT, A. S.; CHEN, E. S.; DEMACHKI, S.; ASSUMPÇÃO, P. P.; FARIA, M. H. G.; RABENHORST, S. H. B.; FERREIRA, M. V. P.; DE ARRUDA CARDOSO SMITH, M. & BURBANO, R.R. Interrelationship between chromosome 8 aneuploidy, C-MYC amplification and increased expression in individuals from northern Brazil with gastric adenocarcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, 12(38): 6207-6211. 2006.

CALCAGNO, D.Q.; FREITAS, V.M.; LEAL, M.F.; DE SOUZA, C.R.; DEMACHKI, S.; MONTENEGRO, R.; ASSUMPÇÃO, P.P.; KHAYAT, A.S.; SMITH, M.A.; DOS SANTOS, A.K. & BURBANO, R.R. MYC, FBXW7 and TP53 copy number variation and expression in gastric cancer. **BMC Gastroenterol**, 13:141. 2013.

CANTER, JA; KALLIANPUR, AR; PARL, FF; MILIKAN, RC. Mitochondrial DNA G10398A polymorphism and invasive breast cancer in African- American women. **Cancer Research**, **65(17)**: 8028-8033. 2005.

CANTO, P.; GRANADOS, J.B.; RAMÍREZ, M.A.M.; REYES, E.; FERIA-BERNAL, G.; GARCÍA-GARCÍA, E.; TEJEDA, M.E.; ZAVALA, E.; TAPIA, A.; ROJANO-MEJÍA, D. & MÉNDEZ, J.P. Genetic variants in ATP6 and ND3 mitochondrial genes are not associated with aggressive prostate cancer in Mexican–Mestizo men with overweight or obesity. **Aging Male**, **19(3)**:187-191. 2016.

CAPALDI, R. A. Structure and function of cytochrome C oxidase. **Annual Review of Biochemistry**, **59**:569-696. 1990.

CARROLL, J.; FEARNLEY, I. M.; SKEHEL, M.; SHANNON, R. J.; HIRST, J. & WALKER, J.E. Bovine Complex I Is a Complex of 45 Different Subunits. **The Journal of Biological Chemistry**, **281**: 32724-32727. 2006.

CATSBURG, C.E.; GAGO-DOMINGUEZ, M.; YUAN, JM.; CASTELAO, E.; CORTESSIS, V.K.; PIKE, M.C. & STERN, M.C. Dietary sources of N-nitroso compounds and bladder cancer risk: Findings from the Los Angeles bladder cancer study. **International Journal of Cancer**, **134**:125-135. 2014.

CHABAN, Y.; BOEKEMA, E.J. & DUDKINA, N.V. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1837(4)**:418-426. 2014.

CHATTERJEE A, MAMBO E, SIDRANSKY D. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. **Oncogene**, **25**:4663–4674. 2006.

CHATTOPADHYAY, E. & ROY, B. Altered Mitochondrial Signalling and Metabolism in Cancer. **Frontiers in Oncology**, **7**:43. 2017.

CHEN, Y.; ZHANG, H.; ZHOU, H.J.; JI, W. & MIN, W. Mitochondrial Redox Signaling and Tumor Progression. **Cancers**, **8(4)**:40. 2016.

CHO, S.Y.; PARK, J.W.; LIU, Y.; PARK, Y.S.; KIM, J.H.; YANG, H.; UM, H.; KO, W.R.; LEE, B.I.; KWON, S.Y.; RYU, S.W.; KWON, C.H.; PARK, D.Y.; LEE, J.H.; LEE, S.I.; SONG, K.S.; HUR, H.; HAN, S.U.; CHANG, H.; KIM, S.J.; KIM, B.S.; YOON, J.H.; YOO, M.W.; KIM, B.S.; LEE, I.S.; KOOK, M.C.; THIESSEN, N.; HE, A.; STEWART, C.; DUNFORD, A.; KIM, J.; SHIH, J.; SAKSENA, G.; CHERNIACK, A.D.; SCHUMACHER, S.; WEINER, A.T.; ROSENBERG, M.; GETZ, G.; YANG, E.G.; RYU, M.H.; BASS, A.J. & KIM, H.K. Sporadic Early-Onset Diffuse Gastric Cancers Have High Frequency of Somatic CDH1 Alterations, but Low Frequency of Somatic RHOA Mutations Compared With Late-Onset Cancers. **Gastroenterology**, **153(2)**:536-549. 2017.

CHOMYN, A.; CLEETER, M.W.; RAGAN, C. I.; RILEY, M.; DOOLITTLE, R.F. & ATTARDI, G. URF6, Last Unidentified Reading Frame of Human mtDNA, Codes for an NADH Dehydrogenase Subunit. **Science**, **234(4776)**:614-618. 1986.

CHU, Q.; LUO, X.; ZHAN, X.; REN, Y. & PANG, H. Female genetic distribution bias in mitochondrial genome observed in Parkinson's Disease patients in northern China. **Scientific reports**, 5. 2015.

CONCEA. **Normativas do CONCEA: para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**. 2ª Edição. Brasília, 2015. 326p.

CORSO, G.; CARVALHO, J.; MARRELLI, D.; VINDIGNI, C.; CARVALHO, B.; SERUCA, R.; ROVIELLO, F. & OLIVEIRA, C. Somatic Mutations and Deletions of the E-Cadherin Gene Predict Poor Survival of Patients With Gastric Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, 31(7):868-875. 2013.

COSTA JUNIOR, C. A. **Avaliação da Integridade Genômica Mitocondrial em Gliomas de Alto e Baixo Grau na População Paraense**. Tese (Doutorado em Neurociências e Biologia Celular). Universidade Federal do Pará, Belém. 2016. 99p.

CRANE, F.L.; HATEFI, Y.; LESTER, R.L. & WIDMER, C. Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta** 25:220-221. 1957.

CRICK, F.H.C.; BARNETT, L; BRENNER, S. & WATTS-TOBIN, R.J. General nature of the genetic code for proteins. **Nature**, 192: 1227-1232. 1961.

CROCE, C. M. Oncogene and Cancer. **The New England Journal of Medicine**, 358(5):502-511. 2008.

CROFTS, A. R. The Cytochrome BC1 complex: Function in the context of Structure. **Annual Review of Physiology**, 66:689-733.2004.

CROFTS, A. R. THE CYTOCHROME BC1 COMPLEX: Function in the Context of Structure. **Annual Review of Physiology**, 66:689-733. 2004.

CZARNECKA, A. M.; KRAWCZYK, T.; ZDROŻNY, M.; LUBIŃSKI, J.; ARNOLD, R. S.; KUKWA, W. & PETROS, J. A. Mitochondrial NADH-dehydrogenase subunit 3 (ND3) polymorphism (A10398G) and sporadic breast cancer in Poland. **Breast cancer research and treatment**, 121(2): 511-518. 2010.

