

MESTRADO em MEDICINA
LEGAL

Deleção 4977 pb do DNA mitocondrial como biomarcador molecular de doenças associadas à idade

Brunelly Cavalcante Rodrigues

M

2019



Deleção 4977 pb do DNA mitocondrial como biomarcador molecular de doenças associadas à idade

Brunelly Cavalcante Rodrigues



BRUNELLY CAVALCANTE RODRIGUES

Deleção 4977 pb do DNA mitocondrial como biomarcador molecular de doenças associadas à idade

Dissertação de Candidatura ao Grau de Mestre em Medicina Legal submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Professor Doutor Rui Manuel de Medeiros Melo Silva

Categoria – Professor afiliado

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto e Coordenador do Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto

Co-orientadora – Doutora Ana Luísa Pereira Teixeira

Categoria – Investigadora Júnior

Afiliação – Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto

Co-orientadora Laboratorial – Mestre Inês Cristiana Martins Nogueira

Categoria – Técnica de Laboratório

Afiliação – Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do Centro de Investigação Português de Oncologia do Porto

“A persistência é o menor caminho do êxito”

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer à Professora Maria José Pinto da Costa, por toda dedicação e apoio que me foi facultado e pela oportunidade de ingressar no mestrado em Medicina Legal.

Ao Professor Doutor Rui Medeiros, meu orientador, por me permitir a realização deste trabalho no Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do IPO-Porto. Quero também agradecer, por toda a dedicação e confiança que me passou ao decorrer deste projeto.

À Doutora Ana Luísa Texeira, minha coorientadora, por cada minuto dispendido comigo, por toda a partilha de conhecimentos, dedicação, apoio e encorajamento prestado, que foi essencial para a realização deste projeto. Obrigada por acreditares em mim e nos momentos mais difíceis, encorajar-me a prosseguir. Por seres um exemplo a seguir a nível profissional e pessoal, por me fazeres suscitar um espírito crítico, que é uma característica indispensável na área da investigação.

À Mestre Inês Nogueira, minha coorientadora, por todo o tempo e dedicação que me prestaste, por todo o apoio nos momentos mais difíceis. Obrigada por todo o incentivo e ensinamentos a nível laboratorial que irão ser essenciais para o meu percurso profissional. Um muito obrigada pela paciência que tiveste comigo ao longo de todo o tempo que me debrucei sobre a tese.

À Mestre Francisca Dias, por todo o interesse demonstrado em ajudar-me com as dificuldades inerentes a este projeto. Por partilhares o teu conhecimento e experiência de vida comigo e por me fazeres rir em diversas situações de *stress*. Um muito obrigada pelos gelados durante a tarde. Como sempre dizes, mereces um “busto”.

À Mestre Mara Fernandes, pela tua amizade e pela pessoa que és. Obrigada pelos chás durante a tarde e momentos engraçados que partilhamos juntas. À Doutora Jani Silva, por toda a ajuda prestada durante todo este tempo, obrigada por cada material que fornecestes mesmo com toda a correria no laboratório, admiro-te muito como pessoa. Ao Mestre Augusto Nogueira por toda a partilha, auxílio e conversas ao longo deste ano. Obrigada pela receção de todos.

À “parceira no crime” Ana Bela Barros, por me fazeres rir em momentos de tensão, por me ofereceres chocolates e pela tua amizade ao longo de todo o mestrado. Obrigada pela força que me deste quando não acreditei em mim própria.

À Joana Pinto, uma amizade que o presente estágio me permitiu fazer. Obrigada por cada gargalhada e momentos de alegria proporcionados. Vou levar a nossa amizade para a vida.

À Muriela Madureira, Cleonice Centeio e Catarina Teixeira, obrigada sobretudo pela vossa amizade. Por todos os momentos que passamos juntas durante estes dois anos e por estarem sempre prontas a ouvir-me. A vossa amizade é muito importante para mim.

Ao Gustavo Sampaio, obrigada por todo o carinho e dedicação. Por todos os conselhos e palavras de força e pelas gargalhadas que demos juntos. Obrigada por me teres ensinado a levar tudo com mais leveza.

Aos meus amigos, Leandro Junior e Marcus Gonçalves por me fazerem rir e pela vossa companhia. Obrigada por serem amigos preocupados e atenciosos.

À minha mãe, Tania Cavalcante, a quem dedico esta tese, para ti nem tenho palavras. Muito obrigada por cada palavra de força que me disseste, estas palavras fizeram toda a diferença ao longo deste ano. Obrigada por todo amor e dedicação e por acreditares em mim. Ao meu Pai, Joel Rodrigues, obrigada pela compreensão, dedicação e auxílio que me forneceste, sem a tua ajuda seria muito mais difícil. À minha irmã, Danielly Rodrigues, obrigada por cada dia em que fizeste o jantar para eu poder escrever, pelos dias em que ficaste em casa para eu não ficar a trabalhar sozinha nos fins de semana. A tua presença, fez e continua a fazer toda a diferença em minha vida.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ÍNDICE DE TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS	13
RESUMO.....	17
ABSTRACT	21
1. INTRODUÇÃO	25
1.1. Deleções no DNA mitocondrial como biomarcadores moleculares de envelhecimento	25
1.2. Mitocôndria: DNA, função e dinâmica.....	28
1.3. Deleções no DNA mitocondrial e o processo de envelhecimento	33
1.4. Doenças associadas à idade.....	37
2. OBJETIVOS	45
2.1. Objetivo principal.....	45
2.2. Objetivos específicos.....	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1. População do estudo.....	49
3.2. Extração e purificação de DNA.....	50
3.3. Detecção da deleção do DNA mitocondrial 4977	50
3.4. Validação do procedimento laboratorial desenvolvido	54
3.5. Análise estatística	55
4. RESULTADOS	59
4.1. Análise da presença de DNA mitocondrial e da deleção mitocondrial 4977 nos indivíduos saudáveis	59
4.2. Análise da deleção do DNA mitocondrial 4977 nos indivíduos com cancro da próstata e acidente vascular cerebral.....	61
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Figura representativa da maturação esquelética durante a infância em várias idades. A1) 1- 5 anos de idade, A2) 2- 7 anos, A3) 3- 9 anos, A4) 4- 11 anos, A5) 5-13 anos, A6) 6-15 anos; e B) Estádios de formação dos dentes (molares) de Demirjian. Adaptado de Demirjian et al (1973) e Creo et al (2017) ^(18, 19)	26
Figura 2 - A) Representação esquemática da estrutura das mitocôndrias. B) Representação dos diferentes processos ocorridos durante a fosforilação oxidativa. O ciclo de Krebs fornece várias moléculas de NADH ao complexo I da fosforilação oxidativa. Antes de passar pelo complexo III, os elétrons passam pela ubiquinona para transformar em ubiquinol, seguido de quinol. Depois de o quinol passar pelo complexo III, este é transferido para o citocromo C e complexo IV seguidamente. No complexo IV, a doação de um próton H ⁺ ao oxigénio leva à formação de uma molécula de água. O complexo V utiliza a força eletromotriz criada pelos complexos III e IV para transformar adenosina difosfato (ADP: Adenosine Diphosphate) + fosfato (Pi: Phosphate) em ATP.	29
Figura 3 - Representação esquemática da dinâmica entre a fissão, fusão e mitofagia. Adaptado de Wu Q et al (2017) ⁽³⁷⁾	30
Figura 4 - Figura representativa do DNA mitocondrial e da respetiva localização dos diferentes genes codificados por esta molécula.	31
Figura 5 - A) Representação esquemática do processo de replicação do mtDNA. Quando há uma maior necessidade energética por parte da célula, ocorre a replicação do mtDNA para que haja um aumento do rendimento energético da mitocôndria. A replicação inicia-se na O _H e O _L . Numa mesma mitocôndria, pode haver cópias de mtDNA normais e alteradas (Δ mtDNA). B) Representação da deleção mtDNA 4977. Entre as posições 8482pb e 13459pb, correspondentes aos genes ATP8 e ND5 existem duas repetições iguais de 13pb onde ocorre a deleção comum. Adaptado de Nadee N. et al (2019) ⁽⁹⁷⁾	35
Figura 6 - Efeito Warburg. Diferenças entre a fosforilação oxidativa, glicólise anaeróbia e glicólise aeróbia. Adaptado de Heiden et al, (2009) ⁽¹⁶⁴⁾	39
Figura 7 - Taxas padronizadas de incidência de CaP por idade no mundo em 2018. Adaptado de GLOBOCAN (2018) ⁽¹⁵¹⁾	40
Figura 8 - Implicações do aumento da concentração de ROS nas células. As ROS podem causar alterações no DNA nuclear e mitocondrial e conseqüentemente levar a um défice metabólico nas células. Um aumento de ROS pode provocar um estado crónico de stress oxidativo às células e induzir a senescência celular. De um modo geral, as ROS contribuem para o processo normal do envelhecimento e doenças associadas, como por exemplo a aterosclerose, que é um fator de risco para ocorrência de um AVC.....	41

Figura 9 - Figura representativa da zona da deleção mtDNA 4977 e da zona de controlo no genoma mitocondrial. Pode também observar-se as zonas de ligação dos primers utilizados para a amplificação da zona controlo e de avaliação da presença da deleção mtDNA 4977.51

Figura 10 - Fragmento de 297 pb observado no gel a partir do produto do PCR realizado para a confirmação da presença de mtDNA nas amostras em estudo. Peso molecular GeneRuler 100 pb DNA Ladder 0.1 µg/µL.52

Figura 11 - Fragmento de 361 pb observado no gel a partir do produto do PCR realizado para a confirmação da presença de mtDNA nas amostras em estudo. Peso molecular GeneRuler 100 pb DNA Ladder 0.1 µg/µL.53

Figura 12 - Representação esquemática da sequência verificada através da sequenciação de amostras de indivíduos que apresentam a deleção mtDNA 4977.54

Figura 13 - Frequência (%) de deteção do mtDNA nos diferentes grupos estudados.....59

Figura 14 - Frequência (%) de deteção da deleção mtDNA 4977 nos diferentes grupos etários estudados.60

Figura 15 - Distribuição das frequências de deteção da deleção mtDNA 4977 nas diferentes variáveis analisadas no grupo controlo.....61

Figura 16 - Figura representativa da diferente frequência (%) de deteção da deleção mtDNA 4977 no grupo controlo, grupo AVC e grupo CaP.....62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Doenças associadas à deleção mtDNA 4977.	36
Tabela 2 - Sequência dos primers utilizados no presente estudo e tamanho do fragmento amplificado.	52
Tabela 3 - Distribuição da frequência da deleção mtDNA 4977 no grupo de CaP e no grupo controlo e respetivo OR.	62
Tabela 4 - Risco para os portadores da deleção mtDNA 4977, no momento do diagnóstico apresentarem doença de fenótipo menos agressivo.	63
Tabela 5 - Distribuição da frequência da deleção mtDNA 4977 no grupo de AVC's e no grupo controlo e respetivo OR.	63
Tabela 6 - Risco para os portadores da deleção mtDNA 4977, no momento do diagnóstico apresentarem AVC do tipo TACI.	64

LISTA DE ABREVIATURAS

A

Acetil-CoA - Acetilcoenzima A

ADP - *Adenosine Diphosphate*

ATP - *Adenosine Triphosphate*

ATP8 - Mitochondrial ATP Synthase of subunit 8

AVC - Acidente Vascular Cerebral

B

BER: *Base Excision Repair*

C

CO₂ - *Carbon Dioxide*

CaP - Cancro da Próstata

D

DNA - *Deoxyribonucleic Acid*

Drp1- *Dynamin Related Protein 1*

F

FADH₂ - *Flavin Adenine Dinucleotide*

I

IC 95% - Intervalo de confiança a 95%

IMC - Índice de Massa Corporal

IMM - *Inner Mitochondrial Membrane*

M

mtDNA: *Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid*

mtDNA 4977- Deleção do mtDNA de 4977 pares de bases

N

NADH - *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen*

ND5 - *NADH Ubiquinone Oxidoreductase Subunit 5*

O

OR - *Odds ratio*

OMM - *Outer Mitochondrial Membrane*

O_L - *Lightstrand*

O_H - *Heavy-strand*

P

P - *Teste qui-quadrado (χ^2)*

Pi - *Phosphate*

PSA - *Prostate-Specific Antigen*

pg- *Picograma*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

Q

qPCR - *Real Time Quantitative PCR*

R

RNA - *Ribonucleic Acid*

rRNA - *Ribosomal RNA*

ROS - *Reactive Oxygen Species*

T

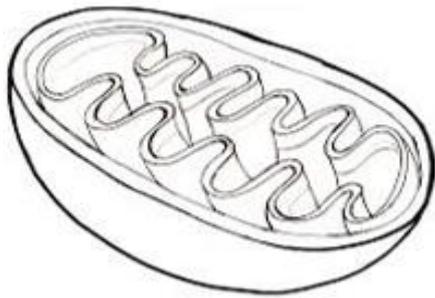
TACI - *Total Anterior Circulation Infarct*

TBE - *Buffer Tris-borate-EDTA*

tRNA - *Transfer RNA*

U

UV – *Ultravioleta*



RESUMO

RESUMO

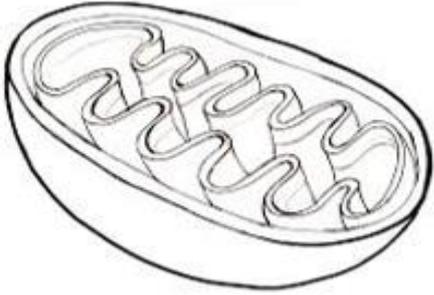
O envelhecimento celular resulta da acumulação de múltiplas formas de dano, em consequência da ocorrência de alterações em vias de manutenção celular, de que são exemplos, as vias envolvidas no metabolismo mitocondrial e na senescência celular. Deste modo, admite-se que as alterações biológicas associadas ao envelhecimento estão relacionadas com a idade, contudo, estas também podem ser influenciadas por fatores exógenos, como os fatores ambientais, sendo que estes podem condicionar variabilidade durante o envelhecimento dos indivíduos. Sendo assim, por vezes a idade cronológica (tempo passado desde o nascimento de um indivíduo até um dado momento temporal) distancia-se da idade biológica (condições dos órgãos, tecidos e células que refletem no estado de saúde de um indivíduo), sendo que indivíduos com a mesma idade cronológica, podem apresentar diferentes níveis de vulnerabilidade e disfunção no organismo. Por este motivo, a determinação da idade biológica pode ser um complemento útil à idade cronológica, refletindo com maior exactidão o estado fisiológico do indivíduo. No âmbito da Medicina Legal, o estabelecimento de biomarcadores moleculares poderão ser úteis como marcadores adicionais no estabelecimento da idade dos indivíduos, auxiliando a ultrapassar algumas das limitações dos métodos existentes, sendo que, a deleção 4977 no DNA mitocondrial (mtDNA: *mitochondrial deoxyribonucleic acid*) tem se revelado como biomarcador promissor para o estabelecimento de idade.

O estudo consistiu na análise do potencial da deleção do mtDNA 4977 como biomarcador molecular de envelhecimento e risco de desenvolvimento de doenças associadas à idade. Assim, neste estudo a deleção mtDNA 4977 foi analisada pela reação em cadeia da polimerase (PCR: *Polymerase Chain Reaction*), a partir de amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis, indivíduos com diagnóstico histopatológico de cancro da próstata (CaP) e em indivíduos com diagnóstico de acidente vascular cerebral (AVC).

De acordo com os resultados, observamos uma associação da deleção mtDNA 4977 com o risco de desenvolvimento de CaP e AVC. Verificamos também, que os indivíduos diagnosticados com CaP portadores desta alteração, têm um risco aumentado de apresentarem CaP menos agressivo no momento do diagnóstico. Contrariamente, os indivíduos diagnosticados com AVC e portadores desta alteração, têm um risco aumentado para o subtipo de pior prognóstico. Deste modo, estes resultados demonstram, que a deleção mtDNA 4977 poderá ser um potencial biomarcador de risco para o desenvolvimento destas doenças associadas ao envelhecimento. Adicionalmente, a presença de fatores como os hábitos tabágicos, o IMC e a hipertensão, podem influenciar

a ocorrência da deleção mtDNA 4977 e, por conseguinte, a frequência desta alteração não apresentar uma correlação com o estabelecimento da idade cronológica dos indivíduos. Assim, admitimos que a ocorrência da deleção mtDNA 4977 reflectirá melhor o estado do envelhecimento celular e deste modo permitirá uma estimativa de idade biológica.

Em conclusão, o presente estudo evidenciou a aplicabilidade da análise da deleção mtDNA 4977 no sangue periférico como uma útil estratégia para a determinação da idade biológica individual e como biomarcador de risco para o desenvolvimento de doenças associadas ao envelhecimento.



ABSTRACT

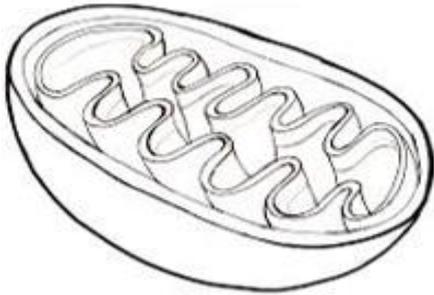
ABSTRACT

The cellular ageing results from the accumulation of multiple forms of damage, caused by several changes in cell maintenance pathways, such as mitochondrial metabolism and cell senescence pathways. Even though it is accepted that the biological changes associated with ageing are related to age, the ageing process is also influenced by exogenous factors, such as environmental factors, that may be responsible by the interindividual variability. The chronological age (the time that has passed since the birth) differs from the biological age (conditions of organs, tissues and cells that reflect an individual's health state). Since individuals with the same chronological age, may present cellular differences and, consequently, different biological age. Thus, the biological age may be a useful approach associated with the chronological age, allowing an accurate analysis of the individual physiological state. In Legal Medicine, the establishment of molecular biomarkers that could be used in addition to the current age markers, can overcome several limitations, being the mitochondrial deoxyribonucleic acid (mtDNA) deletion 4977 a promising biomarker.

The present study analyzed the mtDNA 4977 deletion as a molecular biomarker of ageing and age-related diseases development. Thus, using a PCR technique, we analyzed these molecular alteration in peripheral blood samples from healthy individuals, individuals with histopathological diagnosis of prostate cancer (CaP) and individuals diagnosed with stroke.

According to the results, we observed an association between the mtDNA 4977 deletion with the risk of CaP and stroke development. Moreover, CaP patients with the mtDNA 4977 deletion presented a higher risk of being diagnosed with a less aggressive disease phenotype. On the other hand, the occurrence of the mtDNA 4977 deletion is associated with type of stroke with worse prognosis. Thus, these results demonstrate that the mtDNA 4977 deletion may be a potential risk biomarker of these ageing-related diseases. Additionally, smoking habits, BMI and hypertension may influence the occurrence of the mtDNA 4977 deletion. As so, the occurrence of mtDNA 4977 does not seem to be correlated with the chronological age, suggesting that the occurrence of the mtDNA 4977 deletion may reflect the biological health state.

In conclusion, the present study highlights the potential of peripheral blood mtDNA 4977 deletion analysis as a useful strategy in biological age determination and as a molecular biomarker of age-related diseases development.



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Deleções no DNA mitocondrial como biomarcadores moleculares de envelhecimento

O envelhecimento resulta da acumulação de múltiplas formas de dano e patologias em diferentes tecidos, em consequência da ocorrência de alterações em vias de manutenção celular tais como a atividade metabólica mitocondrial, a senescência celular e o encurtamento dos telômeros (1). O processo de envelhecimento varia de indivíduo para indivíduo e pode ser influenciado por fatores genéticos ou ambientais, de que são exemplos, a dieta alimentar, o *stress* crónico, o sedentarismo e o tabagismo (2, 3).

O envelhecimento pode ser um processo multifactorial e apresentar variações de indivíduo para indivíduo, surgindo a necessidade de se distinguir os conceitos de idade biológica e idade cronológica. A idade cronológica corresponde ao tempo real, normalmente medido em anos, que passou desde o nascimento de um indivíduo até um dado momento temporal (4). Em contrapartida, a idade biológica é um conceito mais subjectivo, caracterizando-se pelas condições das células, tecidos e órgãos de cada indivíduo, refletindo no seu verdadeiro estado fisiológico (5). Sendo assim, a idade biológica pode ser diferente em indivíduos com a mesma idade cronológica (6).

