



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Estudo de associação entre os polimorfismos do gene
RUVBL1 e o câncer de ovário.**

DANIELLE HORNUNG VENTURY

CURITIBA

2013

DANIELLE HORNING VENTURY

Estudo de associação entre os polimorfismos do gene *RUVBL1*
e o câncer de ovário.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para a qualificação ao título de Mestre.

Orientadora: Vanessa Santos Sotomaior

Coorientador: Fabio Faucz

Curitiba

2013

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

V469e
2013

Ventury, Danielle Hornung
Estudo de associação entre polimorfismos do gene RUVBL1 e o câncer de ovário / Danielle Hornung Ventury ; orientadora, Vanessa Santos Sotomaior ; coorientador, Fabio Faucz. – 2013.
vii, 32 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2013

Bibliografia: f. 24-27

1. Genes. 2. Polimorfismo (Genética). 3. Ovários - Câncer. I. Sotomaior, Vanessa Santos. II. Faucz, Fábio Rueda. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDD 20. ed. – 610



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - *Stricto Sensu*

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos onze dias do mês de dezembro de 2013, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação "ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS RS13063604 E RS7650365 DO GENE RUVBL1 E O CÂNCER DE OVÁRIO" apresentada por DANIELLE HORNUNG VENTURY para obtenção do título de mestre; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Profª. Drª. Vanessa Santos Sotomaio PUCPR – Presidente	
Prof. Dr. Cleber Machado de Souza PUCPR	
Profª. Drª. Angelica Beate Winter Boldt UFPR	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Profª. Drª. Vanessa Santos Sotomaio Conceito: APROVADO
Prof. Dr. Cleber Machado de Souza Conceito: Aprovado
Profª. Drª. Angelica Beate Winter Boldt Conceito: Aprovado
Conceito Final: APROVADO

Observações da Banca Examinadora:

Profª. Drª. Vanessa Santos Sotomaio
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho
Coordenador do PPGCS PUCPR

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que me deu o dom da vida através dos meus pais. Ouviu as minhas orações de agradecimento, assim como as minhas decepções e conquistas, dando-me liberdade de escolha para seguir o meu caminho.

Aos meus pais **Flávio** e **Raimilde**, que através do seu amor de casal sacramentado educaram-me na fé cristã, contribuindo com valores sólidos para a formação do meu caráter e personalidade, indicando-me o caminho do bem e dos bons princípios. Ouviram e apoiaram todas as minhas decisões, acreditando na minha capacidade. Exemplos verdadeiros de força interior, fé, simplicidade, esperança e doçura. Que Deus me permita levar algumas das infinitas qualidades presentes nos dois.

Ao meu irmão **João Paulo**, cuja frase dita por muitas vezes, me vem diariamente na memória: “Eu tenho certeza de que você vai conseguir!” Agradeço toda a disposição que teve para comigo e o imenso carinho dedicado ao meu filho Cauê.

Ao meu esposo amado, **Paulo Sérgio**, por ter sonhado junto comigo o projeto do Mestrado, mesmo em momentos de dificuldades. Jamais mediu esforços para que pudéssemos tornar realidade a conquista desse sonho. Agradeço a Deus todos os dias pelo nosso matrimônio e cumplicidade de casal: amor eterno!

Ao nosso filho **Cauê**, por sempre se fazer presente com sua espontaneidade e brilho de uma criança meiga e alegre, lembrando-nos sempre com a sua euforia que o melhor da vida é a convivência familiar e nada substitui um ao outro.

A minha comadre-irmã **Giane**, por me incentivar a cursar o Mestrado e compartilhar momentos de amizade verdadeira em que se estabelecia um vínculo de confiança e afeto, além de me permitir praticar os primeiros procedimentos cotidianos do laboratório. Eterna amizade!

Ao Doutor **Fabio Rueda Faucz** por ter me aceito como aluna especial, oferecendo a oportunidade de entrar para o mestrado e disponibilizando-me suas relevantes contribuições. Generosidade e competência admiráveis!

A Doutora **Vanessa Santos Sotomaior**, meu exemplo maior de comprometimento, ética e responsabilidade profissional. Chegou num momento de fragilidade da minha parte enquanto estudante, sugerindo-me ferramentas para a melhora do meu aprendizado. Dedicou tempo para me orientar no que fosse necessário. Levarei comigo não só as lembranças de nossas longas conversas acerca da minha pesquisa, mas algo bem maior: o de que quando nos propomos a desenvolver um projeto, devemos fazer o nosso melhor! Um enorme sentimento de carinho e gratidão por todas as sábias palavras que me tornaram uma pessoa melhor!

Aos Doutores **Reitan Ribeiro** e **José Clemente Linhares** pela disposição e supervisão no cotidiano hospitalar. Às **pacientes** que tornaram possível a minha pesquisa mesmo em momentos críticos de suas vidas, em que recebiam o diagnóstico demonstrando humildade.

Agradeço à **Prefeitura Municipal de Curitiba (Secretaria Municipal de Educação)**, que me concedeu a licença para mestrado.

À **CAPES**, pela concessão de bolsa para mestrado.

Aos meus colegas de laboratório **Bruna, Rodrigo, Elen, Heloisa, Geovana, Mônica, Rafael** e alunos de PIBIC **Fabio, Thays, Mariana e Rodrigo**, especialmente à **Phâmela** pelo seu comprometimento e companheirismo.

Agradeço também à minha professora e amiga **Marilsa** que sempre potencializou minhas qualidades dando-me o suporte emocional necessário em momentos de incertezas.

Enfim, a todos os colegas que apoiaram e àqueles que de início, não acreditaram na possibilidade da concretização desse sonho, cada qual à sua maneira, fizeram-me decidir e apostar neste sonho através da minha dedicação e força de vontade.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	2
3. OBJETIVOS	3
3.1 Objetivo geral	3
3.2 Objetivos específicos	3
4. REVISÃO DA LITERATURA	4
4.1 Tumores de ovário	4
4.1.1 Câncer de ovário epitelial	6
4.1.2 Estádios para câncer de ovário	7
4.2 Genes e câncer	8
4.2.1 Genes e câncer de ovário	8
4.2.2 O gene <i>RUVBL1</i>	10
4.3 Estudos de associação	12
5. MATERIAIS E MÉTODOS	14
5.1 Pacientes com câncer de ovário	14
5.2 Controles femininos adultos	15
5.3 Extração e purificação das amostras de DNA	15
5.4 Genotipagem	15
5.5 Análise estatística	17
6. RESULTADOS	18
6.1 Pacientes e controles	18
6.2 Genotipagem	18
6.3 Análise de associação	21
7. DISCUSSÃO	22
8. CONCLUSÃO	24
9. REFERÊNCIAS	25
10. ANEXO 1	29
11. ANEXO 2	32

RESUMO

O câncer de ovário é um dos cânceres ginecológicos de mais difícil diagnóstico, possivelmente por não apresentar sintomas característicos no início da doença. Após o diagnóstico, pacientes com câncer de ovário apresentam baixo índice de sobrevida (30%) e o tratamento, na maioria dos casos, é cirúrgico seguido de radioterapia e quimioterapia. Os eventos moleculares envolvidos no desenvolvimento do câncer de ovário, apesar do grande número de artigos publicados tratando do assunto, ainda não são completamente compreendidos. Em 2011, um estudo de associação sugeriu que os polimorfismos rs13063604 e rs7650365 no gene *RUVBL1* poderiam conferir risco aumentado ao câncer de ovário. A proteína codificada pelo *RUVBL1*, a pontina, está envolvida em processos de regulação da transcrição associados a padrões de acetilação de histonas e de reparo do DNA. Neste contexto, nosso trabalho teve como objetivo estudar a associação entre os polimorfismos rs7650365 e rs13063604 do gene *RUVBL1* e câncer de ovário, em uma amostra da população sul-brasileira. Para tanto, um grupo de pacientes em tratamento no Hospital Erasto Gaertner, Curitiba, Paraná – LIGA Paranaense de Combate ao Câncer, e outro de controles foram recrutados, caracterizados, amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR (*polymerase chain reaction*)) e genotipados por sequenciamento. As frequências observadas estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. A partir dos resultados não foram encontradas possibilidades de associação dos polimorfismos rs7650365 rs13063604 com o câncer de ovário, com valores de $p= 0,6$ e $p= 0,9$, frequências alélicas, respectivamente. Tais polimorfismos são intrônicos e a substituição dos nucleotídeos para ambos dá-se pela troca de uma citosina por uma timina.

ABSTRACT

Ovarian cancer is one of the more difficult gynecological cancers to diagnose. This frequently happens because the symptoms do not show up in the early stages of the disease. After a diagnosis, patients with ovarian cancer have a low survival rate (30%) and the treatment in most cases is made through surgical procedure and followed by radiotherapy and chemotherapy. The molecular events involved in the development of ovarian cancer, despite the large number of articles dealing with the subject, are not yet fully understood. In 2011, an association study from *Notaridou et al* suggested that polymorphisms rs13063604 and rs7650365 in the *RUVBL1* gene could confer increased risk for ovary cancer. The pontine protein encoded by *RUVBL1* is involved in processes of transcriptional regulation associated with histone acetylation pattern and DNA repair. In this context, our work aimed to study the association between rs13063604 and rs7650365 polymorphisms in the *RUVBL1* gene and the ovarian cancer, using samples from the South Brazilian population. For this purpose, a group of patients from Hospital Erasto Gaertner, Curitiba, Paraná – LIGA Paranaense de Combate ao Câncer and another one of controls were recruited. They were characterized and genotyped by PCR (polymerase chain reaction). The observed frequencies were at Hardy-Weinberg equilibrium. From the results it was not possible to find any association between rs13063604 polymorphism rs7650365 and ovarian cancer, and also with $p = 0,6$ and $p = 0,9$, allele frequencies, respectively. These polymorphisms are intronic and the change of nucleotides for both occurs by exchanging one cytosine for a thymine.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as neoplasias ginecológicas, o câncer de ovário é a doença que tem o maior índice de mortalidade (Kinde *et al.*, 2013), além de ser um dos cânceres de mais difícil diagnóstico nas mulheres (INCA, 2013), possivelmente por não apresentar sintomas característicos no início da doença ou uma lesão identificada como precursora (Sueblinvong e Carney, 2009).