CZARNECKA, A. M.; KRAWCZYK, T.; ZDROŻNY, M.; LUBIŃSKI, J.; ARNOLD, R. S.; KUKWA, W.; & PETROS, J. A. Mitochondrial NADH-dehydrogenase subunit 3 (ND3) polymorphism (A10398G) and sporadic breast cancer in Poland. **Breast cancer research and treatment**, 121(2): 511-518. 2010.

D'ELIA, L.; ROSSI, G.; IPPOLITO, R.; CAPPUCCIO, F.P. & STRAZZULLO, P. Habitual salt intake and risk of gastric cancer: A meta-analysis of prospective studies. **Clinical Nutrition**, 31:489-498. 2012.

DARVISHI, K.; SHARMA, S.; BHAT, A. K.; RAI, E. & BAMEZAI, R. N. K. Mitochondrial DNA G10398A polymorphism imparts maternal Haplogroup N a risk for breast and esophageal cancer. **Cancer letters**, 249(2): 249-255. 2007.

- DE MARTEL, C.; FERLAY, J.; FRANCESCHI, S.; VIGNAT, J.; BRAY, F.; FORMAN, D. & PLUMMER, M. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. **Lancet Oncol**, **13(6)**:607-615. 2012.
- DE PAEPE, B. Mitochondrial markers for cancer: relevance to diagnosis, therapy, and prognosis and general understanding of malignant disease mechanisms. **International Scholarly Research Notices Pathology**, **2012**: 217162. 2012.
- DE STEFANI, E.; BOFFETTA, P.; RONCO, A.L.; DENEIO-PELLEGRINI, H.; CORREA, P.; ACOSTA, G.; MENDILAHARSU, M.; LUACES, M.E. & SILVA, C. Processed meat consumption and risk of cancer: a multisite case-control study in Uruguay. **British Journal of Cancer**, **107**:1584-1588. 2012.
- DEBERARDINIS, R. J. & CHANDEL, N. S. Fundamentals of cancer metabolism. **Science Advances**, **2(5)**: e1600200. 2016.
- DOHERTY, J.R. & CLEVELAND, J.L. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. **The Journal of Clinical Investigation**, **123(9)**:3685-3692. 2013.
- DONIGER, J.; DAY, R.S. & DIPAOLO, J.A. Quantitative assessment of the role of O<sup>6</sup>-methylguanine in the initiation of carcinogenesis by methylating agents. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **82**:421-425. 1985.
- DOS SANTOS, S.E.B.; RODRIGUES, J.D.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K.C. & ZAGO, M.A. Differential Contribution of Indigenous Men and Women to the Formation of an Urban Population in the Amazon Region as Revealed by mtDNA and Y-DNA. **American Journal of Physical Anthropology**, **109**: 175-180. 1999.
- EL-HUSNY, A.; RAIOL-MORAES, M.; AMADOR, M.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.M.; MONTAGNINI, A.; BARBOSA, S.; SILVA, A.; ASSUMPCÃO, P.; ISHAK, G.; SANTOS, S.; PINTO, P.; CRUZ, A. & RIBEIRO-DOS-SANTOS, A. CDH1 mutations in gastric cancer patients from northern Brazil identified by Next- Generation Sequencing (NGS). **Genetics and Molecular Biology**, **39(2)**:189-198. 2016.
- ELLIOTT, H. R.; SAMUELS, D. C.; EDEN, J. A.; RELTON, C. L. & CHINNERY, P. F. Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. **The American journal of human genetics**, **83(2)**: 254-260. 2008.
- FAHRER, J. & KAINA, B. O 6-methylguanine-DNA methyltransferase in the defense against N-nitroso compounds and colorectal cancer. **Carcinogenesis**, **34(11)**: 2435-2442. 2013.
- FANG, H.; SHEN, L.; CHEN, T.; HE, J.; DING, Z.; WEI, J.; QU, J.; CHEN, G.; LU, J. & BAI, Y. Cancer type-specific modulation of mitochondrial haplogroups in breast, colorectal and thyroid cancer. **BMC Cancer**, **10**:421. 2010.
- FANG, X.; WEI, J.; HE, X.; AN, P.; WANG, H.; JIANG, L.; SHAO, D.; LIANG, H.; LI, Y.; WANG, F. & MIN, J. Landscape of dietary factors associated with risk of gastric cancer: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. **European Journal of Cancer**, **51**:2820-2832. 2015.

- FAUSTINO-ROCHA, A.I.; SILVA, A.; GABRIEL, J.; TEIXEIRA-GUEDES, C.I.; LOPES, C.; GIL DA COSTA, R.; GAMA, A.; FERREIRA, R.; OLIVEIRA, P.A. & GINJA, M. Ultrasonographic, thermographic and histologic evaluation of MNU-induced mammary tumors in female Sprague-Dawley rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, **67**:771-776. 2013.
- FEARON, E.R. & VOGELSTEIN, B. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. **Cell**, **61**:759-767. 1990.
- FOX, J. G. & WANG, T.C. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, **117**:60-69.2007.
- GHAFFARPOUR, M.; MAHDIAN, R.; FERREIDOOONI, F.; KAMALIDEHGHAN, B.; MOAZAMI, N. & HOUSHMAND, M. The mitochondrial ATPase6 gene is more susceptible to mutation than the ATPase8 gene in breast cancer patients. **Cancer Cell International**, **14**:21. 2014.
- GHATAK, S.; LALLAWMZUALI, D.; LALMAWIA; SAPKOTA, R.; ZOTHANPUIA; PAUTU, J.L.; MUTHUKUMARAN, R.B. & KUMAR, N.S. Mitochondrial D-loop and Cytochrome Oxidase C subunit I polymorphisms among the breast cancer patients of Mizoram, Northeast India. **Curr Genet**, **60**: 201-212. 2014.
- GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. **IARC CancerBase No. 11**. Lyon, 2013. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr> Acesso em: 20 nov. 2016.
- GRANDO, S.A. Connections of nicotine to câncer. **Nature Reviews**, **14**:419-429. 2014.
- GRZYBOWSKA-SZATKOWSKA, L.; SLASKA, B.; RZYMOWSKA, J.; BRZOZWSKA, A. & FLORIANCZYK, B. Novel mitochondrial mutations in the *ATP6* and *ATP8* genes in patients with breast câncer. **Molecular Medicine Reports**, **10**: 1772-1778. 2014.
- HAJDU, S.I. A note from history: landmarks in history of cancer, part1. **Cancer @ American Cancer Society**, **117**:1097-1102. 2011.
- HALL, T. BioEdit. Biological sequence alignment editor for in 95/98/NT/2K/XP/7/8/10. Tom Hall. Ibis Biosciences. Carlsbad, CA. Current Version 7.2.5. 2013.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, **144**:646-674. 2011.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, **100**:57-70. 2000.
- HAY, N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? **Nature Reviews Cancer**, **16**:635-649. 2016.
- HE, X.; ZHOU, A.; LU, H.; CHEN, Y.; HUANG, G.; YUE, X.; ZHAO, P. & WU, Y. Suppression of Mitochondrial Complex I Influences Cell Metastatic Properties. **PLoS One**, **8**(4):e61677. 2013.

