

Os níveis séricos de estrogênios e androgênios têm se revelado significativamente elevados em mulheres portadoras do alelo A2 (Feigelson et al, 1998; Haiman et al, 1999), sugerindo que este alelo poderia elevar a atividade do promotor e a transcrição da enzima, aumentando a produção de estrogênios e androgênios (Kado et al, 2002).

Com relação ao polimorfismo CYP17 e o câncer de ovário, poucos estudos foram descritos na literatura e os dados são conflitantes. Spurdle et al (2000) não encontraram associação, bem como Goodman et al (2001), em pequeno estudo.

No entanto, Garner et al (2002) encontraram associação significativa em ambos os genótipos homocigotos e heterocigotos para o alelo variante A2 com o aumento do risco da doença, bem como Yazici et al (2006) detectaram que o alelo A2 pode conferir aumento no risco da doença em pacientes sem mutação nos genes BRCA.

1.6 Polimorfismos nas vias de ação dos esteróides sexuais

1.6.1 Polimorfismo do Receptor de Progesterona (PROGINS)

O gene do receptor de progesterona humano (PRh) pertence a superfamília dos receptores esteroídicos e está localizado no cromossomo 11q22-23 (Figura 4A) (Rowe et al, 1995), sendo responsável por mediar as ações da progesterona (Carvalho et al, 2007). Sendo assim, é um importante regulador no crescimento e diferenciação da glândula mamária e do sistema reprodutor feminino e também está envolvido no desenvolvimento de tumores malignos (Fabjani et al, 2002).

O gene PRh utiliza promotores e sítios de iniciação da tradução diferentes para produzir duas isoformas denominadas hPR-A e hPR-B (Modugno, 2004). A isoforma A consiste de 764 aminoácidos e peso molecular de 94 kDa, enquanto a isoforma B apresenta uma adição de 164 aminoácidos em sua região N-terminal, resultando em uma proteína de 114 kDa (Li et al, 2003). Ambas as

isoformas possuem três domínios funcionais conservados: a região N-terminal, o domínio de ligação do DNA (DBD) e o domínio de ligação ao ligante (LBD) (Kastner et al, 1990).

Outras variantes do receptor de progesterona (Figura 1B), além do hPR-A e hPR-B foram relatadas posteriormente, tais como o hPR-C, hPR-S e o hPR-T (Hirata et al, 2002).

Vários polimorfismos têm sido identificados no gene do receptor de progesterona humano e, dentre eles, destaca-se o polimorfismo PROGINS que consiste de uma inserção *Alu* de 306 pb no íntron G (figura 4B), entre o éxon 7 e 8; uma mutação pontual silenciosa no éxon 5 (rs1042839) (C→T) e uma substituição de um único aminoácido no éxon 4 (rs1042838) (G→T / Valina → Leucina), identificado por Rowe et al (1995) em estudo com o câncer de ovário (Rowe et al, 1995; Kieback et al, 1998; Wang-Gohrke et al, 2000; Hsieh et al, 2005), também conhecido como complexo PROGINS (Fabjani et al, 2002; Kieback et al, 1998).

Segundo McKenna et al (1995), esse polimorfismo resulta em uma transcrição anômala do gene do receptor de progesterona por recombinação ou por um erro no processamento do transcrito primário, levando a uma perda da capacidade de ligação do hormônio ao receptor e da sua ativação, com conseqüente queda da atividade da progesterona.

Evidências sugerem que ambas isoformas exerçam atividades funcionalmente distintas, hPR-A tem mostrado ação repressora do gene do receptor de estrogênio enquanto hPR-B tem grande capacidade de ativá-lo (Fabjani et al, 2002; Modugno, 2004).

Fabjani et al (2002) verificaram que a isoforma hPR-A parece ser a proteína envolvida com o polimorfismo PROGINS, o qual parece conferir decréscimo em sua estabilidade com perda da capacidade de inibir a ativação dos receptores estrogênicos. Kieback et al (1998) acreditam que a isoforma hPRA, sob a ação do polimorfismo PROGINS, condicionaria também uma disfunção na atuação da isoforma hPRB.

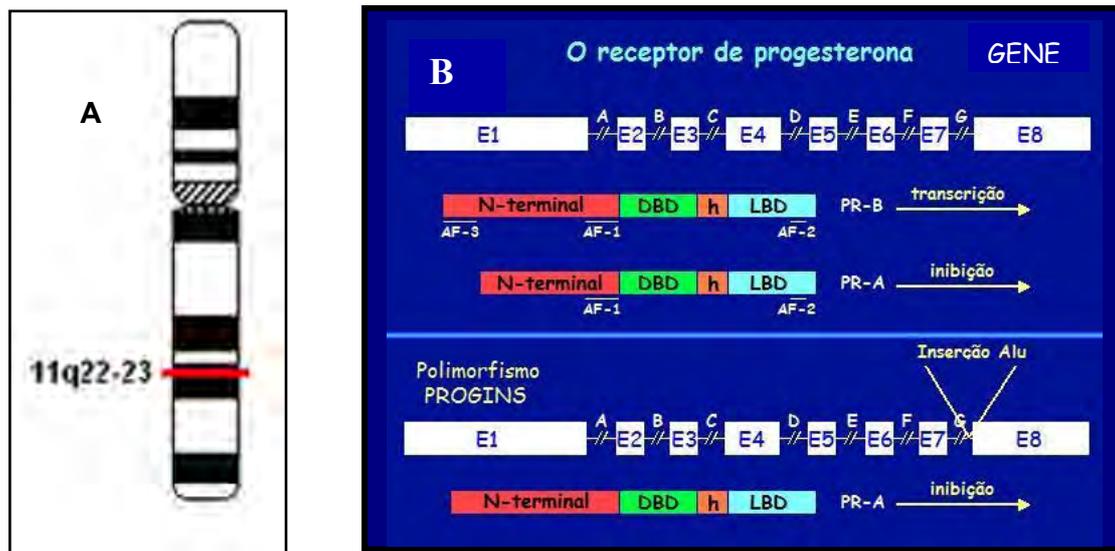


Figura 4: O Receptor de Progesterona e o polimorfismo PROGINS. Na Figura 4A destaca-se em vermelho a localização do gene do receptor de progesterona no cromossomo 11, obtido de NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=607311>) Na figura 4B pode-se observar a estrutura e domínios funcionais dos diferentes tipos de receptor de progesterona, bem como a inserção Alu que caracteriza o polimorfismo PROGINS. Modificado de *The nuclear Signaling Atlas* (2004)

O polimorfismo PROGINS tem sido estudado em associação com o câncer de mama, endométrio, ovário, bem como a endometriose e abortos de repetição (McKenna et al, 1995; Wang-Gohrke et al, 2000; Kurz et al, 2000; Lattuada et al, 2004; Pearce et al, 2005; Romano et al, 2006; Carvalho et al, 2007; Junqueira et al, 2007). Com relação ao câncer de ovário, o primeiro estudo realizado foi em 1995 por McKenna e colaboradores e sugere um possível aumento no risco da doença associada ao polimorfismo em uma população germânica e irlandesa (McKenna et al, 1995). Recentes estudos também continuaram encontrando associação positiva entre o polimorfismo PROGINS e o câncer de ovário, inclusive o nosso, como pode ser observado em destaque na figura 5 (Runnebaum et al, 2001; Agoulinik et al, 2004; Pearce et al, 2005; Romano et al, 2006, Leite et al, 2007).