No âmbito das Ciências Forenses, a determinação da idade biológica pode ter várias utilidades, nomeadamente na avaliação do dano corporal, como por exemplo em situações de profissões de risco, em que existe exposição a fatores externos que podem causar patologias associadas (7). Já a estimativa da idade cronológica de um indivíduo é também um dos importantes parâmetros utilizados na determinação de um perfil individual (8). A identificação de cadáveres através do estabelecimento de parâmetros como o sexo, a idade, a estatura e características individuais é por vezes mais limitado em situações de grandes catástrofes, casos em que os restos cadavéricos estiveram expostos a fatores externos ou em contextos de acidentes com desfiguração do cadáver. Nestas situações, os esqueletos podem estar incompletos, degradados e terem sofrido grandes agressões e, por isso, pode ser necessário a determinação da idade do cadáver (9). Para além disso, a identificação também pode ser necessária em casos de desaparecimentos, suspeitas de documentos de identificação falsos, em investigações de filiação realizadas pelos Serviços de Estrangeiros e Fronteiras (SEF) quando há suspeitas de tráfico de menores e/ou qualquer situação em que há dúvidas sobre a identidade do sujeito (10, 11).

Atualmente, a estimativa da idade cronológica é realizada essencialmente através da análise de alterações que ocorrem de forma natural ao longo do tempo, recorrendo-se sobretudo à análise de ossos e dentes, existindo diversos métodos descritos que são aplicados para este fim na Medicina Legal (12, 13). Contudo, a idade cronológica pode ser estimada com maior exatidão em crianças até aos 16 anos de idade através de métodos que analisam alterações anatómicas relacionadas com o desenvolvimento, tais como a análise das dimensões dos ossos, erupção e mineralização dentária, fusão epifisária e análise de centros de ossificação (Figura 1) (14-17).

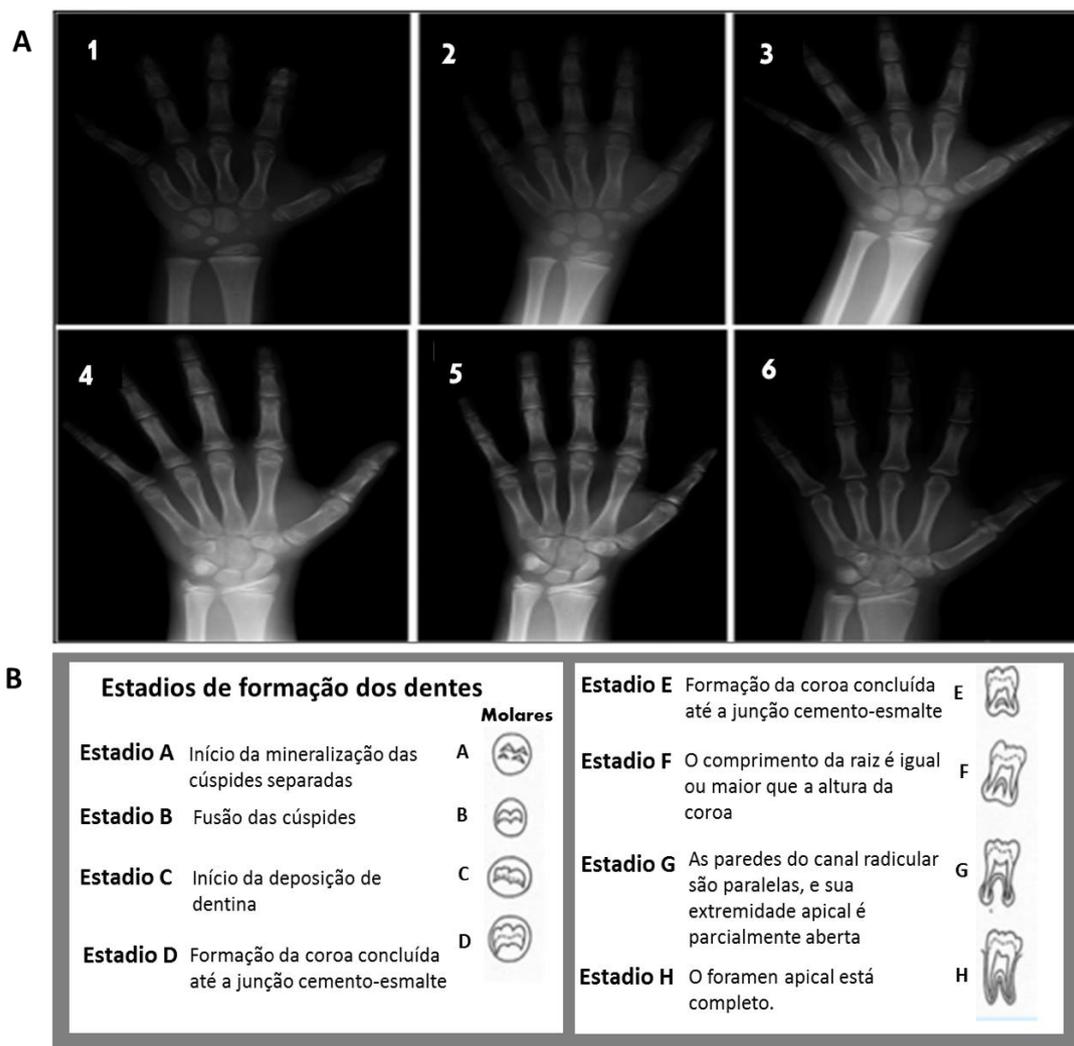


Figura 1 - Figura representativa da maturação esquelética durante a infância em várias idades. **A1)** 1- 5 anos de idade, **A2)** 2- 7 anos, **A3)** 3- 9 anos, **A4)** 4- 11 anos, **A5)** 5-13 anos, **A6)** 6-15 anos; e **B)** Estádios de formação dos dentes (molares) de Demirjian. Adaptado de Demirjian et al (1973) e Creo et al (2017) (18, 19).

Nos adultos, os métodos de determinação de idade cronológica são pouco precisos e estão direccionados essencialmente para as estruturas ósseas e dentes como a sínfise púbica, análise das costelas, dentes e histologia óssea (20-23). Contudo, fatores como hábitos tabágicos, bruxismo, má higiene bucal, osteoporose e maturação precoce dos ossos podem aumentar as margens de erro nos valores das medições e consequentemente afetar a determinação da idade (24). As limitações destes métodos são variadas, abrangendo pontos desde a falta de registos dentários prévios, o que dificulta a comparação da arcada dentária de um cadáver, até aos diferentes níveis de maturação esquelética em indivíduos com a mesma idade cronológica (24). Considerando que os métodos de determinação de idade cronológica são pouco precisos, com erros de medição que podem ir até aproximadamente 11 anos, é essencial complementá-los. Deste modo é necessário o estabelecimento de novos biomarcadores moleculares de idade de forma a ultrapassar as limitações que se verificam na aplicação dos presentes métodos na Medicina Legal (9, 25).

Os biomarcadores são caracterizados pela *Food and Drug Administration* como sendo indicadores de processos biológicos, tanto normais quanto patogénicos e de respostas a uma determinada intervenção terapêutica ou exposição, que podem ser avaliadas em fluidos corporais (26). Um biomarcador ideal, deve ser sensível e específico ao parâmetro de interesse, ser possível de ser analisado através de procedimentos minimamente invasivos e métodos de quantificação de baixo custo (27, 28). Na tentativa de se determinarem novos biomarcadores de idade, existem estudos no âmbito da investigação forense que se baseiam em alterações bioquímicas que ocorrem nos tecidos e órgãos durante o processo natural do envelhecimento, com o objetivo de definir novos biomarcadores mais sensíveis e específicos (9). Existem vários métodos químicos para estimativa de idade como por exemplo: a acumulação de chumbo nos ossos, a racemização de ácido aspártico, a análise da composição química dos dentes, as ligações cruzadas de colagénio e glicosilação de proteínas (9). No âmbito da biologia molecular, métodos como a avaliação do encurtamento dos telómeros, rearranjos circulares de excisão de receptores de células T simples e alterações no ácido desoxirribonucleico (DNA: *deoxyribonucleic acid*) mitocondrial (mtDNA), nomeadamente deleções e mutações pontuais, apresentam também potencial de serem usados como biomarcadores úteis para a estimativa de idade (25, 29-34).

1.2. Mitocôndria: DNA, função e dinâmica

As mitocôndrias são organelos citoplasmáticos, cuja principal função é a produção de energia sob a forma de adenosina trifosfato (ATP: Adenosine Triphosphate) (35, 36). As mitocôndrias possuem uma membrana externa permeável que delimita o organelo (OMM: *Outer Mitochondrial Membrane*) e possui poros ao redor do espaço intermembranar (37). Para além disso a mitocôndria possui também uma membrana interna mais impermeável (IMM: *Inner Mitochondrial Membrane*) que separa o espaço intermembranar da matriz mitocondrial, apresentando esta um elevado conteúdo proteico. Na IMM formam-se invaginações denominadas cristas mitocondriais, onde ocorre a fosforilação oxidativa (38). A estrutura das mitocôndrias é crucial para a sua dinâmica e função bioenergética (39).

No interior das mitocôndrias ocorre a respiração celular, um processo a qual resulta numa produção de energia sob a forma de ATP. Este processo metabólico de produção de energia pode ser anaeróbio, em situações de hipóxia, ou aeróbio, nas situações em que as células têm acesso ao oxigénio (39). Inicialmente, a molécula de glicose é convertida em piruvato no citosol da célula - glicólise (40). O piruvato atravessa as membranas mitocondriais e é convertido em acetilcoenzima A (acetil-CoA). Estes, por sua vez, entra no ciclo do ácido tricarboxílico, resultando na formação de dióxido de carbono (CO_2 : Carbon dioxide), moléculas de nicotinamida adenina di-nucleotido-hidrogénio (NADH: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen*) e di-nucleótido de flavina adenina (FADH_2 : *Flavin adenine dinucleotide*). As moléculas de NADH e FADH_2 migram para as cristas mitocondriais onde irão ceder electrões aos complexos proteicos existentes na IMM, havendo produção de água a partir do oxigénio (O_2) e uma elevada quantidade de moléculas de ATP (Figura 2) (41, 42). Em situações de hipóxia, as células recorrem apenas à glicólise para obter energia, sendo que nestes casos ocorre um excesso de produção de ácido láctico no citosol (43-45).

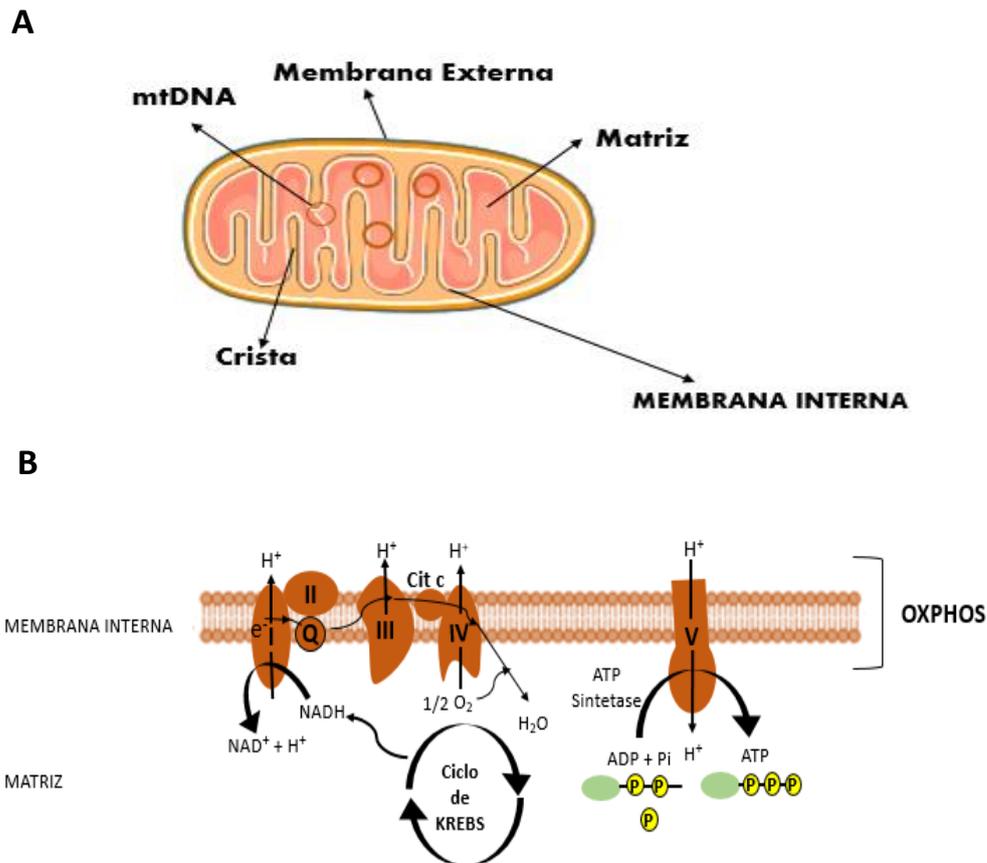


Figura 2 - A) Representação esquemática da estrutura das mitocôndrias. **B)** Representação dos diferentes processos ocorridos durante a fosforilação oxidativa. O ciclo de Krebs fornece várias moléculas de NADH ao complexo I da fosforilação oxidativa. Antes de passar pelo complexo III, os elétrons passam pela ubiquinona para transformar em ubiquinol, seguido de quinol. Depois de o quinol passar pelo complexo III, este é transferido para o citocromo C e complexo IV seguidamente. No complexo IV, a doação de um próton H^+ ao oxigênio leva à formação de uma molécula de água. O complexo V utiliza a força eletromotriz criada pelos complexos III e IV para transformar adenosina difosfato (ADP: *Adenosine Diphosphate*) + fosfato (P_i : *Phosphate*) em ATP.

Como sub-produto da fosforilação oxidativa ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS: *Reactive Oxygen Species*) (46). As ROS são moléculas altamente reativas que se comportam como agentes oxidantes e podem causar danos ao retirar elétrons de diversas moléculas como o DNA, aminoácidos, ácidos gordos e outras moléculas (47). A produção de ROS pode ocorrer por causas endógenas ou exógenas, sendo que, deste último são exemplos a exposição à radiação UV (ultravioleta), radiação ionizante, tabaco, poluentes atmosféricos e produtos químicos tóxicos (48, 49). A produção de ROS pode causar danos oxidativos e consequentemente levar à inativação de proteínas e a danos nas membranas biológicas (50-52).

Sempre que ocorrem danos nas mitocôndrias por ação de ROS, estas sofrem o processo de fissão. Durante este processo as mitocôndrias inalteradas separam-se das que possuem alterações no mtDNA através da proteína relacionada à dinamina 1 (Drp1: Dynamin related protein 1), envolvendo a mitocôndria e formando uma espécie de anel (39). Após a fissão, os autofagossomas reconhecem as mitocôndrias danificadas e fundem-se com os lisossomas para formar os autolisossomas, onde a degradação das mitocôndrias é finalizada, sendo este processo denominado por mitofagia (Figura 3) (53-56). Em contrapartida, quando há a necessidade de aumentar o seu rendimento energético, as mitocôndrias sofrem o processo de fusão em que duas mitocôndrias despolarizadas unem o seu conteúdo (Figura 3) (53).

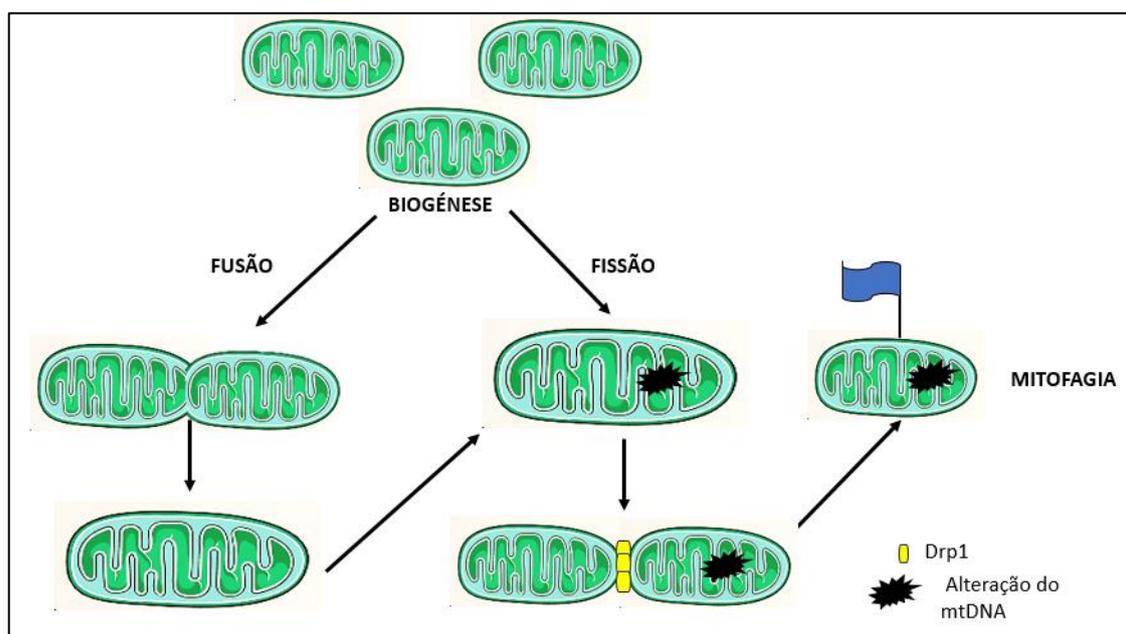


Figura 3 - Representação esquemática da dinâmica entre a fissão, fusão e mitofagia. Adaptado de Wu Q et al (2017) ⁽³⁹⁾.

A dinâmica entre estes três processos (fusão, fissão e mitofagia) é de extrema importância para a eliminação de mitocôndrias danificadas (55). Sendo assim, um comprometimento da mitofagia ou da dinâmica de fissão e fusão mitocondrial, pode provocar uma acumulação de danos nestes organelos e, conseqüentemente, levar a uma disfunção na cadeia respiratória (39). Em tecidos como o cérebro, coração e músculos, que consomem muita energia e possuem uma elevada quantidade de mitocôndrias, a acumulação de mitocôndrias danificadas pode levar ao desenvolvimento de várias doenças como a hipertrofia cardíaca, esclerose amiotrófica lateral e doenças neurodegenerativas como as doenças de Parkinson, Alzheimer e Huntington (57, 58). Para além destas doenças, existem outras patologias hereditárias de origem materna, que estão

relacionadas com alterações no mtDNA. Admite-se que o material genético mitocondrial é transmitido à descendência essencialmente por linhagem materna e aparentemente não sofre recombinação (59-66). Sendo assim, alterações no mtDNA materno podem levar a doenças mitocôndrias, tais como: o síndrome de Leigh, síndrome de Pearson, neuropatia ótica hereditária de Leber e síndrome de Kearns-Sayre (62-66).

O mtDNA é circular e por isso menos suscetível à ação de exonucleases, enzimas capazes de fragmentar o DNA, esta característica torna a análise desta molécula uma ferramenta útil em amostras biológicas que sofreram degradação (36). Esta molécula é formada por aproximadamente 16,5 kilobases e contém genes que codificam para ácidos ribonucleicos (RNA: Ribonucleic acid) ribossomais (rRNA: *ribosomal* RNA), o 12S e o 16S, RNAs de transferência (tRNA: *transfer* RNA), moléculas que transferem aminoácidos durante a síntese de proteínas, e genes que codificam proteínas importantes para a fosforilação oxidativa (Figura 4) (67, 68). O mtDNA está protegido por uma dupla membrana mitocondrial, mantendo-se intacto em diferentes condições de temperatura e humidade (69). Esta molécula possui duas cadeias, uma denominada por cadeia pesada que é rica em purinas, e outra denominada por cadeia leve que é rica em pirimidinas (70). A replicação ocorre bidireccionalmente, iniciando-se em tempos diferentes e em dois pontos de origem espaciais, para a cadeia pesada (O_H:heavy-strand) e leve (O_L:lightstrand) respetivamente (71).