Apesar dos esforços para um melhor entendimento do mecanismo de formação do câncer de ovário, o índice de mortalidade não tem diminuído com o passar dos anos (Buys *et al.*, 2011), ainda que tenham ocorrido melhoras em relação às técnicas cirúrgicas e quimioterapia, possibilitando um aumento na taxa de sobrevivência (Kuhn, 2012). Após o diagnóstico, o tratamento na maioria dos casos, é cirúrgico seguido de radioterapia e quimioterapia (Chan *et al.*, 2006).

Independente do grande número de artigos publicados sobre o câncer de ovário, sua etiologia é ainda pouco compreendida (Landen, Birrer e Sood, 2008). Assim como em outros tipos de câncer, muitos genes tais como *BRCA1* (*breast cancer 1, early onset*) (Notaridou *et al.*, 2011), *BRCA2* (*breast cancer 2, early onset*) (Notaridou *et al.*, 2011), *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*) (Kuhn, 2012), *KRAS* (*kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) (Kuhn, 2012), e *BRAF* (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*) (Romero e Bast, 2012) são descritos como associados. Todavia, o fato do ovário ser o órgão que apresenta a maior diversidade de tipos de tumores no corpo humano (Kuhn, 2012) torna o carcinoma ovariano um grupo de doenças muito heterogêneas, e de difícil estudo.

Em 2011, um estudo de associação sugeriu que os polimorfismos rs13063604 e rs7650365 no gene *RUVBL1* (*RuvB-like AAA ATPase 1*) podem conferir risco aumentado ao câncer de ovário (Notaridou *et al.*, 2011). A proteína codificada pelo *RUVBL1*, a pontina, está envolvida em processos de regulação da transcrição (Weiske e Huber, 2005) associados a padrões de acetilação de histonas (Doyon *et al.*, 2004) e de reparo do DNA (Qiu *et al.*, 1998), assim como participa na manutenção telomérica (Bereshchenko *et al.*, 2012). O papel deste gene no câncer de ovário, bem como dos polimorfismos citados, precisa ser esclarecido.

2 JUSTIFICATIVA

Tendo-se em vista o alto índice de mortalidade das pacientes que apresentam câncer de ovário, muitos estudos vêm tentando compreender os mecanismos genéticos e moleculares, no sentido de elucidar os processos iniciais que ocorrem na tumorigênese ovariana a fim de se tentar diagnosticar precocemente a doença e contribuir no desenvolvimento de novos medicamentos que possam atuar como terapêutica coadjuvante (Hennessy e Markman, 2009).

Até o presente momento, os avanços nas descobertas de novas informações impactam positivamente apenas no que se refere ao tempo de sobrevida e não na diminuição da taxa de mortalidade (Kuhn, 2012), o que justifica a continuidade extensiva das pesquisas na obtenção de estratégias que venham ao encontro da necessidade urgente de detecção precoce da doença, ou seja, em estádios iniciais (Vaughan *et al.*, 2012). Igualmente necessário é o desenvolvimento de tratamento efetivo que proporcione uma melhor qualidade de vida para a paciente antes e após a cirurgia.

O uso de marcadores tumorais para câncer de ovário deveria ajudar na detecção da doença, porém os mesmos apresentam aceitável sensibilidade e baixa especificidade (Suh *et al.*, 2010). Os estudos de associação de genes candidatos à suscetibilidade ao câncer de ovário oferecem alternativa potencial do uso destes polimorfismos como marcadores genéticos mais eficientes, o que pode contribuir para o aumento de qualidade dos métodos diagnósticos, bem como prognósticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a associação entre os polimorfismos rs13063604 e rs7650365 do gene *RUVBL1* e o câncer de ovário em uma amostra da população de Curitiba, Paraná.

3.2 Objetivos específicos

1. Replicar o estudo feito por *Notaridou et al, 2011*.
2. Desenhar os iniciadores para os polimorfismos rs13063604 e rs7650365.
3. Determinar os genótipos das amostras de DNA obtidas considerando os polimorfismos rs13063604 e rs7650365 do gene *RUVBL1*.
4. Investigar a possibilidade de associação entre os alelos encontrados e o câncer de ovário por análise estatística.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Tumores de ovário

O ovário é composto de células germinativas, células estromais que produzem estrógeno e progesterona, e células epiteliais (Romero e Bast, 2012). O ovário apresenta a maior diversidade de tumores do corpo, o que caracteriza o câncer ovariano como um grupo muito heterogêneo de doenças (Kuhn *et al.*, 2012). Alguns estudos epidemiológicos sugerem que o câncer ovariano está relacionado à ovulação, baseados na redução do risco em mulheres que têm filhos, assim como naquelas que utilizam anticoncepcionais (Sueblinvong e Carney, 2009). De acordo com a Teoria de Fathala (Risch, 1998), a ovulação constante causa ruptura, trauma e reparo tecidual repetidamente, o que danifica o DNA e pode levar à transformação neoplásica do epitélio superficial ovariano. Entretanto, mulheres com a síndrome ovariana policística, que utilizam anticoncepcionais orais à base de progesterona como inibidores da ovulação, têm risco aumentado de câncer ovariano epitelial (Saad *et al.*, 2011).

De modo geral, a ocorrência de câncer de mama, de útero ou colorretal, histórico familiar e a ingestão do hormônio estrogênio (sem progesterona) por 10 anos ou mais são considerados fatores de risco para câncer de ovário (Sueblinvong e Carney, 2009). Gravidez, ingestão de anticoncepcional oral, amamentação e alguns anti-inflamatórios parecem reduzir o risco de câncer de ovário, câncer de cólon e de mama (Orita *et al.*, 1989; Antoniou *et al.*, 2009). Dos conjuntos de fatores que estão associados ao risco de câncer de ovário, o histórico familiar sobrepõe todos os outros. A presença de dois familiares de primeiro grau com a doença aumenta o risco para 5% de desenvolver câncer ovariano ao longo da vida, sendo que o risco da população geral é na ordem de 1,4%. Estudos evidenciam um aumento significativo de outros tipos de câncer, como mama, endométrio e cólon, entre familiares da mulher com este tipo de neoplasia (Ambrigs, 2009).

Tumores ovarianos geralmente crescem silenciosamente e são classificados em benignos, malignos ou *borderlines*. Seu comportamento apenas pode ser previsto após a definição histológica do tumor (Moulla *et al.*, 2013). Há uma classificação para os tumores de ovário: tumores ovarianos epiteliais, tumores de células germinativas e tumores estromais gonadais, sendo que para cada categoria

há uma origem distinta. Os tumores ovarianos epiteliais são responsáveis por 90% dos casos e originam-se a partir do epitélio superficial do ovário; já os tumores de células granulosas que estão presentes em 7% dos casos, têm a origem a partir de células estromais; e os tumores de células germinativas são atribuídos apenas em 3% dos casos e derivam dos ovócitos (Romero e Bast, 2012).

O câncer de ovário é a principal causa de morte por neoplasia ginecológica, sendo caracterizado pela disseminação loco-regional na cavidade peritoneal e pela presença de metástases viscerais (Han *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2012; Nolen e Lokshin, 2012). Observa-se um índice de 30% de sobrevida em 5 anos após o diagnóstico (Chan *et al.*, 2007). Segundo os dados mais atuais do INCA (Instituto Nacional do Câncer), ocorreram 2979 mortes por câncer de ovário em 2010 e foram previstos 6190 novos casos em 2012 com 3,3% dentre as dez neoplasias femininas mais incidentes, sendo que na região Sul do Brasil encontra-se a maior taxa de incidência, variando de 6,35 a 9,27 casos para cada 100.000 mulheres. O Paraná tem uma taxa estimada de 6,80 casos a cada 100 000 mulheres, o que equivale ao dobro da taxa prevista para outros estados brasileiros (INCA, 2013). Para o ano de 2013 foram estimadas 15.000 mortes nos Estados Unidos (*American Society Cancer*, 2013) e no mundo mais do que 200.000 mortes decorrentes de câncer de ovário e endométrio devem ser observadas (Kinde *et al.*, 2013).

Pacientes com câncer de ovário têm se beneficiado dos avanços da pesquisa no sentido de aumentar o tempo de sobrevivência após o diagnóstico da doença, o que se efetiva através da quimioterapia e avanços nas técnicas cirúrgicas (Kunn, *et al.*, 2012). Em contrapartida, a mortalidade não tem sido reduzida, talvez pela falta de entendimento adequado dos eventos precoces da carcinogênese ovariana (Buys *et al.*, 2011). Estudos recentes sugerem fortemente que o início do câncer ovariano ocorra fora do ovário, indicando a tuba uterina como sendo o local precursor para tumores serosos pélvicos por apresentar lesões pré-malignas que antecedem o carcinoma seroso (Saad *et al.*, 2011).

