

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

GIANE PEREIRA DA COSTA SILVA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A VARIABILIDADE NO GENE *CDKN1B* E O RISCO DE  
DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER DE OVÁRIO**

CURITIBA  
2011

GIANE PEREIRA DA COSTA SILVA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A VARIABILIDADE NO GENE *CDKN1B* E O RISCO DE  
DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER DE OVÁRIO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito à obtenção ao título de mestre.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fábio R. Faucz

CURITIBA  
2011

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

Silva, Giane Pereira da Costa  
S586a Associação entre a variabilidade no gene CDKN1B e o risco de  
2011 desenvolvimento de câncer de ovário / Giane Pereira da Costa Silva ;  
orientador, Fábio R. Fauz. -- 2011.  
38 f. ; il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,  
Curitiba, 2011  
Inclui bibliografias  
Texto em português e inglês

1. Ovário - Câncer. 2. Câncer - Aspectos genéticos. 3. Carcinogênese.  
4. Quinases ciclina-dependentes. I. Fauz, Fábio Rueda. II. Pontifícia  
Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde. III. Título.

CDD 20. ed. – 610

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	02
1.1. CÂNCER DE OVÁRIO.....	03
1.2. O CÂNCER E A GENÉTICA.....	05
1.3. GENE CDKN1B.....	07
1.4. POLIMORFISMO p.V109G.....	08
1.5. IMPORTÂNCIAS DOS ESTUDOS GENÉTICOS.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. GERAL.....	12
2.2. ESPECÍFICO.....	12
3. ARTIGO.....	13
4. CONCLUSÃO.....	30
5. REFERÊNCIAS.....	31

## **1 – INTRODUÇÃO**

No sistema reprodutor feminino há dois ovários localizados na região pélvica, laterais ao útero. Suas principais funções são: a liberação do ovócito secundário e a produção de hormônios progesterona e estrógeno, os quais desempenham papel importante no ciclo menstrual, na gravidez e nas características secundárias femininas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000).

As células dos organismos multicelulares apresentam uma característica de colaboração mútua, o que é essencial para a sobrevivência do todo. Por outro lado as células cancerosas não se submetem a esse esquema de cooperação. São células cujo DNA está danificado ou alterado e que, por isso, escapam dos mecanismos de controle do ciclo celular. Estas células são provenientes de uma única célula sem controle de proliferação. Este fato pode fazer com que ela perca a capacidade de aderência, passe a secretar enzimas que danificam a matriz extracelular, invada tecidos vizinhos, penetre nos vasos sanguíneos e linfáticos e se espalhe pelo corpo, produzindo tumores secundários ou metástases (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000).

Inicialmente o termo “tumor” era designado a qualquer aumento de volume de um tecido, e poderia ser atribuído até mesmo a edema por inflamação. Hoje esse termo é empregado para designar a proliferação celular anormal, cujo termo correto seria neoplasia. Atualmente todos os tumores malignos são chamados de câncer, para diferenciar dos benignos (aqueles que não produzem metástase e cujo crescimento não é tão acelerado) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000).

A formação de uma neoplasia está envolvida, basicamente com duas categorias de genes: os oncogenes e os genes supressores tumorais. Os oncogenes são proto-oncogenes, genes responsáveis pelas atividades celulares normais, que sofreram algum tipo de alteração, e estarão envolvidos no surgimento de tumores benignos ou malignos. O gene supressor de tumor é o gene que reduz a chance de uma célula num organismo multicelular se tornar um tumor, porém se sofrer alteração aumentará a probabilidade do desenvolvimento deste (WEINBERG, 2008)

Hoje já se sabe que o câncer é uma doença genética, independentemente de ocorrer de forma esporádica ou hereditária, pois a carcinogênese inicia-se com danos no DNA. Genes envolvidos na apoptose, relacionados com a morte celular ou reparação do DNA, podem estar envolvidos no desenvolvimento de diferentes tipos de cânceres (FASCHING *et al.*, 2009), e alguns tumores familiares podem ser explicados pela presença de mutações em genes específicos (MEYER *et al.*, 2010; JAZAERI, 2009; SOUTH *et al.*, 2009; BANSAL *et al.*, 2009).

### 1.1. CÂNCER DE OVÁRIO

O câncer de ovário é um câncer ginecológico, difícil de ser diagnosticado. Cerca de 3/4 dos tumores malignos de ovário apresentam-se em estágio avançado no momento do diagnóstico, pois não há aparecimento de sintomas característicos em uma fase inicial. Porém com o avanço da doença podem aparecer dores abdominais e pélvicas, náuseas, indigestão, constipação e contínuo cansaço (INCA, 2011).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer dos EUA (NCI, 2011), 21.990 novos casos de câncer de ovário foram estimados para 2011, e 15.460 óbitos decorrentes da doença. No Brasil, o INCA (Instituto Nacional do Câncer) não define números para este tipo de tumor, o qual é considerado de baixa incidência; porém com taxas elevadas de mortalidade, em função da descoberta dar-se em estágio avançado (INCA, 2011).

A maior incidência deste tipo de tumor ocorre em mulheres com idade superior a 50 anos e geralmente pós-menopausa, sendo raro em mulheres com menos de 20 anos, mesmo em famílias com câncer hereditário. Pode ser diagnosticado através de ultrassonografia transvaginal e por marcadores tumorais, substâncias detectadas no sangue e que aumentam na presença de tumores malignos, como o CA125 (TROPE *et al.*, 2009). O uso associado da ecografia com a análise do CA125 pode indicar precocemente o câncer de ovário (OLIVEIRA & AMARAL, 2011). Estudos indicam que ter tido câncer de mama, útero ou colorretal, bem como histórico familiar e a ingestão do hormônio

estrogênio (sem progesterona) por 10 anos ou mais pode aumentar o risco de câncer de ovário (SUEBLINVONG & CARNEY, 2009; OLIVEIRA & AMARAL, 2011). Outros estudos sugerem que a gravidez, a ingestão de anticoncepcional oral, a amamentação e alguns anti-inflamatórios, reduzem o risco deste tipo de câncer, o que foi também observado para câncer de cólon e de mama (FASCHING *et al.*, 2009; WHITTMORE *et al.*, 1992; RISCH *et al.*, 1998).

Dos conjuntos de fatores que estão associados ao risco de câncer de ovário, o histórico familiar sobrepõe todos os outros (OLIVEIRA & AMARAL, 2011). 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 em mulheres 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 (APPEL *et al.*, 2009; SCHILDKRAUT *et al.*, 1988; KERLIKOWSKE *et al.*, 1992).

O ovário é constituído por tecido epitelial, com a função de revestimento, e tecido conjuntivo, que forma o estroma, o qual dá sustentação ao órgão. Dos casos de câncer registrados, 90% correspondem ao câncer de ovário epitelial, sendo que, de acordo com Zagouri *et al.* (2009), eles podem ser classificados em:

- tumores serosos: tumores de alto grau, compreendendo aproximadamente 80% a 85% tipos epiteliais. Este tipo de tumor mostra um amplo espectro na aparência patológica, em contraste com muitos outros carcinomas primários de ovário.

- tumores mucinoso: não são muito comuns, compreendendo cerca de 3% dos carcinomas ovarianos. Na maioria falta mucina apical em grande parte das células tumorais que transmitem uma aparência endometrióides.