HE, Y.; WU, J.; DRESSMAN, D. C.; IACOBUZIO-DONAHUE, C.; MARKOWITZ, S. D.; VELCULESCU, V. E. & PAPADOPOULOS, N. Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumor cells. **Nature**, **464(7288)**: 610. 2010.

HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, R.U.; GALVÁN-PORTILLO, M.V.; WARD, M.H.; AGUDO, A.; GONZÁLEZ, C.A.; OÑATE-OCAÑA, L.F.; HERRERA-GOEPFERT, R.; PALMA-COCA, O. & LÓPEZ-CARRILLO, L. Dietary intake of polyphenols, nitrate and nitrite and gastric cancer risk in Mexico City. **Int J Cancer**, **125(6)**:1424-1430. 2009.

HERRNSTADT, C.; ELSON, J.L.; FAHY, E.; PRESTON, G.; TURNBULL, D.M.; ANDERSON, C.; GHOSH, S.S.; OLEFSKY, J.M.; BEAL, M.F.; DAVIS, R.E. & HOWELL, N. Reduced-Median-Network Analysis of Complete Mitochondrial DNA Coding-Region Sequences for the Major African, Asian, and European Haplogroups. **Am J Hum Genet**, **70**: 1152-1171. 2002.

HERZIG, M.C.S.; ZAVADIL, J.A.; STREET, K.; HILDRETH, K.; DRINKWATER, N.R.; REDDICK, T.; HERBERT, D.C.; HANES, M.; MCMAHAN, A.; REDDICK, R. & WALTER, C.A. DNA Alkylating Agent Protects Against Spontaneous Hepatocellular Carcinoma Regardless of O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA Methyltransferase Status. **Cancer Prev Res**, **9(3)**: 245-252. 2016.

HIRST, J. Mitochondrial Complex I. **Annual Review of Biochemistry**, **82**:551-575. 2013.

HOLLSTEIN, M.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, B. & HARRIS, C. C. p53 mutations in human cancers. **Science**, **5015**:49-53. 1991.

HOWE, K.; CLARK, M.D.; TORROJA, C.F.; TORRANCE, J.; BERTHELOT, C.; MUFFATO, M.; COLLINS, J.E.; HUMPHRAY, S.; MCLAREN, K.; MATTHEWS, L.; MCLAREN, S.; SEALY, I.; CACCAMO, M.; CHURCHER, C.; SCOTT, C.; BARRETT, J.C.; KOCH, R.; RAUCH, G.J.; WHITE, S.; CHOW, W.; KILIAN, B.; QUINTAIS, L.T.; GUERRA-ASSUNÇÃO, J.A.; ZHOU, Y.; GU, Y.; YEN, J.; VOGEL, J.H.; EYRE, T.; REDMOND, S.; BANERJEE, R.; CHI, J.; FU, B.; LANGLEY, E.; MAGUIRE, S.F.; LAIRD, G.K.; LLOYD, D.; KENYON, E.; DONALDSON, S.; SEHRA, H.; ALMEIDA-KING, J.; LOVELAND, J.; TREVANION, S.; JONES, M.; QUAIL, M.; WILLEY, D.; HUNT, A.; BURTON, J.; SIMS, S.; MCLAY, K.; PLUMB, B.; DAVIS, J.; CLEE, C.; OLIVER, K.; CLARK, R.; RIDDLE, C.; ELLIOT, D.; THREADGOLD, G.; HARDEN, G.; WARE, D.; BEGUM, S.; MORTIMORE, B.; KERRY, G.; HEATH, P.; PHILLIMORE, B.; TRACEY, A.; CORBY, N.; DUNN, M.; JOHNSON, C.; WOOD, J.; CLARK, S.; PELAN, S.; GRIFFITHS, G.; SMITH, M.; GLITHERO, R.; HOWDEN, P.; BARKER, N.; LLOYD, C.; STEVENS, C.; HARLEY, J.; HOLT, K.; PANAGIOTIDIS, G.; LOVELL, J.; BEASLEY, H.; HENDERSON, C.; GORDON, D.; AUGER, K.; WRIGHT, D.; COLLINS, J.; RAISEN, C.; DYER, L.; LEUNG, K.; ROBERTSON, L.; AMBRIDGE, K.; LEONGAMORNLETT, D.; MCGUIRE, S.; GILDERTHORP, R.; GRIFFITHS, C.; MANTHRAVADI, D.; NICHOL, S.; BARKER, G.; WHITEHEAD, S.; KAY, M.; BROWN, J.; MURNANE, C.; GRAY, E.; HUMPHRIES, M.; SYCAMORE, N.; BARKER, D.; SAUNDERS, D.; WALLIS, J.; BABBAGE, A.; HAMMOND, S.; MASHREGHI-MOHAMMADI, M.; BARR, L.; MARTIN, S.; WRAY, P.; ELLINGTON, A.; MATTHEWS, N.; ELLWOOD, M.; WOODMANSEY, R.; CLARK, G.; COPPER, J.; TROMANS, A.; GRAFHAM, D.; SKUCE, C.; PANDIAN, R.; ANDREWS, R.; HARRISON, E.; KIMBERLEY, A.; GARNETT, J.; FOSKER, N.; HALL, R.; GARNER,

P.; KELLY, D.; BIRD, C.; PALMER, S.; GEHRING, I.; BERGER, A.; DOOLEY, C.M.; ERSAN-ÜRÜN, Z.; ESER, C.; GEIGER, H.; GEISLER, M.; KAROTKI, L.; KIRN, A.; KONANTZ, J.; KONANTZ, M.; OBERLÄNDER, M.; RUDOLPH-GEIGER, S.; TEUCKE, M.; LANZ, C.; RADDATZ, G.; OSOEGAWA, K.; ZHU, B.; RAPP, A.; WIDAA, S.; LANGFORD, C.; YANG, F.; SCHUSTER, S.C.; CARTER, N.P.; HARROW, J.; NING, Z.; HERRERO, J.; SEARLE, S.M.; ENRIGHT, A.; GEISLER, R.; PLASTERK, R.H.; LEE, C.; WESTERFIELD, M.; DE JONG, P.J.; ZON, L.I.; POSTLETHWAIT, J.H.; NÜSSLEIN-VOLHARD, C.; HUBBARD, T.J.; ROEST CROLLIUS, H.; ROGERS, J. & STEMPLE, D.L. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, **496(7446)**:498-503. 2013.

HU, B.; EL HAJJ, N.; SITTNER, S.; BARNES, R. & MELONI-EHRIG, A. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. **J Gastrointest Oncol**, **3(3)**:251-261. 2012.

HUNT, T.H.; ASLAN, R.S.; BECKERT, S.; WAGNER, S.; GHANI, Q.P.; HUSSAIN, M.Z.; ROY, S. & SEN, C.K. Aerobically-Derived Lactate Stimulates Revascularization and Tissue Repair *via* Redox Mechanisms. **Antioxid Redox Signal**, **9(8)**:1115-1124. 2007.