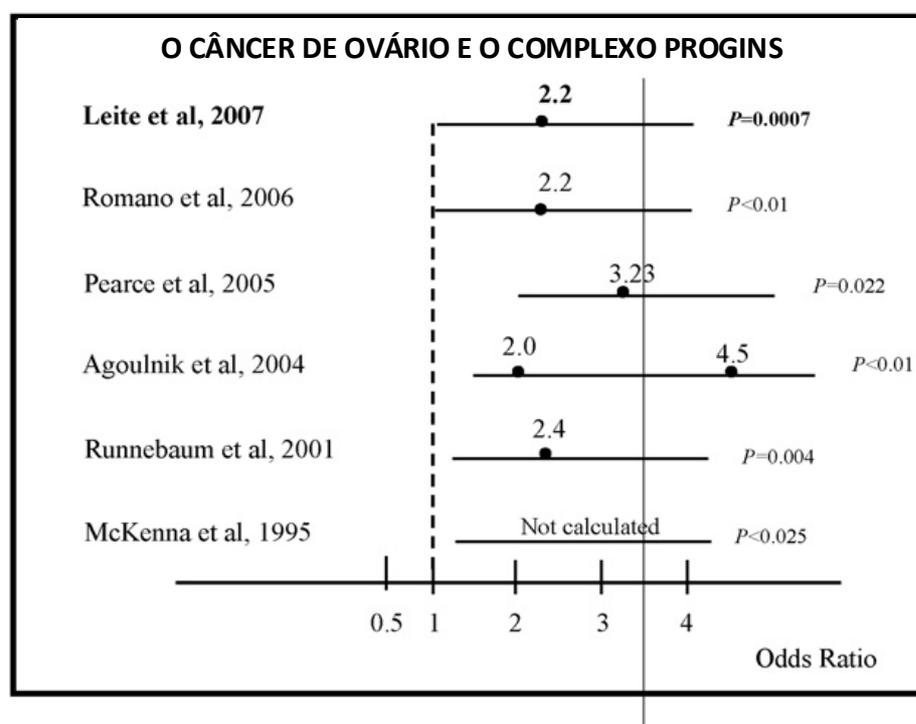


Figura 5: O câncer de ovário e o complexo PROGINS. A figura compara os valores de *odds ratio* e *p* obtidos de diferentes estudos que encontraram associação positiva entre o polimorfismo PROGINS e o câncer de ovário, com destaque para o presente trabalho (modificado de Leite et al, 2007).

Entretanto, outros estudos falharam ao tentar estabelecer alguma diferença estatística significativa associada ao risco da doença (Manolitsas et al, 1997; Lancaster et al, 1998; Spurdle et al, 2001; Tong et al, 2001; Lancaster et al, 2003).

1.6.2 Polimorfismos no Receptor de Estrogênios Alfa (ER- α)

O receptor de estrogênio (RE) se liga aos elementos de resposta ao estradiol (EREs) nos promotores de uma ampla variedade de genes alvo e modula a transcrição gênica recrutando proteínas co-ativadoras e co-repressoras (Kushner et al, 2000).

Receptores de estrogênios se apresentam sob duas formas: ER- α e ER- β , codificadas por diferentes genes, ESR1 e ESR2, respectivamente. O ESR1 está localizado no cromossomo 6q25.1 (Figura 6) (Menasce et al, 1993) e

foi clonado e sequenciado por Green e colaboradores em 1986 (Green et al, 1986) e contém 8 éxons separados por 7 íntrons, abrangendo mais de 70 Kb. Codifica uma proteína nuclear de 595 aminoácidos com peso molecular de 66 KDa, sendo membro da super família dos receptores esteroídicos. O primeiro íntron do gene, como o promotor, usualmente contém um grande número de sequências regulatórias do que outros íntrons (Jakimiuk et al, 2007).

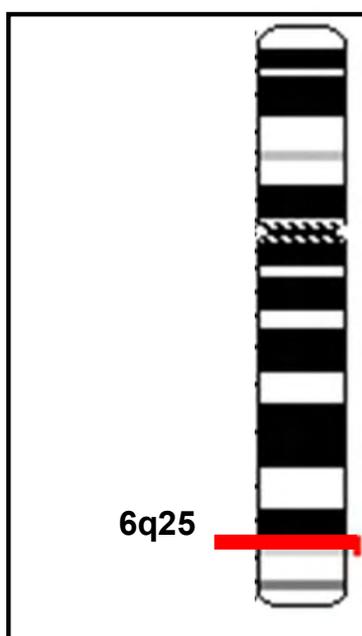


Figura 6: Localização do receptor de estrogênios alfa. Destaca-se em vermelho a localização do ER- α no cromossomo 6, obtido de NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=609300>.

Os receptores de estrogênio apresentam seis domínios estruturais identificados de A até F, incluindo uma região conhecida como dobradiça (ou região D) que permite modificações estruturais do receptor e três domínios funcionais principais (A/B, C e E/F):

O domínio regulador (região A/B) está localizado na extremidade amino-terminal e é o mais variável tanto no tamanho quanto na sequência de aminoácidos (18% de similaridade entre o ER- α e o ER- β). O domínio de função de ativação AF-1 está presente somente no ER- α (Katzenellenbogen et al, 2000; Behl, 2002).

O domínio mais conservado é o de ligação C e liga-se as sequências de DNA, denominados elementos de resposta ao estrogênio (ERE) que estão localizados próximo as regiões promotoras dos genes. A ligação é feita através

de um complexo conhecido como “dedo de zinco”, uma estrutura em forma de alça com quatro aminoácidos de cisteína que formam um complexo coordenado por íons de zinco (Mendelsohn, Karas, 1999; Johnston, Dowsett, 2003).

Localizado na extremidade carboxi-terminal, o domínio de ligação hormonal (região E/F) possui diversas funções, tais como a formação de dímeros de receptores, localização nuclear e dissociação de proteínas co-repressoras. Além disso, possui a função de ativação 2 (AF-2) que, após a ligação ao estrogênio, passa a interagir com co-reguladores, os quais permitirão a formação do complexo protéico envolvido na ativação da transcrição (Steinmetz et al, 2001; Behl, 2002; Johnston, Dowsett, 2003).

Uma série de variações de sequência ou polimorfismos de base única (SNPs) tem sido identificada no ER- α (Figura 7) bem como a associação destes com aumento ou diminuição do risco de desenvolvimento de várias patologias, tais como osteoporose, câncer de ovário familiar, câncer de próstata, acidente vascular cerebral, entre outros (Gennari et al, 2002; Wu et al, 2005, Bergher et al, 2007).

Dentre estes polimorfismos, encontram-se os localizados no *éxon 1* e *íntron 1* do receptor de estrógeno alfa. O *éxon 1* e o *íntron 1* são importantes porque estão envolvidos com a transcrição das regiões A/B da proteína, que contém o domínio funcional AF-1. Este domínio é responsável pela ativação da transcrição. Além disso, atua como um ponto de contato para os co-reguladores (Couse et al, 1999). Assim, mutações nesse domínio poderiam afetar as ações biológicas desse receptor, predispondo ao câncer de ovário.