Num esforço de replicar o sucesso da triagem com câncer cervical, que desde a introdução do teste Papanicolau, teve sua incidência e mortalidade reduzidas em mais que 75%, uma das abordagens para tentar melhorar o diagnóstico em câncer ovariano tem sido feita pela combinação dos resultados do exame de ultrassonografia transvaginal e da avaliação de CA-125 (também chamado de MUC16). Este último é uma glicoproteína transmembrana de alta massa molecular, expressa pelo epitélio mülleriano em 80 % dos casos de câncer ovariano. É utilizado

no monitoramento de resposta à quimioterapia, indicando a presença de doença residual em mais de 90% dos casos (Romero e Bast, 2012). Todavia esse marcador encontra-se em níveis elevados em condições benignas, tais como endometriose, doenças inflamatórias pélvicas, cistos ovarianos, o que limita a sua especificidade enquanto marcador para o câncer de ovário (Kinde *et al.*, 2013).

Esforços concentram-se em diagnosticar mais precocemente a doença a fim de se estabelecer um tratamento mais eficiente (Kinde *et al.*, 2013). Porém se pensarmos em cura, não há estudos conclusivos sobre as lesões precursoras do câncer ovariano, quando comparados aos cânceres de próstata, endométrio e pâncreas, que possuem lesões iniciais (Buys *et al.*, 2011), possibilitando um diagnóstico precoce (não metastático) e uma sobrevida maior (Danesh *et al.*, 2012).

Em função da maior parte dos casos reportarem-se ao tipo epitelial, um detalhamento maior será a respeito desta categoria.

4.1.1 Câncer de ovário epitelial

Cânceres ovarianos epiteliais compreendem diferentes tipos histológicos, os quais podem ser agrupados em duas principais categorias, no que se refere à importância clínica e sua patogênese.

A primeira categoria inclui seroso de baixo grau, endometrióide de baixo grau, células claras e mucinoso (Kuhn *et al.*, 2011). Estes tumores normalmente apresentam-se como uma grande massa confinada a um ovário e com bom prognóstico. Eles são diagnosticados em estádios iniciais (1 e 2; Tabela 1), crescem lentamente e resistem à quimioterapia convencional, mas respondem bem ao tratamento hormonal (Shih e Kurman, 2004). Tais tumores desenvolvem-se continuamente de uma lesão precursora tais como *borderline* e endometriose (Kuhn *et al.*, 2011). O termo “seroso” tem sido usado para descrever o tipo de tumor com características morfológicas semelhantes às células epiteliais da tuba uterina

A segunda categoria inclui carcinoma seroso de alto grau, carcinoma endometrióide de alto grau, tumores malignos mesodermos (carcinosarcomas) e carcinomas indiferenciados, nos quais se observa um crescimento agressivo e quase sempre os estádios da doença encontram-se avançados (3 e 4; Tabela 1), respondem bem à quimioterapia tradicional, porém com menor frequência ao tratamento hormonal.

No Brasil, os tumores epiteliais são responsáveis por cerca de 90% dos cânceres ovarianos (INCA, 2012). Nos Estados Unidos, as frequências dos tumores de ovário do tipo epitelial são: seroso de alto grau: 60%, endometrióide: 15%, células claras: 15%, seroso de baixo grau: 8%, mucinoso: 2%, célula de transição: 2% e outros: 3% (Kinde *et al.*, 2012).

4.1.2 Estádios para câncer de ovário

A Tabela 1 mostra os estádios convencionais para o câncer ovariano.

Tabela 1. Estádios convencionais para câncer ovariano

Estádios	Descrição
1	tumor limitado ao ovário ou ambos ovários
A	um ovário envolvido
B	ambos ovários envolvidos
C	tumor limitado ao ovário com ascite, lavagens peritoneais positivas, envolvimento de superfície ou ruptura presente
2	tumor ovariano com extensão pélvica
3	tumor envolvendo a parte posterior do abdômen ou linfonodos
4	envolvimento de órgãos distantes (incluindo a efusão pleural maligna e envolvimento parenquimatoso de fígado ou baço)

Fonte: B. T. Henessy, 2009.

Cerca de 3/4 dos tumores malignos de ovário apresentam-se em estádios avançados (estádios 3 e 4) no momento do diagnóstico, pois não há aparecimento de sintomas característicos inicialmente (Demsky *et al.*, 2013). Porém, com o avanço da doença, podem aparecer dores abdominais, pélvicas, náuseas, indigestão, constipação e sensação de cansaço contínuo (INCA, 2013), sintomas estes que podem ser confundidos com outras doenças (Suh *et al.*, 2010). O câncer de ovário pode ser diagnosticado pela ultrassonografia transvaginal e marcadores tumorais, (Nolen e Lokshin, 2012), por exemplo, o CA125, a alfafproteína, ECA (antígeno carcino-embrionário) e o beta HCG, que são detectados no exame de sangue e que aumentam na presença de tumores malignos.

4.2 Genes e câncer

O câncer, ou neoplasia maligna, é caracterizado por mutações em genes que desempenham funções no controle do ciclo celular e na apoptose (Croce e Carlo, 2008). Assim, células com estas mutações escapam dos mecanismos de controle do ciclo celular e proliferam muito. Este fato faz com que elas percam a capacidade de aderência, passem a secretar enzimas que atacam a matriz extracelular, invadam tecidos vizinhos, penetrem nos vasos sanguíneos e linfáticos e se espalhem pelo corpo, produzindo tumores secundários; as metástases (Cesari *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2012).

Há dois grupos principais de genes que estão envolvidos no desenvolvimento do câncer. O primeiro é constituído pelos genes supressores de tumor (anti-oncogenes) que, ao perderem a sua função, contribuem para a perda do controle do ciclo celular e para a proliferação celular. Estes genes são considerados os guardiões das células por executarem a verificação de pontos críticos de regulação da progressão do ciclo celular e induzirem a apoptose. Entre eles estão os genes *RB* (*retinoblastoma 1*) e *TP53* (*tumor protein p53*). O outro grupo é formado pelos oncogenes, que numa célula normal localizam-se nos cromossomos como proto-oncogenes. Estes quando ativados por mutações pontuais ou outros mecanismos como a amplificação do gene (aumento em seu número de cópias, o que leva o aumento da oncoproteína) podem ser convertidos em oncogenes, estimulando assim a proliferação celular e interferindo na apoptose (Zhao e Sun, 2012).

4.2.1 Genes e câncer de ovário

Os eventos genéticos moleculares envolvidos no início do desenvolvimento do câncer de ovário vêm sendo bastante estudados (Landen, Birrer e Sood, 2008). Alguns tumores familiares podem ser explicados pela presença de mutações em genes específicos tais como o *PTEN*, *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2* e o *CDKN1B*, que têm sido bastante estudados em tumores de origem ginecológica (Bansal *et al.*, 2009). Mutações germinativas são responsáveis por cerca de 10% das malignidades ovarianas e comumente envolvem *BRCA1* e *BRCA2* (Saad *et al.*, 2011).

Muitos oncogenes têm sido estudados na patologia ovariana (Saad *et al.*, 2011; Kuhn *et al.*, 2012). Um exemplo é *SRC* (*v-src avian sarcoma Schmidt-Ruppin*

A-2 viral oncogene homolog) que codifica para uma tirosina quinase que desempenha função importante na proliferação, adesão e sobrevivência celular, bem como na angiogênese e resistência a drogas quimioterapêuticas (Han *et al.*, 2006). A superexpressão de *SRC* é encontrada em 93% dos cânceres ovarianos em estádios tardios (Wiener *et al.*, 2003). Outros oncogenes expressos na tumorigênese ovariana são *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) (Bartlett *et al.*, 1996) e *KRAS* (*kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*). Mutações em *KRAS* foram detectadas em 61% dos tumores *borderline*, 68% dos tumores de baixo grau, 50% dos adenocarcinomas mucinosos e 5% dos carcinomas serosos de alto grau (Singer *et al.*, 2003).

Anomalias nas proteínas do ciclo celular são observadas num processo de transformação maligna que precede a tumorigênese, sendo um exemplo dessa mediação as ciclinas dependentes de quinase (CDK), os inibidores de CDK e fatores de transcrição codificados por genes como *TP53* e *E2F* (*E2F transcription factor 1*) (Sui *et al.*, 2001). A ciclina E está associada com prognósticos piores das pacientes e é expressa em 40% dos tumores *borderline* e em 70% dos tumores malignos, enquanto que em tumores benignos a sua expressão é de 9% (Sui *et al.*, 2001). A ciclina dependente de quinase (Cdk2), outra proteína envolvida na transição da fase G1 para a S, encontra-se também elevada nos tumores ovarianos malignos de alto grau quando comparada aos de baixo grau ou benignos (Sui *et al.*, 2001). A ciclina D1 é abundantemente encontrada no citoplasma de células de câncer ovariano (89%) e nos seus núcleos (30%), sendo raramente encontrada nas células epiteliais normais (Dhar *et al.*, 1999). *CDK1* (*cyclin-dependent kinase 1*) que regula a fase M do ciclo celular, está altamente expresso em 80% das células malignas, mas indetectável em células epiteliais ovarianas normais (Saad *et al.*, 2011).