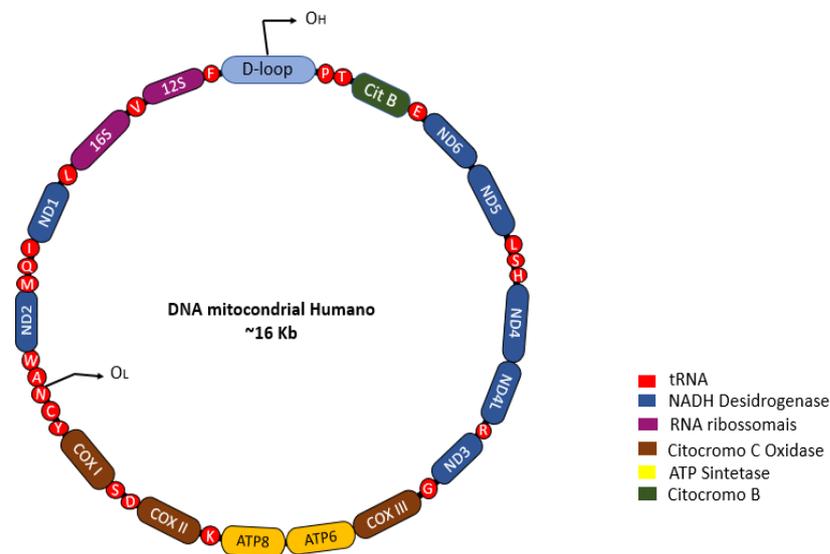


Figura 4 - Figura representativa do DNA mitocondrial e da respetiva localização dos diferentes genes codificados por esta molécula.

Uma célula pode conter centenas de mitocôndrias (o número varia consoante a necessidade energética do tecido) e uma mitocôndria normalmente contém cerca de 2 a 7 moléculas de mtDNA (72). Se ocorrerem alterações no mtDNA, podem coexistir cópias normais e alteradas numa mesma célula, fenómeno conhecido por heteroplasmia do mtDNA (73). Os níveis de heteroplasmia variam consoante a replicação do mtDNA que ocorre de forma aleatória e independente do ciclo celular, dependendo apenas do *status* energético da célula (74). O tipo de alteração e a percentagem de heteroplasmia predominantemente determinam a gravidade das doenças associadas a alterações do mtDNA (75).

Num contexto forense, a heteroplasmia do mtDNA refere-se à existência de dois haplótipos diferentes que podem estar localizados apenas num único tecido ou em todo o corpo (76). A heteroplasmia pode estar relacionada com uma diferença no comprimento da molécula de mtDNA ou com a posição de um nucleótido (77). A existência de heteroplasmia de comprimento num indivíduo, impede a utilização do seu mtDNA para fins de identificação, devido à possibilidade de ocorrer mudanças consideráveis entre gerações (77). Em contrapartida, a existência de alterações num único nucleótido do mtDNA que seja compartilhado entre parentes maternos, pode auxiliar na identificação de famílias inteiras, como foi o caso da identificação genética da família Romanov. Os seus restos mortais foram degradados por diversos componentes químicos. Contudo, uma vez que o mtDNA não sofre recombinação e é resistente à degradação, foi possível identificar todos os elementos da família Romanov através da comparação do mtDNA de uma única descendente viva (78).

Apesar do mtDNA estar protegido por uma dupla camada fosfolipídica e isto lhe conferir proteção a fatores externos, há uma grande exposição a radicais livres induzindo vários danos nesta molécula (79). O principal mecanismo de reparação de danos no mtDNA é realizado por excisão de bases (BER: *Base Excision Repair*) (67). O BER inicia-se com um reconhecimento destes danos, seguido de um processamento realizado por enzimas que removem a alteração e repõem a integridade da sequência danificada (80). No entanto, falhas neste mecanismo de reparação podem levar a um aumento na ocorrência de alterações a nível do mtDNA e a um comprometimento metabólico (81).

1.3. Deleções no DNA mitocondrial e o processo de envelhecimento

De acordo com a “teoria do envelhecimento” desenvolvida por Harman, a produção de ROS aumenta gradualmente com a idade e influencia a senescência celular (82). Mesmo em condições fisiológicas normais, pode ocorrer um “estado crônico de *stress* oxidativo” nas células de organismos aeróbios devido a um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes (83). Este desequilíbrio causa vários danos em diferentes macromoléculas e compromete a eficiência funcional de vários processos celulares, sendo este mais acentuado durante o envelhecimento (84). De acordo com a “teoria mitocondrial”, as ROS produzidas nas mitocôndrias podem induzir danos nas proteínas, fosfolípidos e ácidos nucleicos comprometendo desta forma a cadeia respiratória (82). No entanto, este comprometimento da cadeia respiratória pode por *feedback* positivo aumentar a concentração de ROS e a ocorrência de alterações heteroplasmáticas no mtDNA (85). Deste modo, o aumento de ROS nas células pode resultar no envelhecimento e no desenvolvimento de várias doenças tais como: diabetes, doenças cardiovasculares e cancro (8, 86-94). Estas alterações associadas à idade são acumuladas em tecidos com baixas taxas de proliferação celular, tornando-os energeticamente comprometidos (8). Para além disso, também podem ocorrer alterações nos mecanismos homeostáticos mitocondriais associados com a ativação de vias de sinalização relacionadas com a senescência celular, contribuindo para o processo do envelhecimento (95).

Em diversos estudos, tanto em humanos como em modelos animais, verificou-se a ocorrência de alterações no mtDNA tais como: deleções, duplicações e mutações pontuais em diferentes tipos de tecidos (30, 96, 97). As deleções são alterações que se caracterizam pela perda de um ou mais nucleótidos de um fragmento de DNA, sendo que atualmente são conhecidas mais de 263 deleções no mtDNA (98). Estas alterações no mtDNA são facilmente detetadas em tecidos com alto consumo energético e pouca proliferação celular, acumulando-se ao longo do tempo e sendo, por isso, um potencial biomarcador molecular de idade biológica, com possíveis aplicações em Medicina Legal (8, 82, 86-93).

Os mecanismos de ocorrência das deleções não são inteiramente compreendidos. Algumas evidências sugerem que as deleções do mtDNA ocorrem devido a quebras na cadeia dupla e falhas nos mecanismos de reparação (99). No entanto, os erros de replicação do mtDNA são considerados a principal causa da ocorrência das deleções (100-102). Estas deleções ocorrem essencialmente entre repetições perfeitas (62%) (deleções de classe I), que consiste em duas ou mais repetições de uma sequência específica. Por sua vez, as deleções de classe II correspondem a 12% das deleções mitocondriais e caracterizam-se pelo flanqueamento de repetições imperfeitas, que são sequências repetidas porém não exatamente iguais. Adicionalmente, cerca de 20% das deleções são de classe III, caracterizadas por não serem flanqueadas por nenhuma sequência de repetição, sendo que, a restante percentagem de ocorrência das deleções ocorrem por causas desconhecidas (103).

Entre as deleções no mtDNA, a mais comumente associada quer a doenças mitocondriais como a doenças relacionadas com o processo natural do envelhecimento é a deleção de 4977 pares de bases no mtDNA (mtDNA 4977) (79, 104). Esta deleção foi primeiramente descrita num estudo sobre a síndrome de *Kearns-Sayre* (75, 80, 102-106). Esta deleção ocorre numa zona do mtDNA mais suscetível a alterações, uma vez que está localizada entre sequências repetitivas que favorecem a ocorrência de inserções e deleções por deslizamento das cadeias durante a replicação do DNA (105). A deleção mtDNA 4977 é classificada como uma deleção de classe I, por ocorrer entre duas repetições com 13 pb (ACCTCCCTCACCA), entre as posições 8470-8482, [subunidade 8 do gene mitocondrial ATP sintase (ATP8: subunit 8 of Mitochondrial Gene ATP Synthase)] e 13447-13459, [gene codificante da subunidade 5 da NADH ubiquinona oxidoreductase (ND5: *NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit 5*)] localizadas no arco maior do genoma mitocondrial (Figura 5) (103, 106). Esta deleção tem como consequência a perda de genes importantes para a fosforilação oxidativa: genes que codificam para quatro subunidades do complexo I (enzima NADH desidrogenase), um do complexo IV (enzima citocromo C oxidase), dois do complexo V (subunidades 6 e 8 da ATP sintetase) e cinco tRNAs (Figura 5) (107).

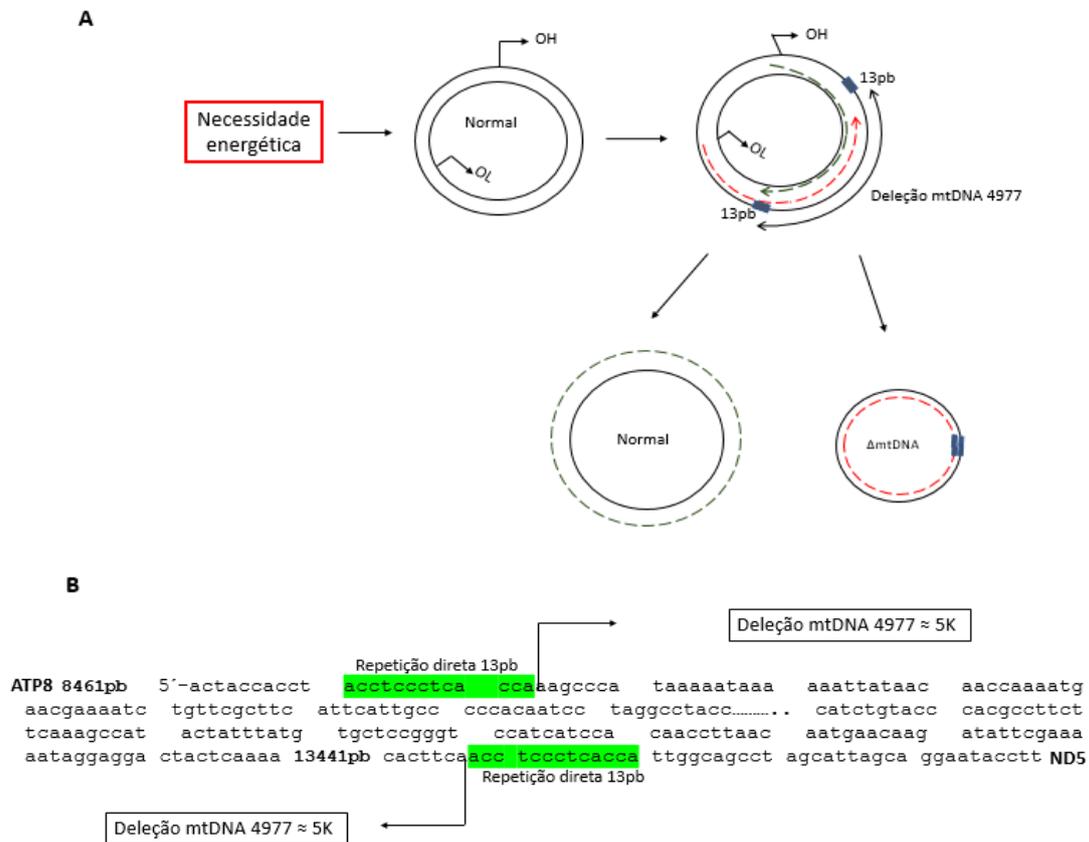


Figura 5 - A) Representação esquemática do processo de replicação do mtDNA. Quando há uma maior necessidade energética por parte da célula, ocorre a replicação do mtDNA para que haja um aumento do rendimento energético da mitocôndria. A replicação inicia-se na O_H e O_L . Numa mesma mitocôndria, pode haver cópias de mtDNA normais e alteradas (Δ mtDNA). **B)** Representação da deleção mtDNA 4977. Entre as posições 8482pb e 13459pb, correspondentes aos genes ATP8 e ND5 existem duas repetições iguais de 13pb onde ocorre a deleção comum. Adaptado de Nadee N. et al (2019) ⁽⁹⁹⁾.

Vários estudos realizados em diferentes tecidos e órgãos, incluindo a pele, olhos, cérebro, coração, músculo esquelético e diferentes tecidos tumorais, demonstram que a acumulação da deleção mtDNA 4977 é proporcional ao aumento do *stress* oxidativo por excesso de formação de ROS (Tabela 1) (108).

Tabela 1 - Doenças associadas à deleção mtDNA 4977.

Cancros	Referências	Outras doenças	Referências
Cancro Colorretal	(109, 110)	Síndrome de <i>Kearns-Sayre</i>	(107)
Cancro da Mama	(111, 112)	Aterosclerose Coronária	(113, 114)
Melanoma	(115, 116)	Doenças de Pele (Fotoenvelhecimento)	(117-119)
Carcinoma Hepatocelular	(120-122)	Infertilidade	(123, 124)
Carcinoma Gástrico	(108, 125)	Doença de Huntington	(126)
Cancro do Esófago	(127, 128)	Patologia Coclear	(129)
Cancro Oral	(130)	Doença de Alzheimer	(131)
Cancro do Pulmão	(132)	Síndrome de Pearson	(133)
Tumor de <i>Warthin</i> (glândulas salivares)	(134)	Doença Testicular Primária	(135)
Cancro do Colo do Útero	(136)	Oftalmoplegia Externa Progressiva	(137)
Cancro da Próstata	(138)	Degeneração Neuromuscular	(139)
		Doença Arterial Periférica Unilateral	(140-142)
		Astenia Severa	(143)
		Cirrose	(143)
		Morte Súbita No Adulto	(144)
		Doença Arterial Coronária	(145)
		Anemia Regenerativa em Lactantes	(146)

No âmbito da Medicina Legal, os estudos de Meissner e colaboradores permitiram estimar a idade cronológica de indivíduos através do estudo da frequência da deleção mtDNA 4977 no músculo esquelético, coração e diferentes áreas do cérebro (34, 147, 148). Contudo, os resultados dos estudos da deleção mtDNA 4977 associados à idade no

sangue são controversos ou inconclusivos (149, 150). Uma vez que o mtDNA pode ser detetado no sangue periférico e este pode ser obtido de uma forma minimamente invasiva, o uso deste tipo de amostra para a avaliação da presença da deleção mtDNA 4977, poderá ser uma mais valia em Medicina Legal (149). Para além disso, o sangue é um tecido com uma elevada taxa de alterações somáticas no mtDNA e a medição destas taxas pode ser realizada com recurso a apenas 1 picograma (pg) de DNA genómico (151, 152). Deste modo são necessários mais estudos da deleção mtDNA 4977 no sangue com o objetivo de melhor compreender a associação desta deleção com a idade e explorar o seu potencial como biomarcador de idade de uma forma minimamente invasiva (148).

1.4. Doenças associadas à idade

As doenças relacionadas com a idade ocorrem por consequência do processo do envelhecimento, sendo que a idade é um fator de risco significativo para estas doenças (1, 153). As doenças associadas à idade mais prevalentes no países desenvolvidos são as doenças cardiovasculares e o cancro (1). Ambas as doenças, são patologias que normalmente são acompanhadas por comorbilidades, havendo uma necessidade de apoio de um cuidador, serviços ao domicílio e recurso a tecnologias assistivas, que ajudam a suprir as necessidades de cuidados dos doentes (154). Para além disso, as comorbilidades causadas por estas patologias, podem levar a uma incapacidade para o trabalho e à necessidade de ajuda financeira por parte do estado (155). Estes fatores em conjunto, têm uma considerável importância para a saúde pública, visto que abrangem uma elevada quantidade de indivíduos. Para além disso, estas doenças têm um impacto na economia, pois, por vezes, as incapacidades associadas a estas patologias estão associadas à diversos gastos que são financiados pelo governo (154). Deste modo, determinar novos biomarcadores moleculares preditivos de doenças associadas à idade, poderia auxiliar numa deteção precoce destas doenças e, conseqüentemente, na diminuição das conseqüências mais graves destas patologias. Assim, tanto o doente como a economia do país teriam mais benefícios.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o cancro é uma doença que se caracteriza pelo crescimento de células alteradas, além dos limites habituais, que adquirem a capacidade de invadir tecidos adjacentes e/ou se disseminar para outros órgãos à distância (153). Esta doença foi a responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018 e estima-se que o número de mortes ultrapasse os 20 milhões em 2025 (153, 156). O aumento do número de casos está essencialmente associado à exposição a vários fatores de risco que

promovem a carcinogénese, tais como: excesso de exposição a radiação UV, consumo de álcool, tabaco e maus hábitos alimentares (157).

O cancro é uma doença heterogénea com diferentes etiologias, padrões de evolução e tratamento. Existem vários fatores, internos e/ou externos, que induzem alterações no DNA, interferindo com diferentes vias de sinalização relacionadas com vários processos celulares, tais como: a morte celular programada, a diferenciação, a migração e a proliferação celular, contribuindo desta forma, para o desenvolvimento do cancro (75, 158). Devido à relação das mitocôndrias com processos como a senescência, metabolismo e apoptose celular, vários estudos sobre alterações no mtDNA têm sido realizados em doentes com cancro com o objetivo de determinar potenciais biomarcadores moleculares de risco para esta doença (138).

As células cancerígenas têm uma maior taxa de proliferação e, por isso, consomem mais energia em forma de ATP (159). Para além disso, durante a carcinogénese, ocorrem diversas alterações a nível celular, tais como: na autofagia, no metabolismo da glicose, lípidos, aminoácidos e um aumento da produção de ROS (158, 160). Sendo assim, devido ao rearranjo metabólico ocorrido nas células cancerígenas, o consumo de glicose é alterado (161).

Numa célula normal, existe a preferência pela fosforilação oxidativa como forma de obtenção de energia, uma vez que, durante a fosforilação oxidativa são formadas trinta e seis moléculas de ATP (162). Deste modo, seria mais rentável para a célula tumoral optar pela fosforilação oxidativa como forma de obtenção de energia, optando as células normais pela glicólise apenas em situações de hipóxia (163). Contrariamente ao que se esperaria, segundo Warburg, existe uma preferência pela realização da glicólise em comparação com a fosforilação oxidativa por parte das células cancerígenas, mesmo em condições normais de oxigénio (Figura 6) (164). Este mecanismo de reprogramação metabólica, denominado por “*Efeito de Warburg*”, resulta numa produção elevada de ácido láctico e gera questões à comunidade científica sobre as vantagens seletivas que este rearranjo proporciona às células cancerígenas, sendo que este rearranjo se verifica na maioria dos cancros (162, 164). Na tentativa de explicar este efeito, Warburg propôs que o rearranjo metabólico que as células tumorais sofrem, ocorra devido a uma disfunção mitocondrial que as leva à realização da glicólise no lugar da fosforilação oxidativa. Contudo, outra teoria afirma que o efeito Warburg pode fornecer uma vantagem seletiva nos microambientes hipóxicos e ácidos frequentemente característicos dos tumores sólidos sendo, deste modo, vantajoso para as células cancerígenas estarem adaptadas a uma sobrevivência nestes ambientes, de forma a manter e proliferar o tumor (165).

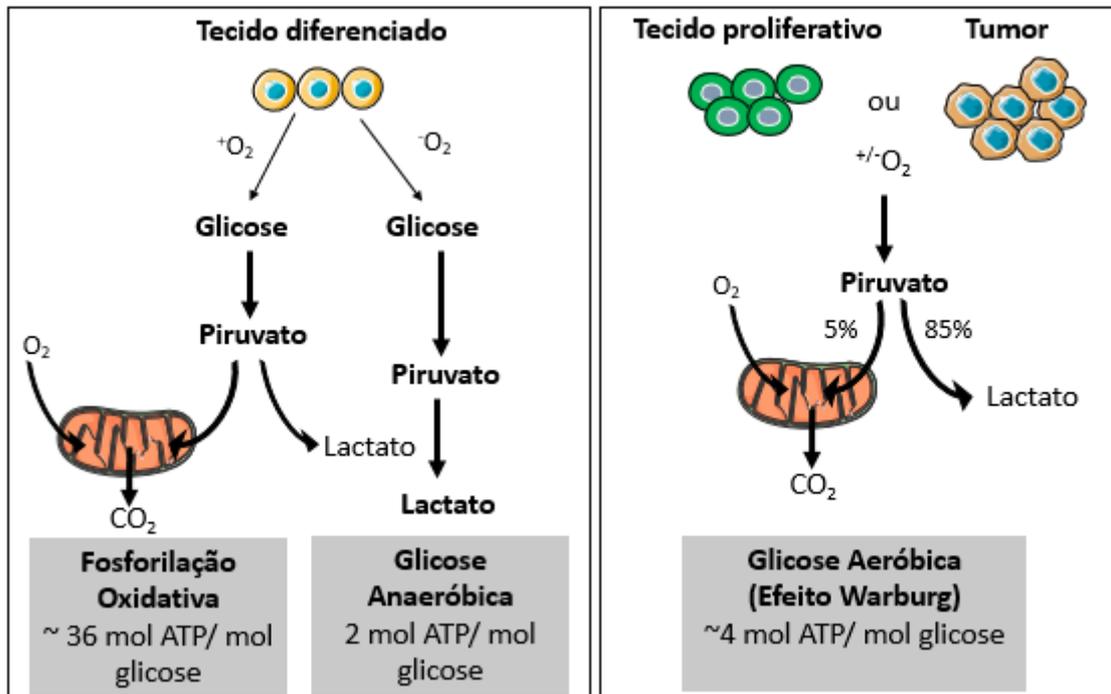


Figura 6 - Efeito Warburg. Diferenças entre a fosforilação oxidativa, glicólise anaeróbica e glicólise aeróbica. Adaptado de Heiden et al, (2009) ⁽¹⁶⁶⁾.