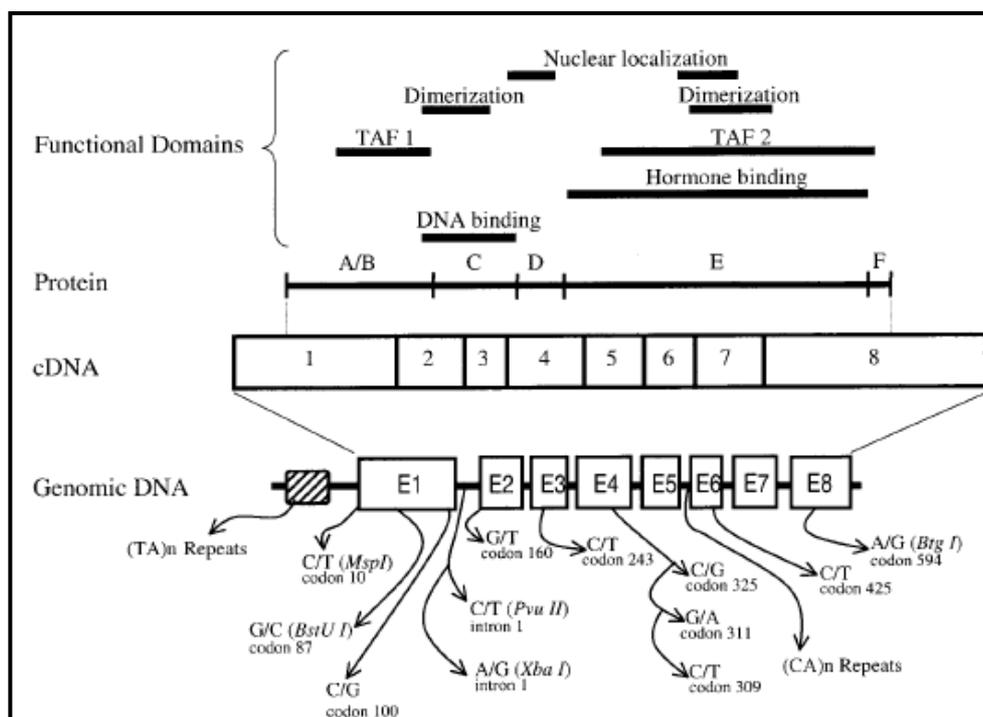


Figura 7: Polimorfismos de base única (SNPs) identificados no Receptor de Estrogênio alfa. Modificado de Gennari et al, 2002.

Dentre os polimorfismos no ER- α , destacam-se os polimorfismos de sítios de restrição (RFLPs) *PvuII* e *XbaI* por serem os mais bem caracterizados até o momento. Ambos localizam-se no primeiro *intron* do gene, assim, os polimorfismos c454-397T→C e c454A→G estão 397 e 351 pb antes do éxon 2 e são descritos pelo nome dos sítios de restrição detectados pela enzimas *PvuII* (rs2234693) e *XbaI* (rs9340799), respectivamente. Cabe destacar a presença de uma repetição de di-nucleotídeos (TA)_n na região inicial do gene.

Em diferentes estudos, estes polimorfismos têm sido associados a uma série de condições patológicas, tais como câncer de próstata e mama, osteoporose, Alzheimer e doenças cardiovasculares. Entretanto, os resultados ainda são conflitantes e os mecanismos moleculares aos quais estes polimorfismos influem na atividade do receptor ainda são incertos (Gennari et al, 2002). Possíveis mecanismos funcionais atribuídos a estes dois polimorfismos incluem uma mudança na expressão do ER- α através da alteração da ligação aos fatores de transcrição e a influência no *splicing* alternativo do gene (Jakimiuk et al, 2007).

Estudos demonstraram que a transição T→C associada com a perda do sítio de restrição para *PvuII* (alelo P) resulta em um potencial sítio de ligação para o fator de transcrição myb, que na presença de B-myb, é capaz de reforçar, *in vitro*, a transcrição. Dessa forma, a presença do alelo P poderia amplificar a transcrição do gene ER- α (Gennari et al, 2002).

Adicionalmente, estudamos outros 2 polimorfismos localizado no *intron* 1 éxon 1 do gene ER- α . Nesse caso, para a detecção da substituição C→T (rs9322331), utiliza-se a enzima *HaeIII* e utiliza-se a enzima de restrição *MspI* para detectar a transição C→T, Ser→Ser (rs1784705), respectivamente.

Em razão da importância fundamental dos receptores de estrogênio na regulação da transcrição gênica, as pesquisas têm estudado as variações descritas acima (polimorfismos) nestes receptores relacionadas ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças estrogênio-dependentes. Assim, alguns estudos já demonstraram correlações significativas entre os polimorfismos no receptor de estrogênio α e a presença de doenças como o câncer de mama (Curran et al, 2001; Cai et al, 2003; Gold et al, 2004), câncer de endométrio (Iwamoto et al, 2003), leiomioma uterino (Hsieh et al, 2003), osteoporose (Dvornyk et al, 2004) e redução dos níveis de colesterol em mulheres após a menopausa durante terapia hormonal (Herrington et al, 2002; Herrington, Howard, 2003).

Até o momento, encontramos somente um trabalho que estuda polimorfismos no gene do receptor de estrógeno e o câncer de ovário. Wu et al (2005) realizaram análises de mutações no ER- α , inclusive com os polimorfismos ER-*PvuII* e ER-*XbaI*, com uma amostragem pequena de casos de câncer de ovário esporádico e familiar (sem a presença de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2). Como resultado, encontrou associação entre a análise dos polimorfismos ER-*PvuII* e ER-*XbaI*, sugerindo que o gene ER- α ou um gene localizado próximo ao locus do ER- α poderia estar associado a suscetibilidade ao câncer de ovário familiar sem a mutação no gene BRCA1.

1.7 Polimorfismos nas vias de metabolização dos esteróides sexuais

1.7.1 Polimorfismo da Glutathione-S-transferase (GST)

A glutathione (GSH) é um tripeptídeo formado pelos resíduos de glicina, glutamato e cisteína e está presente na maioria das células de espécies aeróbias. Seu papel em processos de detoxificação, em associação com diferentes enzimas, é fundamental para conferir resistência à célula (Rossini et al, 2002).

A função deste tripeptídeo é fundamental para a biologia da célula, visto que modula a resposta celular por oxido-redução, detoxifica drogas e metabólitos, regula a expressão gênica e a apoptose e também está envolvida no transporte de solutos orgânicos através de membranas (Jefferies et al, 2003).

A glutathione S-transferase (GST) constitui uma família de enzimas responsáveis pelo metabolismo de uma série de xenobióticos e carcinógenos, que catalisam a conjugação da glutathione, tornando-os solúveis e possíveis de serem excretados em água (Mannervik et al, 1992; Strange, Fryer, 1999; Hayes et al, 2005).

Dessa forma, as GSTs desempenham papel predominante no metabolismo celular, bem como na modificação de compostos eletrofílicos reativos, tanto pela conjugação com as glutathiones, como também por ligação não covalente com vários agentes xenobióticos, incluindo carcinógenos e drogas citotóxicas, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes na dieta alimentar e a fumaça dos cigarros, impedindo a ligação destes ao DNA (Strange, Fryer, 1999).

Esses compostos eletrofílicos reativos podem ser resultantes ainda, de processos endógenos, iniciados, por exemplo, na respiração e em processos inflamatórios, ou ainda, por radiação ionizante com a produção de espécies reativas de oxigênio, incluindo radicais superóxido e hidroxila (Lang, Pelkonen, 1999). Assim, é possível concluir que tais enzimas desempenham uma função protetora contra a atuação dos radicais livres (Taningher et al, 1999).

Dessa forma, inúmeras evidências sugerem que a modulação de enzimas da fase II, como a glutathione S-transferase, desempenhe um importante papel no processo carcinogênico e na proteção contra carcinógenos (Kwak et al, 2001).

Os genes da GST apresentam polimorfismos genéticos que podem alterar a atividade da enzima, contribuindo para a diferença inter-individual nas respostas aos xenobióticos (Hayes et al, 2005; Zhong et al, 2006).

As GSTs citosólicas humanas são classificadas de acordo com a diferença na sequência dos aminoácidos. E são divididas em sete classes distintas: α (A), μ (M), π (P), σ (Sigma), ξ (Zeta), ω (Omega) e θ (T) (Hayes et al, 2005).

Cinco genes μ (M) foram identificados: GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4, GSTM5 (Hayes et al, 2005). O gene do GSTM1 está localizado no cromossomo 1p13.3 (Figura 8), contém 8 éxons e gera uma proteína de 217 aminoácidos com um peso molecular de 25.6 kDa (Hayes et al, 2005).

É interessante ressaltar que um grande número de indivíduos não expressa a enzima devido a uma deleção homozigótica do gene. Uma explicação para isso seria a possível ocorrência de um *crossing-over* desigual (Mitrunen, Hirvonen, 2003). Diante disso, indivíduos que possuem a deleção homozigótica para o GSTM1 podem apresentar um aumento do risco para o desenvolvimento de várias doenças neoplásicas, como o câncer.

