

Uma vez amplificado, o trecho de DNA em questão foi digerido por quatro horas a 37°C em banho-maria, usando a enzima de restrição específica (*MspI* – *New England Bio Labs*) para o polimorfismo, sendo realizada a análise em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

A digestão com a enzima *MspI* gera um fragmento de 340 pb no alelo selvagem (T) e de 200 pb e 140 pb no alelo polimórfico (C). Nas pacientes heterozigotas (T/C), com um alelo selvagem e o outro alelo polimórfico, ocorre digestão parcial e no gel de agarose são gerados fragmentos de 340 pb, 200 pb e 140 pb (Figura 17).

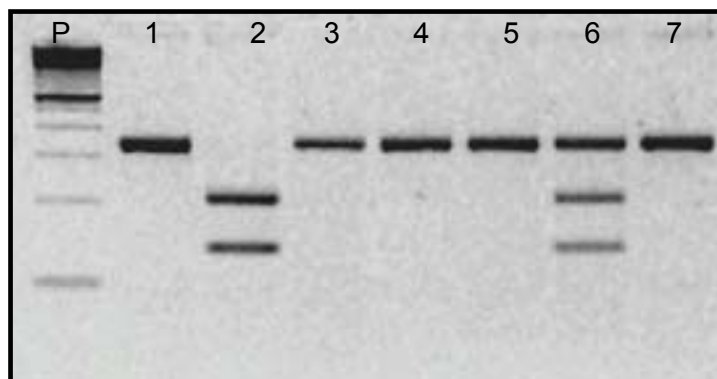


Figura 17: Gel de agarose referente ao polimorfismo *CYP1A1-MspI*. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo 1µg/ml mostrando o estudo do polimorfismo *CYP1A1*. P representa o padrão de peso molecular 100 pb (*Invitrogen*). Nas linhas 1, 3, 4, 5 e 7 nota-se a presença de pacientes homozigotas selvagens para o polimorfismo *CYP1A1-MspI* (T/T), na linha 2 têm-se o padrão de homozigoto mutado (T/C) para o polimorfismo *CYP1A1-MspI* (G/G) e em 6 têm-se o padrão de heterozigoto (T/C) para o polimorfismo *CYP1A1-MspI*.

3.3.4.2 Polimorfismo no *CYP1A1-HincII*

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

- 5'- GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT - 3'
- 5'- GAA AGA CCT CCC AGC GG TC A – 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, 60°C por 30 seg e 72°C por 1 min, 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 a eletroforese por 20 minutos a 100 V.

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 (*HincII* – *New England Bio Labs*) para o polimorfismo, sendo realizada a análise em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo.

A digestão com a enzima *HincII* gera fragmentos de 139 pb e 48 pb no alelo selvagem (A) e de 120 pb, 48 pb e 19 pb no alelo polimórfico (G). Nas pacientes heterozigotas (A/G), com um alelo selvagem e o outro alelo polimórfico, ocorre digestão parcial e no gel de agarose são gerados fragmentos de 139 pb, 120 pb, 48 pb e 19 pb (o fragmento de 18 pb não é visível no gel de agarose) (Figura 18).

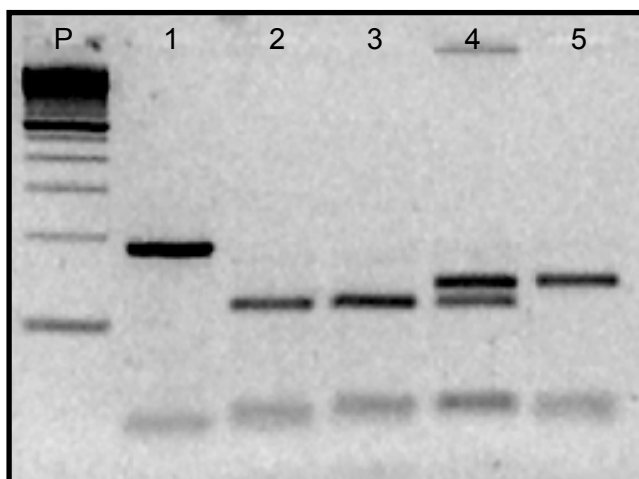


Figura 18: Gel de agarose referente ao polimorfismo *CYP1A1-HincII*. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo 1µg/ml mostrando o estudo do polimorfismo *CYP1A1-HincII*. P representa o padrão de peso molecular 100 pb (*Invitrogen*). Na linha 1 observa-se um fragmento de 187 pb referente ao produto da amplificação antes da digestão, nas linhas 2 e 3 têm-se o padrão de homocigoto mutado (G/G) para o polimorfismo *CYP1A1-HincII*, na linha 5 evidencia-se a presença de homocigoto selvagem (A/A) e em 4 observa-se o padrão de heterocigose para esse polimorfismo (A/G).

3.4 Análise Estatística

O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e as frequências alélicas e genotípicas foram comparados utilizando o teste do qui-quadrado (X^2) ou o teste exato de Fisher, quando valores inferiores a 5 foram observados em pelo menos uma categoria sendo comparada. Os valores de *odds ratio* foram derivados a partir do modelo de regressão logística, utilizando o pacote estatístico “SPSS” (*Statistical Package for Social Science*, v12,0). Para a análise de variáveis quantitativas foi utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA), ou o teste de Mann-Whitney, quando necessário.

O programa HAPLOVIEW v 2.0 foi utilizado para a análise de Desequilíbrio de Ligação e de Haplótipos (Barrett et al, 2005).

Foi realizado o cálculo do poder da amostra para o estudo de cada polimorfismo, utilizando o programa PS: Power and Sample Size calculations (Dupont, 1988).

4. RESULTADOS

4.1 Homogeneidade dos grupos em estudo

Inicialmente, todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis quantitativas, esta análise foi feita através da observação dos valores mínimos e máximos e do cálculo de médias, desvios-padrão e medianas. Para as variáveis qualitativas calculou-se as frequências absolutas e relativas.

A tabela 1 mostra a distribuição das 103 pacientes com carcinoma de ovário e das 282 mulheres do grupo controle I, segundo as variáveis quantitativas e qualitativas, assim como os valores de significância estatística, resultante da comparação entre os grupos.

Tabela 1 – Características descritivas das pacientes com carcinoma de ovário e do grupo controle I, assim como os valores de significância estatística

Variável	Categoria	Grupo		p
		Casos (n = 103)	Controles (n = 282)	
Raça n (%)	Branca	84 (81,6)	203 (72,50)	0,07/0,06(1)
	Não branca	19 (18,4)	77 (27,50)	
Idade	Média (DP)	55,72 + 13,17	55,67 + 7,01	0,911(2)
Estádio Clínico n (%)	Ia	27 (39,7)		
	Ib	1 (1,5)		
	Ic	11 (16,2)		
	II	1 (1,7)		
	IIa	3 (4,4)		
	IIc	2 (2,9)		
	III	3 (4,4)		
	IIIa	4 (5,9)		
	IIIc	12 (17,6)		
	IV	2 (2,9)		
Grau de Diferenciação n (%)	G1	16 (38,1)		
	G2	18 (42,9)		
	G3	8 (19,9)		

(1): nível descritivo de probabilidade do Teste de Fisher e Qui-quadrado, respectivamente.

(2): nível descritivo de probabilidade do Teste ANOVA

Ao se comparar os grupos com relação à idade, observou-se que o grupo caso, formado por 103 mulheres com câncer de ovário apresentou idade média igual a 55,72 (DP=13,17) e no grupo controle, formado por 282 mulheres, a média de idade foi igual a 55,67 (DP=7,01) (Tabela 1). Observou-se que não há diferenças entre os grupos em relação à idade ($F=0,013$; $gl=1$; $p=0,911$).