- tumores endometrióides: representa o segundo mais comum, correspondendo a aproximadamente 10% dos carcinomas ovarianos. Está associado com endometrioses entre outros tipos de endometrióides.

- tumores de células claras (mesonéfricos): correspondem a cerca de 5% dos carcinomas ovarianos. A maioria está associada com endometrioses, particularmente endometrioses atípicas ou tumores associados a endometrioses.

- tumores de Brenner (de células transitórias): são raros, por isso de difícil avaliação.

- tumores mistos: têm pelo menos dois elementos distintos patologicamente presentes, cada um constituindo menos que 10% do tumor.

- tumores indiferenciados: a ausência de características patológicas diferenciadas tem sido considerada suficiente para estabelecer o diagnóstico de carcinoma indiferenciado.

## 1.2. O CÂNCER E A GENÉTICA

O evento genético molecular do desenvolvimento do câncer de ovário vem sendo bastante estudado.

Genes que regulam o ciclo celular são candidatos ideais para análises de envolvimento com a carcinogênese, pois provavelmente estão desregulados em células cancerosas (FASCHING *et al.*, 2007). Os genes *PTEN*, *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2* e o *CDKN1B*, têm sido bastante estudados em tumores de origem ginecológica (MEYER *et al.*, 2010; JAZAERI, 2009; SOUTH *et al.*, 2009; BANSAL *et al.*, 2009). Outros genes, como *KRAS* e *BRAF* estão sendo estudados, pois suas ativações contribuem na tumorigênese (OLIVEIRA & AMARAL, 2011; KURMAN *et al.*, 1998).

O gene *PTEN* (10q23.3), também chamado de *MMAC1*, é um gene supressor tumoral, que bloqueia o ciclo celular na fase G1. Através da regulação negativa da proteína PI3K (*Fosfatidilinositol 3'-Kinase*) sinaliza um caminho, cujo alvo principal é o inibidor ciclina dependentes de quinase (CKDN), codificado a partir do gene *CDKN1B* (LI & SUN, 1998; MCMENAMIM *et al.*, 1999). Já foram caracterizadas mutações no gene *PTEN* em alguns gliomas, cânceres de próstata, rins, mama, melanomas, câncer de tireóide e de endométrio (STECK *et al.*, 1997; GULDBERG *et al.*, 1997), bexiga e testículo (TAMURA *et al.*, 1999). A maioria dos tumores com mutação em *PTEN* encontram-se em fases iniciais, sugerindo que a inativação do *PTEN* é um evento precoce no câncer de ovário (OBATA *et al.*, 1998). Estudos identificaram que mutações neste gene são mais comumente encontradas em tumores



benignos que em malignos, sugerindo assim que, essa alteração genética ocorre no estágio inicial dos tumores (MCMENAMIM *et al.*,1999; DAHIA *et al.*,1997; MAXWELL *et al.*,1998). Em uma pesquisa com tumores epiteliais de ovário, os quais foram divididos em dois grupos (tipo I, tumores de baixo grau; e tipo II, tumores agressivos e em estágios mais avançados) observaram-se mutações nos genes *K-RAS* e *PTEN* para o primeiro grupo e identificou-se a super-expressão de p53, mutações em *TP53* e instabilidade genética para o segundo grupo (OLIVEIRA & AMARAL , 2011; KURMAN *et al.*, 1998).

O *TP53* é um gene supressor tumoral, localizado no cromossomo 17, que codifica uma fosfoproteína de 53kDa, a qual se liga especificamente ao DNA e age como fator de transcrição. Mutações neste gene estão presentes em aproximadamente 50% dos cânceres e estudos mostram a associação com diferentes tipos de cânceres, entre eles o de mama, ovário, adenocarcinoma de esôfago e tumor anaplásico de tireóide (MOURA-GALLO *et al.*, 2004; HAINAUT *et al.*, 2000).

Mutações herdadas em vários genes, como *PTEN* e *PT53*, podem originar cancros nas mulheres, sugerindo-se que essas mutações podem também estar presentes em tumores de ovário (CASTIBLANCO *et al.*, 2006).

O gene *BRCA1* está localizados cromossomo 17 (17q21) e é formado por 22 éxons, distribuídos em cerca de 100kb de DNA que codifica uma proteína de 1863 aminoácidos. Enquanto o gene *BRCA2* está localizado no cromossomo 13 (13q12.3) e apresenta 26 éxons codificadores que origina uma proteína de 3418 aminoácidos. Ambos estão relacionados com reparos no DNA, regulação da expressão gênica e controle do ciclo celular. As mutações nestes genes resultam em um processo de reparação de falhas e uma alta taxa de mutação, especialmente durante a replicação do DNA, levando ao câncer (HIRSHFIELD *et al.*, 2010). Em população específica de judeus Ashkenazi, duas mutações no gene *BRCA1* e uma no gene *BRCA2* correspondem a 90% de todas as mutações patogênicas de famílias com a Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditários (TONIN *et al.*, 1996). Em outras populações foi observado que mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* podem responder por mais de 40% de todos os cânceres de mama e serem bastante importantes em tumores de

ovário. O câncer ovariano hereditário é diagnosticado, em média entre 43 e 48 anos, enquanto os esporádicos aproximam-se dos 61 anos, estudos indicam que este último pode expressar os genes *BRCA1* e *BRCA2* (HIRSHFIELD *et al.*, 2010; FORD *et al.*, 1998; GARBER & OFFIT *et al.*, 2005).

A etiologia do câncer de ovário é complexa e, pelo menos em parte, inclui fatores hereditários, sendo que mutações em *BRCA1*, *BRCA2*, *MLH1* e *MSH2* estão presentes em aproximadamente 50% de câncer de ovário familiar (FASCHING *et al.*, 2009).

Uma alteração que ocorre com alta frequência na variedade de câncer humano é a perda da heteroziguidade, que é a perda de um alelo em um *locus* específico, causada por mutação de deleção, ou perda de um cromossomo, a partir do par cromossômico, resultando em um hemizigoto anormal. É detectada quando marcadores heterozigóticos para um *locus* parecem monomórficos porque um dos alelos foi deletado. Resumindo, a condição pré-existente de heteroziguidade é perdida por eventos genéticos que podem levar a células filhas “homozigotas”. Esta perda está associada a diferentes tipos de tumores. Ocorre em mais de 70% nos glioblastomas e em mais de 60% nos cânceres avançados de próstata (TAMURA *et al.*, 1999).

### 1.3. GENE *CDKN1B*

Em 1994, foi observado que o gene *CDKN1B* (*Inibidor de ciclina dependente de quinase 1B*) atua como gene de supressão tumoral (TOYOSHIMA & HUNTER, 1994); POLYAK *et al.*, 1994). Este gene pertence à família das CDK (Cip/Kip) e sua função é regular um ponto específico do ciclo celular entre G1-S (MISKIMINS WK *et al.*, 2001). Membros dessa família ligam-se aos complexos ciclina-CDK: ciclina E-CDK2; ciclina A-CDK2 e ciclina D-CDK4 inibindo a fosforilação da proteína retinoblastoma (Rb), no citoplasma ou no núcleo, a qual levaria o desencadeamento do processo do ciclo celular (KIBEL *et al.*, 2003). Este gene está localizado no cromossomo 12p13.1-p2, e possui 3 éxons, sendo que primeiro e o segundo codificam uma proteína com 198 aminoácidos, denominada p27, e o terceiro éxon não é traduzido. O gene

*CDKN1B* apresenta algumas variantes descritas, sendo que a p.V109G é a mais observada em associação com tumores.