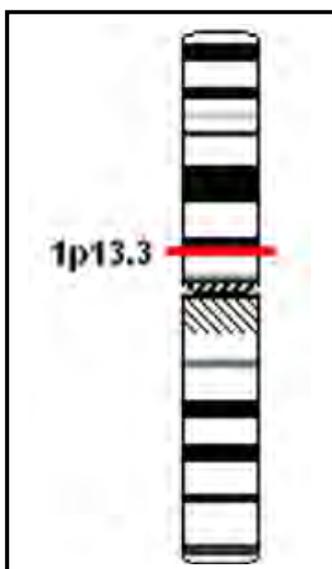


Figura 8: Localização do gene GSTM1. Destaca-se em vermelho a localização do GSTM1 no cromossomo 1, obtido de NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=138350>

Alguns trabalhos têm avaliado o papel do polimorfismo GSTM1 e a relação com o desenvolvimento do câncer de ovário, apresentando resultados conflitantes (Sarhanis et al, 1996; Hengstler et al, 1998; Lallas et al, 2000; Baxter et al, 2001; Spurdle et al, 2001; Coughlin, Hall, 2002; Beeghly et al, 2006).

1.7.2 Polimorfismo da Catecol-O-metiltransferase (COMT)

Em humanos, a enzima Catecol-O-metiltransferase (COMT) se apresenta como duas isoformas: uma forma solúvel (S-COMT) e outra forma vinculada à membrana plasmática das células (MB-COMT). Ambas isoformas são codificadas por um único gene localizado no braço longo do cromossomo 22 (22q).

A COMT é uma enzima de fase II que tem como função a inativação dos catecolestrogênios através da transferência de um grupo metil. Vários estudos têm demonstrado que a metilação dos catecolestrogênios tem pequena ou nenhuma afinidade pelos receptores de estrogênio clássicos, e que falta atividade estrogênica no útero. Adicionalmente, um efeito anti-tumorigênico tem sido proposto para o 2-metoxiestradiol (Mitrunen, Hirvonen, 2003).

É importante destacar que a inativação dos catecolestrogênios pode ser realizada por três formas de conjugação: metilação pela COMT, glucorinidação pela UDP-glucoroniltransferase (UGT) e sulfatação pela sulfotransferases (SULT). No entanto, de forma quantitativa, a maior via de conjugação dos catecolestrogênios é a metilação (Raftogianis et al, 2000; Holt et al, 2007).

Sob circunstâncias normais, os catecolestrogênios apresentam meia-vida curta porque são rapidamente metilados pela COMT em seus metabólitos, 2-metoxiestradiol e 4-metoxiestradiol. Essa meia-vida pode ser estendida caso a capacidade de conjugação seja reduzida ou se existir um excesso de catecolestrogênio (Holt et al, 2007).

Catecolestrogênios, particularmente oriundos da via 4-OH podem suscitar, direta ou indiretamente, efeitos mutagênicos. A quinona reagirá com o DNA para formar adutos (compostos carcinogênicos estruturalmente diversos ligam-se covalentemente ao DNA formando adutos que, se não reparados, provocam mutações estáveis que permanecerão ligados ao DNA até serem removidos por mecanismos de reparo, e adutos depurinadores, os quais são espontaneamente removidos do DNA por desestabilização das ligações glicosídicas. A oxidação das quinonas em semiquinonas forma radicais livres que causam dano ao DNA via oxidação, além de oxidar proteínas, e, conseqüentemente, afetar sua função na célula (Raftogianis et al, 2000).

A COMT é encontrada em diversos tecidos de mamíferos como cérebro, fígado, rins, endométrio e mama. O nível de expressão da proteína tem se mostrado elevado nos tecidos tumorais de mama quando comparados a tecidos normais. Um estudo de 2000 propôs que localização nuclear de S-COMT gerava uma resposta protetora para o aumento na quantidade catecolestrogênios em mulheres que vivem em países industrializados (Huber et al, 2002; Mitrunen, Hirvonen, 2003).

A transição G→A no códon 158 do gene COMT (rs4680) leva a substituição de uma metionina para uma valina na proteína sintetizada. Dessa forma, indivíduos homocigotos e heterocigotos para esse polimorfismo apresentam baixa atividade do alelo (COMTLL). Cabe destacar que 25% dos caucasianos apresentam COMTLL. Os dois alelos podem ser identificados com PCR-RFLP utilizando a enzima de restrição *NlaIII* (Huber et al, 2002).

O polimorfismo COMTLL tem sido relacionado com a redução na atividade de COMT em até quatro vezes se comparados com indivíduos com alelo selvagem (COMT-H). Diante disso, existe a hipótese de que a redução da atividade de COMT poderia estar relacionada com o aumento no risco do desenvolvimento de patologias estrogênio-dependentes, como o câncer, devido ao acúmulo de catecolestrogênios e, conseqüentemente, a dano oxidativo no DNA (Huber et al, 2002).

Alguns estudos buscaram encontrar uma eventual associação entre o polimorfismo do gene COMT e o carcinoma de ovário, com resultados conflitantes (Goodman et al, 2001; Garner et al, 2002; Sellers et al, 2005; Holt et al, 2007).

1.7.3 Polimorfismos do Citocromo P4501A1 (CYP1A1)

O CYP1A1 é considerado um gene chave no metabolismo de carcinógenos, constituindo-se num biomarcador de suscetibilidade ao câncer, particularmente naqueles tumores ligados ao hábito tabagista. Localiza-se no cromossomo 15q22-q24 (Figura 9), contém 7 éxons, pertence a superfamília do Citocromo P450 e codifica uma isoenzima que catalisa a oxidação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) em produtos fenólicos e epóxidos.

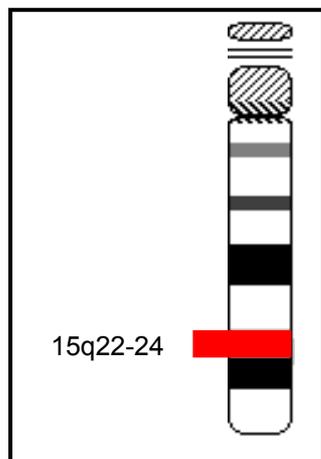


Figura 9: Localização do gene CYP1A1. Destaca-se em vermelho a localização do GSTM1 no cromossomo 15, obtido de NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=138350>

A indução da expressão deste gene ocorre via ligação do composto indutor ao receptor, que ativa a transcrição de outros genes que codificam proteínas envolvidas na metabolização de xenobióticos (Hawajiri et al, 1993, Terry et al, 2003).

Dessa forma, o gene do CYP1A1 produz enzimas de fase I, as quais são responsáveis pelo primeiro passo no metabolismo de oxidação de muitos substratos. Combinado com enzimas de Fase II, esteróides e xenobióticos são detoxificados por excreção. Entretanto, alguns metabólitos iniciais são espécies reativas de oxigênio que podem causar dano ao DNA e tem o potencial de promover o desenvolvimento do câncer (Terry et al, 2003).

Este gene é altamente polimórfico, mas um grande número de trabalhos foca em duas variantes alélicas principais (Cascorbi, 2006). Através do uso da enzima de restrição *MspI*, foi detectada uma variante originada pela transição T→C (3801T>C), resultando no alelo polimórfico denominado *CYP1A1*2A* ou *m1* (Walker, 1996).

A outra variante estudada é conhecida como *Ile/Val* ou *CYP1A1*2C* ou *m2* (rs1048943) e é uma mutação de ponto no nucleotídeo 4889 (códon 462) do éxon 7, resultando em uma mudança de aminoácidos isoleucina por valina. Esta mutação de ponto gera um sítio de restrição para a enzima *HincII*, sendo que o polimorfismo também pode ser chamado de *CYP1A1-HincII* (Weber, Nathanson, 2000; Terry et al, 2003). Esta variante leva a um aumento da atividade catalítica

da enzima. Isto pode conferir uma suscetibilidade aumentada ao câncer por promover uma maior ativação de pró carcinógenos na fase I da biotransformação (Goto et al, 1996; Fontana et al, 1998). A frequência deste alelo mostra extensa variação étnica, tendo sido observados os valores de 31% e 12% entre japoneses e populações caucasóides, respectivamente (Nebert et al, 1996).