HWANG, I. W.; HONG, J. H.; KWON, B. N.; KIM, H. J.; LEE, N. R.; LIM, M. H. & JIN, H. J. Association of mitochondrial DNA 10398 A/G polymorphism with attention deficit and hyperactivity disorder in Korean children. **Gene**. 2017.

IDELCHIK, M.D.P.S.; BEGLEY, U.; BEGLEY, T.J. & MELENDEZ, J.A. Mitochondrial ROS control of cancer. **Seminars in Cancer Biology**. 2017.

INCA. Câncer: O que é. 2016. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee> . Acesso em: 10 dez. 2016.

INCA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015. 124 p.

IWATA, S.; LEE, J.W.; OKADA, K.; LEE, J.K.; IWATA, M.; RASMUSSEN, B.; LINK, T.A.; RAMASWAMY, S., & JAP, B.K. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. **Science**, **281**:64–71. 1998.

JAKSZYN, P.; BINGHAM, S.; PERA, G.; AGUDO, A.; LUBEN, R.; WELCH, A.; BOEING, H.; GIUDICE, G.; PALLI, D.; SAIEVA, C.; KROGH, V.; SACERDOTE, C.; TUMINO, R.; PANICO, S.; BERGLUND, G.; HENRIK SIMÁN, H.; HALLMANS, G.; SANCHEZ, M.J.; LARRAÑAGA, N.; BARRICARTE, A.; CHIRLAQUE, M.D.; QUIRÓS, J.R.; KEY, T.J.; ALLEN, N.; LUND, E.; CARNEIRO, F.; LINSEISEN, J.; NAGEL, G.; OVERVAD, K.; TJONNELAND, A.; OLSEN, A.; BUENO-DE-MESQUITA H.B.; OCKÉ, M.O.; PEETERS, P.H.M.; NUMANS M.E.; CLAVEL-CHAPELON F.; TRICHOPOULOU, A.; FENGER, C.; STENLING, R.; FERRARI, P.; JENAB, M.; NORAT, T.; RIBOLI, E. & GONZALEZ, C.A. Endogenous versus exogenous exposure to N-nitroso compounds and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST) study. **Carcinogenesis**, **27(7)**:1497-1501. 2006.

JEANES, A.; GOTTARDI, C.J. & YAP, A. S. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? **Oncogene**, **27**:6920-6929. 2008.

JIANG, H.; ZHAO, H.; XU, H.; HU, L.; WANG, W.; WEI, Y. & ZHOU, F. Peripheral blood mitochondrial DNA content, A10398G polymorphism, and risk of breast cancer in a Han Chinese population. **Cancer science**, **105(6)**: 639-645. 2014.

JONCKHEERE, A.I.; SMEITINK, J.A.M. & RODENBURG, R.J.T. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, **35**:211-225. 2012.

JU, Y.S.; ALEXANDROV, L.B.; GERSTUNG, M.; MARTINCORENA, I.; NIK-ZAINAL, S.; RAMAKRISHNA, M.; DAVIES, H.R.; PAPAEMMANUIL, E.; GUNDEM, G.; SHLIEN, A.; BOLLI, N.; BEHJATI, S.; TARPEY, P.S.; NANGALIA, J.; MASSIE, C.E.; BUTLER, A.P.; TEAGUE, J.W.; VASSILIOU, G.S.; GREEN, A.R.; DU, M.Q.; UNNIKRISHNAN, A.; PIMANDA, J.E.; TEH, B.T.; MUNSHI, N.; GREAVES, M.; VYAS, P.; EL-NAGGAR, A.K.; SANTARIUS, T.; COLLINS, V.P.; GRUNDY, R.; TAYLOR, J.A.; HAYES, D.N.; MALKIN, D.; ICGC BREAST CANCER GROUP; ICGC CHRONIC MYELOID DISORDERS GROUP; ICGC PROSTATE CANCER GROUP; FOSTER, C.S.; WARREN, A.Y.; WHITAKER, H.C.; BREWER, D.; EELES, R.; COOPER, C.; NEAL, D.; VISAKORPI, T.; ISAACS, W.B.; BOVA, G.S.; FLANAGAN, A.M.; FUTREAL, P.A.; LYNCH, A.G.; CHINNERY, P.F.; MCDERMOTT, U.; STRATTON, M.R. & CAMPBELL, P.J. Origins and functional consequences of somatic mitochondrial DNA mutations in human cancer. **eLife**, **3**:e02935. 2014.

JUKES, T. H. Transitions, transversions, and the molecular evolutionary clock. *Journal of Molecular Evolution*, **26(1)**:87-98. 1987.

KAKIUCHI, M.; NISHIZAWA, T.; UEDA, H.; GOTOH, K.; TANAKA, A.; HAYASHI, A.; YAMAMOTO, S.; TATSUNO, K.; KATO, H.; WATANABE, Y.; ICHIMURA, T.; USHIKU, T.; FUNAHASHI, S.; TATEISHI, K.; WADA, I.; SHIMIZU, N.; NOMURA, S.; KOIKE, K.; SETO, Y.; FUKAYAMA, M.; ABURATANI, H. & ISHIKAWA, S. Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. **Nature Genetics**, **46(6)**:583-587. 2014.

KARARLI, T.T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, **16**: 351-380. 1995.

KARIMI, P.; ISLAMI, F.; ANANDASABAPATHY, S.; FREEDMAN, N.D. & KAMANGAR, F. Gastric Cancer Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, **23(5)**:700-713. 2014.

KAZUNO, A. A.; MUNAKATA, K.; NAGAI, T.; SHIMOZONO, S.; TANAKA, M.; YONEDA, M. & KATO, T. Identification of mitochondrial DNA polymorphisms that alter mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics. **PLoS genetics**, **2(8)**: e128. 2006.

KINZLER, K. W. & VOGELSTEIN, B. Gatekeepers and caretakers. **Nature**, **386**:761-763. 1997.

KNUDSON, A.G. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. **Proc Nat Acad Sci USA**, **68(4)**:820-823. 1971.

KNUDSON, A.G. TWO genetic hits (more or less) to cancer. **Nature Reviews**, **1(2)**:157-162. 2001.

KONDO, N.; TAKAHASHI, A.; ONO, K. & OHNISHI, T. DNA Damage Induced by Alkylating Agents and Repair Pathways. **Journal of Nucleic Acids**, **2010**:543531. 2010.

KUCHARZEWSKA, P.; CHRISTIANSON, H.C.; WELCH, J.E.; SVENSSON, K.J.; FREDLUND, E.; RINGNÉR, M.; MÖRGELIN, M.; BOURSEAU-GUILMAIN, E.; BENZON, J & BELTING, M. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. **Proc Natl Acad Sci USA**, **110(18)**: 7312-7317. 2013.