Com relação à raça, nossa classificação baseou-se em mulheres brancas e não brancas. Obtivemos no grupo controle 203 (72,5%) mulheres da raça branca e 77 (27,5%) mulheres não brancas, enquanto o grupo caso apresentou 74 (74,9%) mulheres da raça branca e 16 (17,8%) mulheres da raça não branca (Tabela 1). Mais uma vez, não foi observada diferença significativa entre os grupos em relação a essa variável ($\chi^2=3,421$; $gl=1$; $p=0,064$; Teste Exato de Fisher: $p=0,070$).

A tabela 2 mostra a distribuição das 103 pacientes com carcinoma de ovário e das 141 mulheres do grupo controle II, segundo as variáveis quantitativas e qualitativas, assim como os valores de significância estatística, resultante da comparação entre os grupos.

Ao se comparar os grupos com relação à idade, observou-se que o grupo caso, formado por 103 mulheres com câncer de ovário, apresentou idade média igual a 55,72 (DP=13,17) e no grupo controle II, formado por 141 mulheres, a média de idade foi igual a 52,31 (DP=4,43) (Tabela 2). Observou-se que há diferenças entre os grupos em relação à idade ($z=-4,36$; $p<0,0001$) e, dessa forma, incluiu-se essa variável nas análises posteriores para verificar a influência da mesma nos resultados obtidos.

Com relação à raça, obtivemos no grupo controle II 103 (78,0%) mulheres da raça branca e 29 (22,0%) mulheres não brancas, enquanto o grupo caso apresentou 74 (74,9%) mulheres da raça branca e 16 (17,8%) mulheres da raça não branca (Tabela 2). Não foi observada diferença significativa entre os grupos em relação a essa variável ($\chi^2=0,52$; $p=0,45$).

Tabela 2 – Características descritivas das pacientes com carcinoma de ovário e do grupo controle II, assim como os valores de significância estatística

Variável	Categoria	Grupo		p
		Casos (n = 103)	Controles (n = 141)	
Raça n (%)	Branca	84 (81,6)	103 (78,0)	00,45(1)
	Não branca	19 (18,4)	29 (22,0)	
Idade	Média (DP)	55,72 + 13,17	52,31 + 4,43	0,0001(2)
Estádio Clínico n (%)	Ia	27 (39,7)		
	Ib	1 (1,5)		
	Ic	11 (16,2)		
	II	1 (1,7)		
	Ila	3 (4,4)		
	Ilc	2 (2,9)		
	III	3 (4,4)		
	IIla	4 (5,9)		
	IIlc	12 (17,6)		
	IV	2 (2,9)		
Grau de Diferenciação n (%)	G1	16 (38,1)		
	G2	18 (42,9)		
	G3	8 (19,9)		

(1): nível descritivo de probabilidade do Qui-quadrado

(2): nível descritivo de probabilidade do teste do Mann-Whitney

4.2 Análise dos Polimorfismos

4.2.1 Teste de Hardy-Weinberg

A análise estatística dos polimorfismos foi realizada considerando-se apenas as amostras que tiveram o resultado molecular viável, ou seja, amostras em que o DNA amplificou na reação de PCR.

Realizou-se o Teste de *Hardy-Weinberg* para verificar se os controles estavam em equilíbrio e os resultados foram: para o polimorfismo PROGINS ($\chi^2=4,83$; gl=1; $p=0,028$), polimorfismo CYP17 ($\chi^2=6,52$; gl=1; $p=0,011$), polimorfismos nos genes que codificam os receptores de estrogênio alfa *PvuII* ($\chi^2=2,62$; gl=1; $p=0,11$), *XbaI* ($\chi^2=1,05$; gl=1; $p=0,31$) e *HaeIII* ($\chi^2=3,06$; gl=1; $p=0,08$), polimorfismo *COMT* ($\chi^2=1,89$; gl=1; $p=0,17$) e polimorfismos *CYP1A1-HincII* ($\chi^2=0,20$; gl=1; $p=0,65$) e *CYP1A1-HaeI* ($\chi^2=1,44$; gl=1; $p=0,23$).

4.2.2 Polimorfismo CYP17

A tabela 3 ilustra a análise comparativa das frequências dos genótipos para o polimorfismo CYP17 entre os grupos de casos e controles, mostrando uma diferença estatisticamente não significativa ($\chi^2=2,709$; gl=2; $p=0,25$).

Tabela 3 – Frequências do polimorfismo CYP17 de acordo com o grupo caso e controle

Polimorfismo	Genótipo	Grupo				p
		Controle		Caso		
		n	%	n	%	
CYP17	A1/A1	81	29,14	26	34,2	0,25(1)
	A1/A2	160	57,55	36	47,4	
	A2/A2	37	13,31	14	18,4	
		278	100,00	76	100,00	

(1): nível descritivo de probabilidade do teste Qui-quadrado

A partir desses resultados, efetuou-se uma análise alélica e entre os mesmos não foi encontrada, novamente, significância estatística ($\chi^2=0,00$; $gl=1$; $p=0,99$; *Odds Ratio*=0,99; 95%IC=0,69-1,44), como mostrado na tabela 4.

Tabela 4 – Frequências alélicas do polimorfismo CYP17 de acordo com o grupo caso e controle

Polimorfismo	Alelos	Grupo				p
		Controle		Caso		
		n	%	n	%	
CYP17	A1	322	57,9	88	57,9	0,99 (1)
	A2	234	42,1	64	42,1	
		556	100,00	160	100,00	

(1): nível descritivo de probabilidade do teste Qui-quadrado

4.2.3 Polimorfismo PROGINS

A distribuição genotípica do polimorfismo PROGINS no grupo de casos e controles encontra-se na tabela 5. Foi observada uma associação significativa entre a frequência do polimorfismo e o desenvolvimento de câncer de ovário ($\chi^2=40,545$; $gl=1$; $p<0,0001^*$).

Tabela 5 – Frequência do polimorfismo PROGINS nos grupos de casos e controles

Polimorfismo	Genótipo	Grupo				p
		Controle		Caso		
		n	%	n	%	
PROGINS	T1/T1	221	78,37	57	71,3	0,0001*(1)
	T1/T2	61	21,63	12	15,0	
	T2/T2	0	0	11	13,8	
		282	100,00	80	100,00	

(1): nível descritivo de probabilidade do teste Qui-quadrado

A partir desses resultados, efetuou-se uma análise alélica para avaliação dos riscos para o polimorfismo em estudo, em relação ao desenvolvimento do câncer. Indivíduos que apresentam o alelo mutado têm aproximadamente 2,2 vezes mais chances de desenvolver câncer quando comparados a indivíduos que apresentam alelo selvagem (OR=2,2; 95%CI = 1,80-3,54, $p=0,0007^*$) (Tabela 6).

Tabela 6 – Frequências alélicas do polimorfismo PROGINS de acordo com o grupo de casos e controles

Polimorfismo	Alelos	Grupo				p
		Controle		Caso		
		n	%	n	%	
PROGINS	T1	503	89,2	126	78,8	0,0007* (1)
	T2	61	10,8	34	21,3	
		564	100,00	160	100,00	

(1): nível descritivo de probabilidade do teste Qui-quadrado

Outra forma de analisar os resultados é realizar o agrupamento dos genótipos, como mostrado na tabela 7, onde os indivíduos com pelo menos um alelo selvagem foram comparados com os indivíduos com genótipo homocigoto mutado. Observa-se, nessa análise, que a presença de dois alelos mutados está conferindo uma susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer para o polimorfismo PROGINS (Teste Exato de Fischer, $gl=1$; $p<0,001$). Não foi possível apresentar o cálculo do valor de *odds ratio* devido à ausência de indivíduos com o genótipo mutado no grupo controle, o que impossibilita a realização da análise estatística.