Outras duas variantes, *CYP1A1*3* ou m3 e *CYP1A1*4* ou m4 não foram incluídas neste trabalho, já que a m3 é restrita a populações africanas e a m4 é uma substituição de treonina para asparagina no códon 461, muito próxima a variante m2 (Weber, Nathanson, 2000).

Alguns estudos reportam que as variantes m1 e m2 aumentam o risco de desenvolvimento do câncer de mama. A variante m2 também parece estar associada com o câncer de próstata e ovário (Tsuchiya et al, 2005).

Diante do exposto acima, almeja-se no presente estudo obter-se amplo painel de polimorfismos gênicos presentes em vários pontos ao longo das vias de síntese (CYP17), ação (receptor de estrogênio α e progesterona) e metabolização (CYP1A1, GST e COMT) de esteróides sexuais e associar os eventuais achados com a presença ou ausência do carcinoma de ovário.

2. PROPOSIÇÃO

Propõe-se, no presente estudo, avaliar:

1. A eventual associação entre os polimorfismos gênicos presentes nos genes do citocromo P450c17 (CYP17), receptor de progesterona (PROGINS) e estrógeno (ER), glutathione S-transferase (GSTM1), catecol-O-metiltransferase (COMT) e polimorfismo do citocromo P450 (CYP1A1) em pacientes com e sem câncer de ovário.
 2. A relação dos referidos polimorfismos com as variáveis clínicas e anatomopatológicas dessa neoplasia.
-

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1 Casuística

Foram analisadas 103 pacientes com carcinoma de ovário atendidas no Ambulatório de Oncocirurgia do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM) e no Ambulatório de Oncoginecologia do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital do Servidor Público do Estadual de São Paulo – Francisco Morato Oliveira (HSPE-FMO), no período de setembro de 2004 até a presente data.

Para cada paciente, foi elaborado um questionário (Anexo 2) contendo dados como idade, idade da menopausa, raça, histórico de doenças endócrinas e/ou outros tipos de câncer, bem como o tipo histológico do câncer em estudo, estágio clínico e grau de diferenciação do mesmo a fim de correlacioná-los com os eventuais achados do estudo.

O grupo controle I, utilizado para comparação com os polimorfismos PROGINS, GSTM1 e CYP 17 foi constituído por 282 pacientes e o grupo controle II, utilizado para comparação entre os polimorfismos no receptor de estrógeno alfa, CYP1A1 e COMT foi constituído por 141 pacientes. Ambos os grupos foram compostos por mulheres atendidas no Setor de Climatério da Disciplina de Endocrinologia Ginecológica do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM. Todas essas pacientes estavam na pós-menopausa e realizaram ultrassonografia que apresentou um eco endometrial menor que 5 mm, evidenciando a ausência de qualquer tipo de doença ginecológica (endócrina e/ou câncer). É importante destacar que os dois grupos em estudo (Câncer e Controle) foram coletados na mesma região demográfica, ou seja, sob o mesmo estresse ambiental.

Todas as mulheres que participaram do estudo tiveram acesso e concordaram de livre escolha com o termo de consentimento pós-informado livre e esclarecido (Anexo 1) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP-EPM (Anexo 3), bem como pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (Anexo 4) e pelo Hospital do Servidor Público do Estadual de São Paulo – Francisco Morato Oliveira (HSPE).

3.2 Métodos

3.2.1 Coleta do material biológico

As amostras de raspado bucal foram obtidas por meio de *swab* bucal com escova do tipo *Cytobrush*[®], friccionadas contra a mucosa de revestimento oral e colocadas em um tubo falcon contendo 10 ml de soro fisiológico 0,9%. As amostras citológicas foram conservadas em -80°C até a extração do DNA genômico.

3.2.2 Extração do DNA genômico

A extração de DNA dos grupos caso e controle foi realizada segundo protocolo do Kit GFX[®] da *Amersham-Pharmacia* para células bucais. O material celular obtido com a escova *cytobrush* (esfregaço bucal) foi inicialmente centrifugado, desprezando o excesso de soro fisiológico. Foram adicionados 500 µl de *Extraction Solution* ao *pellet* celular, agitou-se até que todo o conteúdo fosse dissolvido. Então, o volume foi depositado em uma coluna de filtragem do kit. Em seguida, realizou-se a centrifugação a 14.000 rpm, por três minutos, com o objetivo de separar restos celulares do sobrenadante.

Após essa etapa, novamente adicionou-se 500 µl de *Extraction Solution* e o material foi centrifugado a 14.000 rpm por três minutos. Após descartar o sobrenadante, foi adicionado à coluna 500 µl de *Wash Solution* com nova centrifugação a 14.000 rpm por três minutos.

Por fim, para eluição do DNA, foram adicionados 120 µl de H₂O (destilada e deionizada) autoclavada e pré-aquecida a 70°C, seguida de centrifugação a 14.000 rpm por dois minutos. O DNA purificado foi armazenado a -20°C até sua utilização.

3.2.3 Quantificação do DNA genômico

A análise da quantidade de DNA obtida nas extrações foi realizada através de espectrofotometria com comprimento de onda de 260 nm

(espectrofotômetro Spectronic[®] modelo Genesys 5) onde $A_{260} = 1$ equivale a 50 μg DNA/ml. A pureza do DNA foi determinada pela razão entre as leituras A_{260} e A_{280} .

3.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram realizadas reações de PCR para a análise dos polimorfismos, como descrito abaixo:

3.2.5 Polimorfismo PROGINS

Nas reações de amplificação do polimorfismo PROGINS foram utilizados os oligonucleotídeos descritos abaixo (Wiser et al, 2002).

- *Sense*: 5' - GGC AGA AAG CAA AAT AAA AAG A - 3'
- *Antisense*: 5' - AAA GTA TTT TCT TGC TAA ATG TC - 3'

As reações foram processadas em um volume final de 25 μl contendo 1 μl de cada primer (10 pmol/ μl), 2 μl de DNA genômico (100 ng/ μl), 10 μl de *PCR Master Mix*[®] (Promega, Madison, USA) (50U/ml Taq DNA Polimerase, 400 μM dNTP, 3 mM MgCl_2) e 12 μl de água *MiliQ* autoclavada. As reações foram incubadas em termociclador (Gene Amp PCR System 9700-Perkin Elmer) nas seguintes condições: desnaturação a 95°C durante cinco minutos, seguida de 40 ciclos a 94°C (desnaturação) por 60 segundos, 55°C (anelamento do *primer*) por 60 segundos e 72°C (extensão da fita do DNA) por 60 segundos, findando com incubação a 72°C por 10 minutos.

Os produtos das amplificações foram aplicados em um gel de agarose 1,5% (Amersham Pharmacia Biotech), corados com brometo de etídeo (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e submetidos à eletroforese por 30 minutos a 90 V em cuba horizontal, contendo tampão de corrida TAE 1X (Tris Acetato 0,04M, EDTA 1mM pH8). A visualização dos fragmentos amplificados foi feita em transiluminador de luz ultravioleta.

Os padrões de migração dos produtos da PCR apresentam um perfil que possibilita a diferenciação de três genótipos (Figura 10). A presença de

apenas um fragmento, com 149 pares de bases (pb), evidencia indivíduos com alelos homozigotos selvagens, ou seja, com a ausência da inserção em ambos os alelos e são denominados T1/T1. Em contrapartida, a presença de dois fragmentos, 149 pb e 455 pb, caracterizam os indivíduos heterozigotos (um alelo com a inserção e o outro sem a inserção), que são designados T1/T2. Já a presença de um único fragmento, com 455 pb, evidencia os indivíduos com alelos homozigotos para a inserção, sendo intitulados T2/T2.