KULAWIEC, M.; OWENS, K. M.; & SINGH, K. K. mtDNA G10398A variant in African-American women with breast cancer provides resistance to apoptosis and promotes metastasis in mice. **Journal of human genetics**, **54(11)**: 647. 2009.

KUROWSKA, M.; LABOCHA-PAWŁOWSKA, A.; GNIZDA, D.; MALUSZYNSKI, M. & SZAREJKO, I. Molecular analysis of point mutations in a barley genome exposed to MNU and gamma rays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, **738**: 52-70. 2012.

LADEIRAS-LOPES, R.; PEREIRA, A. K.; NOGUEIRA, A.; PINHEIRO-TORRES, T.; PINTO, I.; SANTOS-PEREIRA, R.; LUNET, N. Smoking and gastric cancer: systematic review and meta-analysis of cohort studies. **Cancer Causes and Control**, **19(7)**:689-701. 2008.

LANCASTER, C. R. D. Succinate:quinone oxidoreductases: an overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1553**:1-6. 2002.

LANGENAU, D.M.; TRAVER, D.; FERRANDO, A.A.; KUTOK, J.L.; ASTER, J.C.; KANKI, J.P.; LIN, S.; PROCHOWNIK, E.; TREDE, N.S.; ZON, L.I. & LOOK, A.T. Myc-Induced T Cell Leukemia in Transgenic Zebrafish. **Science**, **299(5608)**:887-890. 2003.

LAUREN, P. The two histological main types of gastric cancer: diffuse and so-called intestinal type carcinoma: an attempt at a histoclinical classification. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, **64**:31-49. 1965.

LEAL, M.F.; CALCAGNO, D.Q.; DA COSTA, J.F.F.B.; SILVA, T.C.R.; KHAYAT, A.S.; CHEN, E.S.; ASSUMPCÃO, P.P.; SMITH, M.A.C. & BURBANO, R.R. MYC, TP53, and chromosome 17 copy-number alterations in multiple gastric cancer cell lines and in their parental primary tumors. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011:1-8. 2011.

LEAL, M.F.; DO NASCIMENTO, J.L.M.; DA SILVA, C.E.A.; LAMARÃO, M.F.V.; CALCAGNO, D.Q.; KHAYAT, A.S.; ASSUMPCÃO, P.P.; CABRAL, R.I.; SMITH, M.A.C. & BURBANO, R.R. Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, **195**: 85-91. 2009.

LEE, E. Y. H. P.; MULLER, W. J. Oncogenes and tumor suppressor genes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, **2**:a003236. 2010.

LEE, E.Y.H.P. & MULLER, W.J. Oncogenes and tumor suppressor genes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, **2(10)**: a003236. 2010.

LEHUÉDÉ, C.; DUPUY, F.; RABINOVITCH, R.; JONES, R.G. & SIEGEL, P.M. Metabolic Plasticity as a Determinant of Tumor Growth and Metastasis. **Cancer Research**, **76(18)**:5201-5208. 2016.

LEMOS, R.S.; FERNANDES, A. S.; PEDREIRA, M. M.; GOMES, C. M. & TEIXEIRA, M. Quinol:fumarate oxidoreductases and succinate:quinone oxidoreductases: phylogenetic relationships, metal centres and membrane attachment. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1553**:158-170. 2002.

LEWIS, K.M.; HARFORD-WRIGHT, E.; VINK, R. & GHABRIEL, M.N. Characterisation of Walker 256 breast carcinoma cells from two tumour cell banks as assessed using two models of secondary brain tumours. **Cancer Cell International**, **13**: 1-12. 2013.

LI, J.M.; CAI, Q.; ZHOU, H. & XIAO, G.X. Effects of hydrogen peroxide on mitochondrial gene expression of intestinal epithelial cells. **World J Gastroenterol**, **8(6)**: 1117-1122. 2002.

LIGHTOWLERS, R. N.; CHINNERY, P. F.; TURNBULL, D. M. & HOWELL, N. MAMMALIAN mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends in Genetics*, **13(11)**:450-455. 1997.

LLOYD, D.; KRISTENSEN, B. & DEGN, H. Glycolysis and respiration in yeasts. The Pasteur effect studied by mass spectrometry. **Biochemical Journal**, **212(3)**:749-754. 1983.

MACALUSO, M.; PAGGI, M. G. & GIORDANO, A. Genetic and epigenetic alterations as hallmarks of the intricate road to cancer. **Oncogene**, **22**:6472-6478. 2003.

MACA-MEYER, N.; GONZÁLEZ, A.M.; LARRUGA, J.M.; FLORES, C. & CABRERA, V.M. Major genomic mitochondrial lineages delineate early human expansions. **BMC Genetics**, **2**: 1-13. 2001

MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, C.; CARVALHO, R.; SOARES, P.; BERX, G.; CALDAS, C.; SERUCA, R.; CARNEIRO, F. & SOBRINHO-SIMÕES, M. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. **Oncogene**, **20**:1525-1528. 2001.

MAILLOUX, R.J. Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species. **Redox Biology**, **4**:381-398. 2015.

MAO, Y.; KELLER, E. T.; GARFIELD, D. H.; SHEN, K. & WANG, J. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, **32(1-2)**: 303-315. 2013.

MARTINEZ-OUTSCHOORN, U.E.; PEIRIS-PAGÈS, M.; PESTELL, R.G.; SOTGIA, F. & LISANTI, M.P. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. **Nature Reviews**, **14(1)**:11-31. 2017.

MARTINEZ-OUTSCHOORN, U.E.; BALLIET, R.M.; RIVADENEIRA, D.B.; CHIAVARINA, B.; PAVLIDES, S.; WANG, C.; WHITAKER-MENEZES, D.; DAUMER, K.M.; LIN, Z.; WITKIEWICZ, A.K.; FLOMENBERG, N.; HOWELL, A.; PESTELL, R.G.; KNUDSEN, E.S.; SOTGIA, F. & LISANTI, M.P. Oxidative stress in cancer associated fibroblasts drives tumor-stroma co-evolution: A new paradigm for understanding tumor metabolism, the field effect and genomic instability in cancer cells. **Cell Cycle**, **9(16)**:3256-3276. 2010.

MÁXIMO V, SOARES P, SERUCA R, ROCHA AS, CASTRO P e SOBRINHO-SIMOES M. Microsatellite instability, mitochondrial DNA large deletions, and mitochondrial DNA mutations in gastric carcinoma. **Genes Chromosomes Cancer**, **32**: 136-146. 2001.

MCCARRON, J. G.; WILSON, C.; SANDISON, M. E.; OLSON, M. L.; GIRKIN, J. M.; SUNTER, C. & CHALMERS, S. From Structure to Function: Mitochondrial Morphology, Motion and Shaping in Vascular Smooth Muscle. **Journal of Vascular Research**, **50**:357-371. 2013.

MCEUEN, C.S. & THOMSON, D.L. The effect of hypophysectomy on the growth of the Walker rat tumour. **The British Journal of Experimental Pathology**, **14(6)**:384-391. 1933.