O cancro da próstata (CaP) é atualmente o segundo cancro mais incidente na população masculina (153). De acordo com o *International Agency for Research on Cancer*, aproximadamente 1,3 milhões de homens foram diagnosticados com CaP em 2018, o que corresponde a 29,3% dos cancros diagnosticados em homens em todo o mundo (Figura 7) (153).

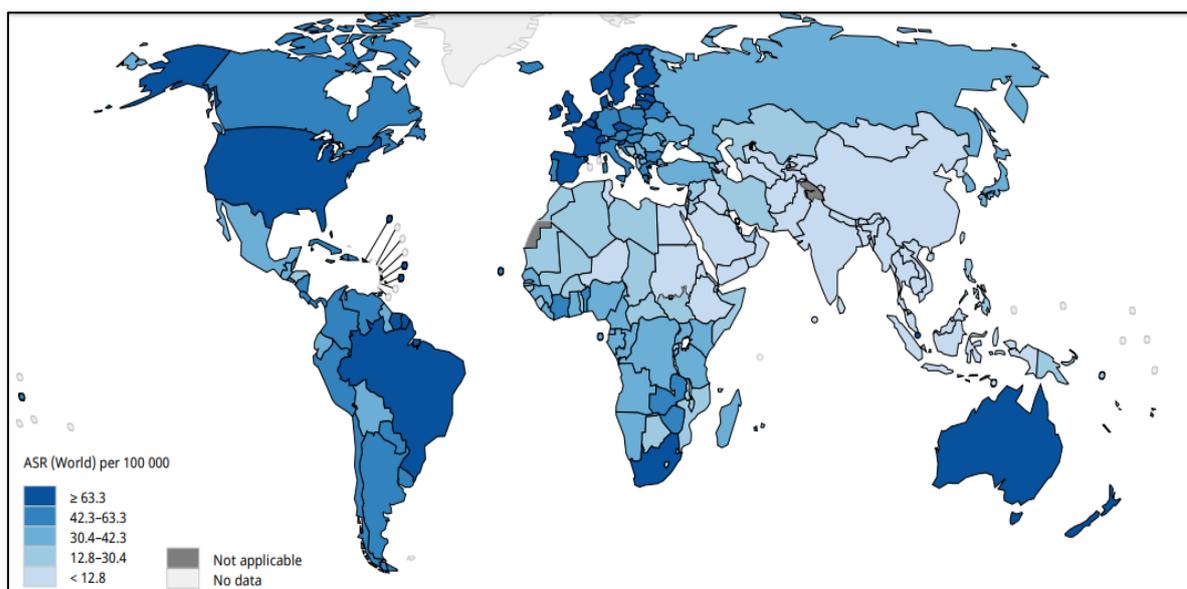


Figura 7 - Taxas padronizadas de incidência de CaP por idade no mundo em 2018. Adaptado de GLOBOCAN (2018) ⁽¹⁵³⁾.

Em Portugal, segundo dados recentes da GLOBOCAN, a incidência de CaP no ano passado foi de 6 609 novos casos de CaP, com cerca de 1900 mortes, o que representa 3,5% do total de mortes em Portugal ⁽¹⁵³⁾. O CaP tem uma incidência de um a cada três homens, para indivíduos com idades compreendidas entre os 60-69 anos e de 46% em homens com mais de 70 anos, sendo que o número de mortes por CaP nesta faixa etária tem diminuído nos últimos anos ⁽¹⁶⁷⁾. Esta diminuição deve-se sobretudo ao aumento da deteção precoce de CaP desde a implementação do uso generalizado do teste de doseamento do antígeno específico da próstata (PSA: *Prostate-Specific Antigen*) ^(168, 169). Contudo, o teste PSA apresenta uma reduzida especificidade, o que pode levar a um sobrediagnóstico de CaP se não for acompanhado por métodos auxiliares. Deste modo, é necessário que o teste PSA seja acompanhado por outros métodos adicionais para o correcto diagnóstico de CaP ⁽¹⁷⁰⁾. Tendo em conta o rearranjo metabólico que ocorre nas células cancerígenas e o contributo das mitocôndrias em processos como a apoptose e senescência celular, o mtDNA torna-se um interessante alvo no estudo de CaP, com a finalidade de se determinarem novos biomarcadores moleculares úteis na avaliação do risco de desenvolvimento desta doença ⁽¹³⁸⁾.

O acidente vascular cerebral (AVC) é um problema de saúde pública, que corresponde a uma das principais causas de morte no mundo ^(171, 172). Por sua vez, em Portugal, esta doença corresponde à principal causa de morte e incapacidades ^(171, 173). O AVC resulta da morte de células cerebrais devido à falta de oxigénio, causada por um bloqueio de uma artéria (AVC isquémico) ou devido ao rompimento de um vaso sanguíneo

(AVC hemorrágico), causando lesões nas células cerebrais (174). A patogênese da doença relaciona-se essencialmente com a hipertensão arterial e com a formação/rutura de placas ateroscleróticas (175). A aterosclerose é uma doença que se caracteriza pela acumulação de lipoproteínas e por um extenso processo inflamatório na parede das artérias cerebrais que resulta num estreitamento progressivo dos grandes vasos (Figura 8) (176). Estudos sugerem que alterações no mtDNA estão intimamente relacionados com a patogênese da aterosclerose, bem como com a severidade das lesões (177-181). Ballinger e colaboradores demonstraram, que nas aortas ateroscleróticas, existe uma maior percentagem de alterações no mtDNA comparando com as aortas saudáveis (79). Esta percentagem deve-se ao *stress* oxidativo impulsionado pelo processo inflamatório a que as células estão sujeitas durante a patogênese da aterosclerose provocando, deste modo, um *feedback* positivo entre a inflamação, *stress* oxidativo e alterações no mtDNA (182-184).

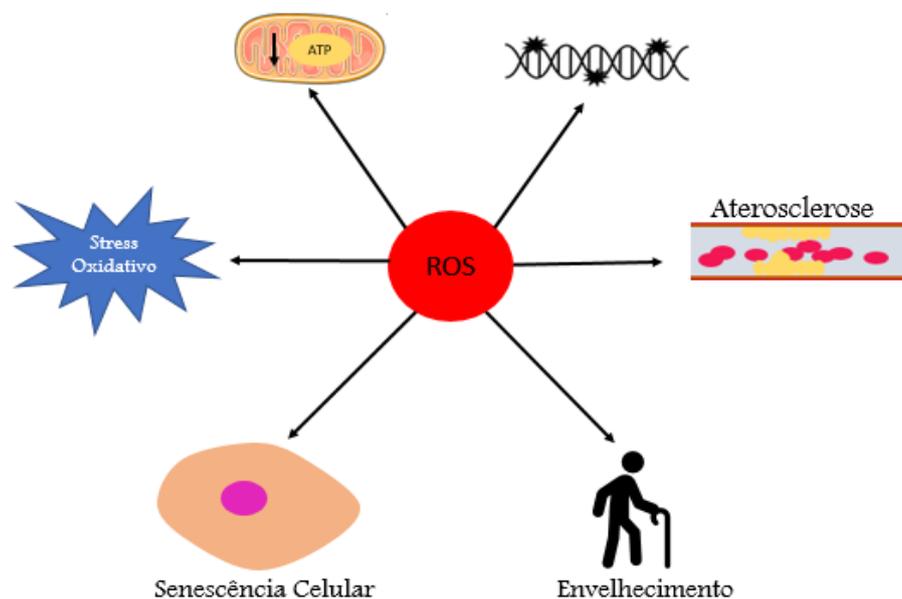
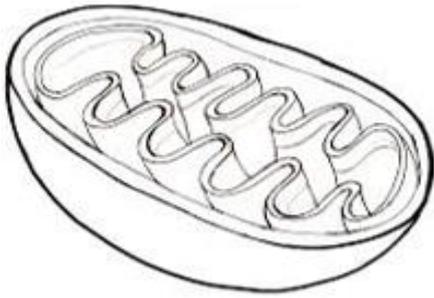


Figura 8- Implicações do aumento da concentração de ROS nas células. As ROS podem causar alterações no DNA nuclear e mitocondrial e consequentemente levar a um déficit metabólico nas células. Um aumento de ROS pode provocar um estado crónico de *stress* oxidativo às células e induzir a senescência celular. De um modo geral, as ROS contribuem para o processo normal do envelhecimento e doenças associadas, como por exemplo a aterosclerose, que é um fator de risco para ocorrência de um AVC.

De facto, já existem estudos que tentam relacionar a deleção mtDNA 4977 com estas doenças associadas ao envelhecimento supramencionadas (138, 185). Yu e Yan , para estudar a relação da deleção mtDNA 4977 com o CaP, utilizou amostras provenientes de biópsias da próstata de doentes com CaP e amostras de indivíduos com hiperplasia prostática benigna (controlo). Os resultados demonstraram que existe uma maior frequência de detecção desta deleção em indivíduos com CaP comparado com indivíduos com hiperplasia prostática benigna. Os graus de *Gleason* dos indivíduos com CaP foram significativamente maiores naqueles que tiveram a deleção, comparado com os indivíduos sem a deleção. Tendo em conta estes resultados, os autores sugerem que a detecção da deleção mtDNA 4977 pode ser um preditor de grau maligno para CaP (138). Contudo, não existem estudos da deleção mtDNA 4977 relacionados com CaP no sangue. Deste modo, é necessário a realização de estudos desta deleção no tecido sanguíneo de forma a compreender se os resultados de Yu e Yan se verificam em outros tecidos. Para além do CaP, existe um estudo da deleção mtDNA 4977 no AVC (185). Huang e colaboradores, estudaram esta alteração do mtDNA no sangue de doentes que tiveram AVC isquémico, sendo que, os resultados não permitiram encontrar nenhuma associação da deleção mtDNA 4977 com o risco ou gravidade de AVC isquémico. Contudo, neste estudo foram utilizados apenas 191 doentes e 74 indivíduos saudáveis. Desta forma, os autores sugeriram a realização de um novo estudo da deleção mtDNA 4977, que incluísse um maior número de doentes, para uma melhor representação da população em estudo (185). Deste modo, torna-se importante o estudo desta deleção no sangue, uma vez que é uma forma menos invasiva e mais simples de se obter amostras de mtDNA, permitindo relacionar a deleção mtDNA 4977 com estas doenças como também determinar novos biomarcadores moleculares preditivos de doenças associadas ao envelhecimento.



OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

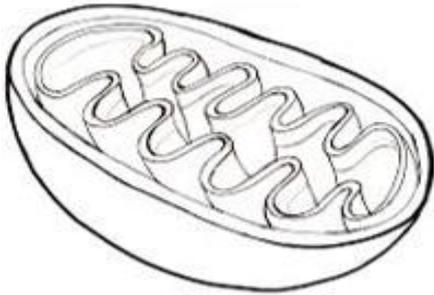
2.1. Objetivo principal

Estudo da deleção mtDNA 4977 como potencial biomarcador molecular de envelhecimento e risco de desenvolvimento de doenças associadas à idade.

2.2. Objetivos específicos

Caracterizar a frequência da deleção mtDNA 4977 na população saudável do norte de Portugal e sua associação com a idade cronológica.

Caracterizar a frequência da deleção mtDNA 4977 em indivíduos com diagnóstico de CaP e AVC, e avaliar a sua associação com o risco de desenvolvimento de doenças associadas à idade.



MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. População do estudo

O estudo da deleção no mtDNA 4977 como biomarcador de envelhecimento e de risco para o desenvolvimento de doenças associadas à idade foi realizado com base num estudo que envolveu 1493 indivíduos.

No presente estudo foram incluídos 533 indivíduos saudáveis (197 mulheres e 336 homens), sem evidência de doença oncológica ou história clínica de AVC's, com uma média de idade de 39 anos (\pm 13 anos), recrutados a partir do Banco de Dadores de Sangue do IPO-Porto. Neste grupo de indivíduos, 56% eram não fumadores, 27% fumadores e 17% ex-fumadores. Relativamente ao Índice de Massa Corporal (IMC), 38% dos indivíduos apresentavam um IMC normal, 45% sobrepeso, 14% obesidade grau I e 2% obesidade grau II e 0,4% obesidade grau III.

Participaram também no estudo um segundo grupo de 539 homens com diagnóstico histopatológico de CaP, com uma média de idade de 68 anos (\pm 8 anos), recrutados no IPO-Porto. Neste grupo de estudo, 42% apresentavam doença localizada e 58% doença avançada. Relativamente aos hábitos tabágicos, 51% eram não fumadores, 12% fumadores e 31% ex-fumadores. Neste grupo de indivíduos, 46% apresentavam um IMC normal, 23% sobrepeso e 32% obesidade de grau I.

Um terceiro grupo de estudo, foi formado por 421 indivíduos com diagnóstico de AVC, com uma média de idade de 68 anos (\pm 12 anos), sendo que 45% eram mulheres e 55% eram homens, recrutados no Centro Hospitalar São João. Neste grupo de estudo, 24% apresentavam um diagnóstico de enfarte total da circulação anterior (TACI: *Total Anterior Circulation Infarct*) e os restantes 76% apresentavam outros subtipos clínicos de AVC. Relativamente aos hábitos tabágicos destes indivíduos, 52% eram não fumadores, 12% fumadores e 32% ex-fumadores. Neste grupo de estudo, 28% apresentavam um IMC saudável, 49% sobrepeso, 18% obesidade grau I, 3% obesidade grau II e 2% obesidade grau III.

A todos os participantes foi recolhida uma amostra de sangue periférico (8 mL) através de uma técnica padronizada de colheita intravenosa, após consentimento informado, de acordo com a Declaração de Helsínquia e após aprovação do estudo pela Comissão de Ética do IPO-Porto.

3.2. Extração e purificação de DNA

O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue total com recurso ao *kit* de extração *GRS Genomic DNA Kit – Blood & Cultured Cells*, de acordo com as recomendações do fabricante (*GRiSP Research Solutions*[®]).

A avaliação da quantidade e qualidade do DNA isolado, foi realizado por espectrofotometria. Este método é capaz de determinar as concentrações médias dos ácidos nucleicos presentes em uma amostra, bem como sua pureza. A quantificação de DNA por espectrofotometria é realizada por medição da quantidade de luz absorvida pelo DNA em solução no comprimento de onda de 260 nm. Este método foi realizado com recurso ao *NanoDrop*[®] *Lite Spectrophotometer* (*Termo Fisher Scientific*[®]).

3.3. Detecção da deleção do DNA mitocondrial 4977

Para estudar a deleção mtDNA 4977 foram estudadas duas regiões do mtDNA. Numa primeira fase amplificou-se por reação em cadeia da polimerase (PCR: *Polymerase Chain Reaction*) um fragmento de mtDNA da região controlo e posteriormente amplificou-se um fragmento de mtDNA onde se localiza a deleção 4977, também com recurso à técnica de PCR (figura 9). Posteriormente a confirmação da amplificação dos fragmentos de interesse foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v).

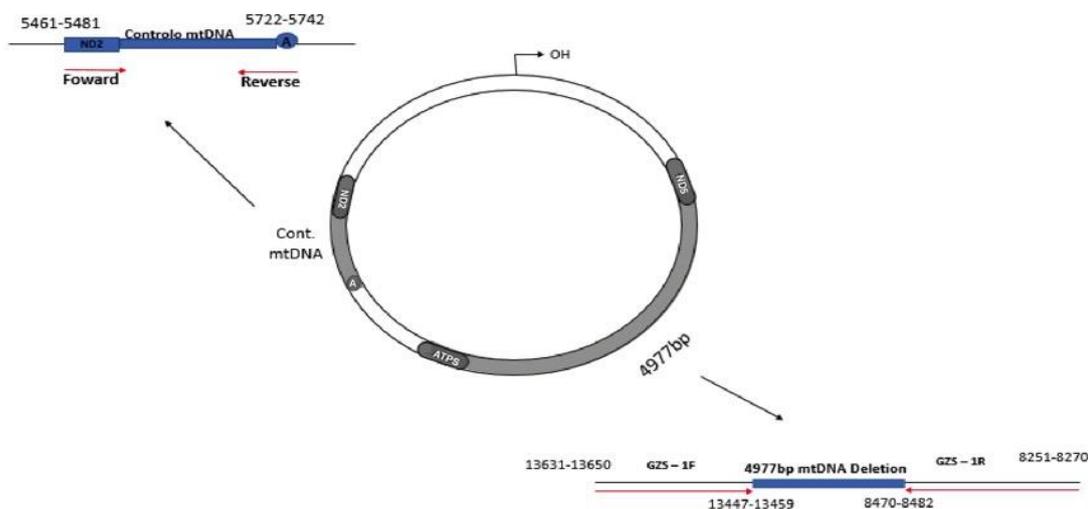


Figura 9 - Figura representativa da zona da deleção mtDNA 4977 e da zona de controlo no genoma mitocondrial. Pode também observar-se as zonas de ligação dos *primers* utilizados para a amplificação da zona controlo e de avaliação da presença da deleção mtDNA 4977.

Tal como o anteriormente referido, inicialmente, realizou-se a confirmação da presença de mtDNA nas amostras em estudo de acordo com o procedimento descrito por Diba e colaboradores (149). Para tal, procedeu-se à amplificação de um fragmento de DNA de 297 pb, correspondente à região controlo de mtDNA a partir de uma mistura de reacção que continha: 5 μ L de 10X *Dream Taq Green Buffer*[™] (*Thermo Scientific*[®]), 1 μ L de *dNTP Mix* 10 mM (*Thermo Scientific*[®]), 1,5 μ L de *primer forward* e *reverse* com uma concentração final de 10 μ M (Tabela 2), 0,2 μ L de *DreamTaq*[™] *DNA Polymerase* 5 U/ μ L (*Thermo Scientific*[®]), 2 μ L de DNA e 38,8 μ L de água bidestilada, perfazendo um volume final de reacção de 50 μ L.

As condições para a amplificação foram: pré-desnaturação a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, *annealing* a 57°C durante 1 minuto, extensão a 72°C durante 35 segundos e uma extensão final a 72°C durante 10 minutos. Em cada reacção foi realizado um controlo negativo.

Tabela 2 - Sequência dos primers utilizados no presente estudo e tamanho do fragmento amplificado.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>	<i>Tamanho do Fragmento</i>
Foward Controlo Reverse Controlo	5'-CCCTTACCACGCTACTCCTA-3' 5'-GGCGGGAGAAGTAGATTGAA-3'	297 pb
GZS1F GZS1R	5'-AACCACAGTTTCATGCCCATC-3' 5'-TGTTAGTAAGGGTGGGGAAGC-3'	361 pb

De forma a confirmar a amplificação do fragmento de mtDNA pretendido, foram analisados 12 µL do produto de PCR com recurso a um gel de agarose a 1,5% (p/v) em tampão *TBE (Buffer Tris-borate-EDTA) 1X* e corado com 2,0 µL de *Green safe (NZYTech®)* em 100 mL de *TBE*. O *Green safe* é um corante que tem a capacidade de se intercalar com o DNA e emitir fluorescência quando iluminado pela luz UV, permitindo a visualização do fragmento pretendido. Recorreu-se ainda a um marcador molecular de 100 pb *DNA Ladder 0.1 µg/µL (Thermo Scientific®)*. O fragmento de mtDNA foi visualizado na presença de luz UV recorrendo ao transiluminador *Gel DocXR (Biorad®)* (Figura 10).