Tabela 7 – Frequência do polimorfismo PROGINS nos grupos de casos e controles com agrupamento dos genótipos

Polimorfismo	Genótipo	Grupo				p
		Controle		Caso		
		n	%	n	%	
PROGINS	T1/T1 e T1/T2	282	100,0	69	86,3	0,001(1)
	T2/T2	0	0,0	11	3,0	
		282	100,00	80	100,00	

(1): nível descritivo de probabilidade do teste exato de Fisher

4.2.4 Polimorfismo do Receptor de Estrógeno Alfa

A distribuição genotípica dos polimorfismos no receptor de estrogênio alfa no grupo de casos e controles encontra-se na Tabela 8. Foi observada uma associação significativa entre a frequência dos polimorfismos *PvuII*, *XbaI* e *HaeIII* e o desenvolvimento de câncer de ovário ($\chi^2=7,26$; $gl=1$; $p=0,03^*$; $\chi^2=26,84$; $gl=1$; $p<0,0001^*$; $\chi^2=6,59$; $gl=1$; $p=0,04^*$). Há uma tendência de associação entre a presença do polimorfismo *MspI* com o carcinoma de ovário ($\chi^2=5,22$; $gl=1$; $p=0,07$).

Tabela 8 – Frequências dos polimorfismos no receptor de estrógeno alfa de acordo com o grupo caso e controle

Polimorfismo	Genótipo	Grupo				p
		Controle		Caso		
		n	%	n	%	
ER/<i>PvuII</i>	P/P	49	34,8	11	17,2	0,03*(1)
	P/p	60	42,6	31	48,4	
	p/p	32	22,7	22	34,4	
ER/<i>XbaI</i>	X/X	68	48,2	9	13,8	<0,001*(1)
	X/x	56	39,7	34	52,3	
	x/x	17	12,1	22	33,8	
ER/<i>HaeIII</i>	A/A	85	60,3	34	42,5	0,04*(1)
	A/a	44	31,2	35	43,8	
	a/a	12	8,5	11	13,8	
ER/<i>MspI</i>	B/B	24	17,0	21	30,4	0,07(1)
	B/b	59	41,8	22	31,9	
	b/b	58	41,1	26	37,7	

1): nível descritivo de probabilidade do teste Qui-quadrado

A partir desses resultados, efetuou-se uma análise alélica para avaliação dos riscos para os polimorfismos no receptor de estrógeno, em relação ao desenvolvimento do câncer. Indivíduos que apresentam o alelo mutado no polimorfismo *HaeIII* têm aproximadamente duas vezes mais chances de desenvolver câncer quando comparados a indivíduos que apresentam alelo selvagem (OR=1,74; 95%CI=1,14-2,66; p=0,01*). A presença de alelo mutado para os polimorfismos *XbaI* e *PvuII* aumenta em 3,2 (OR=3,20; 95%CI=2,08-4,92; p<0,0001*) e 1,8 (OR=1,80; 95%CI=1,18-2,75; p=0,006*) vezes a chance de desenvolver câncer, quando comparadas com a presença do alelo selvagem (Tabela 9). Como foi observada diferença estatística em relação à idade, os testes de associação foram corrigidos para essa diferença.

Tabela 9 – Frequência alélica dos polimorfismos no receptor de estrógeno alfa de acordo com o grupo caso e controle

Polimorfismo	Alelos	Grupo				p
		Controle		Caso		
		n	%	n	%	
ER/PvuII	P	158	56,0	53	75	0,006 *(1)
	p	124	44,0	64	42,1	
ER/XbaI	X	192	68,1	52	78	<0,001*(1)
	x	90	31,9	40,0	60,0	
ER/HaeIII	A	214	75,9	103	64,4	0,01*(1)
	a	68	24,1	57	35,6	
ER/MspI	B	107	37,9	64	46,4	0,10(1)
	b	175	62,1	74	53,6	

1): nível descritivo de probabilidade do teste Qui-quadrado

A análise do agrupamento dos genótipos foi realizada através da comparação entre indivíduos homocigotos selvagem versus o agrupamento de indivíduos heterocigotos e homocigotos mutados, com o valor de *odds ratio* já corrigido para a diferença de idade entre os grupos. Os dados obtidos mostram que mulheres com pelo menos um alelo mutado apresentam 2 vezes mais chance de desenvolver câncer, quando comparadas com mulheres com dois alelos selvagens para o polimorfismo *HaeIII* (OR=2,05; 95%IC=1,17-3,61; $p=0,01^*$). Um aumento de aproximadamente 6 vezes para mulheres com pelo menos um alelo mutado para o polimorfismo *XbaI* (OR=5,79; 95%IC=2,65-12,64; $p<0,0001^*$); e um aumento de risco de 2,5 vezes para mulheres com pelo menos um alelo mutado para o polimorfismo *PvuII* (OR=2,53; 95%IC=1,21-5,29; $p=0,01^*$) também pode ser observado quando comparados com mulheres com dois alelos selvagens.

Realizamos também a análise de desequilíbrio de ligação entres os polimorfismos no receptor de estrógeno alfa e todos os polimorfismos encontram-se em desequilíbrio de ligação ($p<0,05$), com exceção do par *MspI-PvuII* ($D'0,11$; $p>0,05$), como pode ser observado na figura 19.

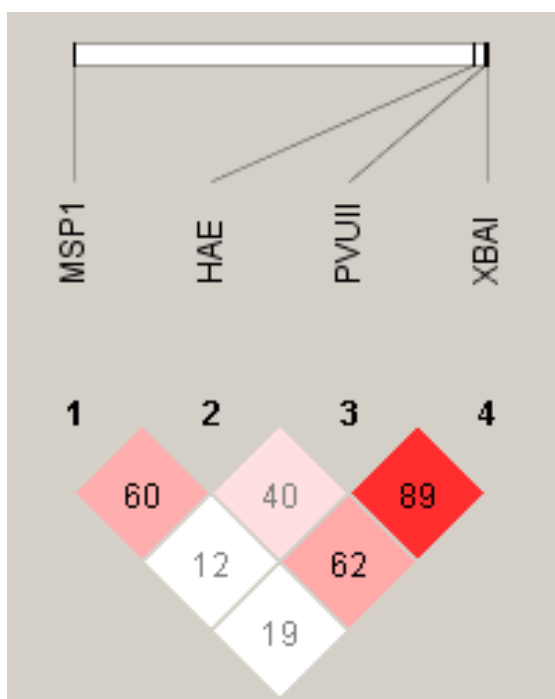


Figura 19: Desequilíbrio de Ligação entre os polimorfismos no receptor de estrogênios alfa. O esquema ao lado representa a localização e a distância relativa dos polimorfismos do receptor de estrógeno alfa em estudo, assim como os valores de D' para cada par de marcadores. O esquema foi gerado pelo programa HAPLOVIEW 4.0.

Com relação à análise dos haplótipos, como pode ser observado no quadro 1, de todas as possíveis combinações, o haplótipo 2111 é o único mais frequente no grupo controle (41,7% versus 14,3%) e apresenta os quatro alelos (bAPX) que individualmente estão mais representados nesse grupo. Portanto, aparentemente esse haplótipo confere uma proteção ao desenvolvimento do câncer para os indivíduos que o possuem, assim como a presença de dois alelos selvagens para nos polimorfismos *HaeIII*, *PvuII* e *XbaI*.