Vários estudos envolvendo o gene *CDKN1B* com diferentes tipos de tumores já foram descritos. Estudo concluiu que o *PTEN* e o *CDKN1B* controlam, em conjunto, negativamente a taxa de proliferação das células epiteliais da próstata em ratos. Esta informação torna-se relevante a partir do momento em que a observação da lesão neoplásica na próstata do rato possui uma contraparte análoga na glândula humana (JOSHI *et al.*, 2007). Estudos indicam que variantes do gene *CDKN1B* desempenham um papel na susceptibilidade ao câncer de próstata e ao câncer de próstata hereditário (CHANG *et al.*, 2004; SUAREZ *et al.*, 2000; HSIEH *et al.*, 2001). A perda de expressão do gene *CDKN1B* está associada com comportamento agressivo em uma variedade de tumores epiteliais humanos (MACRI E LODA, 1998).

Estudo com marcadores de proliferação celular (p21, p27, p53 e Ki-67) associou estes com a carcinogênese de pâncreas (KARAMITOPOULOU *et al.*, 2010).

Um estudo, em que foram analisados combinações de 11 genes relacionados com o ciclo celular, independentes de câncer de ovário epitelial invasivo, sugeriu envolvimento de alguns destes genes na etiologia do câncer de ovário, incluindo o gene *CDKN1B* (GOODE *et al.*, 2009). Possivelmente o gene *CDKN1B*, combinado com alelos múltiplos de baixa susceptibilidade e penetrância moderada, podem representar até 50% dos casos de câncer de ovário com história familiar (PEEDICAYIL *et al.*, 2010)

A redução da expressão da proteína p27 em carcinomas de mama é detectada frequentemente em tumores mais agressivos e pode contribuir para o progresso do ciclo celular (CATZAVELOS *et al.*, 1997; PORTER *et al.*, 1997).

#### 1.4. POLIMORFISMO p.V109G

Inúmeros polimorfismos podem ser identificados no genoma humano. O mais comum é o polimorfismo envolvendo a substituição de um único nucleotídeo (SNP). Muitos podem estar localizados em qualquer parte fora do

gene, nos íntrons, ou localizado na sequência codificadora do gene, são frequentemente silenciosos, porque não prejudicam o efeito funcional. Porém alguns SNPs podem mudar a codificação do aminoácido e significativamente alterar a atividade da proteína ou interagir com outras moléculas. Os SNPs que surgem nos íntrons ou na região promotora podem também alterar a expressão da proteína afetando a sua transcrição (SPURDLE *et al.*, 2009).

Em humanos, alguns SNPs foram identificados no gene *CDKN1B*, o que vem sendo associado com o risco de câncer; como por exemplo as variantes -79C>T e +326T>G, relacionadas com o câncer de próstata (CHANG *et al.*, 2004), ou associado a outros efeitos, como a variante -838C>A relacionada com o alto risco de infarto do miocárdio (GONZALES *et al.*, 2004), a qual tem demonstrado uma menor atividade promotora, potencialmente resultando na diminuição dos níveis de proteína p27; e a variante no códon 55 G>A, que foi encontrado com alta frequência nos casos hepatocelular comparadas com o controle, embora a diferença tenha sido apenas marginalmente significativa (CHEN *et al.*, 2000).

Existem até o momento numerosos estudos que têm sido publicados com a variante +326T>G (p.V109G - rs2066827). Este SNP é originado através da alteração de uma timina para guanina no códon 109 causando a substituição do aminoácido glicina por valina. Em estudos de famílias foi observado que o genótipo T/T foi associado com um risco aumentado de câncer de próstata avançado (CHANG *et al.*, 2004; KIBEL *et al.*, 2003), e também com um risco aumentado de carcinoma de células escamosas do esôfago e adenocarcinoma gástrico (GUO *et al.*, 2006). Em contraste, o genótipo G/G no mesmo *locus* foi associado com aumento do risco de carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço entre os usuários de álcool, e o risco aumentou e piorou o prognóstico em carcinoma epidermóide oral (LI *et al.*, 2004).

Alteração no códon 109 do gene *CDKN1B* já foi associada ao desenvolvimento de câncer de próstata com metástase (CAVÉ *et al.*, 1995), e com alteração na afinidade com um complexo proteico envolvido na sua degradação (HUANG *et al.*, 2007). Em um trabalho, diferentes genes envolvidos no controle do ciclo celular foram estudados e o genótipo G/G da variante

p.V109G do gene *CDKN1B* foi associado a um risco reduzido de desenvolvimento de câncer de ovário em uma população de Londres, porém, apesar de significativos, os resultados foram limítrofes e foi sugerido que novos estudos em outras populações fossem realizados (GAYTHER *et al.*, 2007).

A importância funcional do polimorfismo p.V109G e a carcinogênese de mama não estão completamente compreendidos. Estudos mostraram que carcinoma de mama e o polimorfismo em *CDKN1B* associam-se com alto grau do tumor (TIGLI *et al.*, 2005), metástase nodal e tempo de desenvolvimento da doença em pacientes com câncer de mama, sugerindo que o genótipo em *CDKN1B* pode ser indicador para prognóstico em pacientes com câncer de mama inicial, apesar de estudo não apontar diferença significativa entre pacientes com câncer de mama e indivíduos normais para o polimorfismo (NAIDU *et al.*, 2007).

## 1.5. IMPORTÂNCIAS DOS ESTUDOS GENÉTICOS

O estudo da variabilidade genética em genes que podem apresentar relação funcional com o desenvolvimento do câncer de ovário em conjunto com uma análise de associação poderia facilitar o entendimento deste tipo de tumor, podendo vir a contribuir para um diagnóstico precoce da doença. A análise conjunta em genes que possam estar funcionalmente relacionados ao câncer de ovário pode se mostrar valiosa em investigações futuras, na determinação de que pacientes apresentam maior ou menor risco para o desenvolvimento deste tipo de câncer. Isto faria com que a análise destes genes pudessem se tornar uma importante ferramenta em triagem populacional e até em aspectos relacionados à profilaxia e/ou tratamento.

A utilização de análise de mutações em diferentes genes pode auxiliar no prognóstico de tumores em fases iniciais com maior possibilidade de serem tratados com sucesso (MOURA-GALLO *et al.*, 2004). Além disso, elucidando o caminho regulatório fica clara a condução de novas abordagens para a terapia do câncer (TAMURA *et al.*, 1999). Finalmente, a avaliação genética, com

identificação de mutações específicas, seria fundamental para o diagnóstico, porém é pouco utilizado devido o alto custo e pouca disponibilidade.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a variabilidade existente na região codificante do gene *CDKN1B* em amostras de pacientes com câncer de ovário e em amostras controles, e avaliar a existência de associação entre a presença de variantes neste gene e a predisposição para o desenvolvimento de câncer de ovário.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Recrutar e caracterizar clinicamente amostras de pacientes e controles;
- Caracterizar a variabilidade existentes nos éxons 1 e 2 do gene *CDKN1B* em amostra de pacientes com câncer de ovário e em indivíduos controle a nível germinativo;
- Avaliar a existência de perda de heterozigosidade nos pacientes com mutações detectadas;
- Através de testes estatísticos verificar possível associação entre variabilidade existente no gene *CDKN1B* e o câncer de ovário.