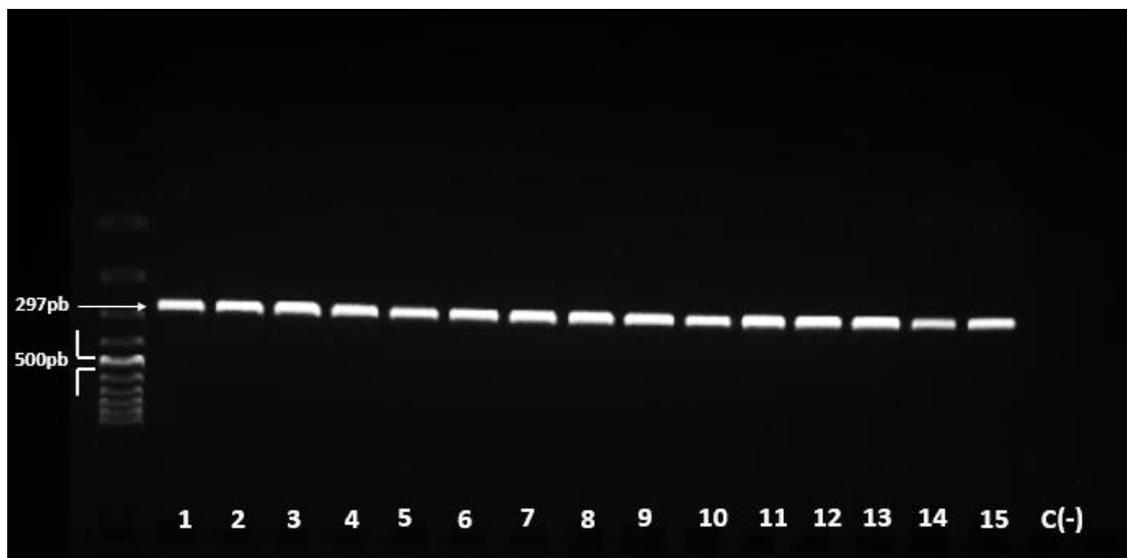


Figura 10 - Fragmento de 297 pb observado no gel a partir do produto do PCR realizado para a confirmação da presença de mtDNA nas amostras em estudo. Peso molecular *GeneRuler 100 pb DNA Ladder 0.1 µg/µL*.

Após confirmação da presença de mtDNA nas amostras em estudo, avaliou-se a presença da deleção mtDNA 4977. Este estudo foi realizado após a otimização e validação de um protocolo adaptado de *Guo* e colaboradores, para o qual foram usados os *primers* GZS1F e GZS1R descritos na tabela 2 (186).

A mistura da reação, num volume final de 50 μ L, consistiu em, 5 μ L de 10X *Dream Taq Green Buffer* (*Thermo Scientific*®), 1 μ L de *dNTP Mix*TM 10 mM (*Thermo Scientific*®), 1,5 μ L de *primer forward* e *reverse* com uma concentração de 10 μ M (Tabela 2), 2 μ L de *MgCl₂* 25mM (*Kapa Biosystems*®), 2 μ L de DNA e 38,8 μ L de água bidestilada.

As condições para amplificação foram: pré-desnaturação a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 10 segundos, *annealing* a 58°C durante 45 segundos, extensão a 72°C durante 50 segundos e uma extensão final a 72°C durante 10 minutos. Em cada reação foi realizado um controlo positivo e negativo.

De forma a confirmar a amplificação do fragmento correspondente à presença da deleção mtDNA 4977 pretendido, foram analisados 12 μ L do produto de PCR com recurso a um gel de agarose a 1,5% (p/v) em tampão *TBE* 1X e corado através de 2 μ L *Green safe* (*NZYTech*®) /100 mL de *TBE*. Recorreu-se ainda a um marcador molecular de 100 pb *DNA Ladder* 0.1 μ g/ μ L (*Thermo Scientific*®). O fragmento de mtDNA foi visualizado na presença de luz UV recorrendo ao transiluminador *Gel DocXR* (*Biorad*®) (Figura 11).

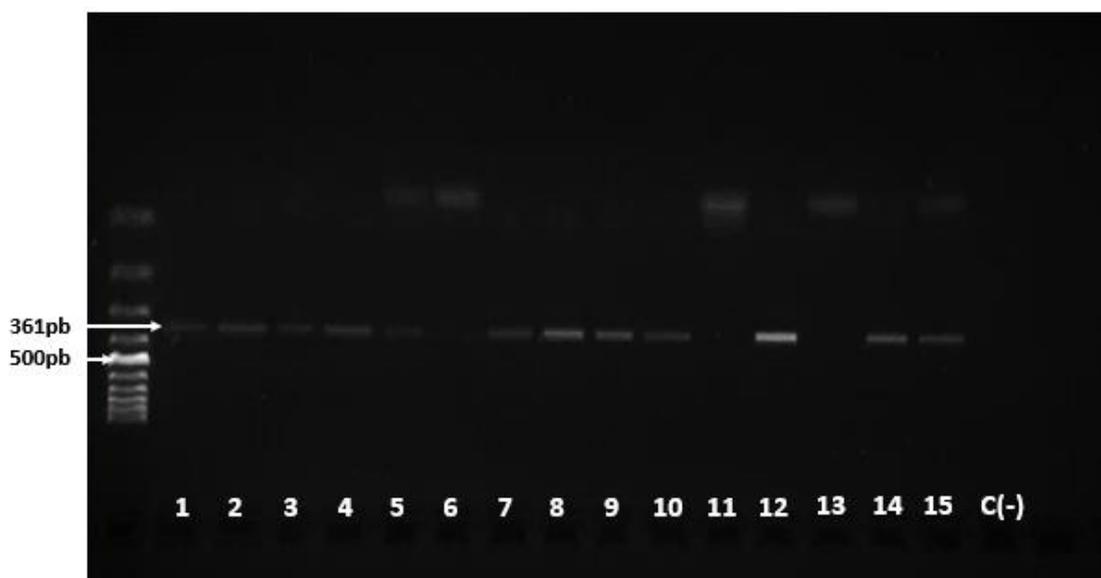


Figura 11 - Fragmento de 361 pb observado no gel a partir do produto do PCR realizado para a confirmação da presença de mtDNA nas amostras em estudo. Peso molecular *GeneRuler* 100 pb *DNA Ladder* 0.1 μ g/ μ L.

3.4. Validação do procedimento laboratorial desenvolvido

Inicialmente, para a detecção da deleção 4977 mtDNA, recorreu-se à técnica de *nested* PCR, de acordo com o protocolo estabelecido por Guo e colaboradores (186). Contudo, verificamos que o fragmento resultante do primeiro PCR, tinha um peso molecular, que de acordo com a informação contida no artigo de Guo e colaboradores, correspondia ao tamanho do fragmento resultante do segundo PCR. Deste modo, após realização do primeiro PCR, procedeu-se à sequenciação do produto de PCR de modo a confirmar a zona do genoma do mtDNA que estava a ser amplificada.

Para preparação das amostras para sequenciação automática, realizou-se uma reação de PCR com recurso aos *primers* GZS1F e GZS1R, de acordo com o procedimento previamente descrito. Seguidamente, os produtos de PCR foram purificados com recurso ao *kit* de purificação *GRS PCR & Gel Band Purification*, de acordo com as recomendações do fabricante (*GRiSP Research Solutions*[®]). Após a purificação, a sequenciação foi realizada pela empresa StabVida, com a realização de sequenciação automática pelo Método de *Sanger*.

A análise das sequências foi realizada manualmente e através do programa informático *EMBOSS explorer website*. O resultado, confirmou que o produto de amplificação do PCR realizado, cujo peso molecular era de 361 pb, corresponde à presença da deleção mtDNA 4977 (Figura 12).

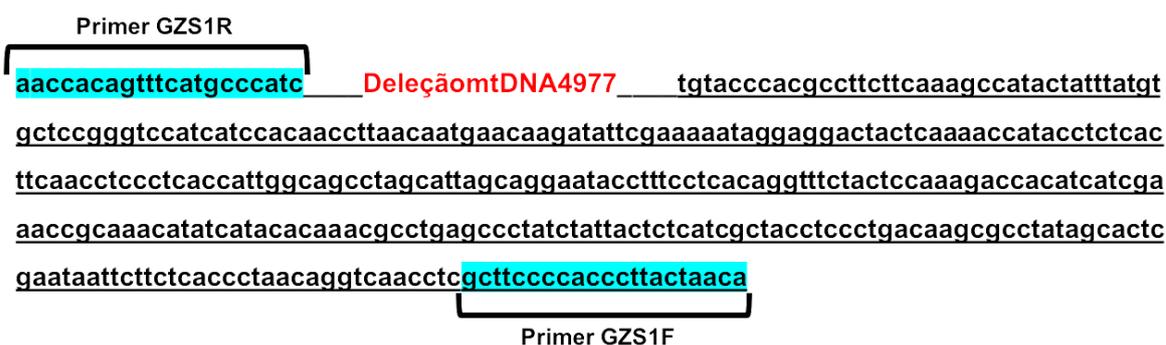
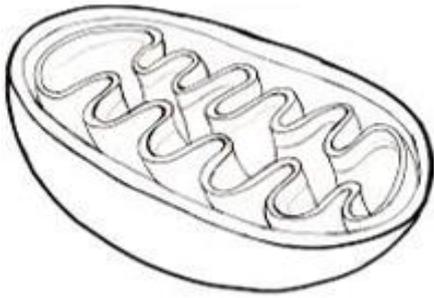


Figura 12 - Representação esquemática da sequência verificada através da sequenciação de amostras de indivíduos que apresentam a deleção mtDNA 4977.

3.5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* estatístico *IBM®SPSS®Statistics* (Versão 25.0).

O OR e o IC 95% foram calculados como uma medida de associação entre a deleção mtDNA 4977 e o risco para desenvolvimento de CaP e AVC. A análise pelo teste do Qui-Quadrado (χ^2) foi utilizada para comparação das variáveis. O valor de p foi obtido pelo teste de χ^2 e foi considerado estatisticamente significativo quando inferior a 0,05.



RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Análise da presença de DNA mitocondrial e da deleção mitocondrial 4977 nos indivíduos saudáveis

O gráfico representado na figura 13 mostra a percentagem de deteção do mtDNA nos diferentes grupos estudados. Os resultados mostram que na população em estudo foi detetado mtDNA em 100% das amostras analisadas (Figura 13).

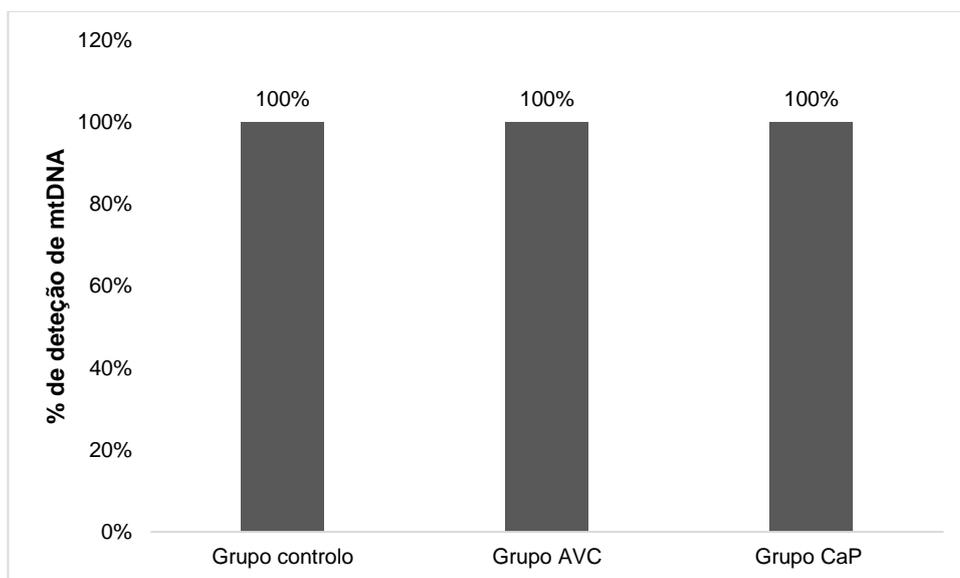


Figura 13 - Frequência (%) de deteção de mtDNA nos diferentes grupos estudados.

Para o estudo da associação entre a idade cronológica nos indivíduos saudáveis, sem evidência de doença oncológica ou história clínica de AVC's (grupo controlo) e a percentagem de deteção da deleção mtDNA 4977, foram definidos 6 grupos etários: 18-20, 21-29, 30-39, 40-49, 50-59 e ≥ 60 anos, encontrando-se descrita a frequência de deteção da deleção mtDNA 4977 nestes grupos na Figura 14. Na população do grupo controlo, observamos uma tendência de diminuição da frequência da deleção mtDNA 4977 entre os 18 e os 49 anos, sendo esta diminuição mais acentuada entre os 30-49 anos. Posteriormente, verifica-se um ligeiro aumento da frequência de deteção da deleção mtDNA 4977 nos escalões etários mais avançados (Figura 14).

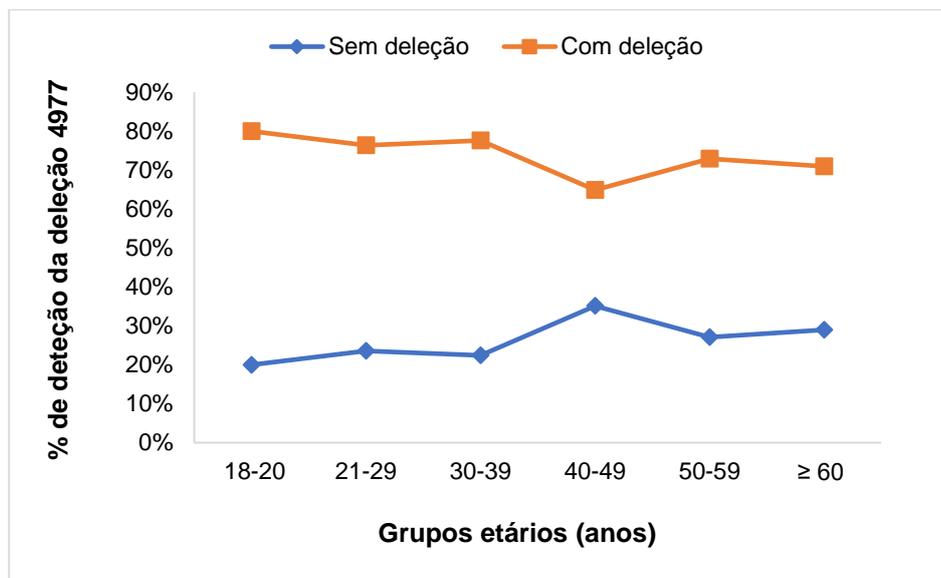


Figura 14 - Frequência (%) de detecção da deleção mtDNA 4977 nos diferentes grupos etários estudados.

De acordo com os resultados obtidos para os diferentes gêneros, verificou-se uma maior frequência da deleção mtDNA 4977 nos homens (71%) comparativamente às mulheres (66%) (Figura 15).

Relativamente aos hábitos tabágicos verificou-se um aumento da frequência de detecção da deleção mtDNA 4977 no grupo dos indivíduos fumadores (76%) em comparação com os indivíduos não fumadores e ex-fumadores (71%) (Figura 15).

Considerando a variável IMC, verificou-se uma maior frequência da deleção mtDNA 4977 no grupo dos indivíduos com sobrepeso (76%) em comparação com os indivíduos que apresentam um IMC normal (72%). Contudo, ao comparar os indivíduos com sobrepeso com os indivíduos obesos, esta percentagem diminui para 74% (Figura 15).

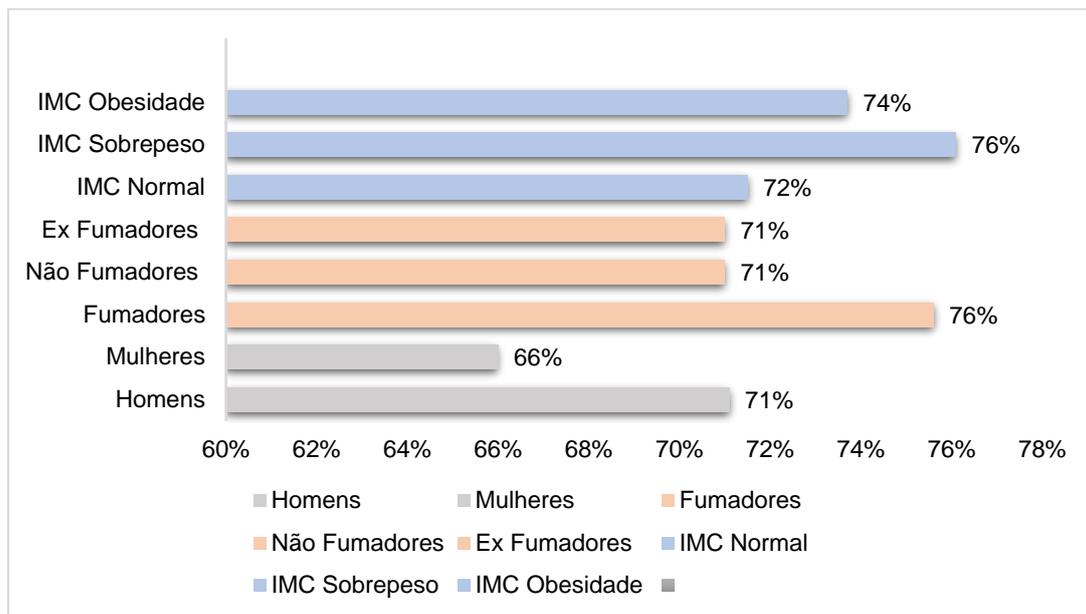


Figura 15 - Distribuição das frequências de detecção da deleção mtDNA 4977 nas diferentes variáveis analisadas no grupo controlo.

4.2. Análise da deleção do DNA mitocondrial 4977 nos indivíduos com cancro da próstata e acidente vascular cerebral

A frequência da deleção mtDNA 4977 foi avaliada no grupo controlo, grupo de indivíduos com diagnóstico de AVC (grupo AVC) e grupo de indivíduos com diagnóstico histopatológico de CaP (grupo CaP). Observamos que esta alteração é mais frequente nos grupos de indivíduos com AVC (75%) e CaP (77%) comparativamente aos indivíduos saudáveis (Figura 16).

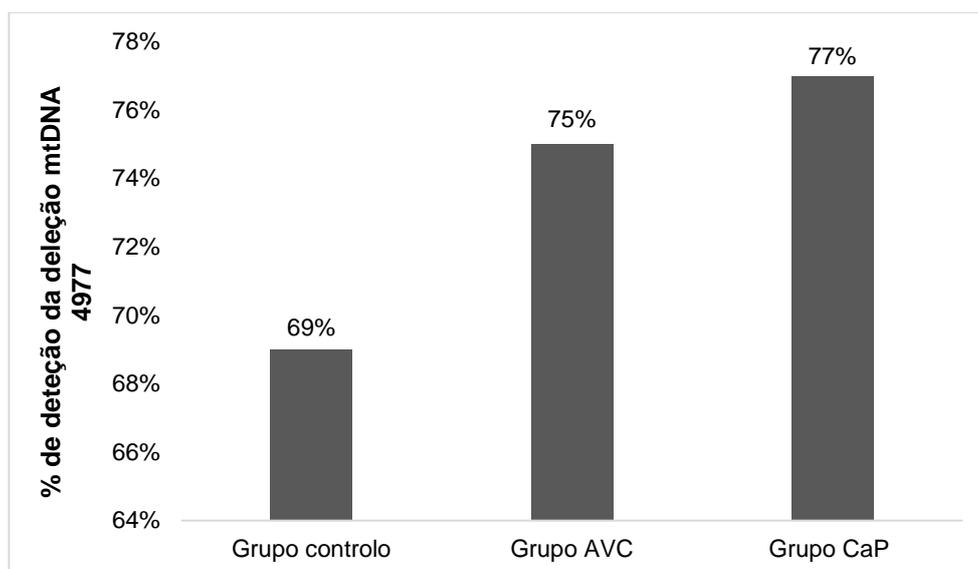


Figura 16 - Figura representativa da frequência (%) de detecção da deleção mtDNA 4977 no grupo controle, grupo AVC e grupo CaP.