Recentemente o gene *PARK2* (*parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase*) foi sugerido como forte candidato a gene supressor de tumor e parece estar envolvido no desenvolvimento de tumores ovarianos (Cesari *et al.*, 2003). A deleção no braço longo do cromossomo 6 é associada com muitos tumores sólidos, incluindo carcinomas de ovário. No entanto, essa mesma deleção está presente em tumores ovarianos benignos, sugerindo que alterações em um ou mais genes representam um evento precoce da tumorigênese ovariana (Cesari *et al.*, 2003).

Em cânceres epiteliais do tipo seroso de baixo grau, endometrióide de baixo grau, células claras e mucinoso foi descrita uma variedade de mutações somáticas que envolvem os genes *ARID1A* (*AT rich interactive domain 1A SWI-like*) (Jones *et*

al., 2011), *BRAF* (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*) (Robert *et al.*, 2012), *CTNNB1* (*catenin cadherin-associated protein, beta 1*) (Robert *et al.*, 2012), *KRAS* (Jones *et al.*, 2012), *PIK3CA* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*) (Robert *et al.*, 2012), *PPP2R1A* (*protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha*) (Robert *et al.*, 2012), e *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*) (Shih e Kurman, 2004), raramente *BRCA1*, *BRCA2* (*breast cancer 2, early onset*) ou *TP53* (Kuhn *et al.*, 2011). O carcinoma seroso de alto grau apresenta-se com mutações do gene *TP53* em mais de 95% dos casos (Kuhn *et al.*, 2013).

Em 2011, foram descritas associações de dois polimorfismos, rs13063604 e rs7650365, no gene *RUVBL1*, conferindo um risco aumentado ao câncer ovariano seroso [HetOR= 1.42 (1.15-1.74) e HomOR= 1.63 (1.10-1.42), $p=0,0002$] e [HetOR= 0.97 (0.80-1.17), HomOR= 0.74 (0.58-0.93), $p=0.009$], respectivamente (Notaridou *et al.*, 2011).

4.2.2 O gene *RUVBL1*

O DNA genômico é exposto, ao longo da vida, a danos exógenos e endógenos e por isso, é fundamental existirem mecanismos de reparo do DNA. Proteínas envolvidas no reparo têm papel fundamental, e entre elas, encontra-se a *RUVBL1* (Qiu *et al.*, 1998; Izumi *et al.*, 2012).

Os genes *RUVBL1* (*ruvb-like AAA ATPase 1*) e *RUVBL2* (*ruvb-like AAA ATPase 2*), codificam para as proteínas conhecidas como pontina e reptina, ou TIP48 e TIP49, respectivamente (Dutta, 2010). Estas proteínas são ATPases evolutivamente conservadas (Izumi *et al.*, 2012). TIP48 e TIP49 interagem uma com a outra e formam um duplo hexâmero, que provavelmente consiste de dois homo hexâmeros. Em algumas circunstâncias agem independentemente, tendo efeitos antagonistas. No entanto, em muitos casos aparecem como um complexo, agindo juntas em diversas funções celulares, sendo a sua função melhor compreendida a de controle da transcrição (Izumi *et al.*, 2012).

O gene *RUVBL1* possui 11 éxons, codifica para a proteína pontina que é formada por 456 aminoácidos (50 KDa), e é altamente homólogo ao gene *RUVB*, apresenta 42.857 pares de bases e localiza-se no cromossomo 3q21(região 2 banda1), uma região com frequente rearranjo em diferentes tipos de tumores sólidos

(Qiu *et al.*, 1998). Como nomes sinônimos ao gene *RUVBL1*, encontram-se *INO80H*, *NMP238*, *TIP48* (PONTIN), *TIP49A*, *POINTIN52*, *TAP54 α* e *ECP54*.

A pontina participa ativamente de inúmeros processos celulares importantes para a homeostasia celular, faz a hexamerização para a hidrólise de ATP, está envolvida na ativação da transcrição de genes selecionados por acetilação de histonas H4 e H2A, assim como no recrutamento para reparo do dano no DNA (Karagiannis e El-Osta, 2007).

O produto do gene *RUVBL1* desempenha uma função essencial na transformação oncogênica por *MYC* (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) e também modula a ativação da transcrição pelo complexo *LEF1/HNF1A* (*lymphoid enhancer-binding factor 1*), (*HNF1 homeobox A*) - *CTK1B*, essencial para a proliferação celular, além de interagir com proteínas de ligação ao TATA Box, age como cofator para a transcrição de genes (Bereshchenko *et al.*, 2012). O complexo *RUVBL1/RUVBL2* participa na manutenção dos telômeros e conseqüentemente a depleção de *RUVBL1* reduz severamente a atividade da telomerase, responsável pela integridade e capeamento dos telômeros nos cromossomos (Venteicher *et al.*, 2009). Quando a telomerase está diminuída, os cromossomos são expostos a defeitos permitindo que p53 e demais proteínas iniciem a apoptose (Saad *et al.*, 2011).

Num estudo em que se usou uma fluorescência específica para telômeros em carcinoma intraepitelial tubal seroso – um precursor do carcinoma seroso de alto grau - estavam 82 % dos casos com telômero encurtado quando comparados às células normais, sugerindo que a atividade da telomerase é uma ocorrência importante na iniciação da tumorigênese ovariana (Kuhn *et al.*, 2010).

O produto do gene *RUVBL1* está envolvido na mitose, uma vez que interage com as tubulinas. Apresenta-se como ativador e regulador da cromatina (controlando a sua abertura e fechamento), além de atuar como helicase (Izumi *et al.*, 2012; Bereshchenko *et al.*, 2012).

Ocorre também a superexpressão do gene *RUVBL1* em carcinoma hepatocelular (Haurie *et al.*, 2009) e é observado em cânceres de cólon (Carbson *et al.*, 2003) e próstata (Kim *et al.*, 2007). Foi sugerido como alvo de estudos para a terapia do câncer, o complexo *RUVBL1/RUVBL2* em função de estarem envolvidos na transformação celular mediada por c-Myc e na metástase do câncer através da regulação da transcrição da β -catenina. A supressão do complexo *RUVBL1/RUVBL2* induz a diminuição da apoptose das células tumorais (Izumi *et al.*, 2012).

4.3 Estudos de associação

Um dos maiores desafios atuais da genômica é proporcionar benefícios clínicos para a população em geral. A diversidade genética no genoma humano deve ser considerada na identificação de fatores genéticos específicos que podem estar associados aos riscos de doenças, incidência e severidade, entre as diferentes populações, o que contribuirá diretamente na melhora dos diagnósticos, tratamento e prevenção das doenças. Tais avanços têm mudado a prática médica e contribuem para direções futuras, no sentido de cuidados clínicos estarem baseados na informação genômica (Kricka e Resta, 2013).

Uma ferramenta valiosa como modelo de estudo para correlacionar genes e doenças é o estudo de associação.

Estudos de associação baseiam-se na comparação das frequências alélicas de um marcador genético entre os indivíduos afetados e não afetados por uma doença. Um alelo determinado é considerado associado com o fenótipo estudado quando tem a sua ocorrência diferenciada entre indivíduos afetados comparados ao grupo controle de não afetados. Esses estudos implicam na utilização de uma população de indivíduos não aparentados, assim como leva em conta informações referentes à origem, sexo, etnia, idade, entre outras. Na seleção dos casos, em primeiro lugar, leva-se em conta a definição clara do diagnóstico, baseada na clínica e em testes laboratoriais. Tais associações têm a capacidade de detectar efeitos genéticos e analisar genes candidatos à susceptibilidade de determinada doença.

O estudo da variabilidade genética em genes tais como *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51C* e *RUVBL1*, que podem apresentar relação funcional com o desenvolvimento do câncer de ovário em uma análise de associação poderia facilitar o entendimento deste tipo de tumor, na determinação de que pacientes apresentam maior ou menor risco para o desenvolvimento deste tipo de câncer. Isto faria com que a análise dos genes acima mencionados pudesse se tornar uma importante ferramenta em triagem populacional (Vaughan *et al.*, 2012).

Durante os últimos anos, numerosos estudos têm reportado a descrição de SNPs (*single nucleotide polymorphism*) conferindo susceptibilidade às doenças, incluindo muitos cânceres. A maioria dos estudos de associação genética para o câncer ovariano têm usado a seleção de genes candidatos a partir das vias incluindo o metabolismo de hormônios, o reparo do DNA, o controle do ciclo celular, assim como oncogenes e genes supressores tumorais (Easton e Eeles, 2008).

Os SNPs constituem verdadeiramente um elemento-chave para a compreensão da variabilidade genética humana e sua associação com doenças distintas. Os estudos com os SNPs tem o intuito de investigar o potencial destes polimorfismos como marcadores genéticos de susceptibilidade ou proteção em distintas patologias.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Recrutamento das amostras

As pacientes incluídas no estudo foram recrutadas no ambulatório de oncologia ginecológica do Hospital Erasto Gaertner, Curitiba, Paraná – LIGA Paranaense de Combate ao Câncer, no período de 2012 e 2013. Para tanto, analisaram-se os prontuários eletrônicos a fim de se realizar uma triagem inicial das mulheres que apresentavam exames (ecografia e/ou ultrassonografia) que sugerissem tumores ovarianos. Numa segunda fase, levantaram-se informações gerais sobre laudos sugestivos encaminhados por postos de saúde e o histórico de exames laboratoriais, como por exemplo o CA 125 e exames não laboratoriais, tais como os de imagem (ecografia).