### 3. ARTIGO

#### **A polymorphism in the *CDKN1B* gene is related with increased risk of ovarian cancer.**

Giane Pereira da Costa Silva<sup>1</sup>, Rodrigo Bertollo de Alexandre<sup>1</sup>, Bruna Maria de Azevedo<sup>1</sup>, Vinícius Medeiros Fava<sup>1</sup>, Reitan Ribeiro<sup>2</sup>, Sérgio Bruno Hatschaback<sup>2</sup>, Fabio Rueda Faucz<sup>1</sup>.

(1) Group for Advanced Molecular Investigation (NIMA), Graduate Program in Health Sciences (PPGCS), Center for Biological and Health Sciences (CCBS), Pontificia Universidade Católica do Parana (PUCPR) Curitiba, PR, Brazil;

(2) CEPEP (Research and Teaching Center), Erasto Gaertner Hospital. Curitiba - PR, Brazil

#### **Running Title: *CDKN1B* and ovarian cancer**

The authors declare no conflict of interest.

Financial support: This work was supported by the Araucária Foundation, project number 20/07 - 7705 to Dr. F.R. Faucz

The information was not previously presented.

To whom correspondence should be addressed: *Prof. Fabio Rueda Faucz PhD.*

Pontificia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). Centro de Ciências Biológicas e da Saude. Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho, 80215-901 Curitiba, PR, Brazil. ([fabio.faucz@pucpr.br](mailto:fabio.faucz@pucpr.br))



## SUMMARY

**Background:** Ovarian cancer is the most difficult gynecological cancer to diagnose. Approximately 75% of ovarian cancer cases are diagnosed in an advanced stage of the disease due to the absence of specific symptoms. It is known that carcinogenesis initiates with DNA damage, moreover, some genes have been frequently studied or associated in gynecological origin tumors, among them the *CDKN1B* gene.

**Objective:** To evaluate the existence of association between the presence of variants in the *CDKN1B* gene and predisposition to the development of ovarian cancer.

**Methods:** DNA from patients and controls was extracted from blood samples, Exons 1 and 2 of the *CDKN1B* were analyzed by direct sequencing.

**Results:** Two mutations were observed in the promoter region of the gene, one of them localized in position -127 and the other one in + 326 (V109G). The frequency these variants did not demonstrate a significant difference between patients and controls.

**Conclusion:** The study demonstrated that there was no association between the variants analyzed and ovarian cancer, however, the analysis showed a tendency of protection of the G/G genotype.

**Key words:** *CDKN1B* , polymorphism, ovarian cancer

## INTRODUCTION

Ovarian cancer is the most difficult gynecological cancer to diagnose. About 75% of malignant tumors in the ovary are already at an advanced stage at the time of diagnosis, due to the fact that no specific or characteristic symptoms appear initially. The highest incidence of ovarian cancer occurs in women over 50 years of age. It can be detected by transvaginal ultrasound along with CA125, tumor markers (TROPE, 2009)

Today, independently of occurring in a sporadic or a hereditary form, it is known that cancer is a genetic disease since carcinogenesis always begins with DNA damage. Several genes have been studied in gynecological origin tumors, among them *CDKN1B* (MEYER *et al.*, 2010; JAZAERI, 2009; SOUTH *et al.*, 2009; BANSAL *et al.*, 2009).

The *CDKN1B* (Cyclin dependent kinase inhibitor 1 B), located at 12p13, is a tumor suppressor gene, which belongs to the CDK family (Cip/Kip) and its function is to regulate a specific region of the cell cycle between G1 and S. Members of this family bind to the cyclin-CDK: cyclin E-CDK2; cyclin A-CDK2 and cyclin D-CDK4 complexes, inhibiting phosphorylation of their retinoblastoma (Rb) protein in both the nuclear and cytoplasmic level, which would trigger the cell cycle (KIBEL *et al.*, 2003). This gene has 3 exons: the first and second encode a protein with 198 amino acids, called p27. The third is not translated.

Studies have revealed a correlation between mutations and polymorphisms present in the *CDKN1B* and different types of cancer, among them prostate cancer and sporadic medullar thyroid carcinoma (PARQUALI *et al.*, 2011). Moreover, recent studies have related the genomic region 12p to the development of neoplasm in the ovary (CHENG *et al.*, 2010; CASERTA *et al.*, 2008; COSSU-ROCCA *et al.*, 2006; NOWEE *et al.*, 2007).

The most frequent variant found in the *CDKN1B* gene is the alteration of a nucleotide in position 326 replacing a thymine by a guanine, causing the substitution of glycine for valine in position 109. The functional correlation of this polymorphism to the development of neoplasm is still not completely understood, however, some studies associate this variant to the risk of developing prostate

cancer, gastric adenocarcinoma (SLINGERLAND & PAGANO, 2000), and carcinoma of squamous cells from the esophagus (GUO *et al.*,2006). Huang *et al.* (2007) and Naidu *et al.* (2007) discovered that the p.V109G variant could affect the affinity of this gene to a protein complex involved in its degradation.

The choice of the gene *CDKN1B* was made due to the positive results from other researchers demonstrating a relationship of this gene not only to different tumors but also to the cellular division process.

The study of the genetic variability of genes that may present a functional relationship to the development of ovarian cancer as well as an analysis of this association could facilitate the understanding of this type of tumor, contribute to an early diagnosis of the disease, and lead to a better comprehension of the prognosis. Analysis of this gene could become an important instrument in population screening, and for aspects linked to prophylaxis and treatment.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patients**

Patients who underwent removal of ovarian cancer in the Erasto Gaertner Hospital, Curitiba - PR, Brazil, from June 10<sup>th</sup>, 2010 to July 30<sup>st</sup>, 2011, were asked to take part in the study. During the surgery, peripheral blood samples and tumoral tissue samples of the material removed were collected from each patient. Only those samples for which a diagnosis of ovarian cancer was confirmed through histopathological analysis performed at the hospital were used in the study. The samples were classified as serous epithelial ovarian cancer.

Tumor samples of patients who presented the germline p.V109G mutation were also analyzed for loss of heterozygosity.

A total of 28 women with ovarian cancer were included in the study. Ages ranged from 44 to 76 years (mean age of 55.1 years). All were characterized as Eurodescendants. None of this group presented a history of familiar cancer.

Written informed consent was obtained from all participants, and the study was approved by the CEP-PUC/PR - 5509/10.

The control group included 59 women, ranging from 50 to 59 years of age and a mean age of 53.8 years, who were seen at the Erasto Gaertner Hospital, Curitiba, Parana, Brazil, and were not diagnosed as carriers of ovarian cancer or any other kind of neoplasm and/or presented a familial history of cancer.

## **DNA analysis**

Blood genomic DNA was extracted according to the methodology described by John (1990) and colleagues and modified by Lahiri and Nurberger Jr (1991), and DNA extraction of tissue samples was performed utilizing Trizol and chloroform.