De acordo com os resultados, verificamos que os indivíduos que apresentam a deleção mtDNA 4977 têm um risco aumentado de desenvolvimento de CaP comparativamente aos indivíduos sem a deleção (OR=1,36; IC 95%: 0,99 -1,85; $P=0,052$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição da frequência da deleção mtDNA 4977 no grupo de CaP e no grupo controle e respectivo OR.

Deleção mtDNA 4977	Grupo controle (%)*	Grupo CaP (%)	OR	IC 95%	P
Negativo	97 (29%)	124 (23%)	Referência		
Positivo	239 (71%)	415 (77%)	1,36	0,99-1,85	0,052

* Indivíduos saudáveis do sexo masculino; OR: odds ratio, IC 95%: Intervalo de confiança a 95%; P: teste χ^2

Adicionalmente, observamos que a deleção mtDNA 4977 está presente em 63% dos doentes com CaP e que apresentam IMC de sobrepeso/obesidade grau I, II e III, comparativamente aos doentes com IMC normal (37%). Contudo, esta tendência não é verificada quanto aos hábitos tabágicos, sendo que, 43% dos doentes com CaP e que apresentam a deleção mtDNA 4977 são fumadores/ex-fumadores e 57% são não-fumadores ativos.

Considerando a concentração sérica do PSA no momento do diagnóstico, observamos que os indivíduos com a deleção mtDNA 4977 têm um maior risco de apresentarem níveis mais baixos de PSA (≤ 10 ng/mL) comparativamente ao grupo controle (OR=2,23; IC 95%: 1,42-3,49; $P < 0,001$) (Tabela 4). Relativamente ao estágio de desenvolvimento da doença, observamos também uma associação estatisticamente significativa entre a presença da deleção mtDNA 4977 e o risco dos indivíduos com CaP apresentarem doença localizada no momento do diagnóstico (OR=2,00; IC 95%: 1,32-3,06; $P=0,001$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Risco para os portadores da deleção mtDNA 4977, no momento do diagnóstico apresentarem doença de fenótipo menos agressivo.

Deleção mtDNA 4977	Grupo controle (%)*	Grupo CaP PSA (≤ 10 ng/mL) (%)	Grupo CaP Localizado (%)
	Negativo	97 (29%)	31 (15%)
Positivo	239 (71%)	170 (85%)	188 (83%)
OR	Referência	2,23	2,00
IC 95%		1,42-3,48	1,32-3,06
P		<0,001	0,001

* Indivíduos saudáveis do sexo masculino; OR: odds ratio, IC 95%: Intervalo de confiança a 95%; P: teste χ^2 .

Quando analisado a frequência de detecção da deleção mtDNA 4977 no grupo AVC, verificamos que os indivíduos com a deleção mtDNA 4977 apresentam um risco aumentado, de desenvolvimento de AVC's (OR=1,36; IC 95%: 1,02-1,81; $P=0,038$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição da frequência da deleção mtDNA 4977 no grupo de AVC's e no grupo controle e respetivo OR.

Deleção mtDNA 4977	Grupo controle (%)	Grupo AVC's (%)	OR	IC 95%	P
Negativo	164 (31%)	104 (25%)	Referência		
Positivo	369 (69%)	317 (75%)	1,36	1,02-1,81	0,038

*OR: odds ratio, IC 95%: Intervalo de confiança a 95%; P: teste χ^2 .

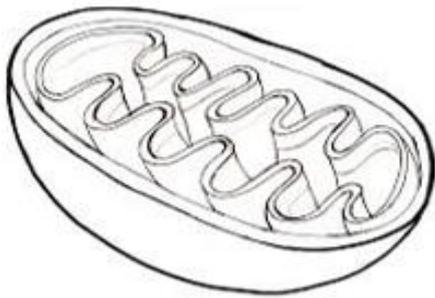
No grupo de indivíduos com AVC e portadores da deleção mtDNA 4977, 80% são hipertensos. Quanto ao IMC, observamos que 72% dos indivíduos com AVC e com a deleção mtDNA 4977 apresentam sobrepeso/obesidade grau I, II e III, comparativamente a 28% dos indivíduos que apresentavam um IMC normal. Relativamente aos hábitos tabágicos, verificamos que 47% dos doentes com a deleção mtDNA 4977 são fumadores/ex-fumadores e 54% são não fumadores ativos.

Após a estratificação do grupo AVC de acordo com a classificação TACI, verificamos que os indivíduos com a deleção mtDNA 4977 apresentam um maior risco de desenvolverem um AVC do tipo TACI (OR=2,70; IC 95%: 1,44-4,94; $P=0,001$) (Tabela 6). Não se observando associação estatisticamente significativa entre a ocorrência desta alteração no mtDNA e o desenvolvimento de outros tipos de AVC's (OR=1,22; IC 95% 0,89-1,68; $P=0,215$).

Tabela 6 - Risco para os portadores da deleção mtDNA 4977, no momento do diagnóstico apresentarem AVC do tipo TACI.

Deleção mtDNA 4977	Grupo controlo (%)	Grupo AVC-TACI (%)	Grupo AVC-Não TACI (%)
Negativo	164 (31%)	13 (14%)	77 (27%)
Positivo	369 (69%)	78 (86%)	212 (73%)
OR	Referência	2,70	1,22
IC 95%		1,44-4,94	0,89-1,68
P		0,001	0,215

*OR: odds ratio, IC 95%: Intervalo de confiança a 95%; P : teste χ^2 .



DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O envelhecimento é um processo complexo e gradual, que difere de indivíduo para indivíduo e pode ser influenciado por fatores tanto genéticos como não genéticos, tais como a dieta alimentar, o tabagismo, o *stress* crónico e a inatividade física (1, 2). O efeito destes fatores ao longo do processo de envelhecimento, pode originar diferenças entre a idade cronológica e a idade biológica dos indivíduos. A idade cronológica é definida como o tempo contado a partir do nascimento de um indivíduo. Em contrapartida, o conceito de idade biológica refere-se às alterações biológicas degenerativas e declínio funcional dos órgãos, tecidos e células que se refletem no estado de saúde do indivíduo. Sendo que, o número de alterações celulares e sistémicas que acompanham o processo de envelhecimento, podem ser analisadas e/ou quantificadas através de biomarcadores característicos deste processo. A aplicação de biomarcadores para a determinação tanto da idade cronológica como da idade biológica, constitui uma ferramenta que pode ser utilizada em Medicina Legal em diferentes contextos. Enquanto que o estabelecimento da idade cronológica dos indivíduos pode ter utilidade para a identificação e determinação de um perfil pessoal, a idade biológica pode ser uma ferramenta aplicada na avaliação do risco do desenvolvimento de doenças, por exposição a diferentes fatores de risco, podendo ser uma estratégia útil a determinar em questões de exposições profissionais.

As técnicas de estimativa de idade realizadas com maior frequência, dependem da análise das características morfológicas dos dentes ou de características esqueléticas de indivíduos vivos ou mortos (17). Contudo, estes métodos apresentam uma elevada taxa de erro associado, sendo essencial complementá-los, sendo útil a identificação de novos biomarcadores de idade cronológica. Diversos estudos sugerem, que a acumulação de alterações no mtDNA humano está associada ao processo do envelhecimento (117-119, 145). Deste modo, no âmbito da biologia molecular, alterações no mtDNA, nomeadamente deleções e mutações pontuais, têm sido estudados na tentativa de determinar biomarcadores de envelhecimento que possam ser utilizados como métodos de estimativa de idade tanto cronológica como biológica, úteis nas investigações forenses (3-9).

Estudos sugerem que deleções no mtDNA com um elevado tamanho como a deleção mtDNA 4977, podem condicionar o envelhecimento celular, uma vez que podem ter como consequência a perda de genes importantes para o metabolismo das células, o que pode causar alterações nos mecanismos de respiração celular, aumento da formação de ROS, *stress* oxidativo e dano em diferentes moléculas (82, 85, 111, 149). Deste modo, esta deleção tem sido estudada como um potencial biomarcador molecular de risco de

desenvolvimento de doenças associadas ao envelhecimento e preditivo de idade cronológica (94, 108, 127, 187).

Na nossa população saudável em estudo, observamos uma elevada frequência da deleção mtDNA 4977 (69%), estando esta deteção de acordo com estudos prévios, nomeadamente, um estudo realizado com recurso a 473 amostras de sangue na população alemã (150). De facto, von Wurmb e colaboradores verificaram que esta deleção ocorria em 74% dos indivíduos saudáveis estudados (150). Contudo, no estudo de Abnet e colaboradores, esta deleção não foi detetada em amostras de sangue de indivíduos saudáveis, nem em doentes com carcinoma espinocelular do esófago (127). Adicionalmente, Dida e colaboradores, sugerem que a deleção mtDNA 4977 não é claramente detectável em amostras de sangue, porque o sangue é um tecido caracterizado por uma alta taxa de proliferação celular. Por conseguinte, a reparação dos danos no mtDNA ocorre mais rapidamente comparado com tecidos com baixa atividade mitótica e alta necessidade de oxigénio, como por exemplo, o músculo esquelético e o tecido cardíaco (149). Contudo, é de realçar que estas diferenças observadas entre os diversos estudos, também podem ser condicionadas pelos diferentes procedimentos experimentais utilizados.

Relativamente ao estabelecimento da idade cronológica, o presente estudo, não evidenciou qualquer associação desta com a presença da deleção mtDNA 4977 nos indivíduos saudáveis. De acordo com os estudos de von Wurmb e colaboradores, a variação da frequência de deteção da mtDNA 4977 entre indivíduos com a mesma idade cronológica, pode ser resultado da exposição a outros fatores biológicos independentes da idade, tais como a exposição à radiação UV e os hábitos tabágicos (188). De acordo com estas evidências, os nossos resultados indicam que a deleção mtDNA 4977 é não só mais frequente em indivíduos do género masculino, mas como também em indivíduos fumadores e que apresentam um IMC elevado, salientando que esta alteração molecular poderá estar fortemente associada a uma idade biológica, uma vez que esta retrata com maior precisão a exposição a fatores de risco ambientais e estilos de vida. Tradicionalmente, o género masculino está associado a maiores comportamentos de risco como o elevado consumo de álcool, hábitos tabágicos, e maus hábitos alimentares, o que pode ter influenciado a frequência de deteção da deleção mtDNA 4977 neste género. Para além disso, existem outros fatores externos que podem estar relacionados com a frequência de deteção desta deleção que não foram avaliados no presente estudo, como por exemplo, a exposição à radiação UV. De facto, existem estudos que demonstram que a exposição à radiação UV aumenta a frequência da deleção mtDNA 4977. Bernerburg e colaboradores revelaram que doses não letais repetidas de radiação UV do tipo A

promovem a ocorrência da deleção mtDNA 4977 em fibroblastos humanos normais (189). Noutro estudo, foi observado também, que a deleção mtDNA 4977 foi detectada com maior frequência na pele fotoenvelhecida e nas zonas dos olhos mais expostas à radiação UV, comparativamente com outras zonas do corpo menos exposto ao sol (119, 187, 189, 190). Outro fator importante que deve ser considerado é a influência da componente genética na frequência da deleção mtDNA 4977 (149). Estudos sugerem que a variabilidade em genes específicos no genoma nuclear e mitocondrial pode ajudar a reparar danos no mtDNA de células somáticas através de um sistema de reparação mais eficiente ou de um processo de eliminação de ROS mais eficaz (150). Adicionalmente, trabalhos desenvolvidos por Cortopassi e colaboradores demonstraram, que o padrão de acumulação da deleção do mtDNA 4977 é diferente entre tecidos humanos, sendo que, em amostras de tecidos de músculo cardíaco adulto, do tronco cerebral, do córtex cerebral e do músculo do diafragma, observou-se uma maior frequência da deleção mtDNA 4977 quando comparado com amostras de tecido de fígado, rim, pele, baço e pulmão (191). Deste modo, podemos admitir que fatores como a variabilidade genética, hábitos tabágicos, exposição à radiação UV, ou mesmo diferenças de género podem condicionar a ocorrência da deleção mtDNA 4977.

Tal como anteriormente referido, a deleção mtDNA 4977 também tem sido associada ao desenvolvimento de diversas doenças relacionadas com o envelhecimento, de que são exemplos, o cancro e o AVC (104, 117, 136, 141). De facto, os resultados obtidos neste estudo, mostram que a deleção mtDNA 4977 é mais frequente nos indivíduos com CaP comparativamente com os indivíduos saudáveis, sendo que, os portadores desta alteração têm um risco aumentado para o desenvolvimento de CaP. Nos estudos de Yu e Yan a deleção mtDNA 4977 foi detetada em 75% dos indivíduos estudados com CaP *versus* 15% dos casos com hiperplasia prostática benigna (138). Resultados semelhantes foram obtidos em estudos que analisaram amostras de sangue de indivíduos com outros tipos de cancros (110, 111). Nie e colaboradores, detetaram a deleção mtDNA 4977 com uma maior frequência no sangue de mulheres com cancro da mama (48%), quando comparado com indivíduos saudáveis (9%), sugerindo os autores, que esta deleção seja um possível biomarcador molecular para cancro da mama (111). Adicionalmente, Li e colaboradores verificaram que a quantidade relativa da deleção mtDNA 4977 foi significativamente maior nas artérias mesentéricas de indivíduos com cancro colorretal comparado com os indivíduos saudáveis (110). De acordo com os resultados obtidos, os autores sugerem que os vasos sanguíneos próximos das células tumorais estão sujeitos a um maior *stress* oxidativo e conseqüentemente são mais susceptíveis a alterações no mtDNA (110). Deste modo, a deleção mtDNA tem a potencialidade de ser utilizada como um biomarcador

molecular de risco para CaP e outros tipos de câncros. Observamos também, que a ocorrência da deleção mtDNA 4977 estava associada a um maior risco dos indivíduos apresentarem doença menos agressiva no momento do diagnóstico (níveis de PSA \leq 10 ng/mL e doença localizada), o que sugere que esta alteração parece estar associada a estádios iniciais do desenvolvimento tumoral. Porém, nos estudos de Yu e Yan, os graus de *Gleason* dos indivíduos com CaP foram maiores para os portadores da deleção mtDNA 4977, comparado com os indivíduos sem a deleção, o que não se verificou no presente estudo. Contudo, a população utilizada pelos autores, foi constituída por amostras de tecido de próstata de indivíduos com CaP. Para além disso, a amostragem utilizada, foi composta por 130 indivíduos, uma amostragem muito menor do que a utilizada no presente estudo. Estes fatores em conjunto, podem explicar as diferenças verificadas entre o presente estudo e o de Yu e Yan (138). Deste modo, este é o primeiro estudo a associar a deleção mtDNA 4977, detetada em amostras de sangue, com um maior risco de ocorrência de CaP. Adicionalmente, outros estudos mostram que a deleção mtDNA 4977 parece estar associada a estádios mais iniciais do desenvolvimento tumoral, sugerindo que esta alteração possa participar na iniciação da carcinogénese. Pavicic e Richard, relataram a deteção da mtDNA 4977 em taxas mais altas no tecido não tumoral adjacente (74%) comparado com o tecido tumoral correspondente (45%) de doentes com cancro da mama e em indivíduos saudáveis (39%) (192). Resultados semelhantes foram observados nos estudos de Dani e colaboradores, que detetaram uma menor proporção da deleção mtDNA 4977 em indivíduos saudáveis (30%) e tecidos tumorais (54%) de indivíduos com cancro do pulmão comparado com tecidos não-tumorais adjacentes (60%) (125). Segundo Wu e colaboradores, uma possível explicação para estes resultados pode estar associado a uma diluição de cópias de mtDNA com a deleção mtDNA 4977 no tecido tumoral, como resultado da expansão clonal durante a progressão do cancro. Para além disso, pode também ocorrer uma eliminação das células portadoras desta deleção através da apoptose celular (193). Por outro lado, segundo Wang e colaboradores, a deleção do mtDNA 4977 pode conferir uma desvantagem metabólica às células em proliferação e, portanto, as células com esta alteração são selecionadas negativamente nos tecidos tumorais altamente proliferativos (193). Adicionalmente e de acordo com Dani e colaboradores, o facto da ocorrência da deleção mtDNA 4977 poder eliminar importantes genes envolvidos na fosforilação oxidativa, como a ATPase 6, ATPase 8, citocromo oxidase III e subunidades NADH ND3, ND4, ND4L e ND5, pode representar uma forte desvantagem metabólica para as células portadoras desta alteração, fazendo com que células com a deleção mtDNA 4977 sejam eliminadas em fases mais avançadas dos tumores, que inicialmente possuem heteroplasmia para a deleção mtDNA 4977 (125).

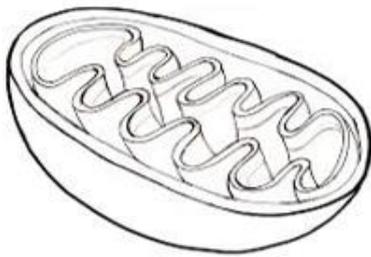
Os resultados do nosso estudo demonstram ainda, que a deleção mtDNA 4977 está presente com uma maior frequência nos indivíduos com CaP e um IMC mais elevado. Este resultado está de acordo com um estudo recente de Ahmadi e colaboradores. Os autores propõem que uma má alimentação aumenta o IMC e, por sua vez, o aumento do IMC provoca um aumento da concentração de ROS nas células, originando a ocorrência da deleção mtDNA 4977 (194). De facto, os indivíduos obesos apresentam níveis elevados de *stress* oxidativo e o tecido adiposo, representa uma fonte importante de ROS (195). Desta forma, o ROS produzido por consequência do excesso de peso, pode induzir alterações no mtDNA e à deleção mtDNA 4977.

Na literatura, surgem também evidências da associação da deleção mtDNA 4977 e a ocorrência de doenças cerebrovasculares, de que é exemplo a aterosclerose (113). A aterosclerose é uma doença que está intimamente ligada com a ocorrência de AVC por obstrução dos vasos sanguíneos. Ballinger e colaboradores demonstraram, que nas aortas ateroscleróticas, existe uma maior frequência de alterações no mtDNA comparado com as aortas saudáveis (79). Para além disso, tendo em conta a elevada necessidade energética das células neuronais, as mitocôndrias portadoras da deleção mtDNA 4977 estão mais sujeitas a um défice metabólico, formação de ROS e *stress* oxidativo (182, 183). Deste modo, esta deleção pode contribuir para um *stress* oxidativo acentuado presente no processo inflamatório da aterosclerose e consequentemente maior risco de AVC. Uma vez que as amostras de tecido cerebral são de difícil acesso, seria uma mais valia o desenvolvimento de novos biomarcadores moleculares detetáveis no sangue relacionados com esta doença, sendo que, o estudo da deleção mtDNA 4977 pode ser uma estratégia útil considerando os resultados observados.

De facto, na população em estudo observamos um maior risco de AVC nos indivíduos portadores da deleção mtDNA 4977. Na análise da literatura, apenas surge um estudo que tenta associar a deleção mtDNA 4977 com o risco para AVC em amostras de sangue. Contudo, os autores não verificaram nenhuma associação entre a presença da deleção mtDNA 4977 e o risco de AVC. Porém, a população deste estudo foi constituída por 191 doentes e 74 indivíduos saudáveis, sendo que os autores sugerem a realização de novos estudos de associação da deleção mtDNA 4977 com o AVC que incluísse um maior número de indivíduos, de forma a representar melhor a população em estudo, o que foi realizado no presente estudo (185). Observamos também, uma maior frequência desta alteração no mtDNA dos indivíduos hipertensos, e com IMC elevado. Contudo, nos estudos de Huang e colaboradores em indivíduos com diagnóstico de AVC isquémico, não se verificou uma

maior frequência de detecção da deleção mtDNA 4977 nos indivíduos hipertensos e com um IMC fora dos limites normais (185). Sabe-se que, o *stress* oxidativo no cérebro desempenha um papel importante na patogênese da hipertensão associada à obesidade. Estudos em ratos obesos alimentados com uma dieta rica em gordura, exibiram elevado *stress* oxidativo no cérebro e aumento da expressão de subunidades NADPH oxidase (196). Contudo, a infusão de antioxidantes no ventrículo cerebral dos ratos, reduziu a pressão arterial e a atividade do nervo simpático nesta área (196). Estes resultados sugerem que a excitação simpática induzida pelo *stress* oxidativo no cérebro possa desempenhar um papel importante na patogênese da hipertensão associada à obesidade (196). Sendo assim, os parâmetros IMC elevado e a hipertensão podem estar intimamente relacionados e contribuir para a elevada percentagem de ocorrência da deleção mtDNA 4977 entre os indivíduos hipertensos e com IMC elevado, aumentando assim o risco para AVC. Cumulativamente, observamos que os indivíduos portadores da deleção mtDNA 4977, apresentam maior risco de AVC do tipo TACI, que corresponde à forma de ocorrência de AVC com um pior prognóstico, comparado com as outras classificações do AVC (197). Contudo, no estudo de Huang e colaboradores, a deleção mtDNA 4977 não demonstrou ter qualquer efeito no prognóstico do AVC, incluindo gravidade e recorrência desta doença (185). Deste modo, este é o primeiro estudo a associar a deleção mtDNA 4977, detetada em amostras de sangue, com um maior risco de ocorrência e agressividade de AVC.