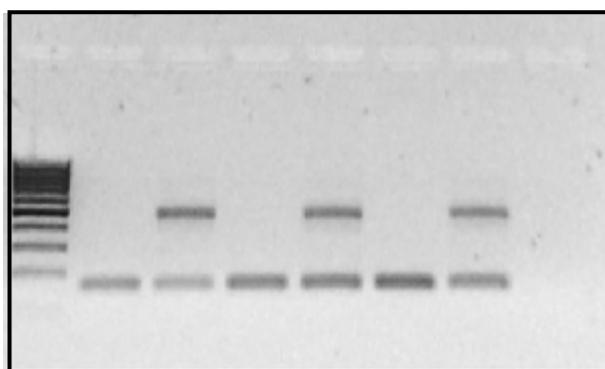


Figura 10: Gel de agarose referente ao polimorfismo PROGINS. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio 1µg/ml mostrando o estudo do polimorfismo do receptor de progesterona (PROGINS). P representa o padrão de peso molecular 100 pb (*Invitrogen*). Evidencia-se a presença de heterozigose (T1/T2) nas linhas 2, 4 e 6. Nas linhas 1, 3 e 5 observamos a presença de homozigose (T1/T1) e na linha 7 temos o controle negativo da reação.

3.2.6 Polimorfismo do GSTM1

O estudo do GSTM1 também foi realizado pela técnica de PCR, nas mesmas condições e ciclagem do polimorfismo PROGINS. Os produtos das reações também foram analisados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo.

Devido ao polimorfismo do GSTM1 poder apresentar uma deleção homozigótica para os dois alelos, foi necessária a utilização de um segundo *primer*, com o intuito de obterem-se controles internos indicativos da presença de DNA, bem como a integridade dos reagentes utilizados. Portanto, foi adicionado um par de oligonucleotídeos de um gene constitucional (β -globina) nas reações de PCR.

Os *primers* alelo específicos utilizados para o GSTM1 e a β -globina foram previamente descritos por Gattas e Soares-Vieira (2000):

GSTM1

- *Sense*: 5' - GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C – 3'
- *Antisense*: 5' - GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G – 3'

β -Globina

- *Sense*: 5'- CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC – 3'
- *Anti-sense*: 5'- GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC – 3'

O produto do PCR gera dois genótipos distintos (Figura 11), onde a presença das bandas de 268 pb e 215 pb evidencia que a paciente possui o gene da GSTM1, sendo caracterizado como positivo (+/+). Quando se observa apenas a banda de 268 pb, correspondente à β -globina, concluí-se que o GSTM1 não está presente, sendo denominado de nulo (-/-).

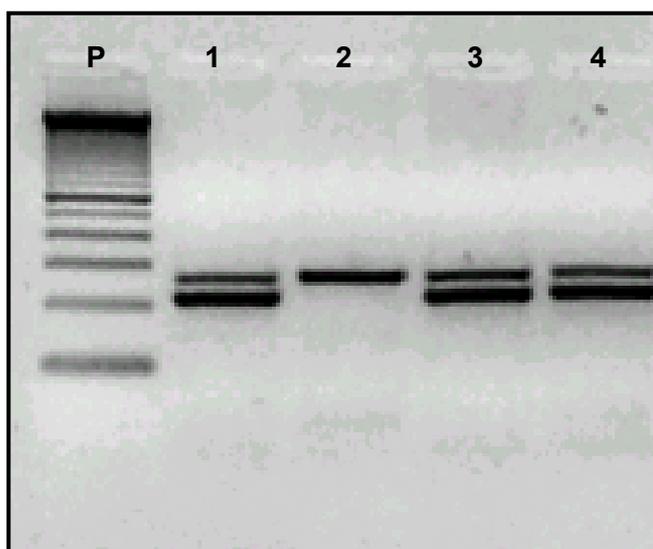


Figura 11: Gel de agarose referente ao polimorfismo do gene da GSTM1. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio 1 μ g/ml mostrando o estudo do polimorfismo do gene da GSTM1. P representa o padrão de peso molecular 100 pb (*Invitrogen*). A ausência do gene GSTM1 pode ser observada na linha 1 (-/-) e nas linhas 1, 3 e 4 a presença do mesmo juntamente com a β -globina.

3.3 PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

3.3.1 Polimorfismo no gene do CYP17

Para análise do polimorfismo presente no gene CYP17 utilizamos a técnica de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e os oligonucleotídeos utilizados na mesma foram previamente descritos por Feigelson et al, 1999:

- *Sense*: 5'-CAT TCG CAC TCT GGA GTC – 3'
- *Anti-sense*: 5'- AGG CTC TTG GGG TAC TTG – 3'

As condições de PCR e ciclagem foram iguais às do polimorfismo PROGINS, com exceção da temperatura de anelamento do *primer* (neste caso, 57°C).

Uma vez amplificado, o trecho de DNA em questão foi digerido por 4 horas a 37°C em banho-maria, usando a enzima de restrição específica para o polimorfismo (*MspA1* – *New England Bio Labs*), sendo realizada a análise em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo.

O perfil de restrição evidencia três genótipos distintos (Figura 12). Quando a enzima *MspA1* não encontra o sítio de reconhecimento, revela-se um único fragmento de 419 pb, o que indica a presença de alelos homozigotos selvagens (A1/A1). Quando a enzima reconhece o sítio de restrição em apenas um dos alelos, aparecem três fragmentos de 419 pb, 295 pb e 124 pb, indicando um indivíduo heterozigoto (A1/A2). Por fim, quando a enzima detecta o sítio de reconhecimento em ambos os alelos, observam-se fragmentos de 295 pb e 124 pb e são designados homozigotos mutados (A2/A2).

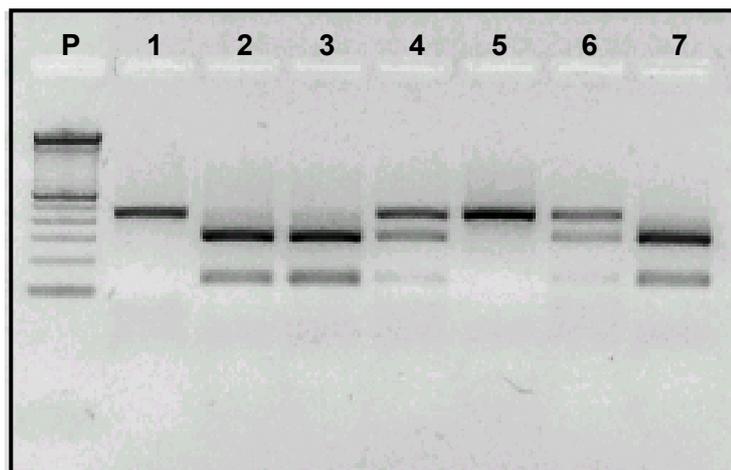


Figura 12: Gel de agarose referente ao polimorfismo do gene CYP17. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio 1µg/ml mostrando o estudo do polimorfismo do CYP17. P representa o padrão de peso molecular 100 pb (*Invitrogen*). Nas linhas 1 e 5 observa-se a presença de homocigose sem a mutação (A1/A1), nas linhas 4 e 6 evidencia-se a presença de heterocigose (A1/A2) e finalmente na linhas 2, 3 e 4 nota-se a presença de homocigose com a mutação (A2/A2).