Quadro 1 – Análise de haplótipos dos polimorfismos no receptor de estrógeno alfa de acordo com o grupo caso e controle

MSP1 / HAE / PVU / XBA	Casos (%)	Controles (%)	Qui-quadrado	Valor de p
2111	14,3	41,7	32,70	<0,0001
1222	10,8	16,9	2,80	0,0944
2122	24,5	6,7	27,20	<0,0001
1111	8,4	11,0	0,69	0,4055
2121	4,6	9,1	2,65	0,1035
1211	13,4	2,4	20,25	<0,0001
2222	8,8	4,0	4,18	0,041
1122	9,0	3,8	4,79	0,0286
1121	0,6	3,5	3,24	0,0719

4.2.5 Polimorfismo GSTM1

Ao analisar-se a frequência do polimorfismo para o gene GSTM1 entre as pacientes com carcinoma de ovário e controle formado por mulheres saudáveis, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($\chi^2=2,563$; $gl=1$; $p=0,109$; *Odds Ratio*=1,50; 95%IC=0,91-2,46), como mostrado na tabela 10.

Tabela 10 – Frequências do polimorfismo GSTM1 de acordo com o grupo caso e controle

Polimorfismo	Genótipo	Grupo				p
		Controle		Caso		
		n	%	n	%	
GSTM1	1/1	188	66,67	48	57,1	0,109(1)
	0/0	94	33,33	36	42,9	
		282	100,00	84	100,00	

(1): nível descritivo de probabilidade do teste Qui-quadrado

4.2.6 Polimorfismo COMT

A distribuição genotípica dos polimorfismos no gene COMT no grupo de casos e controles encontra-se na Tabela 11. Não foi observada associação significativa entre a frequência do polimorfismo desenvolvimento de câncer de ovário ($\chi^2=0,63$; $gl=2$; $p=0,73$; Teste Exato de Fisher: $p=0,70$)

Tabela 11 – Frequência do polimorfismo COMT nos grupos de casos e controles

Polimorfismo	Genótipo	Grupo				p
		Controle		Caso		
		n	%	n	%	
COMT	G/G	57	40,0	31	42	0,7*(1)
	G/A	71	50,0	34	46	
	A/A	13	9,0	9	12	
		141	100,00	74	100,00	

(1): nível descritivo de probabilidade do teste Exato de Fisher

A partir desses resultados, efetuou-se a análise alélica. Mais uma vez, não foi observada diferença estatística entre o grupo de casos e controles para este polimorfismo (Tabela 12) (OR=1,03; 95%CI=0,68-1,57; $p=0,88$).

Tabela 12 – Frequência alélica dos polimorfismos no receptor de estrógeno alfa de acordo com o grupo caso e controle

Polimorfismo	Alelos	Grupo				p
		Controle		Caso		
		n	%	n	%	
COMT	G	185	65,6	96	64,9	0,88 (1)
	A	97	34,4	52	35,1	
		282	100,00	148	100,00	

(1): nível descritivo de probabilidade do teste Qui-quadrado

4.2.7 Polimorfismo CYP1A1

A distribuição genotípica dos polimorfismos do gene CYP1A1 no grupo de casos e controles encontra-se na Tabela 13. Não foi observada associação significativa entre a frequência do polimorfismo CYP1A1-*MspI* bem como CYP1A1-*HincII* e o desenvolvimento do carcinoma de ovário (Teste Exato de Fisher: $p=0,82$ Teste Exato de Fisher: $p=0,68$, respectivamente).

Tabela 13 – Frequência dos polimorfismos CYP1A1 nos grupos de casos e controles

Polimorfismo	Genótipo	Grupo				p
		Controle		Caso		
		n	%	n	%	
CYP1A1- <i>MspI</i>	T/T	85	60,0	53	63,0	0,82(1)
	T/C	52	37,0	30	36	
	C/C	4	3,0	1,0	1	
CYP1A1- <i>HincII</i>	A/A	113	80,0	76	85,0	0,68(1)
	A/G	27	19,0	13	15,0	
	G/G	1	1,0	0	0,0	

(1): nível descritivo de probabilidade do teste exato de Fisher

A distribuição alélica dos polimorfismos em questão encontra-se na tabela 14. Não foi observada diferença estatística entre o grupo de casos e controles para os polimorfismos CYP1A1-*MspI* e CYP1A1-*HincII* (OR=0,87; 95%CI=0,54-1,41; p=0,57 e OR=0,69; 95%CI=0,35-1,36; p=0,28, respectivamente).

Tabela 14 – Frequência alélica dos polimorfismos CYP1A1 de acordo com o grupo caso e controle

Polimorfismo	Genótipo	Grupo				p
		Controle		Caso		
		n	%	n	%	
CYP1A1- <i>MspI</i>	T	222	78,7	136	81,0	0,57(1)
	C	60	21,3	32	19,0	
CYP1A1- <i>HincII</i>	A	253	89,7	165	92,7	0,28(1)
	G	29	10,3	13	7,3	

(1): nível descritivo de probabilidade do teste Qui-quadrado

Realizamos também a análise de desequilíbrio de ligação entres os polimorfismos no CYP1A1 e ambos os polimorfismos encontram-se em desequilíbrio de ligação ($D' = 0,89$; $p < 0,001$).



Figura 20: Desequilíbrio de Ligação entre os polimorfismos no gene CYP1A1. O esquema ao lado representa a localização e a distância relativa dos polimorfismos do gene CYP1A1 em estudo, assim como os valores de D' para cada par de marcadores. O esquema foi gerado pelo programa HAPLOVIEW 4.0.

Com relação à análise dos haplótipos, não foi observada diferença estatística para a frequência dos haplótipos entre os grupos de caso e controle ($p > 0.05$), como pode ser observado na tabela 15, onde S representa o alelo selvagem e m o alelo mutado. A frequência do haplótipo M/S foi estimada como <5% em ambos os grupos. Por essa razão, esse haplótipo não está representado na tabela abaixo, já que o programa automaticamente desconsidera frequências tão baixas.

Tabela 15 – Análise de haplótipos dos polimorfismos no CYP1A1 de acordo com o grupo caso e controle

Alelos HincII e MspI	Casos	Controles	Qui-quadrado	Valor de p
S/S	1%	77,5%	0,8	0,37
S/M	11,6%	12,2%	0,03	0,86
M/M	7,2%	9,1%	0,53	0,47

4.3 Inclusão de outras variáveis

Verificou-se também a existência de associações entre os polimorfismos estudados e as outras variáveis disponíveis para análise. Não se observou nenhuma relação entre os polimorfismos estudados e TRH, dismenorréia, dispareunia, câncer de mama, hipertensão arterial, diabetes, tipo histológico, estado clínico e grau de diferenciação.

Entretanto, foram observadas associações estatisticamente significantes para o polimorfismo PROGINS e antecedentes familiares ($\chi^2=6,776$; $gl=1$; $p=0,009^*$; teste exato de Fischer, $p=0,01^*$; *Odds Ratio*=4,69; 95%IC=1,38-15,87). Dessa forma, pacientes com antecedência familiar apresentam 4,69 mais chances de apresentar pelo menos um alelo mutado, ou seja, o alelo de risco, quando comparados com pacientes sem antecedentes familiares (Tabela 16). Para os polimorfismos CYP17 e GSTM1 não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos com e sem antecedentes familiares.

Tabela 16 – Frequências do polimorfismo PROGINS no grupo caso de acordo com o grupo com e sem antecedente familiar

Polimorfismo	Genótipo	Grupo				p
		Com Antecedente Familiar		Sem antecedente Familiar		
		n	%	n	%	
PROGINS	T1/T1	24	49,0	25	51,0	0,009 e
	T1/T2 e T2/T2	18	81,8	4	18,2	0,01*(1)
		42	100,00	29	100,00	

(1): nível descritivo de probabilidade do Teste de Fisher e Qui-quadrado, respectivamente.