MESSAOUDI, I.; ESTEP, R.; ROBINSON, B & WONG S.W. Nonhuman Primate Models of Human Immunology. **Antioxidants & Redox Signaling**, **14(2)**:261-273. 2011.

MIGLIORE, L. & COPPEDÈ, F. Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. **Mutation Research**, **512**:135-153. 2002.

MILLER J.A. & MILLER, E.C. The metabolism and carcinogenicity of p-dimethylaminoazobenzene and related compounds in the rat. **Cancer Research**, **7(1)**: 39-41. 1947.

MIMS, M.; HAYES, T. G.; ZHENG, S.; LEAL, S. M.; FROLOV, A.; ITTMANN, M. M. & PRCHAL, J. T. Mitochondrial DNA G10398A polymorphism and invasive breast cancer in African-American women. **Cancer Research**, **66(3)**: 1880-1881. 2006.

MIRVISH, S.S. Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. **Cancer Letters**, **93**:17-48. 1995.

MITOMAP. 2006. A human mitochondrial genome database. Disponível em: [www.mitomap.org](http://www.mitomap.org) . Acesso em: 11 jun. 2017.

MOHAMED YUSOFF, A. A. M. Role of mitochondrial DNA mutations in brain tumors: A mini-review. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, **11**:535-544. 2015.

MORAES SP, CUNHA A, REIS NETO JA, BARBOSA H, RONCOLATTO CAP, DUARTE RF. MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR DE WALKER. Modelo experimental de tumor de Walker. **Acta Cir Bras**, **15(4)**. 2000.

MOROZOV, V.M.; MASSOLL, N. A.; VLADIMIROVA, O. V.; MAUL, G. G. & ISHOV, A. M. Regulation of c-met expression. By transcription repressor Daxx. **Oncogene**, **27**:2177-2186. 2008.

MOSQUERA-MIGUEL, A.; ÁLVAREZ-IGLESIAS, V.; CARRACEDO, Á.; SALAS, A.; VEGA, A.; MILNE, R. & BENITEZ, J. Is mitochondrial DNA variation associated with sporadic breast cancer risk?. **Cancer research**, **68(2)**: 623-625. 2008.

MULLER, H.J. & ALTENBURG, E. The frequency of translocations produced by X-rays in drosophila. **Genetics**, **15(4)**:283-211. 1930.

NADIAH, T.B.; HASNAN, J. & ZAFARINA, Z. Association of Mitochondrial DNA 10398 Polymorphism in Invasive Breast Cancer in Malay Population of Peninsular Malaysia. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, **19(1)**: 36-42. 2012.

NAGINI, S. Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, **4(5)**:156-169. 2012.

NAKAJIMA, E.C. & VAN HOUTEN, B. Metabolic Symbiosis in Cancer: Refocusing the Warburg Lens. **Molecular Carcinogenesis**, **52**:329-337. 2013.

NISHIMOTO, I. N.; HAMADA, G. S.; KOWALSKI, L. P.; RODRIGUES, J. G.; IRIYA, K.; SASAZUKI, S.; HANAOKA, T.; TSUGANE, S. Risk Factors for Stomach Cancer in Brazil (I): a Case-control Study among Non-Japanese Brazilians in São Paulo. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, **32(8)**:277-283. 2002.

OLIVEIRA, A. M.; ROSS, J. & FLETCHER, A. Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and the caretakers. **American Journal of Clinical Pathology**, **124** Suppl(1):S16-28. 2005.

OMS. Cancer country profiles 2014 - Brazil. Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/country-profiles/en/> Acesso em: 20 nov. 2016.

PANTALEAO, C. & LUCHS, A. Câncer e modelos experimentais de tumores murinos. **Rev Inst Adolfo Lutz**, **69(4)**:439-45. 2010.

PENA, S.D.; DI PIETRO, G.; FUCHSHUBER-MORAES, M.; GENRO, J.P.; HUTZ, M.H.; KEHDY, F.S.; KOHLRAUSCH, F.; MAGNO, L.A.; MONTENEGRO, R.C.; MORAES, M.O.; DE MORAES, M.E.; DE MORAES, M.R.; OJOPI, E.B.; PERINI, J.A.; RACCIOPI, C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K.; RIOS-SANTOS, F.; ROMANO-SILVA, M.A.; SORTICA, V.A. & SUAREZ-KURTZ, G. The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected. **PLoS ONE**, **6(2)**:e17063. 2011.

PEZZOTTI, A.; KRAFT, P.; HANKINSON, S. E.; HUNTER, D. J.; BURING, J.; & COX, D. G. The mitochondrial A10398G polymorphism, interaction with alcohol consumption, and breast cancer risk. **PloS one**, **4(4)**: e5356. 2009.

POBEL, D.; RIBOLI, E.; CORNÉE, J.; HÉMON, B. & GUYADER, M. Nitrosamine, nitrate and nitrite in relation to gastric cancer: A case-control study in Marseille, France. **European Journal of Epidemiology**, **11**:67-73. 1995.

POLK, D. B. & PEEK JR., R. M. Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond. **Nature Reviews Cancer**, **10(6)**:403-414. 2010.

POLYAK, K.; LI, Y.; ZHU, H.; LENGAUER, C.; WILLSON, J. K. V.; MARKOWITZ, S. D.; TRUSH, M. A.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. **Nature Genetics**, **20**:291-293. 1998.

PORPORATO, P.E.; PAYEN, V.L.; DE SAEDELEER, C.J; PRÉAT, V.; THISSEN, J-P.; FERON, O. & SONVEAUX, P. Lactate stimulates angiogenesis and accelerates the healing of superficial and ischemic wounds in mice. **Angiogenesis**, **15(4)**:581-592. 2012.

QI, Y.; WEI, Y.; WANG, Q.; XU, H.; WANG, Y.; YAO, A. & ZHOU, F. Heteroplasmy of mutant mitochondrial DNA A10398G and analysis of its prognostic value in non-small cell lung cancer. **Oncology letters**, **12(5)**: 3081-3088. 2016.

QUIROS, S.; ROOS, W.P. & KAINA, B. Processing of O6-methylguanine into DNA doublestrand breaks requires two rounds of replication whereas apoptosis is also induced in subsequent cell cycles. **Cell Cycle**, **9(1)**:168-178. 2010.

RAY, A.M.; ZUHLKE, K.A.; LEVIN, A.M.; DOUGLAS, J.A.; COONEY, K.A. & PETROS, J.A. Sequence Variation in the Mitochondrial Gene Cytochrome c Oxidase Subunit I and Prostate Cancer in African American Men. **Prostate**, **69(9)**: 956-960. 2009.

RIBEIRO, H.F.; ALCÂNTARA, D.F.A.; MATOS, L.A.; SOUZA, J.M.C.; LEAL, M.F.; SMITH, M.A.C.; BURBANO, R.R. & BAHIA, M.O. Cytogenetic characterization and evaluation of c-MYC gene amplification in PG100, a new Brazilian gastric cancer cell line. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **43(8)**:698-811. 2010.