3.3.2 Polimorfismo no Receptor de Estrógeno Alfa

3.3.2.1 Íntron 1 do gene ER- α

Nas reações de amplificação para os polimorfismos T→C e A→G, descritos pelo nome dos sítios de restrição detectados pelas enzimas *PvuII* e *XbaI*, foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos ou *primers* (Herrington et al, 2002):

- Sense: 5'-CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTCCTATTCTCC-3'
- Anti-Sense: 5'-TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTCGATTATCTGA-3'

As condições de PCR foram iguais às dos polimorfismos anteriores. As reações foram incubadas em termocilador nas seguintes condições: desnaturação a 95°C durante 2 minutos, seguida de 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e meio, finalizados com incubação a 72°C por 7 minutos. Os produtos da amplificação foram amplificados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (1µg/ml) e submetidos à eletroforese por 20 minutos a 100 V.

Uma vez amplificado, o trecho de DNA em questão foi digerido por 10 horas a 37°C em banho-maria, usando a enzima de restrição específica (*PvuII* – *New England Bio Labs*) para o polimorfismo T→C e outra reação de digestão com a enzima de restrição *XbaI*, com o mesmo tempo de incubação e temperatura, para o polimorfismo A→G, sendo realizada a análise em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídeo.

A digestão com a enzima *PvuII* gera um fragmento de 1300 pb no alelo selvagem (A) e fragmentos de 850 pb e 450 pb no alelo polimórfico (a). Assim, nas pacientes com genótipo homozigoto selvagem (P/P), o perfil de digestão apresentou um único fragmento de 1300 pb visível no gel. Nas pacientes heterozigotas (P/p), com um alelo selvagem e o outro alelo polimórfico, ocorre digestão parcial e no gel de agarose são visíveis três fragmentos: um de 1300 pb e outros dois fragmentos de 850 pb e 450 pb. Se ambos os alelos forem polimórficos (p/p) têm-se 2 fragmentos visíveis no gel de agarose, 850 pb e 450 pb (Figura 9).

A digestão com a enzima *XbaI* também gera um fragmento de 1300 pb no alelo selvagem (X) e fragmentos de 900 pb e 400 pb no alelo polimórfico (a). Assim, nas pacientes com genótipo homozigoto selvagem (X/X), o perfil de digestão apresentou um único fragmento de 1300 pb visível no gel. Nas pacientes heterozigotas (X/x), com um alelo selvagem e o outro alelo polimórfico, ocorre digestão parcial e no gel de agarose são visíveis três fragmentos: um de 1300 pb e outros dois fragmentos de 900 pb e 400 pb. Se ambos os alelos forem polimórficos (x/x) têm-se apenas 2 fragmentos visíveis no gel de agarose, 900 pb e 400 pb (Figura 13).

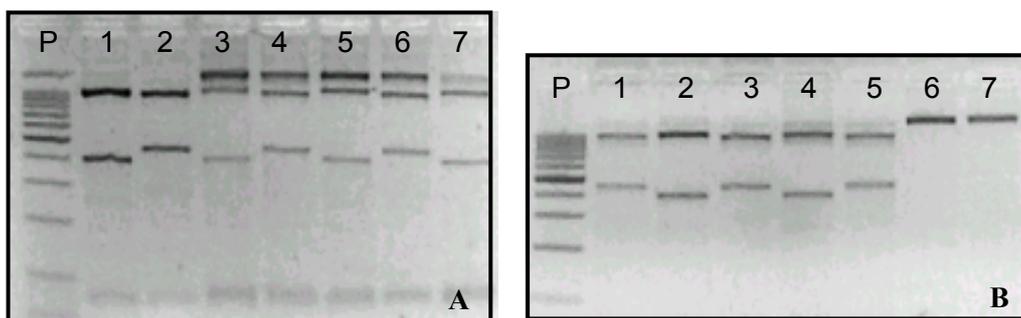


Figura 13 A e B: Géis de agarose referentes aos polimorfismos *PvuII* e *XbaI* do receptor de estrógeno alfa. Géis de agarose 2,5% corados com brometo de etídio 1µg/ml mostrando o estudo do polimorfismo do receptor de estrógeno alfa. P representa o padrão de peso molecular 100 pb (*Invitrogen*). Na figura A, nas linhas 4 e 6 observa-se a presença de heterozigose para o polimorfismo *PvuII* (P/p), nas linhas 3, 5 e 7 evidencia-se a presença de heterozigose para o polimorfismo *XbaI* (X/x) e finalmente na linhas 1 e 2 nota-se a presença de homozigose com a mutação em ambos polimorfismos (x/x para a linha 1 e p/p para a linha 2). Na figura B nota-se nas linhas 6 e 7 os indivíduos selvagens para esse polimorfismo (XX e PP, respectivamente).

Nas reações de amplificação do íntron 1 do gene ER- α para a transição C \rightarrow T foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos ou *primers* (Herrington et al, 2002):

- *Sense*: 5'- CAT CTA CTC CTA TGT CTG GT- 3'
- *Anti-sense*: 5'- CGT GTA GAC TGA AGG GCA T - 3'

As condições de PCR foram iguais às dos polimorfismos descritos acima. As reações foram incubadas nas seguintes condições: desnaturação a 95°C durante 2 min, seguida de 40 ciclos a 94°C por 30 seg, 54°C por 45 seg e 71°C por 45 seg, finalizados com incubação a 72°C por 10 minutos. Os produtos da amplificação foram amplificados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (1µg/ml) e submetidos a eletroforese por 20 minutos a 100 V.

Uma vez amplificado, o trecho de DNA em questão foi digerido por 10 horas a 37°C em banho-maria, usando a enzima de restrição específica (*HaeIII* – *New England Bio Labs*) para o polimorfismo, sendo realizada a análise em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídeo.

A digestão com a enzima *HaeIII* gera fragmentos de 205 pb e 22 pb no alelo selvagem (A) e de 227 pb no alelo polimórfico (a). Assim, nas pacientes com genótipo homocigoto selvagem (A/A), o perfil de digestão apresentou um único fragmento de 205 pb visível no gel (o fragmento de 22 pb não é visível no gel de agarose). Nas pacientes heterocigotas (A/a), com um alelo selvagem e o outro alelo polimórfico, ocorre digestão parcial e no gel de agarose são visíveis um fragmento de 205 pb (digerido) e outro de 277 pb (não digerido). Se ambos os alelos forem polimórficos (a/a), não ocorre digestão, sendo visível no gel de agarose somente o fragmento de 277 pb (Figura 14).

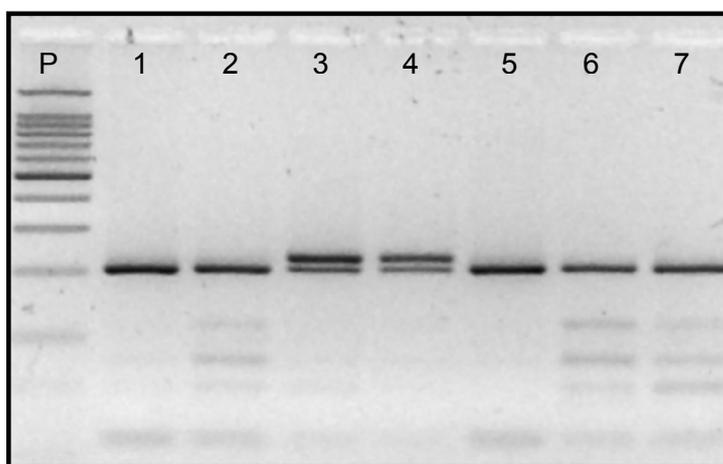


Figura 14: Gel de agarose referente ao polimorfismo *ER-HaeIII* do receptor de estrógeno alfa. Gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídio 1µg/ml mostrando o estudo do polimorfismo do receptor de estrógeno alfa. P representa o padrão de peso molecular 100 pb (*Invitrogen*). Nas linhas 1, 2, 5, 6 e 7 observa-se a presença de homocigose para o polimorfismo *HaeIII* (a/a), nas linhas 3 e 4 evidencia-se a presença de heterocigose para o polimorfismo *HaeIII* (A/a) .