4.4 Cálculo do Poder da Amostra

Na análise de poder da amostra, foi observado que com uma amostra contendo 103 casos e 282 controles, o estudo envolvendo os polimorfismos PROGINS, CYP17 e GSTM apresentava 80% de poder para detectar valores de *odds ratio* para o alelo de risco ≥ 1.4 . Ou seja, a amostra apresentava poder estatístico para detectar as diferenças alélicas observadas para os polimorfismos PROGINS (*Odds Ratio*=2,22; 95%CI=1,80-3,54) e para o polimorfismo GSTM (*Odds Ratio*=0,67; 95%IC=0,40-1,10), mas não para o polimorfismo CYP17 (*Odds Ratio*=0,99; 95%IC=0,69-1,44).

O cálculo do poder da amostra para os polimorfismos do receptor de estrogênios alfa demonstrou que com um total de 103 casos e 141 controles, o estudo apresenta 80% de poder de detectar fatores genéticos que apresentem um valor de *odds ratio* $\geq 1,7$, considerando como referência a menor frequência alélica observada no grupo controle (38%, polimorfismo ER-*MspI*). O cálculo de *odds ratio* para o alelo de risco dos polimorfismos ER-*HaeIII*, ER-*XbaI* e ER-*PvuII*, foram 1,74, 3,2 e 1,8, respectivamente (95%IC=1,13-2,66; 95%IC=2,06-4,90 e 95%IC=1,14-2,67; respectivamente). Ou seja, a amostra tinha poder estatístico para detectar essas diferenças. Já o polimorfismo ER-*MspI*, seu *Odds*

Ratio é igual a 0,70 (95%IC=0,46-1,06). Ou seja, nesse caso, a amostra não tinha poder estatístico para identificar essa associação.

Já para os polimorfismos *CYP1A1-HincII*, *CYP1A1-MspI* e COMT, observou-se que considerando-se as frequências alélicas de 10,3%, 21,3% e 34,4% respectivamente, a amostra de 103 casos e 141 controles, considerando o índice de sucesso das genotipagens, apresenta poder de 32%, 12% e 5%, respectivamente de detectar, os *odds ratio* observados (OR=0,87; 95%CI=0,35-1,36; 95%CI=0,54-1,41 e 95%CI=0,68-1,57; respectivamente).

5. *DISCUSSÃO*

O presente estudo demonstrou que polimorfismos presentes em genes envolvidos na ação dos esteróides sexuais parecem exercer influência no surgimento de condições patológicas como o carcinoma de ovário.

Ao final de nossa análise, encontramos uma associação significativa entre a frequência do polimorfismo PROGINS e o desenvolvimento do câncer de ovário. Também foi observada uma associação significativa entre a frequência dos polimorfismos ER-*PvuII*, ER-*XbaI* e ER-*HaeIII* e o desenvolvimento de câncer de ovário e uma tendência de associação entre a presença do polimorfismo ER-*MspI* com o carcinoma.

Com relação aos polimorfismos presentes nos genes do CYP17, GSTM1, COMT e CYP1A1, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo de casos e controles ou entre as outras variáveis de risco analisadas, sugerindo que os mesmos não apresentam uma participação importante no desenvolvimento do carcinoma de ovário em nossa amostra.

Não se observou nenhuma relação entre os polimorfismos estudados e TRH, dismenorréia, dispareunia, câncer de mama, hipertensão arterial, diabetes, tipo histológico, estado clínico e grau de diferenciação.

Em relação aos parâmetros de classificação desse tipo de tumor, estabelecidos pela FIGO em 1988, o nosso grupo caso foi composto por 57,4% pacientes com estágio clínico tipo I; prevalecendo o grau de diferenciação G2, com 42,9%.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, que se iniciou com os polimorfismos PROGINS, CYP17 e COMT em 2005, usamos o grupo controle chamado I e formado por 282 pacientes. No entanto, como as amostras de DNA oriundas de raspado bucal sofrem maior degradação devido à presença de inúmeras enzimas da saliva, não foi possível continuar as análises com esse mesmo grupo. Dessa forma, para os demais polimorfismos foi usado outro grupo controle, chamado II e formado por 141 pacientes.

Quando se analisaram as variáveis clínicas e anatomopatológicas, observou-se que os grupos caso e controle II apresentavam uma diferença significativa em relação à idade, ou seja, as pacientes com câncer de ovário apresentaram faixa etária maior quando comparadas às mulheres do grupo controle.

Com esse resultado, nos preocupamos em considerar essa variável nas análises realizadas. Dessa forma, assegurou-se que se houvesse associação positiva entre o fenótipo (câncer) e o polimorfismo, a mesma ocorreria em decorrência do polimorfismo, e não devido à diferença entre as idades existentes entre os grupos, eventualidade essa que poderia estar falseando nossos resultados.

Apesar da diferença das idades entre os grupos caso e controle II, todas as pacientes desse grupo controle, assim como as do controle I, se encontravam na pós-menopausa.

Em relação à variável raça, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. Apesar disso, a classificação da variável raça no Brasil é extremamente difícil, devido à intensa miscigenação como comprovam os resultados de Parra et al (2003). Diante disso, optamos pela classificação somente em mulheres brancas e não brancas.

Em 1983, Cramer e Welch notaram que a superfície do epitélio ovariano repetidamente se invaginava durante a vida para liberação dos corpos lúteos e, assim, facilitava a formação de fissuras e cistos. Sugeriram então que, sobre excessiva estimulação por FSH ou LH e resultante estimulação por estrogênios ou precursores de estrogênios, o epitélio poderia passar por proliferação e transformação maligna.

Em relação a condições estrogênio-dependentes, nosso grupo encontrou associação significativa entre PROGINS e endometriose (Carvalho et al, 2007), bem como PROGINS e miomatose uterina (Gomes et al, 2007) e PROGINS e o carcinoma de endométrio (Junqueira et al, 2007).

O polimorfismo PROGINS foi identificado por Rowe et al (1995) em estudo com câncer de ovário esporádico. Segundo os mesmos autores, embora esse polimorfismo ocorra em um *intron*, é provável que essa inserção possa alterar a expressão do *locus* do receptor de progesterona. Esse polimorfismo, ao que parece, determina a transcrição anômala no gene do receptor de progesterona, pela recombinação ou por um erro no processamento do transcrito primário (McKenna et al, 1995).

Além disso, dados da literatura indicam que a isoforma A do receptor de progesterona seria a proteína que estaria associada ao PROGINS, favorecendo a estabilidade do RNA mensageiro dessa isoforma, aumentando assim a sua atividade transcricional (Vegato et al, 1993).

Tal fato poderia causar o inadequado controle do receptor de estrogênio e da isoforma B do receptor de progesterona, podendo elevar o risco do desenvolvimento de do carcinoma de ovário (Kieback et al, 1998).

Em contrapartida, análises mostraram que a perda de parte do domínio de ligação resulta em um decréscimo da regulação da atividade transcricional da progesterona, com redução da ação de progestinas na presença do polimorfismo. Realmente, o complexo PROGINS se localiza perto do domínio de ligação do hormônio, entre os éxons 4 e 8, podendo influenciar nos níveis de progesterona circulantes (Romano et al, 2007; Terry et al, 2005).

No presente trabalho, foi observada uma associação significativa entre a frequência do polimorfismo PROGINS e o desenvolvimento de câncer de ovário ($p < 0,0001^*$). O genótipo mutado foi observado com uma frequência superior no grupo de casos, quando comparado com o grupo de controles, sendo que indivíduos que apresentam o alelo mutado têm 2,22 vezes mais chances de desenvolver este câncer quando comparados a indivíduos que apresentam o alelo selvagem ($p = 0,0007^*$). Além disso, pacientes com antecedentes familiares apresentam 4,69 mais chances de apresentar pelo menos um alelo mutado quando comparados com pacientes sem antecedência familiar ($p = 0,01^*$).