O presente estudo, reforça que a deleção mtDNA 4977 pode ser detetada com uma elevada frequência nas células do sangue. Para além disso, os nossos resultados sugerem uma associação da presença desta deleção com doenças associadas ao envelhecimento, embora não se tenha verificado uma associação entre a deleção mtDNA 4977 e a idade cronológica. Considerando os resultados obtidos em relação à CaP, a deleção mtDNA 4977 demonstra estar associada a um maior risco de os indivíduos apresentarem doença menos agressiva no momento do diagnóstico. Por outro lado, no AVC, esta alteração demonstrou estar associada com um subtipo de AVC considerado de pior prognóstico. Sendo assim, os resultados apresentados neste estudo refletem a importância do estudo da deleção mtDNA 4977 no sangue como um biomarcador da idade biológica e sua associação com doenças associadas ao envelhecimento.



CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

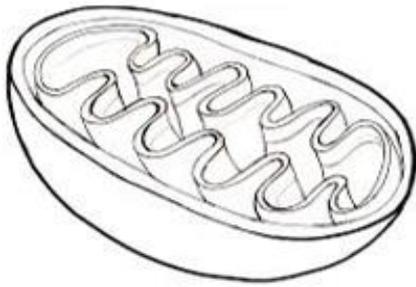
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

A deleção mtDNA 4977 tem sido proposta como um potencial biomarcador de estabelecimento de idade útil em diferentes contextos da Medicina Legal. Adicionalmente, admite-se que esta alteração molecular possa estar relacionada com o risco de desenvolvimento de doenças associadas à idade, sendo que, no presente estudo, foi demonstrado uma associação desta alteração com o risco de desenvolvimento de CaP e AVC. De acordo com os resultados, observamos também que os indivíduos diagnosticados com CaP portadores desta alteração, têm um risco aumentado de apresentarem CaP menos agressivo no momento do diagnóstico. Por sua vez, os indivíduos diagnosticados com AVC e portadores desta alteração, têm um risco aumentado para o subtipo de pior prognóstico. Deste modo, estes resultados demonstram, que a deleção mtDNA 4977 poderá ser um potencial biomarcador de risco para o desenvolvimento destas doenças associadas ao envelhecimento. Os resultados do presente estudo demonstraram ainda, que a presença de fatores como os hábitos tabágicos, o IMC e a hipertensão, podem influenciar a ocorrência da deleção mtDNA 4977 e, por conseguinte, a frequência desta alteração não apresentar uma correlação com o estabelecimento da idade cronológica dos indivíduos. Assim, admitimos que a ocorrência da deleção mtDNA 4977 reflectirá melhor o estado do envelhecimento celular e deste modo permitirá uma estimativa de idade biológica.

Dada a potencialidade do estudo da deleção mtDNA 4977 como biomarcador de idade biológica, a sua análise pode ter inúmeras aplicações no contexto da Medicina Legal, nomeadamente em situações em que se estabelece o nexo de causalidade entre o efeito de um fator de risco e o desenvolvimento de doenças. Uma das situações em que possa ser útil o estabelecimento da ligação entre a exposição a fatores ambientais e o desenvolvimento de doenças, é a exposição de indivíduos, que por exemplo residem próximos a fábricas. Adicionalmente, em profissões consideradas de risco, em que os trabalhadores lidam permanentemente com agentes classificados como cancerígenos, a determinação da deleção mtDNA 4977 pode ser um biomarcador indicador do estado celular dos mesmos. Também é de considerar que situações de exposição a *stress* crónico, induzido por fatores como *bullying*, discriminação racial, violência doméstica, *stress* pós-traumático, maus tratos na infância, *burnout*, podem influenciar o estado celular do indivíduo e deste modo, a análise da alteração mtDNA 4977 pode ser um biomarcador útil a determinar, uma vez que a homeostasia destes indivíduos estará alterada.

Com o presente estudo, de acordo com a técnica experimental usada só foi possível a detecção da deleção mtDNA 4977, não nos permitindo saber o número de cópias de mtDNA com a alteração molecular analisada. Futuramente será relevante a análise deste parâmetro, com recurso a uma técnica de PCR em tempo real (qPCR: *real time quantitative PCR*) com o objetivo de avaliar a heteroplasmia de cópias de mtDNA com a deleção mtDNA 4977 no sangue de indivíduos com CaP e AVC. Desta forma, seria possível associar a uma percentagem de heteroplasmia a qual provocaria um fenótipo de doença, podendo a quantidade desta alteração ser um melhor indicador do estado de saúde dos indivíduos. Cumulativamente, também seria relevante analisar outros fatores que possam influenciar a ocorrência desta deleção, como a exposição à radiação UV.

Em conclusão, o presente estudo evidenciou a aplicabilidade da análise da deleção mtDNA 4977 no sangue periférico como uma útil estratégia para a determinação da idade biológica individual e como biomarcador de risco para o desenvolvimento de doenças associadas ao envelhecimento.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Niccoli T, Partridge L. Ageing as a risk factor for disease. *Current biology : CB*. 2012;22(17):R741-52.
2. Brooks-Wilson AR. Genetics of healthy aging and longevity. *Human genetics*. 2013;132(12):1323-38.
3. Udler MS, McCarthy MI, Florez JC, Mahajan A. Genetic risk scores for diabetes diagnosis and precision medicine. *Endocrine reviews*. 2019.
4. Jylhävä J, Pedersen, N. L., & Hägg, S. . Biological Age Predictors. *EBioMedicine*. 2017;21:29-36.
5. Sprott RL. Biomarkers of aging and disease: introduction and definitions. *Exp Gerontol*. 2010;45(1):2-4.
6. Couoh LR. Differences between biological and chronological age-at-death in human skeletal remains: A change of perspective. *American journal of physical anthropology*. 2017;163(4):671-95.
7. Hau M, Haussmann MF, Greives TJ, Matlack C, Costantini D, Quetting M, et al. Repeated stressors in adulthood increase the rate of biological ageing. *Frontiers in zoology*. 2015;12:4.
8. Zapico SC, Ubelaker DH. mtDNA Mutations and Their Role in Aging, Diseases and Forensic Sciences. *Aging Dis*. 2013;4(6):364-80.
9. S CZ, Ubelaker DH. Applications of physiological bases of ageing to forensic sciences. Estimation of age-at-death. *Ageing Res Rev*. 2013;12(2):605-17.
10. Krishan K, Kanchan T, Garg AK. Dental Evidence in Forensic Identification - An Overview, Methodology and Present Status. *The open dentistry journal*. 2015;9:250-6.
11. Calabuig G, Cañadas EV. *Medicina legal y toxicología*. 6a. Madrid: Masson, SA; 2004. 1377 p.
12. Cunha E, Baccino E, Martrille L, Ramsthaler F, Prieto J, Schuliar Y, et al. The problem of aging human remains and living individuals: a review. *Forensic science international*. 2009;193(1-3):1-13.
13. Santoro V, De Donno A, Marrone M, Campobasso CP, Introna F. Forensic age estimation of living individuals: a retrospective analysis. *Forensic science international*. 2009;193(1-3):129.e1-4.
14. Pfau RO, Sciulli PW. A method for establishing the age of subadults. *Journal of forensic sciences*. 1994;39(1):165-76.
15. Saunders S, DeVito C, Herring A, Southern R, Hoppa R. Accuracy tests of tooth formation age estimations for human skeletal remains. *American journal of physical anthropology*. 1993;92(2):173-88.

16. Melsen B, Wenzel A, Miletic T, Andreasen J, Vagn-Hansen PL, Terp S. Dental and skeletal maturity in adoptive children: assessments at arrival and after one year in the admitting country. *Annals of human biology*. 1986;13(2):153-9.
17. Albert AM. The use of vertebral ring epiphyseal union for age estimation in two cases of unknown identity. *Forensic science international*. 1998;97(1):11-20.
18. Creo AL, Schwenk WF, 2nd. Bone Age: A Handy Tool for Pediatric Providers. *Pediatrics*. 2017;140(6).
19. Demirjian A, Goldstein H, Tanner JM. A new system of dental age assessment. *Human biology*. 1973;45(2):211-27.
20. Brooks ST. Skeletal age at death: the reliability of cranial and pubic age indicators. *American journal of physical anthropology*. 1955;13(4):567-97.
21. Cool SM, Hendrikz JK, Wood WB. Microscopic age changes in the human occipital bone. *Journal of forensic sciences*. 1995;40(5):789-96.
22. Iscan MY, Loth SR, Wright RK. Age estimation from the rib by phase analysis: white females. *Journal of forensic sciences*. 1985;30(3):853-63.
23. Cameriere R, Ferrante L, Cingolani M. Variations in pulp/tooth area ratio as an indicator of age: a preliminary study. *Journal of forensic sciences*. 2004;49(2):317-9.
24. Javadinejad S, Sekhavati H, Ghafari R. A Comparison of the Accuracy of Four Age Estimation Methods Based on Panoramic Radiography of Developing Teeth. *Journal of dental research, dental clinics, dental prospects*. 2015;9(2):72-8.
25. Bekaert B, Kamalandua A, Zapico SC, Van de Voorde W, Decorte R. Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. *Epigenetics*. 2015;10(10):922-30.
26. Cagney DN, Sul J, Huang RY, Ligon KL, Wen PY, Alexander BM. The FDA NIH Biomarkers, EndpointS, and other Tools (BEST) resource in neuro-oncology. *Neuro-oncology*. 2018;20(9):1162-72.
27. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? Current opinion in HIV and AIDS. 2010;5(6):463-6.
28. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical chemistry*. 2010;56(11):1733-41.
29. Theves C, Keyser-Tracqui C, Crubezy E, Salles JP, Ludes B, Telmon N. Detection and quantification of the age-related point mutation A189G in the human mitochondrial DNA. *Journal of forensic sciences*. 2006;51(4):865-73.
30. Munscher C, Rieger T, Muller-Hocker J, Kadenbach B. The point mutation of mitochondrial DNA characteristic for MERRF disease is found also in healthy people of different ages. *FEBS letters*. 1993;317(1-2):27-30.

31. Papiha SS, Rathod H, Briceno I, Pooley J, Datta HK. Age related somatic mitochondrial DNA deletions in bone. *Journal of clinical pathology*. 1998;51(2):117-20.
32. Mornstad H, Pfeiffer H, Yoon C, Teivens A. Demonstration and semi-quantification of mtDNA from human dentine and its relation to age. *International journal of legal medicine*. 1999;112(2):98-100.
33. Lacan M, Theves C, Keyser C, Farrugia A, Baraybar JP, Crubezy E, et al. Detection of age-related duplications in mtDNA from human muscles and bones. *International journal of legal medicine*. 2011;125(2):293-300.
34. Meissner C, von Wurmb N, Oehmichen M. Detection of the age-dependent 4977 bp deletion of mitochondrial DNA. A pilot study. *International journal of legal medicine*. 1997;110(5):288-91.
35. Kluge MA, Fetterman JL, Vita JA. Mitochondria and endothelial function. *Circulation research*. 2013;112(8):1171-88.
36. Pinheiro MdFT, org. - CSI Criminal, Edições Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2008. 196 p. ISBN 978-989-643-003-0.
37. Ellenrieder L, Martensson CU, Becker T. Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins, problems and diseases. *Biological chemistry*. 2015;396(11):1199-213.
38. John GB, Shang Y, Li L, Renken C, Mannella CA, Selker JM, et al. The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Molecular biology of the cell*. 2005;16(3):1543-54.
39. Wu Q, Luo CL, Tao LY. Dynamin-related protein 1 (Drp1) mediating mitophagy contributes to the pathophysiology of nervous system diseases and brain injury. *Histol Histopathol*. 2017;32(6):551-9.
40. Akram M. Mini-review on glycolysis and cancer. *Journal of cancer education : the official journal of the American Association for Cancer Education*. 2013;28(3):454-7.
41. Elston T, Wang H, Oster G. Energy transduction in ATP synthase. *Nature*. 1998;391(6666):510-3.
42. Noji H, Yoshida M. The rotary machine in the cell, ATP synthase. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(3):1665-8.
43. Chinnery PF, Schon EA. Mitochondria. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2003;74(9):1188-99.
44. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*. 2005;39:359-407.
45. Bartolak-Suki E, Imsirovic J, Nishibori Y, Krishnan R, Suki B. Regulation of Mitochondrial Structure and Dynamics by the Cytoskeleton and Mechanical Factors. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(8).

46. Papa S, Martino PL, Capitanio G, Gaballo A, De Rasmio D, Signorile A, et al. The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. *Advances in experimental medicine and biology*. 2012;942:3-37.
47. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews*. 2014;94(3):909-50.
48. Mammucari C, Rizzuto R. Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging. *Mech Ageing Dev*. 2010;131(7-8):536-43.
49. Wondrak GT, Jacobson MK, Jacobson EL. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. 2006;5(2):215-37.
50. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2007;12(5):913-22.
51. D'Autreaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(10):813-24.
52. Fogg VC, Lanning NJ, Mackeigan JP. Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death. *Chinese journal of cancer*. 2011;30(8):526-39.
53. Ikeda Y, Shirakabe A, Brady C, Zablocki D, Ohishi M, Sadoshima J. Molecular mechanisms mediating mitochondrial dynamics and mitophagy and their functional roles in the cardiovascular system. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2015;78:116-22.
54. Ikeda Y, Shirakabe A, Maejima Y, Zhai P, Sciarretta S, Toli J, et al. Endogenous Drp1 mediates mitochondrial autophagy and protects the heart against energy stress. *Circulation research*. 2015;116(2):264-78.
55. Suen DF, Narendra DP, Tanaka A, Manfredi G, Youle RJ. Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic cybrid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(26):11835-40.
56. Song Y, Ding W, Xiao Y, Lu KJ. The Progress of Mitophagy and Related Pathogenic Mechanisms of the Neurodegenerative Diseases and Tumor. *Neuroscience journal*. 2015;2015:543758.
57. Ong SB, Hall AR, Hausenloy DJ. Mitochondrial dynamics in cardiovascular health and disease. *Antioxidants & redox signaling*. 2013;19(4):400-14.
58. Itoh K, Nakamura K, Iijima M, Sesaki H. Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends in cell biology*. 2013;23(2):64-71.

59. Eker C, Celik HG, Balci BK, Gunel T. Investigation of human paternal mitochondrial DNA transmission in ART babies whose fathers with male infertility. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2019;236:183-92.
60. Luo S, Valencia CA, Zhang J, Lee NC, Slone J, Gui B, et al. Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018;115(51):13039-44.
61. Gray MW, Lang BF, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, et al. Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. *Nucleic acids research*. 1998;26(4):865-78.
62. El-Hattab AW, Craigen WJ, Scaglia F. Mitochondrial DNA maintenance defects. *Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease*. 2017;1863(6):1539-55.
63. Lake NJ, Compton AG, Rahman S, Thorburn DR. Leigh syndrome: One disorder, more than 75 monogenic causes. *Annals of neurology*. 2016;79(2):190-203.
64. Rotig A, Bourgeron T, Chretien D, Rustin P, Munnich A. Spectrum of mitochondrial DNA rearrangements in the Pearson marrow-pancreas syndrome. *Human molecular genetics*. 1995;4(8):1327-30.
65. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Hudson G, Chinnery PF. Inherited mitochondrial optic neuropathies. *Journal of medical genetics*. 2009;46(3):145-58.
66. Kearns TP, Sayre GP. Retinitis pigmentosa, external ophthalmoplegia, and complete heart block: unusual syndrome with histologic study in one of two cases. *AMA archives of ophthalmology*. 1958;60(2):280-9.
67. Druzhyna NM, Wilson GL, LeDoux SP. Mitochondrial DNA repair in aging and disease. *Mech Ageing Dev*. 2008;129(7-8):383-90.
68. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981;290(5806):457-65.
69. Gilkerson RW. Mitochondrial DNA nucleoids determine mitochondrial genetics and dysfunction. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(10):1899-906.
70. Wang L. Mitochondrial purine and pyrimidine metabolism and beyond. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*. 2016;35(10-12):578-94.
71. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1410(2):103-23.
72. Shuster RC, Rubenstein AJ, Wallace DC. Mitochondrial DNA in anucleate human blood cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;155(3):1360-5.
73. Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, Gomez N, Blakely EL, Alston CL, et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Annals of neurology*. 2015;77(5):753-9.

74. Bogenhagen D, Clayton DA. Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell*. 1977;11(4):719-27.
75. Holt IJ, Harding AE, Petty RK, Morgan-Hughes JA. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *American journal of human genetics*. 1990;46(3):428-33.
76. Just RS, Irwin JA, Parson W. Mitochondrial DNA heteroplasmy in the emerging field of massively parallel sequencing. *Forensic science international Genetics*. 2015;18:131-9.
77. Wilson MR, Polansky D, Replogle J, DiZinno JA, Budowle B. A family exhibiting heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region reveals both somatic mosaicism and pronounced segregation of mitotypes. *Human genetics*. 1997;100(2):167-71.
78. Ivanov PL, Wadhams MJ, Roby RK, Holland MM, Weedn VW, Parsons TJ. Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nature genetics*. 1996;12(4):417-20.
79. Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(2):514-9.
80. Gredilla R. DNA damage and base excision repair in mitochondria and their role in aging. *Journal of aging research*. 2010;2011:257093.
81. DeBalsi KL, Hoff KE, Copeland WC. Role of the mitochondrial DNA replication machinery in mitochondrial DNA mutagenesis, aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev*. 2017;33:89-104.
82. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology*. 1956;11(3):298-300.
83. Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*. 2017;19(11):42.
84. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science (New York, NY)*. 1996;273(5271):59-63.
85. Golden TR, Melov S. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and aging. *Mech Ageing Dev*. 2001;122(14):1577-89.
86. Thompson LV. Oxidative stress, mitochondria and mtDNA-mutator mice. *Exp Gerontol*. 2006;41(12):1220-2.
87. Eshaghian A, Vleugels RA, Canter JA, McDonald MA, Stasko T, Sligh JE. Mitochondrial DNA deletions serve as biomarkers of aging in the skin, but are typically

- absent in nonmelanoma skin cancers. *The Journal of investigative dermatology*. 2006;126(2):336-44.
88. Herbst A, Pak JW, McKenzie D, Bua E, Bassiouni M, Aiken JM. Accumulation of mitochondrial DNA deletion mutations in aged muscle fibers: evidence for a causal role in muscle fiber loss. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2007;62(3):235-45.
89. Lee HC, Chang CM, Chi CW. Somatic mutations of mitochondrial DNA in aging and cancer progression. *Ageing Res Rev*. 2010;9 Suppl 1:S47-58.
90. Bua E, Johnson J, Herbst A, Delong B, McKenzie D, Salamat S, et al. Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. *American journal of human genetics*. 2006;79(3):469-80.
91. Arai T, Nakahara K, Matsuoka H, Sawabe M, Chida K, Matsushita S, et al. Age-related mitochondrial DNA deletion in human heart: its relationship with cardiovascular diseases. *Aging clinical and experimental research*. 2003;15(1):1-5.
92. Birch-Machin MA. The role of mitochondria in ageing and carcinogenesis. *Clinical and experimental dermatology*. 2006;31(4):548-52.
93. Yu-Wai-Man P, Lai-Cheong J, Borthwick GM, He L, Taylor GA, Greaves LC, et al. Somatic mitochondrial DNA deletions accumulate to high levels in aging human extraocular muscles. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2010;51(7):3347-53.
94. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*. 1998;78(2):547-81.
95. Correia-Melo C, Passos JF. Mitochondria: Are they causal players in cellular senescence? *Biochim Biophys Acta*. 2015;1847(11):1373-9.
96. Cortopassi GA, Arnheim N. Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic acids research*. 1990;18(23):6927-33.
97. Khaidakov M, Heflich RH, Manjanatha MG, Myers MB, Aidoo A. Accumulation of point mutations in mitochondrial DNA of aging mice. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2003;526(1-2):1-7.
98. Samuels DC, Schon EA, Chinnery PF. Two direct repeats cause most human mtDNA deletions. *Trends in genetics : TIG*. 2004;20(9):393-8.
99. Nissanka N, Minczuk M, Moraes CT. Mechanisms of Mitochondrial DNA Deletion Formation. *Trends in genetics : TIG*. 2019;35(3):235-44.
100. Lezza AM, Mecocci P, Cormio A, Beal MF, Cherubini A, Cantatore P, et al. Mitochondrial DNA 4977 bp deletion and OH8dG levels correlate in the brain of aged subjects but not Alzheimer's disease patients. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1999;13(9):1083-8.