3.3.2.2 Éxon 1 do gene ER-α

Nas reações de amplificação do éxon 1 do gene ER-α para a transição C→T foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos ou *primers* (Herrington et al, 2002):

- *Sense*: 5' - ATG CGC TCG GTC GCC TCT AA - 3'
- *Anti-sense*: 5' - CTG CAG GAA AGG CGA CAG CT - 3'

As condições de PCR foram as mesmas citadas para os outros polimorfismos, a ciclagem ocorreu por 40 ciclos, onde a primeira etapa foi de 94°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 1 minuto e polimerização a 72°C por um minuto. Os produtos da amplificação foram amplificados em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo (1µg/ml) e submetidos à eletroforese por 20 minutos a 100 V.

Para análise do polimorfismo presente no éxon 1 do gene ER-α, os produtos de PCR foram incubados a 37°C em uma reação com volume final de 10 µl por 4 horas usando a enzima de restrição *MspI* (*Fermentas International* INC., Ontário, Canada), sendo realizada a análise em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo.

A digestão com a enzima *MspI* gera fragmentos de 198 pb, 121 pb, 90 pb, 53 pb e 18 pb no alelo selvagem (A) e de 288 pb, 121 pb, 90 pb, 53 pb e 18 pb no alelo polimórfico (a). Assim, nas pacientes com genótipo homocigoto selvagem (B/B), o perfil de digestão apresentou 4 fragmentos de 198 pb, 121 pb, 90 pb e 53 pb visíveis no gel (o fragmento de 18 pb não é visível no gel de agarose). Nas pacientes heterocigotas (B/b), com um alelo selvagem e o outro alelo polimórfico, ocorre digestão parcial e no gel de agarose são visíveis 5 fragmentos de 288 pb, 198 pb, 121 pb, 90 pb e 53 pb. Se ambos os alelos forem polimórficos (b/b) são visíveis no gel fragmentos de 288 pb, 121 pb e 53 pb (Figura 15).

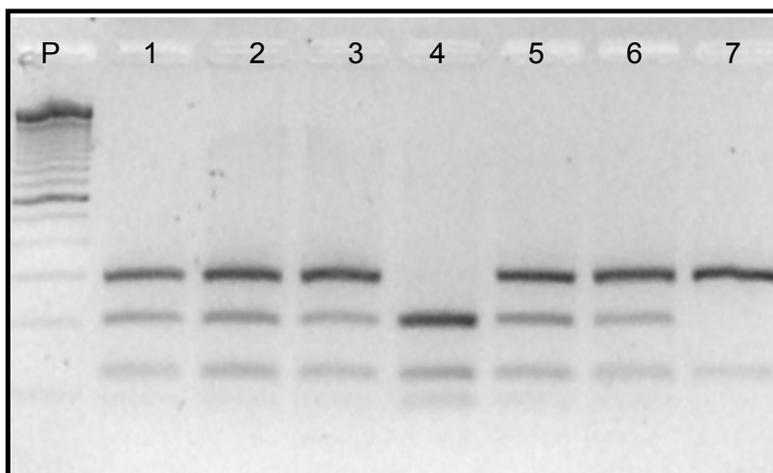


Figura 15: Gel de agarose referente ao polimorfismo ER-*MspI* do receptor de estrógeno alfa. Gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo 1µg/ml mostrando o estudo do polimorfismo do receptor de estrógeno alfa. P representa o padrão de peso molecular 100 pb (*Invitrogen*). Nas linhas 1, 2, 3, 5 e 6 observa-se a presença de heterocigose para o polimorfismo *MspI* (B/b), nas linha 4 evidencia-se a presença de homocigoto selvagem para o polimorfismo *MspI* (B/B) e finalmente em 7 têm-se o padrão de homocigoto mutado (B/B) para o polimorfismo *MspI*.

3.3.3 Polimorfismo COMT

Nas reações de amplificação do para transição G→A do gene COMT foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos ou *primers* (Lavigne et al, 1997):

- Sense 5´- TAC TGT GGC TAC TCA GCT GTG C – 3´
- *Anti-sense*: 5´- GTG AAC GTG GTG TGA ACA CC – 3´

As condições de PCR foram as mesmas citadas para os outros polimorfismos, e as condições de ciclagem no termociclador foram: 94°C por 3 minutos para desnaturação, seguida de 40 ciclos a 94°C por 45 seg, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, finalizados com incubação a 72°C por 7 minutos.

Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 2,5% (Invitrogen, Califórnia, EUA) corado com brometo de etídeo (1µg/ml) e submetido à eletroforese por 20 minutos a 100 V.

Uma vez amplificado, o trecho de DNA em questão foi digerido por 6 horas a 37°C em banho-maria, usando a enzima de restrição específica (*NlaIII* – *New England Bio Labs*) para o polimorfismo, sendo realizada a análise em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídeo.

A digestão com a enzima *NlaIII* gera fragmentos de 114 pb, 54 pb, 42 pb, e 27 pb no alelo selvagem (G) (o fragmento de 27 pb não é visível no gel de agarose) e de 96 pb, 54 pb, 27 pb e 18 pb (os fragmentos de 18 pb e 27 pb não são visíveis no gel de agarose) no alelo polimórfico (A). Nas pacientes heterozigotas (G/A), com um alelo selvagem e o outro alelo polimórfico, ocorre digestão parcial e no gel de agarose são gerados fragmentos de 114 pb, 96 pb, 54 pb, 42 pb e 18 pb (o fragmento de 18 pb não é visível no gel de agarose) (Figura16).

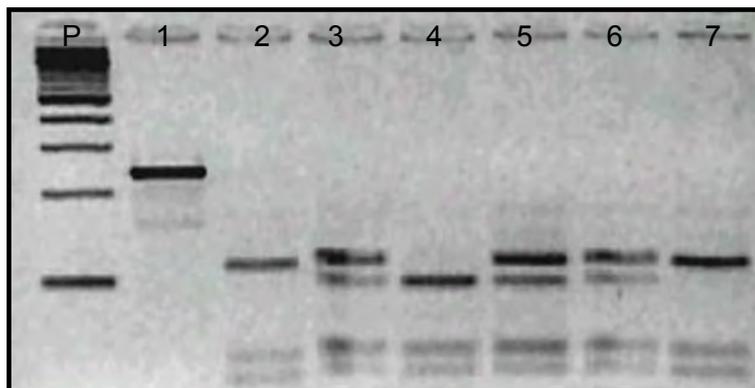


Figura 16: Gel de agarose referente ao polimorfismo COMT. Gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídio 1µg/ml mostrando o estudo do polimorfismo do receptor de estrógeno alfa. P representa o padrão de peso molecular 100 pb (*Invitrogen*). Na linha 1 observa-se um fragmento de 236 pb referente ao produto da amplificação antes da digestão, nas linhas 3, 5 e 6 nota-se a presença de heterozigose para o polimorfismo COMT (G/A), na linha 4 evidencia-se a presença de homozigoto selvagem para o polimorfismo COMT (G/G) e finalmente em 7 têm-se o padrão de homozigoto mutado (G/G) para o polimorfismo COMT1.

3.3.4 Polimorfismos no CYP1A1

3.3.4.1 Polimorfismo no CYP1A1-*MspI*

Nas reações de amplificação do para transição T→C do gene CYP1A1 foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos ou *primers* (Huang *et al.* (1999):

- Sense: 5'- TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT -3'
- Anti-sense: 5'- CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT -3'

As condições de PCR foram as mesmas citadas para os outros polimorfismos, e as condições de ciclagem no termociclador foram: 95°C por 5 minutos para desnaturação, seguida de 40 ciclos a 95°C por 30 seg, 64,2°C por 1 minuto e 72°C por 1 min, finalizados com incubação a 72°C por 7 minutos.

Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5% (Invitrogen, Califórnia, EUA) corado com brometo de etídeo (1µg/ml) e submetidos a eletroforese por 20 minutos a 100 V.