Realizou-se o cálculo do poder da amostra, que apresenta 80% de poder (valor usualmente considerado na literatura como adequado) de detectar efeitos genéticos que apresentem um valor de *odds ratio* maior ou igual a 1,4, ou mais de 99% de poder para detectar valores de *odds ratio* maiores que 2, como encontrado em nossos resultados para o polimorfismo PROGINS. Em conjunto, esses dados atestam à confiabilidade estatística dos dados aqui apresentados.

A presença do polimorfismo PROGINS, o qual altera a função do receptor, provavelmente causa um distúrbio nos níveis hormonais da célula,

podendo também modular o risco para distúrbios ginecológicos malignos e benignos. Entretanto, o efeito do alelo PROGINS permanece incerto. Nós acreditamos que a presença do alelo PROGINS pode levar a uma resposta da progesterona e uma proliferação sem controle das células epiteliais ovarianas, favorecendo o desenvolvimento do carcinoma de ovário.

Diversos estudos avaliaram a possível associação entre o câncer de ovário e o polimorfismo PROGINS, os quais incluem a variante V660L, H770H e a inserção *Alu*. Alguns deles não encontraram aumento no risco associado à presença do alelo mutado (Manolitsas et al, 1997; Lancaster et al, 1998; Tong et al, 2001; Spurdle et al, 2001; Lancaster et al, 2003).

Entretanto, outros estudos encontraram associação positiva entre o polimorfismo PROGINS e o câncer de ovário (McKenna et al, 1995; Runnebaum et al, 2001; Agoulinik et al, 2004; Pearce et al, 2005; Romano et al, 2006, Leite et al, 2007) (Anexo 6).

Recentemente, um trabalho britânico envolvendo 4788 casos de câncer de ovário e 7614 controles obtidos de 12 estudos caso-controle diferentes encontrou associação entre o alelo PROGINS e o risco do desenvolvimento do câncer de ovário do tipo endometrióide. Cabe destacar que dentre os 12 estudos, 5 deles apresentavam média de idade das mulheres do grupo controle entre 48,4 e 54,4 anos e sempre maior que o grupo caso; sem que a confiabilidade dos dados fosse questionada (Pearce et al, 2008).

Existem várias razões para os achados negativos, tais como: amostras reduzidas que limitam o estudo, amostras tendenciosas e seleção de grupos controle aos quais não são representativos da população (Modugno, 2004).

Os fatores etiológicos envolvidos na carcinogênese do câncer de ovário ainda não foram totalmente definidos, mas recentes estudos epidemiológicos têm apontado que o estrogênio pode ser responsável por promover a progressão tumoral em mulheres na pós-menopausa. Existem evidências experimentais de que o estrogênio desempenhe um papel fundamental na carcinogênese ovariana (Cunat et al, 2004).

Apesar de estudos terem reportado a presença de estrogênio e receptores de progesterona em variadas concentrações em tecidos ovarianos normais e cancerosos, o papel do estrogênio na carcinogênese e no desenvolvimento do câncer de ovário ainda permanece incerto (Wu et al, 2005).

Inicialmente, o câncer de ovário era considerado como uma patologia não estrogênio-dependente devido às poucas respostas clínicas obtidas através da terapia anti-estrogênica clássica. Apesar de apenas 5-18% dos casos de câncer de ovário serem sensíveis ao tratamento com tamoxifeno, 60% deles são positivos para o ER. Além disso, não está bem estabelecido se o tamoxifeno age como um antagonista de estrogênio puro no tecido ovariano, mas o efeito parcialmente agonista não pode ser excluído (Cunat et al, 2004).

O efeito proliferativo dos estrogênios tem sido demonstrado em diferentes linhagens de células cancerosas positivas para o ER. Os estrogênios podem afetar a progressão tumoral pelo aumento da proliferação bem como promover invasão ou mobilidade celular. No entanto, o papel dos receptores de estrogênio na mediação desse efeito mitogênico ainda não foi estabelecido (Cunat et al, 2004).

Com relação aos polimorfismos no gene do receptor de estrogênios alfa, foi observada uma associação significativa entre a frequência dos polimorfismos *PvuII*, *XbaI* e *HaeIII* e o desenvolvimento de câncer de ovário ($p=0,03^*$; $p<0,0001^*$; $p=0,04^*$, respectivamente) e uma tendência de associação entre a presença do polimorfismo *MspI* com o carcinoma de ovário ($p=0,07$). Cabe destacar que com uma amostra contendo 90 casos e 141 controles, o estudo apresenta 80% de poder (valor usualmente considerado na literatura como adequado) de detectar fatores genéticos que apresentem um valor de *odds ratio* maior ou igual a 1,72, considerando como referência a menor frequência alélica observada no grupo controle (38%, polimorfismo *MspI*). Visto que os valores de *odds ratio* para o polimorfismo *HaeIII*, *XbaI* e *PvuII* são 1,74; 3,2 e 1,8, respectivamente, existe poder estatístico para detectar esses efeitos, já que todos são superiores a 1,72. Por outro lado, para o polimorfismo *MspI*, o *odds ratio* é igual a 0,71 ou 1,41 (valor complementar para o outro alelo). Nesse

caso, nossa amostra não tinha poder para identificar essa associação, o que pode explicar o fato de não termos encontrado uma associação positiva entre este polimorfismo e o câncer de ovário.

Os dados obtidos com o agrupamento dos genótipos mostraram que mulheres com pelo menos um alelo mutado apresentam 2 vezes mais chance de desenvolver câncer, quando comparadas com mulheres com dois alelos selvagens para o polimorfismo *HaeIII*. Além disso, um aumento de aproximadamente 6 vezes para mulheres com pelo menos um alelo mutado para o polimorfismo *XbaI* e um aumento de risco de 2,5 vezes para mulheres com pelo menos um alelo mutado para o polimorfismo *PvuII* também pode ser observado quando comparados com mulheres com dois alelos selvagens.

Todos os polimorfismos estudados presentes no receptor de estrogênio alfa encontram-se em desequilíbrio de ligação, com exceção do par *MspI-PvuII*. O haplótipo bAPX, ou seja, a presença de alelo polimórfico para *MspI* e alelos selvagens para os outros polimorfismos confere, aparentemente, uma proteção ao desenvolvimento do câncer para os indivíduos que o possuem, assim como a presença de dois alelos selvagens para nos polimorfismos *HaeIII*, *PvuII* e *XbaI*.

Interessantemente, Becharini et al (2000) reportaram que existe um forte desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos *PvuII* e *XbaI* e a variação de repetições de dinucleotídeos (TA)_n em pacientes com BMD (densidade mineral óssea). Pacientes com o genótipo PPXX apresentaram maior significância no número de repetições quando comparadas com o genótipo ppXX. Além disso, existe uma relação entre redução dos níveis de variação de massa óssea nos indivíduos pp com menor número de repetições.

Até o momento, encontramos somente um trabalho que estudou polimorfismos no gene do receptor de estrogênio e o câncer de ovário. Wu et al (2005) realizaram análises de mutações no ER- α , além dos polimorfismos *PvuII* e *XbaI*, com uma amostragem pequena de casos de câncer de ovário esporádico e familiar (sem a presença de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2), além de estudar a perda da região genética 6q25, comum em tumores

ovarianos. Como resultado, encontrou associação entre a análise dos polimorfismos *PvuII* e *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 (Wu et al, 2005).

Nossos dados aqui descritos, com relação ao polimorfismo no receptor de progesterona (PROGINS) e polimorfismos no receptor de estrogênio alfa, concordam com a literatura que descreve que progesteronas e estrogênios parecem estar relacionados ao câncer através de vias mediadas por seus receptores (Sellers et al, 2005).

Nosso grupo não encontrou associação significativa entre os polimorfismos ER-*HaeIII* e ER-*MspI* e endometriose (Sato et al, 2008), bem como ER-*HaeIII* e ER-*MspI* e mioma (Villanova et al, 2006).