Eram atendidas em média de 3 a 4 pacientes por semana, selecionadas a partir da suspeita de tumor maligno através de exames de imagem, sem tratamento prévio e dentre elas havia três categorias: os casos novos acolhidos pela assistente social, as pacientes que iriam pegar o resultado dos exames e posteriormente eram encaminhadas para a cirurgia e aquelas que seriam acompanhadas em período de pós-operatório. Para evitar qualquer distorção em nossa análise, por exemplo, gerada pelo tempo de sobrevivência das pacientes, apenas foram recrutados os casos novos. Todas as pacientes foram atendidas pelos médicos especialistas José Clemente Linhares, Reitan Ribeiro e João Antonio Guerreiro. As informações clínicas referentes às pacientes estudadas foram coletadas diretamente nos prontuários eletrônicos, sob a supervisão dos médicos responsáveis, acima citados.

Foi coletado o sangue periférico das pacientes que apresentavam tumor ovariano, todas maiores de idade e que concordaram em participar voluntariamente da pesquisa. Foram excluídas as amostras das pacientes que não apresentaram qualidade técnica suficiente para a realização das genotipagens e cujos exames não puderam confirmar o diagnóstico de neoplasia maligna.

Todas as pacientes, bem como os controles, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), autorizando a sua participação na pesquisa, ficando com uma cópia do mesmo. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da PUCPR sob o número de parecer 0003983/10 intitulado “Análise genética

de predisposição ao câncer de ovário e mama: variabilidade germinativa versus variabilidade somática”.

5.2 Controles femininos adultos

Como controles foram usadas amostras de DNA do sangue de doadoras voluntárias recrutadas no Hemobanco, em Curitiba, Paraná, após assinatura do TCLE e confirmação de algumas informações referentes ao estado geral de saúde e casos de câncer de ovário na família.

5.3 Extração e purificação de amostras de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue periférico foi realizada de acordo com metodologia anteriormente descrita (John *et al.*, 1990) e modificada (Lahiri e Nurberger Jr, 1991).

Para a lise das hemácias foi utilizado o reagente NONIDET P40 AMRESCO. Após a lise foram realizadas sucessivas lavagens do *pellet* com TKM1 (Tris HCl pH7,6 1M; KCl 1M; MgCl₂ 1M e EDTA 0,1M). A seguir foi adicionado TKM2 (Tris HCl pH7,6 1M; KCl 1M; MgCl₂ 1M ; EDTA 0,1M e NaCl 1M) acrescido de 10% de SDS (*sodium dodecyl-sulphate*) para que houvesse a liberação do DNA. Esta mistura foi incubada em banho-maria a 55°C durante a noite.

Para precipitar as proteínas e separá-las do DNA foram adicionados 6 M de NaCl. Etanol a 20°C negativos foi empregado na precipitação das amostras de DNA e etanol 70% a 4°C na sua lavagem. Após a secagem do DNA este foi ressuspenso em tampão TE (Tris HCl pH 8,0 1M e EDTA 0,1M) para sua quantificação.

As amostras foram quantificadas e diluídas para uma concentração de 25 ng/μl. Elas foram congeladas até o momento de sua utilização.

5.4 Genotipagem

As amostras de DNA foram submetidas ao processo de amplificação por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para tanto foram

desenhados iniciadores (Tabela 2) com o auxílio do programa *Primer3* (<http://primer3.wi.mit.edu>). As condições de amplificação encontram-se na Tabela 3.

Tabela 2. Características dos iniciadores desenhados para cada sequência, identificando o nome do iniciador, sua respectiva sequência, tamanho em pares de base e temperatura de fusão (T_m).

Iniciador	Sequência	Tamanho (pb)	T_m (°C)	Amplicon (PB)
604 F	CTGCAGTGAGCTGTGATGGT	20	62	303
604 R	TGACTGCTCCAAAGGAAAGG	20	60	
365 F	CGGTTTTACCTTGGGTGTGT	20	60	296
365 R	CCAATTC AATGGCACTCTCC	20	60	

Tabela 3. Programas para amplificação das amostras.

rs13063604			rs 7650365		
Temperatura (°C)	Tempo (segundos)	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (segundos)	Número de ciclos
94°C	120	1	94°C	120	1
94°C	30	15	94°C	30	40
66° C	30		56° C	30	
72°C	45			30	
94°C	30	27	72°C	45	
56°C	30		72°C	180	
72°C	45			1	
72°C	180	1	72°C	180	1
10°C		1	10°C		1

A amplificação do rs13063604 e do rs7650365 foi obtida pela PCR que continha, em 25 μ l, 1 ng de DNA genômico de cada amostra, 10 pmol de cada iniciador direto e reverso, em tampão *Master Mix 2x BioLabs*.

Vinte por cento do produto de PCR, diluídos em tampão de corrida [1ul de *bluejuice 10X gel loading buffer* invitrogen, 65% de sacarose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA e 0.3% azul bromofenol], foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. A corrida foi realizada em tampão TBE 1X (tris-base 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM) por duas horas, com corrente elétrica de 60 mA a 70 V. As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta, após coloração do gel com

0,5 µg/ml de brometo de etídio. Os tamanhos esperados dos amplicons eram de 296pb para o rs7650365 e de 303pb para o rs1306604.

Os produtos de PCR foram amplificados em termociclador *Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cyclor*, purificados e sequenciados. As reações de sequenciamento foram realizadas com o reagente *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* produzido pela *Applied Biosystems* de acordo com as instruções do fabricante. Os eletroferogramas foram analisados com o auxílio do programa Lasergene (DNASar).

5.5. Análise Estatística

Inicialmente as amostras foram testadas para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, e a significância das diferenças nas frequências observadas para os polimorfismos entre os grupos de pacientes e controles foi realizada por um teste padrão qui-quadrado e as diferenças foram consideradas significantes quando o valor de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Pacientes e controles

Foram obtidas amostras de 113 controles, 103 (91,2%) são eurobrasileiros e 10 (8,8%) são afrobrasileiros. Outras informações sobre os controles estão no Anexo 1. A média da idade dos controles é de $31 \pm 9,98$ anos.

As amostras das pacientes totalizam 25. As de origem eurobrasileira são 23 (92%) e as afrobrasileiras são 2 (8%). A média da idade destas pacientes é de $56 \pm 14,12$ anos. Todas as pacientes tiveram diagnósticos confirmados por análise de biópsia tumoral. Outras informações sobre as pacientes estão no Anexo 2.

6.2 Genotipagem

Todas as amostras obtidas de pacientes e controles foram amplificadas e sequenciadas para os dois polimorfismos testados. Resultados típicos da amplificação são apresentados nas Figuras 1 e 2, e alguns exemplos de eletroferogramas estão na Figura 3. As frequências alélicas e genotípicas obtidas estão nas Tabelas 4 e 5.

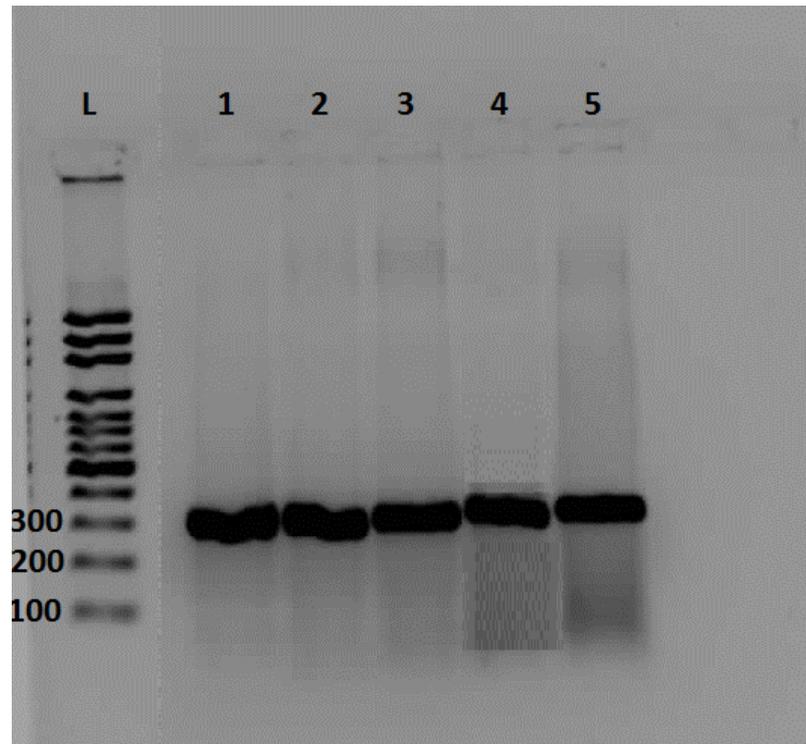


Figura 1. Perfil eletroforético, em matriz de gel de agarose 1 %, da amplificação do rs13063604 do gene *RUVBL1*. Números 1 a 5 representam 5 pacientes; números 100, 200 e 300 representam 100pb, 200pb e 300 pb; L - Ladder (*1kb Plus DNA Ladder, Invitrogen*)