Amplification of the *CDKN1B* gene was carried out in 25 µl of PCR mix containing 25 ng of genomic DNA; GoTaq Green Master Mix 2X (Promega, Madison, WI) reagent was utilized according to specifications of the supplier, as well as 10pmol of each primer {first part of exon one [5'- GTC GGG GTC TGT GTC TTT TG -3' (forward) and 5'- CTG ACA TCC TGG CTC TCC TG - 3' (reverse)], second part of exon one [5'- AGC ACT GCA GAG ACA TGG AA - 3' (forward) and 5'- GGC CAG GTA GCA CTG AAC AC - 3' (reverse)], exon two [5'- GGG TGG AGG TAG TGG GTT TT - 3' (forward) and 5'- GGG GCC TGG GTT ACA AGT AG - 3' (reverse)]}.

A GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) thermocycler was used for all three primer pairs in the following cycle: denaturation at 94°C for 3 minutes followed by 40 cycles at 94°C for 30 seconds, 64°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds, and a final cycle at 72°C for 10 minutes of incubation.

The products obtained from the PCR underwent electrophoresis in polyacrilamde gel to verify the fragment size. The polyacrilamde gel reading was performed by silver nitrate staining, based on the technique described by Sammons et al. (1981).

After PCR, the products were purified by the addition of ammonia acetate 7.5M and 100% ethanol. Subsequently, samples were washed with 70% ethanol and centrifuged. The supernatant was eliminated using a pipette and the pellet

was left to dry. The resuspension with milli-Q water was performed followed by quantification. The amplicons were then sequenced using a BigDye Terminator Sequence v3.1 according to manufacturer instructions (Applied Biosystems, USA).

Mutation p.V109G, only in the control group, was performed through restriction fragment length polymorphism (RFLP). The amplicon obtained with the primers for the second part of exon one was cleaved by *Bgl* I endonuclease according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, USA). Tissue samples of patients that presented p.V109G were analyzed for loss of heterozygosity, using the RFLP technique.

## RESULTS

A mutation in position -127 was observed in the 28 analyzed samples. The genotypic frequencies observed were 60% (GG), 32% (AG) and 8% (AA). Frequencies of the alleles were 69.7% (G) and 30.3 % (A).

Moreover the T/G transversion was observed in the second part of exon 1 in nucleotide 326 (rs2066827), which causes the substitution of valine (GTC) for glycine (GGC) at position 109 (p.V109G). There was a slight proportional elevation of the TT genotype in genotypic frequencies of patients and controls. On the other hand, the GG genotype appeared in controls and was absent in patients. The proportions found for genotypic and allelic frequencies observed in controls and patients are described in the following tables (1 and 2) and identification of the mutation is highlighted in the Figure 1.

In the second exon no variants were observed. Both mutations were in Hardy-Weinberg equilibrium and after DNA tissue analysis no loss of heterozygosity was identified.

## DISCUSSION

In the present study the complete coding sequence of gene *CDKN1B* in 28 patients with epithelial ovarian cancer as well as an analysis of the p.V109G mutation was performed in 59 control subjects.

According to the study performed by Jin *et al.* (2009) in which the researchers sought an association between SNP and p27, there was a significant difference between the genotypic frequencies of ovarian cancer patients and controls, which led to the conclusion that the T/T genotype may be a potential risk factor in susceptibility to epithelial ovarian cancer. In another study, Goode *et al.* (2009) compared several genes that possess SNPs and are involved in the cellular cycle to ovarian cancer, demonstrating that the p.V109G has a certain tendency in the association of risk for developing ovarian cancer. In the present study there was no statistical difference of association, nevertheless, it was observed that there was a slight propensity, similar to the previous studies, revealing that the T/T genotype could be a risk factor while the G/G genotype is related to a protective factor concerning this specific tumor.

Ferrando *et al.* (1996) in a study with breast cancer concluded that the variation of the allele G may not be related to a predisposition to this type of tumor given the observation in the allele distribution in patients and controls. A similar observation concerning the distribution of the allele G among ovarian cancer patients and normal individuals was noted in this study, suggesting the same conclusions and reinforcing the idea that the G/G genotype could be a protective factor.

In a study developed by Naidu *et al.* (2007) related to polymorphism V109G, the allelic frequencies of V and G did not present significant dissemblance between breast cancer patients and normal individuals. The authors suggested the necessity of studies with more samples (230 samples were utilized) in order to verify if the V109G polymorphism can be an indicator for increased risk of developing breast cancer and/or a potential marker for tumor prognosis.

Huang *et al.* (2000) showed the relationship between p.V109G and prostate cancer in Taiwan. There was no expressive difference in the results, which indicated that this variant is not correlated to this type of cancer, contradicting the correlation found in the study by Kibel *et al.*(2003). The discrepancy of the results presented by both researchers might be due to the racial divergence between the groups. The variant G allele is more frequent in Europeans, Americans and Caucasians than in Taiwanese. The authors warn that the application of these discoveries from the Taiwanese population in other populations or ethnical groups and contrariwise may not be appropriate. As the prevalence of p.V109G in Taiwan is small, it can be concluded that this polymorphism may not be a proper marker of prostate cancer in the population from Taiwan.

The summation of genetic susceptibility markers to ovarian cancer prediction models could assist in improving the efficiency of early detection tests and enable a population screening program (PHAROAH *et al.*, 2008).

Some studies have indicated that low or high expression of p27, the protein transcribed by *CDKN1B*, is associated to the survival of ovarian cancer patients. Similar results were obtained in other types of epithelial cancers such as breast and colon (FARLEY *et al.*, 2011) indicating that this gene should be involved in the development of cancer.

Protein p27 as a prognosis marker has created much controversy and debate. One of the most frequent debates involves whether nuclear or cytoplasmic expression of p27 is the most relevant. Some authors have implied the importance of the nuclear, and others the cytoplasmic, while some did not distinguish between the two (NEWCOMB *et al.*,1999; MASCIULLO *et al.*,1999; ROSEN *et al.*,2005; DUNCAN *et al.*,2010). According to Lee *et al.* (2011) the evidence of the low nuclear expression of p27 and the high cytoplasmic expression of this protein is increasing which suggests that it is not a good prognosis factor for ovarian cancer. Several studies involving breast, gastric, colorectal, bladder, endometrial and ovarian cancer (LLOYD *et al.*,1999; LODA *et al.*,1997; MASCIULLO *et al.*,1999; TAN *et al.*,1997; RAHMAN *et al.*,2003; WATANABE *et al.*,2002; MORI *et al.*,1997; KORKOLOPOULOU *et al.*,2000) have

shown seemingly contrasting results concerning the influence of the behavior of p27. For example, Duncan (2010) showed that overexpression of nuclear p27 was associated to different types of tumors such as endometrial, pancreatic, breast, and ovarian cancer (RAHMAN *et al.*,2003; WATANABE *et al.*,2002; NEWCOMB *et al.*, 1999; NYCUM *et al.*,2001; KOUVARAKI *et al.*,2002; HURTEAU *et al.*,2001; SHIGEMASA *et al.*,2001)

In conclusion, this study showed the *CDKN1B* gene variability in epithelial ovarian cancer patients sample compared with a control group. The analysis showed a tendency of protection of G/G genotype. The absence of association could be due to the fact that this gene is not associated with this tumor or that there are different types of ovarian epithelial cancer that are actually combined in one single group. This would dilute the importance of the gene and produce non-statistically significant results. In order to prove the second hypothesis, a more thorough immunohistochemical and cytological analysis should be performed. In addition, the *CDKN1B* analysis should be performed in different populations to confirm the true role of the p.V109G mutation in ovarian cancer.