Quanto ao polimorfismo do gene CYP17, segundo Carvalho et al (2007), essa variação causada pelo SNP pode alterar a atividade da região promotora desse gene, possibilitando o aumento da transcrição do CYP17 e, teoricamente, aumentando a produção dos níveis de hormônios esteróides endógenos.

Habuchi et al (2000) demonstraram que o alelo A1, no homem, determinaria um efeito mais androgênico e por isto, esse alelo vem sendo associado com maior risco para o desenvolvimento do câncer de próstata.

Entretanto, 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).

Kado et al (2002) relataram que este alelo poderia elevar a atividade do promotor e a tradução da enzima, aumentando a produção de estrogênios e androgênios. Entretanto, em nosso estudo, não foi encontrada significância estatística entre os grupos caso e controle ($p=0,25$).

Recentes estudos sugerem a associação com o aumento do risco para o desenvolvimento do câncer de mama para a variante A2 do gene CYP17, especialmente para casos de câncer de mama na fase de pré-menopausa ou em estadios avançados (Feigelson et al, 1997; Bergman-Jungstrom et al, 1999).

Estudos subsequentes, entretanto, falharam em mostrar essa associação, até mesmo dentro de subgrupos (Helzlsouer et al, 1998; Haiman et al, 1999).

Com relação ao câncer de ovário, Spurdle et al (2000) também não encontraram evidências de associação. Como o nosso estudo, a falta de informações epidemiológicas não possibilitou análises de subgrupos, o que pode ter mascarado uma possível associação em determinada faixa etária ou estágio clínico.

Gardner et al (2002) encontraram associação positiva entre o polimorfismo no gene CYP17 e o câncer de ovário. Cabe ressaltar que em suas análises, o efeito do alelo A2 parece estar mais evidente em mulheres mais velhas (principalmente na pós-menopausa). Uma possível explicação para a falta de associação seria que o nosso grupo caso possui uma média de idade inferior a essas mulheres estudadas por Gardner.

Em estudo mais recente, Nagle et al (2007) encontraram associação positiva entre o polimorfismo CYP 17 e o câncer de ovário, e reportaram que a presença do alelo A2 aumenta em 30% a taxa de morte se comparada com a presença do alelo selvagem, o que condiz com estudos similares com câncer de mama (Goode et al, 2002).

Goodman et al (2001) também não encontraram associação entre o polimorfismo CYP17 e o carcinoma de ovário. Nesse caso, os autores justificaram a falta de poder de detecção como o fator responsável pelos dados. No entanto, isso não se aplica ao nosso caso, já que tínhamos poder de detecção para encontrar uma eventual associação.

Estudos *in vitro* sugerem que o sítio adicional tipo SP1 5' no CYP17 não estaria realmente ligado ao fator de transcrição (Kristensen et al, 1999), ou seja, a presença do polimorfismo pode não estar relacionada com o aumento da atividade do promotor, aumento da taxa de produção da enzima e elevação dos níveis de hormônios esteróides sexuais (Garner et al, 2002; Shin et al, 2005). Além disso, a relevância biológica do polimorfismo no gene CYP17 é questionável dado que um estudo com grande amostragem não encontrou relação entre os níveis de hormônios sexuais circulantes e o SNPs do gene

CYP17 bem como EDH17B2, COMT e CYP1B1 em mulheres com câncer de mama (Dunning et al, 2004).

Em concordância, não foi observada, em nosso estudo, associação significativa entre a frequência do polimorfismo no gene COMT e o desenvolvimento de câncer de ovário ($p=0,7$).

De fato, nossos dados são similares a outros estudos que se propuseram a investigar uma possível relação entre o polimorfismo no gene COMT e o carcinoma de ovário. Goodman et al (2000) não encontrou associação em um estudo caso-controle composto por 108 casos e 106 controles. Esta falta de associação não variou com a idade, histórico familiar, tipo histológico do tumor ou genótipo GSTT1 ou GSTM1.

Um estudo com mulheres havaianas também não encontrou nenhum efeito do polimorfismo COMT sobre o carcinoma ovariano, apesar de que mulheres fumantes e com o alelo COMT Met tiveram um elevado risco no desenvolvimento de tumores ovarianos borderline (OR, 2.2; 95% CI, 1.0-4.7) (Goodman et al, 2001).

Garner et al (2002) também não observaram efeito da variante polimórfica sobre a doença em estudo na EUA com uma população de 240 casos e 240 controles. Entretanto, notaram uma associação inversa no grupo de pacientes com tumores mucinosos, ou seja, a presença da mutação *Val/Met* diminuiu o risco de desenvolvimento desses tumores (RR, 0.28; 95% CI, 0.13-0.61).

Holt et al (2007) estudaram a relação entre polimorfismos envolvidos no metabolismo de estrogênios e o carcinoma de ovário (310 casos e 577 controles) e encontraram um aumento de 2,6 vezes no risco de desenvolvimento da doença apenas em mulheres homozigotas para o polimorfismo COMT com o polimorfismo CYP1B1 *Leu* quando comparadas a mulheres homozigotas para o polimorfismo CYP1A1 *Val*.

Dessa forma, a redução na atividade de COMT encontrada em indivíduos com a variante polimórfica em até quatro vezes se comparados com indivíduos com alelo selvagem parece não estar associada ao desenvolvimento do câncer de ovário.

Com relação ao polimorfismo do gene GSTM1, não foi encontrada diferença estatística, tanto nas frequências genóticas, como no cálculo do risco para o desenvolvimento da referida neoplasia estrogênio-dependente. O cálculo do poder da amostra foi positivo para esse polimorfismo.

Sarhanis et al (1996) buscaram identificar uma possível influência do GSTM1, GSTT1 e CYP2D6 em pacientes com câncer de ovário, além de buscar uma associação com a expressão da proteína p53 (84 casos e 325 controles). Os dados apresentados não mostraram associação entre os genótipos estudados e o câncer. No entanto, o genótipo nulo encontrou-se associado ao câncer ovariano nas pacientes que super expressam a p53.

Hengstler et al (1998) não encontraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso (103 pacientes) e controle (115 pacientes) entre os genótipos 0/0 para GSTM1 e GSTT1 e o carcinoma de ovário. Lallas et al (2000) também concluíram que o genótipo nulo para GSTM1 não aumenta o risco no desenvolvimento do câncer de ovário em estudo com 80 controles e 33 casos.

Entretanto, Baxter et al (2001) encontraram associação positiva entre o genótipo nulo e o câncer de ovário ($p=0,025$) em estudo com 293 casos e 219 controles. No entanto, observou que o aumento do risco de desenvolvimento do câncer estaria associado ao câncer de ovário de tipo histológico endometrióide e a combinação entre os cânceres endometrióides e de células claras. Cabe destacar que esse estudo, segundo o próprio autor, não tinha poder de amostra suficiente (30%) para detectar valores de *odds ratio* 1,5 e nível de significância menor que 0,05.

Spurdle et al (2001) não encontraram associação entre os polimorfismos GSTM1, GSTT1 e GSTP1 e o câncer. No entanto, encontraram associação positiva entre o genótipo nulo GSTM1 e o aumento do risco de desenvolvimento do câncer de ovário tipo endometrióide/células claras, sugerindo também que o genótipo nulo poderia estar associado a subtipos específicos de carcinomas de ovário.

Coughlin, Hall (2002) em uma revisão de literatura afirmam não haver associação positiva entre o genótipo nulo GSTM1 e o desenvolvimento do carcinoma de ovário. Nossos resultados se mostraram consoantes com a

maioria dos estudos já realizados. Não observamos frequências significantes do genótipo 0/0 entre pacientes com carcinoma de ovário.