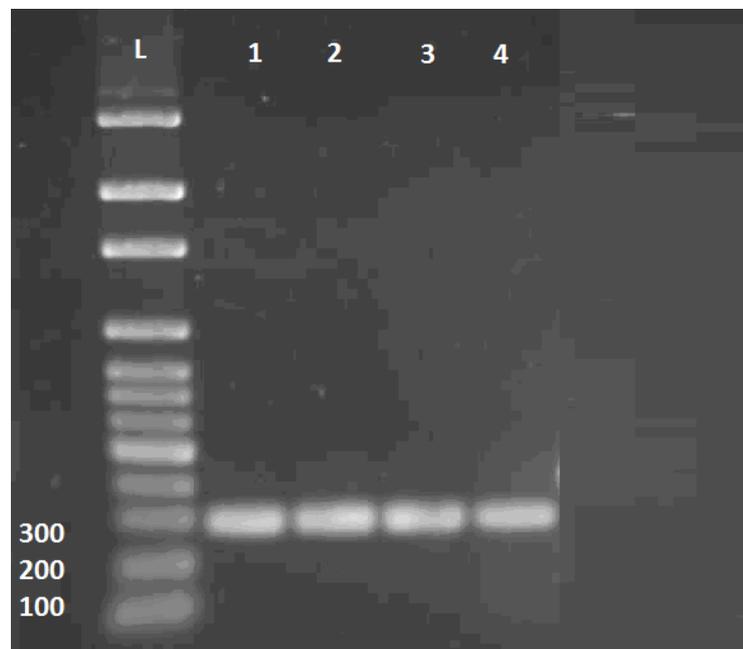


Figura 2. Perfil eletroforético, em matriz de gel de agarose 1%, da amplificação do rs7650365 do gene *RUVBL1*. Números 1 a 4 representam 4 pacientes; números 100, 200 e 300 representam 100pb, 200pb e 300 pb; L - Ladder (*1kb Plus DNA Ladder, Invitrogen*)

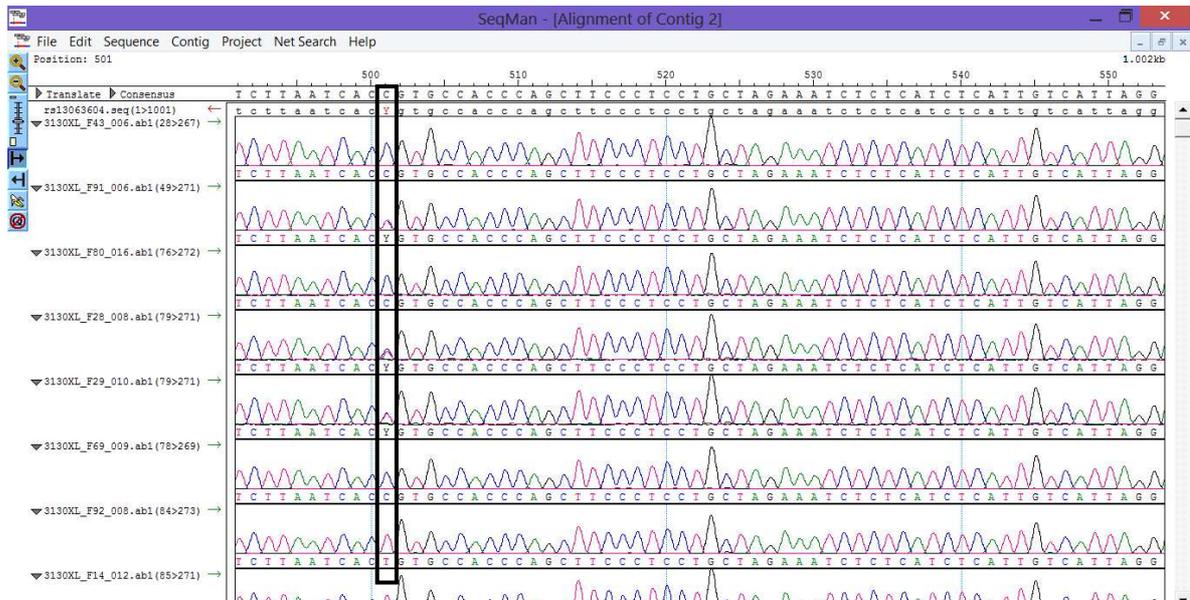


Figura 3. Eletroferograma representativo dos resultados obtidos – rs7650365. Verificação das bases na sequência do alinhamento, detectando uma troca de C>T.

Tabela 4. Frequências genotípicas e alélicas observadas em pacientes e controles, considerando o polimorfismo rs7650365.

Genótipo	Pacientes		Controles		χ^2	P
	N	%	N	%		
T/T	4	16	18	15,9	0,33	0,6
T/G	9	36	53	46,9		
G/G	12	48	42	37,2		
Total	25	100	113	100		
Alelo	N	%	N	%	0,5	0,6
T	17	34	43	19		
G	32	66	183	81		
Total	50	100	226	100		

Observações: O valor de $\chi^2 = 0,33$ e $p=0,6$ para as frequências genotípicas e $\chi^2 = 0,5$ e $p=0,6$ para as frequências alélicas, não associando o polimorfismo com o câncer de ovário.

Tabela 5. Frequências genotípicas e alélicas observadas em pacientes e controles, considerando o polimorfismo rs13063604.

Genótipo	Pacientes		Controles		χ^2	P
	N	%	N	%		
T/T	1	4	6	5,3	0,25	0,6
T/G	8	32	31	27,4		
G/G	16	64	76	67,3		
Total	37	100	113	100		
Alelo	N	%	N	%	χ^2	P
T	10	20	43	19	0,003	0,9
G	40	80	183	81		
Total	50	100	226	100		

Observações: O valor de χ^2 é 0,25 e $p=0,6$ para as frequências genotípicas e $\chi^2 = 0,003$ e $p= 0,9$ para as frequências alélicas, o que sugere a hipótese de não associação do polimorfismo com o câncer de ovário.

6.3 Análise de associação

As frequências alélicas e genotípicas observadas estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg e são semelhantes entre pacientes e controles para rs7650365 cujos valores das frequências genotípicas esperados para T/T foram de 18,01%, para T/G de 50,77% e para G/G de 44,22%. Para o rs13063604 os valores das frequências genotípicas esperadas foram para T/T de 5,73%, para T/G de 31,93% e para G/G de 75,33%.

Como resultado para o teste do χ^2 foram obtidos para o rs7650365 nas frequências genotípicas $\chi^2 = 0,33$ e $p = 0,6$; e para as frequências alélicas do mesmo marcador foram encontrados os valores de $\chi^2 = 0,5$ e $p = 0,6$. No que se refere ao rs13063604 as frequências genotípicas apresentaram um $\chi^2 = 0,25$, com os valores de $p = 0,6$; sendo que para as frequências alélicas o $\chi^2 = 0,0032$ e $p= 0,9$.

7. Discussão

O presente estudo investigou a possibilidade de associação entre os polimorfismos rs7650365 e rs1303604, tagSNPs, no gene *RUVBL1* e o câncer de ovário em uma amostra de pacientes de Curitiba.

Evidências de associação destes polimorfismos com câncer de ovário foram inicialmente encontradas em um estudo que combinou os diferentes subtipos histológicos. Quando esta análise restringiu-se ao subtipo seroso a associação dos dois polimorfismos acima citados também foi sugerida, no entanto, quando houve a replicação do estudo, apenas o rs13063604 permaneceu como associado ao câncer de ovário (Notaridou *et al.*, 2011).

Com a finalidade de pesquisar se tal associação também está presente em nossa população, pacientes com câncer de ovário do Hospital Erasto Gaertner, Curitiba, Paraná – LIGA Paranaense de Combate ao Câncer – foram recrutadas, bem como controles femininos do Hemobanco de Curitiba. Após a extração e amplificação das amostras de DNA os amplicons foram purificados e sequenciados. Assim, foram obtidos os genótipos para o cálculo e análise das frequências alélicas e genotípicas.

Os resultados obtidos não mostram associação entre o rs7650365 com o câncer de ovário na amostra estudada ($\chi^2 = 0,5$ e $p = 0,6$, frequências alélicas), nem com o rs13063604 ($\chi^2 = 0,0032$ e $p = 0,9$, frequências alélicas).

Um aspecto importante é o tamanho amostral, que pode estar limitando a captura do eventual efeito gerado pelo rs7650365 e rs13063604. Durante aproximadamente um ano de coleta, foram obtidas amostras de 20 pacientes, já que a maioria foi recrutada no ano de 2013. As pacientes mostraram-se receptivas à ideia de participar do estudo e, portanto, foram coletadas amostras de quase todos os casos novos atendidos neste período no referido hospital.

Mais um ponto relevante que pode ser apontado como uma limitação do estudo é a diferença de idade entre pacientes e controles. A idade média dos controles ($31 \pm 9,98$) é menor em relação à das pacientes ($56 \pm 14,12$), este fato pode trazer um viés para a análise, já que a maioria dos controles não atingiu a idade mais comum de manifestação da doença. No entanto, todos os controles eram questionados durante o recrutamento sobre a ocorrência de tumores na família. Foram incluídos no estudo apenas os que responderam negativamente. Todavia,

esta só é útil nos casos de câncer hereditário; não valendo para os casos de mutação *de novo*, ou seja, para os casos esporádicos. Na amostra estudada, apenas uma paciente relatou ter tido a mãe falecida em decorrência do câncer de ovário.