ROMERO-GARCIA, S.; MORENO-ALTAMIRANO, M.M.; PRADO-GARCIA, H & SÁNCHEZ-GARCÍA, F.J. Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, effects on immune Cells and Therapeutic Relevance. **Frontiers in Immunology**, **7**:52. 2016.

SALAS, A.; GARCÍA-MAGARIÑOS, M.; LOGAN, I. & BANDELT, H. J. The saga of the many studies wrongly associating mitochondrial DNA with breast cancer. **BMC cancer**, **14(1)**: 659. 2014.

SAZANOV, L.A. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, **16**:375-388. 2015.

SCOTT, T.A.; ARNOLD, R.S. & PETROS, J.A. Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit 1 Sequence Variation in Prostate Cancer. **Scientifica**, **2012**: 701810. 2012.

- SEN, N.P.; SEAMAN, S.W.; BADDOO, P.A.; BURGESS, C. & WEBER, D. Formation of *N*-Nitroso-*N*-methylurea in Various Samples of Smoked/Dried Fish, Fish Sauce, Seafoods, and Ethnic Fermented/Pickled Vegetables Following Incubation with Nitrite under Acidic Conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **49(4)**:2096-2103. 2001.
- SEQUEIRA, A.; ROLLINS, B.; MAGNAN, C.; VAN OVEN, M.; BALDI, P.; MYERS, R. M. & BUNNEY, W. E. Mitochondrial mutations in subjects with psychiatric disorders. **PloS one**, **10(5)**: e0127280. 2015.
- SETIAWAN, V. W.; CHU, L. H.; JOHN, E. M.; DING, Y. C.; INGLES, S. A.; BERNSTEIN, L. & NEUHAUSEN, S. L. Mitochondrial DNA G10398A variant is not associated with breast cancer in African-American women. **Cancer genetics and cytogenetics**, **181(1)**: 16-19. 2008.
- SINGH, R.K.; SRIVASTAVA, A.; KALAIRASAN, P.; MANVATI, S.; CHAPRA, R & BAMEZAI, R.N.K. mtDNA germ line variation mediated ROS generates retrograde signaling and induces pro-cancerous metabolic features. **Scientific Reports**, **4**:6571. 2014.
- SHADEL, G.S. & HORVATH, T.L. Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis. **Cell**, **163(3)**:560-569. 2015.
- SHENOY, P.A.; KUO, A.; VETTER, I. & SMITH, M.T. The Walker 256 Breast Cancer Cell-Induced Bone Pain Model in Rats. **Frontiers in Pharmacology**, **7**:1-7. 2016.
- SHIRAIISHI, A.; SAKUMI, K. & SEKIGUCHI, M. Increased susceptibility to chemotherapeutic alkylating agents of mice deficient in DNA repair methyltransferase. **Carcinogenesis**, **21(10)**: 1879-1883. 2000.
- SOARES-MAIA, R.; FAUSTINO-ROCHA, A.I.; TEIXEIRA-GUEDES, C.I.; PINHO-OLIVEIRA, J.; TALHADA, D.; REMA, A.; FARIA, F.; GINJA, M.; FERREIRA, R.; GIL DA COSTA, R.M.; OLIVEIRA, P.A. & LOPES, C. MNU-Induced Rat Mammary Carcinomas: Immunohistology and Estrogen Receptor Expression. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, **32(2)**:157-163. 2013.
- SONG, P.; WU, L. & GUAN, W. Dietary Nitrates, Nitrites, and Nitrosamines Intake and the Risk of Gastric Cancer: A Meta-Analysis. **Nutrients**, **7**:9872-9895. 2015.
- SONVEAUX, P.; VÉGRAN, F.; SCHROEDER, T.; WERGIN, M.C.; VERRAX, J.; RABBANI, Z.N.; DE SAEDELEER, C.J.; KENNEDY, K.M.; DIEPART, C.; JORDAN, B.F.; KELLEY, M.J.; GALLETZ, B.; WAHL, M.L.; FERON, O. & DEWHIRST, M.W. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, **118(12)**:3930-3942. 2008.
- STAFFORD, P. & QUIN-CHEN, E.B. The pattern of natural selection in somatic cancer mutations of human mtDNA. **Journal of Human Genetics**, **55**:605-612. 2010.
- STEWART, J. B. & CHINNERY, P. F. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. **Nature reviews. Genetics**, **16(9)**: 530. 2015.

SUN, F.; HUO, X.; ZHAI, Y.; WANG, A.; XU, J.; SU, D.; BARTLAM, M. & RAO, Z. Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II. **Cell**, **121**:1043-1057. 2005.

TAHARA, T.; SHIBATA, T.; OKAMOTO, Y.; YAMAZAKI, J.; KAWAMURA, T.; HORIGUCHI, N.; OKUBO, M.; NAKANO, N.; ISHIZUKA, T.; NAGASAKA, M.; NAKAGAWA, Y. & OHMIYA, N. Mutation spectrum of TP53 gene predicts clinicopathological features and survival of gastric cancer. **Oncotarget**, **7(27)**:42252-42260. 2016.

TAKAYAMA, S.; THORGEIRSSON, U. P. & ADAMSON, R. H. Chemical carcinogenesis studies in nonhuman primates. **Proceeding of the Japan Academy, Ser.B**, **84**:176-187. 2008.

TATEMATSU, M.; TAKAHASHI, M.; FUKUSHIMA, S.; HANANOUCHE, M. & SHIRAI, T. Effects in rats of sodium chloride on experimental gastric cancers induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine or 4-nitroquinoline-1-oxide. **J Natl Cancer Inst**, **55(1)**:101-106. 1975.

TENNANT, S.M.; HARTLAND, E.L.; PHUMOONNA, T.; LYRAS, D.; ROOD, J.I.; ROBINSON-BROWNE, R.M. & VAN DRIEL, I.R. Influence of Gastric Acid on Susceptibility to Infection with Ingested Bacterial Pathogens. **Infection and Immunity**, **76(2)**: 639-645. 2008.

TOMASETTI, C.; MARCHIONNI, L.; NOWAK, M.A.; PARMIGIANI, G. & VOGELSTEIN, B. Only three driver gene mutations are required for the development of lung and colorectal cancers. **Proc Natl Acad Sci USA**, **112(1)**:118-123. 2015.

TRAMACERE, I.; NEDRI, E.; PELUCCHI, C.; BAGNARDI, V.; ROTA, M.; SCOTTI, L.; ISLAMI, F.; CORRAO, G.; LA VECCHIA, C.; BOFFETA, P. A meta-analysis on alcohol drinking and gastric cancer risk. **Annals of Oncology**, **23**: 28-36. 2012.

TSUKAMOTO, T.; MIZOSHITA, T.; TATEMATSU, M. Animal Models of Stomach Carcinogenesis. **Toxicologic Pathology**, **35**:636-648. 2007.

UMEKI, K.; SHIOTA, G. & KAWASAKI, H. Clinical significance of c-met Oncogene alterations in human colorectal cancer. **Oncology**, **56**:314-321. 1999.