Os polimorfismos no CYP1A1 têm sido associados com câncer de pulmão e colorretal (Nakachi et al, 1993; Kawajiri et al, 1996; Sivaraman et al, 1994). O polimorfismo *CYP1A1-HincII* (Ile/Val) foi descrito como associado ao câncer de pulmão e câncer de boca (Hayashi et al, 1991; Kawajiri et al, 1996; Park et al, 1997).

A região não codificante do DNA é importante para a estabilidade do mRNA e expressão de produtos gênicos. A expressão do gene CYP1A1 é modulada por mecanismos pós-transcrição e pós-tradução. Dessa forma, o polimorfismo *CYP1A1-MspI*, que ocorre na região 3' não-codificante, parece controlar a expressão do gene CYP1A1, enquanto o polimorfismo *CYP1A1-HincII* modula atividade da enzima codificada pelo gene CYP1A1 (Sugawara et al, 2003).

Alguns trabalhos procuraram investigar o possível papel desses polimorfismos no gene CYP1A1 e o risco no desenvolvimento do câncer de ovário. Aktas et al (2002) estudaram 117 pacientes com câncer de ovário e 208 controles na Turquia e observaram que o genótipo heterozigoto para o polimorfismo *CYP1A1-HincII* estava associado a um aumento de 5,7 vezes no risco do desenvolvimento da doença.

Terry et al (2003) compararam as frequências alélicas para as variantes *CYP1A1-HincII* e *CYP1A1-MspI* em 445 casos de câncer de ovário e 472 controles na EUA e não encontraram correlação. Entretanto, mulheres que possuem a variante *CYP1A1-HincII* e que consumiam mais do que a média diária recomendada de gordura animal apresentavam um aumento no risco de desenvolvimento da doença, assim como mulheres que consumiam mais do que a média diária de cafeína recomendada.

Goodman et al (2001) estudaram 129 casos e 144 controles nos EUA e observaram que mulheres que apresentavam pelo menos um alelo variante do polimorfismo *CYP1A1-MspI* e eram fumantes tiveram um risco aumentado de desenvolvimento de carcinoma ovariano quando comparadas com mulheres que nunca fumaram e eram homozigotas para o polimorfismo.

Um estudo caso-controle no Japão com 129 casos e 144 controles não encontrou correlação entre o câncer de ovário e os polimorfismos *CYP1A1-HincII* e *CYP1A1-Mspl*.

Da mesma forma, em nosso estudo, não foi observada associação significativa entre a frequência do polimorfismo *CYP1A1-Msp* bem como *CYP1A1-Hinc* e o desenvolvimento do carcinoma de ovário ($p=0,57$ e $p=0,28$, respectivamente).

Realizamos também a análise de desequilíbrio de ligação entres os polimorfismos no *CYP1A1* e ambos os polimorfismos encontram-se em desequilíbrio de ligação ($D'=0,89$; $p<0,001$). Entretanto, não foi observada diferença estatística para a frequência dos haplótipos entre os grupos de caso e controle ($p>0.05$).

As inconsistências entre os estudos que procuram buscar uma relação entre os polimorfismos *CYP1A1-HincII* e *CYP1A1-Mspl* e o carcinoma de ovário parecem estar relacionadas as diferenças étnicas, já que os estudos foram realizados com mulheres japonesas, turcas, americanas e brasileiras.

Uma vez que a carcinogênese é influenciada por vários genes, uma única variante polimórfica possui, individualmente, um efeito pequeno, mas o risco populacional atribuído a tais genes de suscetibilidade pode ser grande e deve ser levado em consideração, justificando a realização da análise de várias variantes simultaneamente (Norppa, 2003).

6. CONCLUSÕES

1. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a frequência do polimorfismo CYP17 e as pacientes com câncer de ovário ($p=0,25$).
 2. Com relação ao polimorfismo PROGINS, verificou-se associação significativa entre o genótipo homozigoto mutado e o câncer ($p<0,0001$).
 3. Foi observada uma associação significativa entre a frequência dos polimorfismos ER-*PvuII*, ER-*XbaI* e ER-*HaeIII* no gene do receptor de estrogênios alfa e o desenvolvimento de câncer de ovário ($p=0,03$; $p<0,00001$ e $p=0,04$, respectivamente). Há uma tendência de associação entre a presença do polimorfismo ER-*MspI* com o carcinoma de ovário ($p=0,07$).
 4. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a frequência do polimorfismo GSTM1 e as pacientes com câncer ovário ($p=0,109$).
 5. Não foi observada associação significativa entre a frequência do polimorfismo COMT e o desenvolvimento de câncer de ovário ($p=0,7$).
 6. Não foi observada associação significativa entre a frequência do polimorfismo CYP1A1-*MspI* bem como CYP1A1-*HincII* e o desenvolvimento do carcinoma de ovário ($p=0,82$ e $p=0,68$, respectivamente).
 7. Foram observadas associações estatisticamente significantes para o polimorfismo PROGINS e antecedentes familiares ($p=0,009$).
 8. Não se observou qualquer relação entre os polimorfismos estudados e TRH, dismenorréia, dispareunia, hipertensão arterial, diabetes, tipo histológico, estado clínico e grau de diferenciação.
-

7. ANEXOS

Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Ovário**TÍTULO DA PESQUISA:**

“Análise de polimorfismos nos genes cyp1a, cyp1b1, cyp3a4, cyp 17, cyp19, comt, gstm1, receptor de estrogênios e progesterona em mulheres com carcinoma de ovário.”

OBJETIVO:

Essas informações estão sendo fornecidas para a sua participação voluntária neste estudo que procura identificar modificações no gene de uma proteína que está relacionada a processos do câncer de ovário. Até o presente momento, apesar do esforço de todos os pesquisadores do mundo, não há um mecanismo que explique o surgimento desta doença de maneira satisfatória. Dessa forma, estamos fazendo um estudo para procurar, se há algum tipo de característica, nos genes, que mais se relaciona ao surgimento de determinado câncer de ovário e, portanto, quais mulheres apresentarão maior ou menor risco de desenvolver a doença em seus diferentes graus. Isso é importante, pois esse tipo de informação poderá explicar o aparecimento da doença e, dependendo dos resultados, poderá nos ajudar a desenvolver um método laboratorial para a determinação de risco de desenvolvimento da neoplasia.

As mulheres desse estudo serão aquelas com diagnóstico prévio de neoplasia de ovário, atendidas no Ambulatório de Onco Cirurgia do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM, onde participarão dentro da rotina de atendimento.

COLETA DO MATERIAL:

Coleta de células da mucosa oral (boca):

A coleta somente será realizada no dia da consulta ambulatorial, com diagnóstico prévio de neoplasia de ovário.

DESCRIÇÃO:

Será solicitado à paciente que agite na boca (bocheche) 10ml de soro fisiológico (0,9%) por alguns segundos e, em seguida, que retorne o mesmo líquido em um frasco. Amostras de raspado bucal também serão obtidas através de escova do tipo Cytobrush® (escova comercial própria para coletas citológicas sem provocar traumatismo) friccionadas contra a mucosa de revestimento bucal colocadas no mesmo tubo. As amostras citológicas assim obtidas serão conservadas em -80°C até posterior extração de DNA genômico e realização da técnica de PCR-RFLP, para amplificação das regiões modificadas do DNA. O banco de DNA genômico das pacientes dos grupos de estudo e controle será utilizado exclusivamente para este projeto, que tem duração prevista de 4 (quatro) anos.

DESCONFORTOS E RISCOS:

A coleta de células não apresenta risco para a paciente. A lavagem da boca com soro fisiológico (0,9%) também não proporciona desconforto.

BENEFÍCIOS:

Poderá existir benefício futuro para o seu tratamento na dependência dos resultados desse estudo.