## REFERENCES

BANSAL N, YENDLURI V, WENHAM RM. The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. **Cancer Control**.16(1):8-13, 2009.

CASERTA D, BENKHALIFA M, BALDI M, FIORENTINO F, QUMSIYEH M, MOSCARINI M. Genome profiling of ovarian adenocarcinomas using pangenomic BACs microarray comparative genomic hybridization. **Mol Cytogenet**. 20:1-10, 2008.

CHENG L, ZHANG S, TALERMAN A, ROTH LM. Morphologic, immunohistochemical, and fluorescence in situ hybridization study of ovarian embryonal carcinoma with comparison to solid variant of yolk sac tumor and immature teratoma. **Hum Pathol**. 41(5):716-23, 2010.

CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162(1): 156-9, 1987.

COSSU-ROCCA P, ZHANG S, ROTH LM, EBLE JN, ZHENG W, KARIM FW, MICHAEL H, EMERSON RE, JONES TD, HATTAB EM, CHENG L. Chromosome 12p abnormalities in dysgerminoma of the ovary: a FISH analysis. **Mod Pathol**. 19(4):611-5, 2006.

DUNCAN TJ, AL-ATTAR A, ROLLAND P, et al. Cytoplasmic p27 expression is an independent prognostic factor in ovarian cancer. **Int J Gynecol Pathol**. 29:8–18, 2010.

FARLEY J, SMITH LM, DARCY KM, BRADY MF, BELL J, MCGUIRE W, BIRREER MJ. Nuclear P27 expression in benign, borderline (LMP) and invasive tumors of the ovary and its association with prognosis: A gynecologic oncology

group study. **Gynecologic Oncology**. 121:395–401, 2011.

FERRANDO A.A., BALBIN M., PENDAS A.M., VIZOSO F., VELASCO G., LOPEZ-OTIN C.: Mutational analysis of the human cyclin- dependent kinase inhibitor p27KIP1 in primary breast carcinomas. **Hum. Genet.** 97: 91-94, 1996.

GOODE EL, FRIDLEY BL, VIERKANT RA, CUNNINGHAM JM, PHELAN CM, ANDERSON S, et al. Candidate gene analysis using imputed genotypes: cell cycle single-nucleotide polymorphisms and ovarian cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 18(3):935-44, 2009.

GUO W, CUI YJ, FANG SM, LI Y, WANG N, ZHANG JH. Association of polymorphisms of p21cip1 and p27kip1 genes with susceptibilities of esophageal squamous cell carcinoma and gastric cardiac adenocarcinoma. **Ai Zheng** 25:194–199, 2006.

HUANG SP, YU CC, LIU CC, WU TT, HUANG CH, WU MT. *CDKN1B* V109G Polymorphism Frequency and Prostate Cancer Risk in Taiwan. **Urologia Internationalis.** 81:36-40, 2007

HURTEAU JA, ALLISON BM, BRUTKIEWICZ SA, et al. Expression and subcellular localization of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) in epithelial ovarian cancer. **Gynecol Oncol.** 83:292–8, 2001.

JAZAERI AA. Molecular profiles of hereditary epithelial ovarian cancers and their implications for the biology of this disease. **Mol Oncol.**3(2):151-6, 2009.

JIN X, KANG S, WANG N, XING YP, LI Y. Single nucleotide polymorphisms in cell cycle regulator p21 and p27 genes are associated with susceptibility to epithelial ovarian cancer]. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.** 43(3):209-12, 2008.

JOHN, S. W. M.; WEITZNER, G.; ROZEN, R.; SCRIVER, C. R. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocyte. **Nucleic Acids Research**, London, v. 19, n. 2, p. 408, 1990.

KIBEL AS, SUAREZ BK, BELANI J, OH J, WEBSTER R, BROPHY-EBBERS M, et al. CDKN1A and *CDKN1B* polymorphisms and risk of advanced prostate carcinoma. **Cancer Res.** 63(9):2033-6, 2003.

KORKOLOPOULOU P, CHRISTODOULOU P, KONSTANTINIDOU AE, et al. Cell cycle regulators in bladder cancer: a multivariate survival study with emphasis on p27Kip1. **Hum Pathol.** 31:751–60, 2000.

KOUVARAKI M, GORGOULIS VG, RASSIDAKIS GZ, et al. High expression levels of p27 correlate with lymph node status in a subset of advanced invasive breast carcinomas: relation to E-cadherin alterations, proliferative activity, and ploidy of the tumors. **Cancer.** 94:2454–65, 2002.

LAHIRI DK, 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.

LEE YH, HEO J, KIM TH, KANG H, KIM G, KIM J, CHO S, AN HJ. Significance of Cell Cycle Regulatory Proteins as Malignant and Prognostic Biomarkers in Ovarian Epithelial Tumors. **International Journal of Gynecological Pathology.** 30:205–217, 2011.

LLOYD RV, ERICKSON LA, JIN L, et al. p27kip1: a multi- functional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. **Am J Pathol.** 154:313–23, 1999.

LODA M, CUKOR B, TAM SW, et al. Increased proteasome- dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. **Nat Med.** 3:231–4, 1997.

MASCIULLO V, SGAMBATO A, PACILIO C, et al. Frequent loss of expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in epithelial ovarian cancer. **Cancer Res.** 59: 3790–4, 1999.

MEYER LA, ANDERSON ME, LACOUR RA, SURI A, DANIELS MS, URBAUER DL, et al. Evaluating women with ovarian cancer for BRCA1 and BRCA2 mutations: missed opportunities. **Obstet Gynecol.** 115(5):945-52, 2010.

MORI M, MIMORI K, SHIRAISHI T, et al. p27 expression and gastric carcinoma. **Nat Med.** 3:593, 1997.

NAIDU R., HAR Y. C., TAIB N. A. M. P27 V109G Polymorphism is Associated with Lymph Node Metastases but not with Increased Risk of Breast Cancer. **J. Exp Clin Cancer Res.** 26:133-140, 2007

NEWCOMB EW, SOSNOW M, DEMOPOULOS RI, et al. Expression of the cell cycle inhibitor p27KIP1 is a new prognostic marker associated with survival in epithelial ovarian tumors. **Am J Pathol.** 154:119–25, 1999.

NOWEE ME, SNIJDERS AM, ROCKX DA, DE WIT RM, KOSMA VM, HÄMÄLÄINEN K, SCHOUTEN JP, VERHEIJEN RH, VAN DIEST PJ, ALBERTSON DG, DORSMAN JC. DNA profiling of primary serous ovarian and fallopian tube carcinomas with array comparative genomic hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification. **J Pathol.** 213(1):46-55, 2007.

NYCUM LR, SMITH LM, FARLEY JH, et al. The role of p27 in endometrial carcinoma. **Gynecol Oncol.** 81:242–6, 2001.