Um importante desenvolvimento nos últimos anos é o reconhecimento de que todos os cânceres resultam de mutações num grupo de genes e em vias de sinalização através da ação desses genes (Kinde *et al.*, 2013). Evidências sugerem que o gene *RUVBL1* desempenha importantes funções no desenvolvimento do câncer ovariano e sua expressão encontra-se aumentada nos cânceres de mama, cólon e pulmão (Notaridou, 2011). Todavia, é possível afirmar que o rs13063604, um polimorfismo intrônico, possa estar envolvido na alteração de expressão da proteína. Mais provável, é que este polimorfismo seja um marcador para uma variação funcional, ou seja, que esteja em desequilíbrio de ligação com uma variação causal.

Ambas as amostras são heterogêneas quanto aos subtipos histológicos. A distribuição histológica do câncer ovariano observado no presente estudo é consistente com os dados publicados na literatura, sendo 80% das pacientes diagnosticadas com o tipo epitelial, 12% *borderline* e 8% estromais de células granulosas.

A descoberta de variantes genéticas associadas ao risco de desenvolvimento de câncer de ovário, à resposta terapêutica e à sobrevida pós-tratamento pode prover abordagens moleculares para o cálculo de risco, monitoramento de resposta terapêutica, prognóstico e, especialmente importante no câncer de ovário, diagnóstico precoce (Meng *et al.*, 2013; Ricci *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2013).

Assim, devemos considerar que mais estudos são necessários para uma melhor compreensão do papel da variabilidade do gene *RUVBL1* no câncer de ovário, uma doença que hoje é considerada como a neoplasia ginecológica mais fatal em mulheres do mundo todo e com alta heterogeneidade.

A busca por marcadores genéticos que possam compor um método diagnóstico precoce do câncer de ovário é fundamental para a redução da mortalidade desta doença e aumento da qualidade de vida das pacientes em tratamento.

8. Conclusão

Não há associação dos polimorfismos rs7650365 e rs13063604 com o câncer de ovário.

9 REFERÊNCIAS

- AHMED, A. A. *et al.* The origin of ovarian cancer. **International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 119, p. 14-136, ago. 2011.
- ANTONIOU, A. C. *et al.* Reproductive and hormonal factors, and ovarian cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the International BRCA1/2 Carrier Cohort Study. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 18, n. 2, p. 601–10, fev. 2009.
- APPEL M, Mônego H, Ramos JGL, Poli Meh, Stein AT, Jussara Munareto Silva JM, Bernd FF, Bersch GP. Rastreamento e diagnóstico do câncer de ovário. **Revista da AMRIGS**, v. 53, n. 3. p. 313-318, 2009.
- BANSAL, N. *et al.* The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. **Cancer control: journal of the Moffitt Cancer Center**, v. 16, n. 1, p. 8–13, jan. 2009.
- BARTLETT, J. M. *et al.* The prognostic value of epidermal growth factor receptor mRNA expression in primary ovarian cancer. **British journal of cancer**, v. 73, n. 3, p. 301–6, fev. 1996.
- BERESHCHENKO, O. *et al.* Pontin is essential for murine hematopoietic stem cell survival. **Haematologica**, v. 97, n. 9, p. 1291–4, set. 2012.
- CESARI, R. *et al.* Parkin, a gene implicated in autosomal recessive juvenile parkinsonism, is a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q25-q27. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 10, p. 5956–61, 13 maio. 2003.
- DANESH, K. *et al.* A branching process model of ovarian cancer. **Journal of theoretical biology**, v. 314, p. 10–5, 7 dez. 2012.
- DEMSKY, R. *et al.* Keeping it simple: Genetics referrals for all invasive serous ovarian cancers. **Gynecologic Oncology**, 2013.
- DHAR, K. K. *et al.* Expression and subcellular localization of cyclin D1 protein in epithelial ovarian tumour cells. **British journal of cancer**, v. 81, n. 7, p. 1174–81, dez. 1999.
- DOYON, Y. *et al.* Structural and Functional Conservation of the NuA4 Histone Acetyltransferase Complex from Yeast to Humans. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 5, p. 1884–1896, 2004.
- EASTON, D. F.; EELES, R. A. Genome-wide association studies in cancer. **Human molecular genetics**, v. 17, n. R2, p. R109–15, 15 out. 2008.
- HAN, L. Y. *et al.* Antiangiogenic and antitumor effects of SRC inhibition in ovarian carcinoma. **Cancer research**, v. 66, n. 17, p. 8633–9, 1 set. 2006.

- HENNESSY, B. T.; MARKMAN, M. Development of novel agents for ovarian cancer. **Update on Cancer Therapeutics**, v. 3, p. 19-32, 2009.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA) - BRASIL, 2012. Disponível em:<<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 16 de outubro de 2013.
- IZUMI, N. *et al.* Integrated regulation of PIKK-mediated stress responses by AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2. **Landes Bioscience**, p. 29-43, fev. 2012.
- JHA S.; DUTTA, A. RVB1RVB2 running rings around molecular biology. **Molecular Cell**, v. 34, n. 5, p. 521–533, 2010.
- JONES, S. *et al.* Frequent Mutations of Chromatin Remodeling Gene ARID1A in Ovarian Clear Cell Carcinoma. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 228–231, 2011.
- JONES, S. *et al.* Low-grade serous carcinomas of the ovary contain very few point mutations. **Journal of Pathology**, v. 226, n. 3, p. 413–420, 2012.
- KARAGIANNIS, T. C.; EL-OSTA, A. Chromatin modifications and DNA double-strand breaks: the current state of play. **Leukemia**, v. 21, n. 2, p. 195–200, fev. 2007.
- KINDE, I. *et al.* Evaluation of DNA from the papanicolaou test to detect ovarian and endometrial cancers. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 167, p. 167ra4, 9 jan. 2013.
- KUHN, E. Ovarian Cancer Is an Imported Disease: Fact or Fiction? **Current Obstetrics and Gynecology Reports**, v. 1, n. 1, p. 1–9, mar. 2012.
- KUHN, E. *et al.* Shortened telomeres in serous tubal intraepithelial carcinoma: an early event in ovarian high-grade serous carcinogenesis. **American Journal Surgery Pathology**, v. 34, n. 6, p. 829-836, jun. 2010.
- LANDEN, C. N. *et al.* Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 26, n. 6, p. 995–1005, 20 fev. 2008.
- LAHIRI DK e NURNBERGER JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res.** **19**(19):5444, 1991.
- LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. **The Journal of cell biology**, v. 196, n. 4, p. 395–406, 20 fev. 2012.
- MENG QH, XU E, HILDEBRANDT MA, LIANG D, LU K, YE Y, WAGAR EA, Wu X. Genetic Variants in the Fibroblast Growth Factor Pathway as Potential Markers of Ovarian Cancer Risk, Therapeutic Response, and Clinical Outcome. **Clin Chem.** 2013 Oct 21.
- NOLEN, M. B. *et al.* Protein biomarkers of ovarian cancer : the forest and the trees. **Future Oncology**, v. 8, n. 1, p. 55–71, jan. 2012.
- NOTARIDOU, M. *et al.* Common alleles in candidate susceptibility genes associated with risk and development of epithelial ovarian cancer. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 9, p. 2063–2074, mai. 2011.

- ORITA, M. *et al.* Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 8, p. 2766–70, abr. 1989.
- QIU, X. B. *et al.* An eukaryotic RuvB-like protein (RUVBL1) essential for growth. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 43, p. 27786–93, 23 out. 1998.
- RICCI MT, PENNESE L, GISMONDI V, PERFUMO C, GRASSO M, GENNARO E, BRUZZI P, VARESCO L. The FMR1 CGG repeat test is not a candidate prescreening tool for identifying women with a high probability of being carriers of BRCA mutations. **European Journal Human Genetics**. 2013 Sep 25. doi: 10.1038/ejhg.2013.193.
- RISCH, H. A. Hormonal Etiology of Epithelial Ovarian Cancer With a Hypothesis Concerning the Role of Androgens and Progesterone. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 23, 2 dez 1998.
- ROBERT J. KURMAN; IE-MING SHIH. Molecular Pathogenesis and Extraovarian Origin of Epithelial Ovarian Cancer. **Human Pathology**, v. 42, n. 7, p. 918–931, 1 jul. 2012.
- ROMERO, I.; BAST, R. C. Human Ovarian Cancer: Biology, Current Management, and Paths to Personalizing Therapy. **Endocrinology**, v. 153, n. 4, p. 1593–1602, abr. 2012.
- SAAD, A. *et al.* Microenvironment and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer. **Horm Cancer**, v. 1, n. 6, p. 277–290, 23 out. 2011.
- SHIH, I.-M.; KURMAN, R. J. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1511–1518, maio. 2004.
- SINGER, G. *et al.* BRIEF Mutations in BRAF and KRAS Characterize the Development of Low-Grade Ovarian Serous Carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 6, p. 6–8, 19 mar. 2003.
- SUEBLINVONG, T.; CARNEY, M. E. Current understanding of risk factors for ovarian cancer. **Current treatment options in oncology**, v. 10, n. 1-2, p. 67–81, abr. 2009.
- SUH, K. S. *et al.* Ovarian cancer biomarkers for molecular biosensors and translational medicine. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 10, n. 8, p. 1069–83, nov. 2010.
- TANG Z, OW GS, THIERY JP, IVSHINA AV, KUZNETSOV VA. Meta-analysis of transcriptome reveals let-7b as an unfavorable prognostic biomarker and predicts molecular and clinical subclasses in high-grade serous ovarian carcinoma. **International Journal Cancer**. 2013 Jul 3. doi: 10.1002/ijc.28371.
- VAUGHAN, S. *et al.* Rethinking Ovarian Cancer: Recommendations for Improving Outcomes. **Nature Review Cancer**, v. 11, n. 10, p. 719–725, 21 jun, 2012.