UMESAWA, M.; ISO, H.; FUJINO, Y.; KIKUCHI, S. & TAMAKOSHI, A. Salty Food Preference and Intake and Risk of Gastric Cancer: The JACC Study. **J Epidemiol**, **26(2)**:92-97. 2016.

VAN DER WOUDE, C.J.; KLEIBEUKER, J.H.; TIEBOSCH, A. T. G. M.; HOMAN, M.; BEUVING, A.; JANSEN P. L. M.; MOSHAGE, H. Diffuse and intestinal type gastric carcinomas differ in their expression of apoptosis related proteins. **Journal of Clinic Pathology**, **56**:699-702. 2003.

VEGRAN, F.; BOIDOT, R.; MICHIELS, C.; SONVEAUX, P & FERON, O. Lactate Influx through the Endothelial Cell Monocarboxylate Transporter MCT1 Supports an NF-kB/IL-8 Pathway that Drives Tumor Angiogenesis. **Cancer Research**, **71(7)**:2550-2560. 2011.

VOGELSTEIN, B.; PAPADOPOULOS, N.; VELCULESCU, V.E.; ZHOU, S.; DIAZ JR., L.A. & KINZLER, K.W. Cancer Genome Landscape. **Science**, **339**:1546-1558. 2013.

VOGIATZI, P.; VINDIGNI, C.; ROVIELLO, F.; RENIERI, A.; GIORDANO, A. Deciphering the underlying genetic and epigenetic events leading to gastric carcinogenesis. **Journal of Cellular Physiology**, **211(2)**:287-295. 2007.

WALLACE, D.C. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. **The Annual Reviews of Biochemistry**, **76**: 781-821. 2007.

WANG, K.; YUEN, S.T.; XU, J.; LEE, S.P.; YAN, H.H.; SHI, S.T.; SIU, H.C.; DENG, S.; CHU, K.M.; LAW, S.; CHAN, K.H.; CHAN, A.S.; TSUI, W.Y.; HO, S.L.; CHAN, A.K.; MAN, J.L.; FOGLIZZO, V.; NG, M.K.; CHAN, A.S.; CHING, Y.P.; CHENG, G.H.; XIE, T.; FERNANDEZ, J.; LI, V.S.; CLEVERS, H.; REJTO, P.A.; MAO, M. & LEUNG, S.Y. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. **Nature Genetics**, **46(6)**:573-582. 2014.

WARBURG, O.; WIND, F. & NEGELEIN, E. The metabolism of tumors in the body. **The Journal of General Physiology**, **8(6)**:519-530. 1927.

WEBBER, J.; YEUNG, V. & CLAYTON, A. Extracellular vesicles as modulators of the cancer microenvironment. **Semin Cell Dev Biol**, **40**:27-34. 2015.

WEINHOUSE, S. Studies on the fate of isotopically labeled metabolites in the oxidative metabolism of tumors. **Cancer Research**, **11(8)**:585-591. 1951.

WESTCOTT, P. M.; HALLIWILL, K. D.; TO, M. D.; RASHID, M.; RUST, A. G.; KEANE, T. M. & FREDLUND, E. The mutational landscapes of genetic and chemical models of Kras-driven lung cancer. **Nature**, **517(7535)**: 489. 2015.

WHITE, M. B.; AMOS, J.; HSU, J. M. C.; GERRARD, B.; FINN, P.; DEAN, M. A frame-shift mutation in the cystic fibrosis gene. **Nature**, **344**:665-667. 1990.

WU, S.; POWERS, S.; ZHU, W. & HUNNUN, Y.A. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. **Nature**, **529**:43-47. 2016.

XU, L.; QU, Y-H.; CHU, X-D.; WANG, R.; NELSON, H.H.; GAO, Y-T. & YUAN, J-M. Urinary Levels of N-Nitroso Compounds in Relation to Risk of Gastric Cancer: Findings from the Shanghai Cohort Study. **PLoS ONE**, **10(2)**: e0117326. 2015.

XUE, J.; YANG, S. & SENG, S. Mechanisms of Cancer Induction by Tobacco-Specific NNK and NNN. **Cancer**, **6**:1138-1156. 2014.

YEH, J. J.; LUNETTA, K. L.; VAN ORSOUW, N. J.; MOORE, F. D.; MUTTER, G. L.; VIJG, J. & ENG, C. Somatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in papillary thyroid carcinomas and differential mtDNA sequence variants in cases with thyroid tumours. **Oncogene**, **19(16)**: 2060. 2000.

YEN, J.; WHITE, R.M. & STEMPLE, D.L. Zebrafish models of cancer: progress and future challenges. **Current Opinion in Genetics & Development**, **24**:38-45. 2014.

YONG, X.; TANG, B.; LI, B-S.; XIE, R.; HU, C-J.; LOU, G.; QIN, Y.; DONG, H. & YANG, S-M. *Helicobacter pylori* virulence factor CagA promotes tumorigenesis of gastric cancer via multiple signaling pathways. **Cell Communication and Signaling**, **13**:30. 2015.

YOSHIDA, G.J. Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, **34**:111. 2015.

YU, Y.; LV, F.; LIN, H.; QIAN, G.; JIANG, Y.; PANG, L. & LIU, Q. Mitochondrial ND3 G10398A mutation: a biomarker for breast cancer. **Genet Mol Res**, **14**(4): 17426-31. 2015.

ZHANG, L.; HOU, Y.; ASHKTORAB, H.; GAO, L.; XU, Y.; WU, Y.; ZHAI, J. & ZHANG, L. The impact of *C-MYC* gene expression on gastric cancer cell. **Molecular and Cellular Biochemistry**, **344**:125-135. 2010.

ZHANG, W.; LU, H. & GRAHAN, D.Y. An Update on *Helicobacter pylori* as the Cause of Gastric Cancer. **Gastrointestinal Tumors**, **1**(3):155-165. 2014.

ZHANG, Z.; HUANG, L.; SHULMEISTER, V. M.; CHI, Y. I.; KIM, K. K.; HUNG, L.W.; CROFTS, A. R.; BERRY, E. A. & KIM, S. H. Electron transfer by domain movement in cytochrome *bc1*. **Nature**, **392**(6677):677-684. 1998.

ZHU, Y.; WANG, P.P.; ZHAO, J.; GREEN, R.; SUN, Z.; ROEBOTHAN, B.; SQUIRES, J.; BUEHLER, S.; DICKS, E.; ZHAO, J.; COTTERCHIO, M.; CAMPBELL, P.T.; JAIN, M.; PARFREY, P.S. & MCLAUGHLIN, J. R. Dietary N-nitroso compounds and risk of colorectal cancer: a case-control study in Newfoundland and Labrador and Ontario, Canada. **British Journal of Nutrition**, **111**:1109-1117. 2014.

ZOROV, D.B.; JUHASZOVA, M & SOLLLOT, S.J. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS release. **Physiological Reviews**, **94**(3):909-950. 2014.