PASQUALI D, CIRCELLI L, FAGGIANO A, PANCIONE M, RENZULLO A, ELISEI R, ROMEI C, ACCARDO G, COPPOLA VR, PALMA MD, FEROLLA P, GRIMALDI F, COLAO A, COLANTUONI V. CDKN1B V109G polymorphism a new prognostic factor in sporadic medullary thyroid carcinoma. **Eur J Endocrinol** . 164:397-404, 2011.

PHAROAH, P.D., ANTONIOU, A.C., EASTON, D.F., PONDER, B.A. Polygenes, risk prediction, and targeted prevention of breast cancer. **N. Engl. J. Med.** 358, 2796–2803, 2008.

RAHMAN A, MAITRA A, ASHFAQ R, et al. Loss of p27 nuclear expression in a prognostically favorable subset of well- differentiated pancreatic endocrine neoplasms. **Am J Clin Pathol.** 120:685–90, 2003.

ROSEN DG, YANG G, CAI KQ, et al. Subcellular localization of p27kip1 expression predicts poor prognosis in human ovarian cancer. **Clin Cancer Res.** 11:632–7, 2005.

SAMMONS, D W; ADAMS, L D; NISHIZAWA, E E. Silver staining in PAGE. **Electrophoresis.** 2:135-141, 1981.

SHIGEMASA K, SHIROYAMA Y, SAWASAKI T, et al. Underexpression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with poor prognosis in serous ovarian carcinomas. **Int J Oncol.** 18:953–8, 2001.

SLINGERLAND J., PAGANO M.: Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. **J. Cell Physiol.** 183:10-17, 2000.

SOUTH SA, VANCE H, FARRELL C, DICIOCCIO RA, FAHEY C, PIVER MS, et al. Consideration of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in BRCA mutation-negative familial ovarian cancers. **Cancer.** 15;115(2):324-33, 2009.

TAN P, CADY B, WANNER M, et al. The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas. **Cancer Res.** 57:1259–63, 1997.

TROPE C, DAVIDSON B, PAULSEN T, ABELER VM, KAERN J. Diagnosis and treatment of borderline ovarian neoplasms "the state of the art". **Eur J Gynaecol Oncol.** 30(5):471-82, 2009.

WATANABE J, SATO H, KANAI T, et al. Paradoxical expression of cell cycle inhibitor p27 in endometrioid adenocarcinoma of the uterine corpus-correlation with proliferation and clinicopathological parameters. **Br J Cancer.** 87:81–5, 2002.

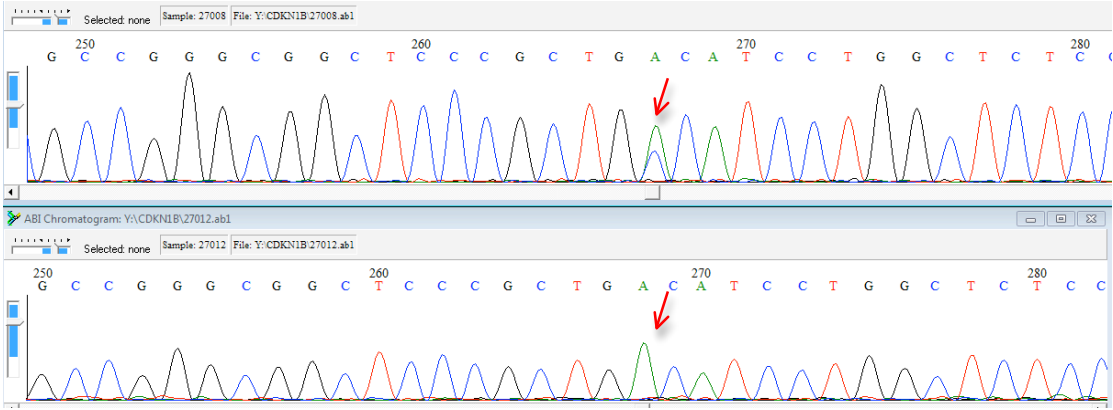
Table 1. Genotypic frequencies of patients with ovarian cancer and controls to p.V109G

<b>Genotype</b>	<b>CONTROLS</b>		<b>PATIENTS</b>	
	<b>N</b>	<b>Freq.(%)</b>	<b>N</b>	<b>Freq. (%)</b>
T/T	29	49,2	16	57,1
T/G	24	40,7	12	42,9
G/G	6	10,1	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>59</b>	<b>100%</b>	<b>28</b>	<b>100%</b>

Table 2. Allelic frequencies of patients with ovarian cancer and controls to p.V109G

<b>Allele</b>	<b>CONTROLS</b>	<b>PATIENTS</b>
	<b>Freq.(%)</b>	<b>Freq.(%)</b>
T	69.5	78.6
G	30.5	21.4

Figure 1. Identification of p.V109G in samples of ovarian cancer patients.





#### 4. CONCLUSÃO

A variabilidade existente no gene *CDKN1B* foi caracterizada em 28 pacientes com câncer de ovário do tipo epitelial e em 59 indivíduos controles.

Após a caracterização da variabilidade não foi identificada associação entre a variabilidade deste gene e o desenvolvimento do câncer. Apesar disso o resultado sugere uma tendência de associação entre o polimorfismo p.V109G e o câncer de ovário, onde o genótipo G/G apresentaria um caráter protetor.

Não foi identificada perda de heterozigosidade no DNA extraído dos tecidos tumorais.

Devido às inconsistências descritas nos últimos anos relacionando este polimorfismo e a susceptibilidade ao desenvolvimento deste tipo de câncer, novas pesquisas ainda são necessárias para elucidar o real papel deste gene, principalmente em grupos étnicos heterogêneos como o brasileiro, visto que o gene *CDKN1B* desempenha um papel importante na carcinogênese, bem como a p27, que em muitos estudos, tem sua expressão relacionada com o desenvolvimento de tumores.

## 5. REFERÊNCIAS

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** . 53 (3): 313-318, 2009.

BANSAL N, YENDLURI V, WENHAM RM. The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. **Cancer Control**.16(1):8-13, 2009.

CASTIBLANCO G A, PIRES N Y, WISTUBA O I, RIQUELME S E, ANDRADE M L, CORVALÁN R A. Pathogenic role of PTEN tumor suppressor gene in ovarian cancer associated to endometriosis. **Rev Med Chil**. 134(3):271-8, 2006.

CATZAVELOS C., BHATTACHARYA N., UNG Y.C., et al.: Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27KIP1 protein: Prognostic implications in primary breast cancer. **Nat. Med**. 3:227-230, 1997.

CAVE´ H, MARTIN E, DEVAUX I & GRANDCHAMP B. Identification of a polymorphism in the coding region of the p27Kip1 gene. **Annales de Genetique**. 38 108, 1995.

CHANG BL, ZHENG SL, ISAACS SD, WILEY KE, TURNER A, LI G, WALSH PC, MEYERS DA, ISAACS WB & XU J. A polymorphism in the *CDKN1B* gene is associated with increased risk of hereditary prostate cancer. **Cancer Research**. 64:1997–1999, 2004.

CHEN TC, NG KF, LIEN JM, JENG LB, CHEN MF, HSIEH LL. Mutational analysis of the p27(kip1) gene in hepatocellular carcinoma. **Cancer Lett**. 153:169–173, 2000.