101. Albertini AM, Hofer M, Calos MP, Miller JH. On the formation of spontaneous deletions: the importance of short sequence homologies in the generation of large deletions. *Cell*. 1982;29(2):319-28.
102. Krishnan KJ, Reeve AK, Samuels DC, Chinnery PF, Blackwood JK, Taylor RW, et al. What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? *Nature genetics*. 2008;40(3):275-9.
103. Chen T, He J, Huang Y, Zhao W. The generation of mitochondrial DNA large-scale deletions in human cells. *Journal of human genetics*. 2011;56(10):689-94.
104. Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, Beal MF, Wallace DC. Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nature genetics*. 1992;2(4):324-9.
105. Shoffner JM, Lott MT, Voljavec AS, Soueidan SA, Costigan DA, Wallace DC. Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: a slip-replication model and metabolic therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(20):7952-6.
106. Lee HC, Wei YH. Mitochondrial DNA instability and metabolic shift in human cancers. *International journal of molecular sciences*. 2009;10(2):674-701.
107. Carlos T. Moraes ER, Vittoria Petruzzella, Sara Shanski, Salvatore DiMauro, Eric A. Schon & Eduardo Bonilla. Molecular analysis of the muscle pathology associated with mitochondrial DNA deletions. *Nature Publishing Group*. 1992;1:359-7.
108. Wang J, Lu YY. Mitochondrial DNA 4977-bp deletion correlated with reactive oxygen species production and manganese superoxidodismutase expression in gastric tumor cells. *Chin Med J (Engl)*. 2009;122(4):431-6.
109. Chen T, He J, Shen L, Fang H, Nie H, Jin T, et al. The mitochondrial DNA 4,977-bp deletion and its implication in copy number alteration in colorectal cancer. *BMC medical genetics*. 2011;12:8.
110. Li T, Chen GL, Lan H, Mao L, Zeng B. Prevalence of the 4977-bp and 4408-bp mitochondrial DNA deletions in mesenteric arteries from patients with colorectal cancer. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*. 2016;27(5):3774-6.
111. Nie H, Chen G, He J, Zhang F, Li M, Wang Q, et al. Mitochondrial common deletion is elevated in blood of breast cancer patients mediated by oxidative stress. *Mitochondrion*. 2016;26:104-12.
112. Dimberg J, Hong TT, Nguyen LTT, Skarstedt M, Lofgren S, Matussek A. Common 4977 bp deletion and novel alterations in mitochondrial DNA in Vietnamese patients with breast cancer. *SpringerPlus*. 2015;4:58.

113. Corral-Debrinski M, Shoffner JM, Lott MT, Wallace DC. Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease. *Mutat Res.* 1992;275(3-6):169-80.
114. Vecoli C, Borghini A, Pulignani S, Mercuri A, Turchi S, Carpeggiani C, et al. Prognostic value of mitochondrial DNA(4977) deletion and mitochondrial DNA copy number in patients with stable coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2018;276:91-7.
115. Shen J, Wan J, Huff C, Fang S, Lee JE, Zhao H. Mitochondrial DNA 4977-base pair common deletion in blood leukocytes and melanoma risk. *Pigment cell & melanoma research.* 2016;29(3):372-8.
116. Chen YK, Senadi GC, Lee CH, Tsai YM, Chen YR, Hu WP, et al. Apoptosis induced by 2-aryl benzothiazoles-mediated photodynamic therapy in melanomas via mitochondrial dysfunction. *Chemical research in toxicology.* 2014;27(7):1187-98.
117. Yang JH, Lee HC, Lin KJ, Wei YH. A specific 4977-bp deletion of mitochondrial DNA in human ageing skin. *Archives of dermatological research.* 1994;286(7):386-90.
118. Pang CY, Lee HC, Yang JH, Wei YH. Human skin mitochondrial DNA deletions associated with light exposure. *Archives of biochemistry and biophysics.* 1994;312(2):534-8.
119. Yang JH, Lee HC, Wei YH. Photoageing-associated mitochondrial DNA length mutations in human skin. *Archives of dermatological research.* 1995;287(7):641-8.
120. Wheelhouse NM, Lai PB, Wigmore SJ, Ross JA, Harrison DJ. Mitochondrial D-loop mutations and deletion profiles of cancerous and noncancerous liver tissue in hepatitis B virus-infected liver. *British journal of cancer.* 2005;92(7):1268-72.
121. Fukushima S, Honda K, Awane M, Yamamoto E, Takeda R, Kaneko I, et al. The frequency of 4977 base pair deletion of mitochondrial DNA in various types of liver disease and in normal liver. *Hepatology (Baltimore, Md).* 1995;21(6):1547-51.
122. Shao JY, Gao HY, Li YH, Zhang Y, Lu YY, Zeng YX. Quantitative detection of common deletion of mitochondrial DNA in hepatocellular carcinoma and hepatocellular nodular hyperplasia. *World journal of gastroenterology.* 2004;10(11):1560-4.
123. Kao S, Chao HT, Wei YH. Mitochondrial deoxyribonucleic acid 4977-bp deletion is associated with diminished fertility and motility of human sperm. *Biology of reproduction.* 1995;52(4):729-36.
124. Dhillon VS, Shahid M, Husain SA. Associations of MTHFR DNMT3b 4977 bp deletion in mtDNA and GSTM1 deletion, and aberrant CpG island hypermethylation of GSTM1 in non-obstructive infertility in Indian men. *Molecular human reproduction.* 2007;13(4):213-22.
125. Dani MA, Dani SU, Lima SP, Martinez A, Rossi BM, Soares F, et al. Less DeltamtDNA4977 than normal in various types of tumors suggests that cancer cells are

- essentially free of this mutation. *Genetics and molecular research : GMR*. 2004;3(3):395-409.
126. Horton TM, Graham BH, Corral-Debrinski M, Shoffner JM, Kaufman AE, Beal MF, et al. Marked increase in mitochondrial DNA deletion levels in the cerebral cortex of Huntington's disease patients. *Neurology*. 1995;45(10):1879-83.
127. Abnet CC, Huppi K, Carrera A, Armistead D, McKenney K, Hu N, et al. Control region mutations and the 'common deletion' are frequent in the mitochondrial DNA of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *BMC cancer*. 2004;4:30.
128. Tan BH, Skipworth RJ, Stephens NA, Wheelhouse NM, Gilmour H, de Beaux AC, et al. Frequency of the mitochondrial DNA 4977bp deletion in oesophageal mucosa during the progression of Barrett's oesophagus. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2009;45(5):736-40.
129. Seidman MD, Bai U, Khan MJ, Murphy MJ, Quirk WS, Castora FL, et al. Association of mitochondrial DNA deletions and cochlear pathology: a molecular biologic tool. *The Laryngoscope*. 1996;106(6):777-83.
130. Lee HC, Yin PH, Yu TN, Chang YD, Hsu WC, Kao SY, et al. Accumulation of mitochondrial DNA deletions in human oral tissues -- effects of betel quid chewing and oral cancer. *Mutat Res*. 2001;493(1-2):67-74.
131. Hamblet NS, Castora FJ. Elevated levels of the Kearns-Sayre syndrome mitochondrial DNA deletion in temporal cortex of Alzheimer's patients. *Mutat Res*. 1997;379(2):253-62.
132. Dai JG, Xiao YB, Min JX, Zhang GQ, Yao K, Zhou RJ. Mitochondrial DNA 4977 BP deletion mutations in lung carcinoma. *Indian journal of cancer*. 2006;43(1):20-5.
133. Toth T, Bokay J, Szonyi L, Nagy B, Papp Z. Detection of mtDNA deletion in Pearson syndrome by two independent PCR assays from Guthrie card. *Clinical genetics*. 1998;53(3):210-3.
134. Lewis PD, Baxter P, Paul Griffiths A, Parry JM, Skibinski DO. Detection of damage to the mitochondrial genome in the oncocytic cells of Warthin's tumour. *The Journal of pathology*. 2000;191(3):274-81.
135. Cummins JM, Jequier AM, Martin R, Mehmet D, Goldblatt J. Semen levels of mitochondrial DNA deletions in men attending an infertility clinic do not correlate with phenotype. *International journal of andrology*. 1998;21(1):47-52.
136. Kara M, Tatar A, Borekci B, Dagli F, Oztas S. Mitochondrial DNA 4977 bp Deletion in Chronic Cervicitis and Cervix Cancers. *Balkan journal of medical genetics : BJMG*. 2012;15(1):25-9.

137. Moraes CT, Sciacco M, Ricci E, Tengan CH, Hao H, Bonilla E, et al. Phenotype-genotype correlations in skeletal muscle of patients with mtDNA deletions. *Muscle & nerve Supplement*. 1995;3:S150-3.
138. Yu JJ, Yan T. Effect of mtDNA mutation on tumor malignant degree in patients with prostate cancer. *Aging Male*. 2010;13(3):159-65.
139. Porteous WK, James AM, Sheard PW, Porteous CM, Packer MA, Hyslop SJ, et al. Bioenergetic consequences of accumulating the common 4977-bp mitochondrial DNA deletion. *European journal of biochemistry*. 1998;257(1):192-201.
140. Bhat HK, Hiatt WR, Hoppel CL, Brass EP. Skeletal muscle mitochondrial DNA injury in patients with unilateral peripheral arterial disease. *Circulation*. 1999;99(6):807-12.
141. Brass EP, Wang H, Hiatt WR. Multiple skeletal muscle mitochondrial DNA deletions in patients with unilateral peripheral arterial disease. *Vascular medicine (London, England)*. 2000;5(4):225-30.
142. Pineda M, Playan-Arison A, Alcaine-Villarroya MJ, Vernet AM, Serra-Castanera A, Solano A, et al. [Familiar chronic progressive external ophthalmoplegia of mitochondrial origin]. *Revista de neurologia*. 2004;38(11):1023-7.
143. Pesce V, Cormio A, Marangi LC, Guglielmi FW, Lezza AM, Francavilla A, et al. Depletion of mitochondrial DNA in the skeletal muscle of two cirrhotic patients with severe asthenia. *Gene*. 2002;286(1):143-8.
144. Polisecki EY, Schreier LE, Ravioli J, Corach D. Common mitochondrial DNA deletion associated with sudden natural death in adults. *Journal of forensic sciences*. 2004;49(6):1335-8.
145. Sabatino L, Botto N, Borghini A, Turchi S, Andreassi MG. Development of a new multiplex quantitative real-time PCR assay for the detection of the mtDNA(4977) deletion in coronary artery disease patients: a link with telomere shortening. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2013;54(5):299-307.
146. Martinez de Zabarte Fernandez JM, Rodriguez-Vigil Iturrate C, Martinez Faci C, Garcia Jimenez I, Murillo Sanjuan L, Munoz Mellado A. [A regenerative anemia in infants: 2 cases of Pearson s syndrome]. *Archivos argentinos de pediatria*. 2017;115(1):e24-e7.
147. Meissner C, Bruse P, Mohamed SA, Schulz A, Warnk H, Storm T, et al. The 4977 bp deletion of mitochondrial DNA in human skeletal muscle, heart and different areas of the brain: a useful biomarker or more? *Exp Gerontol*. 2008;43(7):645-52.
148. Meissner C, von Wurmb N, Schimansky B, Oehmichen M. Estimation of age at death based on quantitation of the 4977-bp deletion of human mitochondrial DNA in skeletal muscle. *Forensic science international*. 1999;105(2):115-24.

149. Zabihi Diba L, Mohaddes Ardebili SM, Gharesouran J, Houshmand M. Age-related decrease in mtDNA content as a consequence of mtDNA 4977 bp deletion. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal.* 2016;27(4):3008-12.
150. von Wurmb-Schwark N, Schwark T, Caliebe A, Drenske C, Nikolaus S, Schreiber S, et al. Low level of the mtDNA(4977) deletion in blood of exceptionally old individuals. *Mech Ageing Dev.* 2010;131(3):179-84.
151. Yao YG, Kajigaya S, Young NS. Mitochondrial DNA mutations in single human blood cells. *Mutat Res.* 2015;779:68-77.
152. Malik AN, Shahni R, Rodriguez-de-Ledesma A, Laftah A, Cunningham P. Mitochondrial DNA as a non-invasive biomarker: accurate quantification using real time quantitative PCR without co-amplification of pseudogenes and dilution bias. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;412(1):1-7.
153. World Health Organization (International Agency of Research on Cancer), Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018, GLOBOCAN, 12 September 2018.
154. Jaul E, Barron J. Age-Related Diseases and Clinical and Public Health Implications for the 85 Years Old and Over Population. *Frontiers in public health.* 2017;5:335.
155. Portugal, Lei n.º 98, de 04 de Setembro de 2009, Regime jurídico dos acidentes de trabalho e das doenças profissionais, Procuradoria-Geral Distrital de Lisboa (Ministério Público).
156. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer.* 2015;136(5):E359-86.
157. Xie SH, Lagergren J. Risk factors for oesophageal cancer. *Best practice & research Clinical gastroenterology.* 2018;36-37:3-8.
158. Cha YH, Yook JI, Kim HS, Kim NH. Catabolic metabolism during cancer EMT. *Archives of pharmacal research.* 2015;38(3):313-20.
159. Yang H, Xiong Y, Guan K. Metabolic alteration in tumorigenesis. *Science China Life sciences.* 2013;56(12):1067-75.
160. Robey RB, Weisz J, Kuemmerle NB, Salzberg AC, Berg A, Brown DG, et al. Metabolic reprogramming and dysregulated metabolism: cause, consequence and/or enabler of environmental carcinogenesis? *Carcinogenesis.* 2015;36 Suppl 1:S203-31.
161. Li Z, Zhang H. Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 2016;73(2):377-92.
162. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(5):325-37.

163. Devic S. Warburg Effect - a Consequence or the Cause of Carcinogenesis? *J Cancer*. 2016;7(7):817-22.
164. Ott W. The metabolism of carcinoma cells. *American Association for Cancer Research Journals*. 1925; 9(1):148-63.
165. Cairns RA. Drivers of the Warburg phenotype. *Cancer journal (Sudbury, Mass)*. 2015;21(2):56-61.
166. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, NY)*. 2009;324(5930):1029-33.
167. Saúde D-Gd. Prescrição e Determinação do Antígeno Específico da Próstata - PSA. *Serviço Nacional de Saúde*. 2017;060.
168. Albertsen PC, Moore DF, Shih W, Lin Y, Li H, Lu-Yao GL. Impact of comorbidity on survival among men with localized prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(10):1335-41.
169. Matzkin H, Eber P, Todd B, van der Zwaag R, Soloway MS. Prognostic significance of changes in prostate-specific markers after endocrine treatment of stage D2 prostatic cancer. *Cancer*. 1992;70(9):2302-9.
170. Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med*. 2003;349(4):366-81.
171. Thrift AG, Thayabaranathan T, Howard G, Howard VJ, Rothwell PM, Feigin VL, et al. Global stroke statistics. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society*. 2017;12(1):13-32.
172. Goldstein LB, Adams R, Alberts MJ, Appel LJ, Brass LM, Bushnell CD, et al. Primary prevention of ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council: cosponsored by the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Interdisciplinary Working Group; Cardiovascular Nursing Council; Clinical Cardiology Council; Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Council; and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline. *Stroke*. 2006;37(6):1583-633.
173. Our World in Data, Causes of Death. 2018. Disponível em: [<https://ourworldindata.org › causes-of-death>].
174. Chauhan G, Debette S. Genetic Risk Factors for Ischemic and Hemorrhagic Stroke. *Current cardiology reports*. 2016;18(12):124.
175. Di Carlo A. Human and economic burden of stroke. *Age and ageing*. 2009;38(1):4-5.
176. Borghini A, Cervelli T, Galli A, Andreassi MG. DNA modifications in atherosclerosis: from the past to the future. *Atherosclerosis*. 2013;230(2):202-9.

177. Anderson CD, Biffi A, Nalls MA, Devan WJ, Schwab K, Ayres AM, et al. Common variants within oxidative phosphorylation genes influence risk of ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2013;44(3):612-9.
178. Madamanchi NR, Runge MS. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation research*. 2007;100(4):460-73.
179. Sobenin IA, Chistiakov DA, Bobryshev YV, Postnov AY, Orekhov AN. Mitochondrial mutations in atherosclerosis: new solutions in research and possible clinical applications. *Current pharmaceutical design*. 2013;19(33):5942-53.
180. Yu E, Calvert PA, Mercer JR, Harrison J, Baker L, Figg NL, et al. Mitochondrial DNA damage can promote atherosclerosis independently of reactive oxygen species through effects on smooth muscle cells and monocytes and correlates with higher-risk plaques in humans. *Circulation*. 2013;128(7):702-12.
181. Ungvari Z, Kaley G, de Cabo R, Sonntag WE, Csiszar A. Mechanisms of vascular aging: new perspectives. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2010;65(10):1028-41.
182. Pant S, Deshmukh A, Gurumurthy GS, Pothineni NV, Watts TE, Romeo F, et al. Inflammation and atherosclerosis--revisited. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2014;19(2):170-8.
183. Faraci FM. Reactive oxygen species: influence on cerebral vascular tone. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2006;100(2):739-43.
184. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews*. 2007;87(1):315-424.
185. Huang YH, Chen CM, Lee YS, Chang KH, Chen HW, Chen YC. Detection of mitochondrial DNA with 4977 bp deletion in leukocytes of patients with ischemic stroke. *PloS one*. 2018;13(2):e0193175.
186. Guo ZS, Jin CL, Yao ZJ, Wang YM, Xu BT. Analysis of the Mitochondrial 4977 Bp Deletion in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Balkan journal of medical genetics : BJMG*. 2017;20(1):81-6.
187. Berneburg M, Gattermann N, Stege H, Grewe M, Vogelsang K, Ruzicka T, et al. Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system. *Photochemistry and photobiology*. 1997;66(2):271-5.
188. von Wurmb-Schwark N, Higuchi R, Fenech AP, Elfstroem C, Meissner C, Oehmichen M, et al. Quantification of human mitochondrial DNA in a real time PCR. *Forensic science international*. 2002;126(1):34-9.

189. Berneburg M, Grether-Beck S, Kurten V, Ruzicka T, Briviba K, Sies H, et al. Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(22):15345-9.
190. Gendron SP, Mallet JD, Bastien N, Rochette PJ. Mitochondrial DNA common deletion in the human eye: a relation with corneal aging. *Mech Ageing Dev*. 2012;133(2-3):68-74.
191. Cortopassi GA, Shibata D, Soong NW, Arnheim N. A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(16):7370-4.
192. Pavicic WH, Richard SM. Correlation analysis between mtDNA 4977-bp deletion and ageing. *Mutat Res*. 2009;670(1-2):99-102.
193. Wu CW, Yin PH, Hung WY, Li AF, Li SH, Chi CW, et al. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in gastric cancer. *Genes, chromosomes & cancer*. 2005;44(1):19-28.
194. Ahmadi M, Golalipour M, Samaei NM. Mitochondrial Common Deletion Level in Blood: New Insight Into the Effects of Age and Body Mass Index. *Current aging science*. 2019;11(4):250-4.
195. Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obesity research & clinical practice*. 2013;7(5):e330-41.
196. Zhang X, Dong F, Ren J, Driscoll MJ, Culver B. High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. *Experimental neurology*. 2005;191(2):318-25.
197. Bamford J, Sandercock P, Dennis M, Burn J, Warlow C. Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. *Lancet (London, England)*. 1991;337(8756):1521-6.