- VENTEICHER, A. S. *et al.* Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly. v. 132, n. 6, p. 945–957, 2009.
- WEISKE, J.; HUBER, O. The histidine triad protein Hint1 interacts with Pontin and Reptin and inhibits TCF-beta-catenin-mediated transcription. **Journal of cell science**, v. 118, n. Pt 14, p. 3117–29, 15 jul. 2005.
- WU, Z. *et al.* MCAM is a novel metastasis marker and regulates spreading, apoptosis and invasion of ovarian cancer cells. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 33, n. 5, p. 1619–28, out. 2012.
- ZHAO, M. *et al.* Distinct and competitive regulatory patterns of tumor suppressor genes and oncogenes in ovarian cancer. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. e44175, jan. 2012.

ANEXO 1

Amostras dos controles

ID da amostra	Quantificação DNA(ng/μl)	Ratio	rs7650365		rs13063604		Idade
			Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	
6	269,6	1,87	G	G	G	G	41
30	2082,7	1,88	G	A	G	G	39
32	774,5	1,88	G	A	G	G	35
68	347,5	1,87	G	A	G	G	20
74	2284,6	1,81	G	G	G	G	23
102	1045,9	1,86	G	A	G	G	19
198	978,4	1,8	G	A	G	A	41
286	688,1	1,92	G	A	G	A	34
330	679,5	1,86	G	A	G	A	36
334	1020,6	1,89	G	G	G	G	22
336	1043,4	1,86	G	A	G	G	25
346	501,8	1,85	G	A	G	G	43
358	1012,6	1,85	G	G	G	G	44
368	1867,7	1,87	G	G	G	A	38
378	807,4	1,86	A	A	G	G	20
458	151,7	1,8	G	G	G	G	40
464	134,4	1,95	G	G	A	A	28
466	193,4	1,83	G	G	G	G	39
482	1104,4	1,87	G	A	G	A	15
494	1552,7	1,89	G	A	G	A	18
496	220,8	1,98	G	G	G	A	51
498	314,8	1,85	A	A	G	G	32
518	1188,8	1,85	G	G	G	G	27
538	357,7	1,87	G	A	G	A	36
544	372,7	1,89	G	A	G	A	47
612	135,2	1,85	G	A	G	G	25
630	671,8	1,89	G	A	G	G	40
638	807,3	1,88	A	A	G	G	43
640	312,1	2	G	A	G	G	30
642	1140,7	1,87	A	A	G	G	41
676	246,9	1,87	G	A	G	A	26
682	243,6	1,9	G	A	G	G	47
690	162	1,91	G	G	G	G	31
698	725,4	1,88	A	A	G	G	40
700	1119,3	1,89	G	A	G	G	52
704	686,7	1,9	G	A	G	G	25
722	598,3	1,89	G	G	G	G	43
764	106,6	1,84	G	A	G	G	45
766	124,4	1,86	G	A	G	G	25
768	151,7	1,9	G	A	G	G	29

ID da amostra	Quantificação DNA(ng/μl)	Ratio	rs7650365		rs13063604		Idade
			Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	
784	107,7	1,87	G	A	G	G	21
792	175,9	1,86	G	A	G	G	58
806	138,5	1,95	G	G	A	A	30
808	353	1,9	G	A	G	G	18
832	898,3	1,89	G	A	G	A	28
850	1309,5	1,88	G	G	G	G	40
852	635,4	1,87	G	G	G	A	37
858	165,5	1,88	G	A	G	G	22
864	187,1	1,89	G	G	G	A	40
870	168,1	1,9	G	G	G	G	21
884	827,3	1,91	G	A	G	G	24
886	208	1,88	A	A	G	G	21
904	267,2	1,82	G	A	G	G	19
906	206,5	1,85	A	A	G	G	19
908	856,1	1,81	G	A	G	A	18
922	334,9	1,86	G	A	G	G	37
932	211,5	1,86	G	A	G	A	18
936	395,8	1,85	A	A	G	G	19
938	451,3	1,89	A	A	G	G	15
952	409,6	1,86	G	A	G	G	20
960	243,7	1,85	G	G	G	A	27
964	403,9	1,91	G	G	G	A	23
970	349	1,82	G	G	G	A	42
972	595,1	1,98	G	A	G	G	30
974	668,5	1,97	G	A	G	G	27
978	279	1,89	A	A	G	G	21
986	506	1,85	G	A	G	G	21
1016	1936	1,88	G	A	G	G	49
1018	353,6	1,9	G	G	G	A	32
1022	913,6	1,85	G	G	G	G	52
1024	659	1,89	G	G	G	G	53
1028	998,1	1,88	G	G	G	A	32
1030	1258,1	1,88	G	A	G	G	37
1032	151,6	1,81	A	A	G	G	33
1034	712,8	1,86	G	A	G	A	25
1044	245	1,96	G	G	G	A	30
1046	660	1,85	A	A	G	G	33
1068	3669	1,89	G	G	G	G	28
1080	358,6	1,86	G	G	G	G	19
1082	1503,8	1,89	A	A	G	G	28
1094	3556,1	1,86	G	G	G	G	23
1096	488,2	1,83	G	A	G	A	33
1098	1009,6	1,86	G	A	G	G	46
1108	577	1,88	G	G	A	A	28
1112	545,2	1,88	G	A	G	G	30

ID da amostra	Quantificação DNA(ng/μl)	Ratio	rs7650365		rs13063604		Idade
			Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	
1116	454,6	1,86	G	G	G	G	26
1118	257,2	1,9	G	G	G	G	26
1122	722,8	1,87	A	A	G	A	22
1124	1709	1,88	A	A	G	G	38
1128	525,9	1,85	G	A	G	A	34
1136	2664,3	1,87	G	G	G	A	21
1140	2815,4	1,87	G	A	G	G	21
1142	645,9	1,84	A	A	G	G	21
1144	649,2	1,82	A	A	G	G	19
1146	263,5	1,82	A	A	G	G	20
1150	243	1,88	G	G	A	A	19
1156	585,7	1,85	G	A	G	A	18
1172	4639,3	1,87	G	A	G	G	42
1174	178,3	1,88	G	G	G	G	18
1182	713,4	1,81	A	A	G	G	29
1190	2254,3	1,88	A	A	G	G	34
1200	1370,6	1,87	G	G	G	G	42
1204	430,2	1,89	G	A	G	G	31
1206	1837,5	1,89	G	A	G	A	23
1212	187,1	1,81	G	G	G	G	26
1228	1380	1,87	G	G	A	A	27
1236	1378,9	1,85	G	A	G	G	28
1246	751	1,84	G	G	G	A	42
1248	3684,4	1,86	G	G	G	G	24
1256	1337,2	1,86	G	G	A	A	40
1260	564,5	1,86	G	A	G	G	36
1262	1328,2	1,87	G	A	G	A	29
1264	2635,8	1,88	G	G	G	A	44

ANEXO 2
Amostras das pacientes

ID da amostra	Ratio	Quantificação DNA(ng/μl)	rs7650365		rs13063604		Idade	Diagnóstico
			Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2		
10005123	1,8	62	G	G	G	G	50	Câncer de Células Transicionais do Ovário
10004469	1,79	151,2	A	A	G	G	45	Adenocarcinoma Pouco Diferenciado
10003704	1,73	21,7	A	A	G	G	50	Cistoadenocarcinoma
10004955	1,83	39,2	G	A	G	G	57	Adenocarcinoma Seroso
10005851	2,08	9,4	G	A	G	G	58	Adenocarcinoma Seroso
10005030	1,83	5776	G	G	G	G	59	Tumor de Células Claras
10006675	1,79	231,7	G	G	G	G	56	Cistoadenocarcinoma Seroso
10006908	1,85	745,9	G	A	G	A	73	Carcinoma Pouco Diferenciado
10006992	1,79	231,7	G	A	G	A	48	Adenocarcinoma Pouco Diferenciado
10007274	2,01	809	G	A	G	G	70	Neoplasia Maligna Pouco Diferenciada
11003232	1,87	776	G	G	G	G	75	Adenocarcinoma
13001723	1,88	582,7	G	G	G	G	52	Tumor Seroso <i>Borderline</i>
13003112	1,88	816,3	G	G	A	A	51	Adenocarcinoma Seroso
13003469	1,89	611,3	G	G	G	A	62	Cistoadenoma Mucinoso <i>Borderline</i>
13003440	1,87	848,6	A	A	G	G	62	Adenocarcinoma Seroso
13003236	1,87	586,4	G	A	G	G	69	Tumor de Células Granulosas
13003263	1,01	22,9	G	A	G	A	61	Adenocarcinoma
13004833	1,86	153,1	G	G	G	G	53	Adenocarcinoma
13004192	1,85	353,1	G	G	G	A	51	Tumor de Células Granulosas
13000813	1,87	423,9	G	G	G	A	18	Adenocarcinoma Seroso
13004227	1,82	1071	G	G	G	G	67	Carcinoma Mucinoso Maligno
13004437	1,9	1617	A	A	G	G	42	Tumor Mucinoso <i>Borderline</i>
1003663	1,89	2362	G	G	G	A	48	Carcinoma Mucinoso Diferenciado
13004334	1,66	13,5	G	A	G	A	85	Adenocarcinoma Pouco Diferenciado
13005183	1,89	119,8	G	A	G	G	27	Cistoadenoma Seroso <i>Borderline</i>