DAHIA P. L., MARSH D. J., ZHENG Z., ZEDENIUS J., KOMMINOTH P., FRISK T. *et al.* Somatic deletions and mutations in the Cowden disease gene, *PTEN*, in sporadic thyroid tumors. **Cancer Res.** 57: 4710-4713, 1997.

FASCHING PA, GAYTHER S, PEARCE L, SCHILDKRAUT JM, GOODE E, THIELF F, CHENEVIX-TRENCH G, CHANG-CLAUDEH J, WANG-GOHRKEI S, RAMUSE S, PHAROAHJ P, BERCHUCKK A. Role of genetic polymorphisms and ovarian cancer susceptibility. **Molecular Oncology.** 171:181, 2009.

FORD D, EASTON DF, STRATTON M, *et al.* Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. **American Journal of Human Genetics.** vol. 62, no. 3, pp. 676–689, 1998.

GARBER JE AND OFFIT K. Hereditary cancer predisposition syndromes. **Journal of Clinical Oncology.** vol. 23, no. 2, pp. 276–292, 2005.

GAYTHER SA, SONG H, RAMUS SJ, KJAER SK, WHITTEMORE AS, QUAYE L, TYRER J, SHADFORTH D, HOGDALL E, HOGDALL C, BLAEKER J, DICIOCCIO R, MCGUIRE V, WEBB PM, BEESLEY J, GREEN AC, WHITEMAN DC, GOODMAN MT, LURIE G, CARNEY ME, MODUGNO F, NESS RB, EDWARDS RP, MOYSICH KB, GOODE EL, COUCH FJ, CUNNINGHAM JM, SELLERS TA, WU AH, PIKE MC, IVERSEN ES, MARKS JR, GARCIA-CLOSAS M, BRINTON L, LISSOWSKA J, PEPLONSKA B, EASTON DF, JACOBS I, PONDER BA, SCHILDKRAUT J, PEARCE CL, CHENEVIX-TRENCH G, BERCHUCK A, PHAROAH PD. Tagging single nucleotide polymorphisms in cell cycle control genes and susceptibility to invasive epithelial ovarian cancer. **Cancer Res.** 67:3027–3035, 2007.

GONZALEZ P, DIEZ-JUAN A, COTO E *et al.* A single-nucleotide polymorphism in the human p27kip1 gene (-838C [ A) affects basal promoter activity and the risk of myocardial infarction. **BMC Biol.** 2:5, 2004.

GOODE EL, FRIDLEY BL, VIERKANT RA, CUNNINGHAM JM, PHELAN CM, ANDERSON S, et al. Candidate gene analysis using imputed genotypes: cell cycle single-nucleotide polymorphisms and ovarian cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 18(3):935-44, 2009.

GULDBERG P, THOR STRATEN P, BIRCK A, AHRENKIEL V, KIRKIN AF, ZEUTHEN J. Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. **Cancer Res.** 57(17):3660-3, 1997.

HAINAUT P, HOLLSTEIN M. p53 and human cancer: the first thousand mutations. **Adv Cancer Res.** 77: 81-137, 2000.

HIRSHFIELD KM, REBBECK TR, LEVINEAJ. Germline mutations and polymorphisms in the origins of cancers in women. **J. Oncol.** 2010:297671, 2010.

HSIEH CL, OAKLEY-GIRVAN I, BALISE RR, HALPERN J, GALLAGHER RP, WU AH, KOLONEL LN, O'BRIEN LE, LIN IG, VAN DEN BERG DJ, THE CZ, WEST DW, WHITTEMORE AS. A genome screen of families with multiple cases of prostate cancer: evidence of genetic heterogeneity. **Am J Hum Genet.** 69: 148-58, 2001.

HUANG SP, YU CC, LIU CC, WU TT, HUANG CH, WU MT. *CDKN1B* V109G Polymorphism Frequency and Prostate Cancer Risk in Taiwan. **Urologia Internationalis.** 81:36-40, 2007

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA) - BRASIL , 2011 .Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 14 de agosto de 2011.

JAZAERI AA. Molecular profiles of hereditary epithelial ovarian cancers and their implications for the biology of this disease. **Mol Oncol.** 3(2):151-6, 2009.

JOSHI PP, KULKARNI MV, YU BK, SMITH KR, NORTON DL, VEELLEN W, et al. Simultaneous downregulation of CDK inhibitors p18(Ink4c) and p27(Kip1) is required for MEN2A-RET-mediated mitogenesis. **Oncogene**. 25;26(4):554-70, 2007.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000.

KARAMITOPOULOU E, ZLOBEC I, TORNILLO L, CARAFA V, SCHAFFNER T, BRUNNER T, BORNER M, DIAMANTIS I, ZIMMERMANN A, TERRACCIANO L. Differential cell cycle and proliferation marker expression in ductal pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN). **Pathology**. 42(3):229-34, 2010.

KERLIKOWSKE K, BROWN JS, GRADY SK, et al. Should women with familial ovarian cancer undergo prophylactic oophorectomy? **Obstet Gynecol**. 80(4): 700-7, 1992.

KIBEL AS, SUAREZ BK, BELANI J, OH J, WEBSTER R, BROPHY-EBBERS M, et al. CDKN1A and CDKN1B polymorphisms and risk of advanced prostate carcinoma. **Cancer Res**. 63(9):2033-6, 2003.

KURMAN RJ, VISVANATHAN K, RODEN R, WU TC, SHING I-M. Early detection and treatment of ovarian cancer: Shift-ing from early stage to minimal volume of disease based on a new model of carcinogenesis. **Am. J. Obstet. Gynecol**. 198: 351-6, 2008.

LI, DM; SUN H. PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, n. 95, p. 15406-15411, 1998.

LI G, STURGIS EM, WANG LE et al. Association between the V109G polymorphism of the p27 gene and the risk and progression of oral squamous cell

carcinoma. **Clin Cancer Res.**10:3996–4002, 2004.

MACRI E, LODA M. Role of p27 in prostate carcinogenesis. **Cancer Metastasis Rev.**, 17:337-344, 1998.

MAXWELL GL, RISINGER JI, GUMBS C, SHAW H, BENTLEY RC, BARRETT JC, *et al.* Mutation of the *PTEN* tumor suppressor gene in endometrial hyperplasias. **Cancer Res.** 58: 2500-2503, 1998.

MCMENAMIN ME, SOUNG P, PERERA S, KAPLAN I, LODA M, SELLERS WR. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. **Cancer Res.** 59(17):4291-6, 1999.

MEYER LA, ANDERSON ME, LACOUR RA, SURI A, DANIELS MS, URBAUER DL, *et al.* Evaluating women with ovarian cancer for BRCA1 and BRCA2 mutations: missed opportunities. **Obstet Gynecol.** 115(5):945-52, 2010.

MISKIMINS WK, WANG G, HAWKINSON M, MISKIMINS R. Control of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 expression by cap-independent translation. **Mol Cell Biol.** 21(15):4960-7, 2001.

MOURA – GALLO *et al.* Mutações no gene TP53 em tumores malignos de mama: associação com fatores de risco e características clinic-patológicas, inclusive risco de óbito, em pacientes residentes no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de epidemiologia.** Vol.7, No 2, 2004.

NAIDU R, HAR YC, TAIB NAM. P27 V109G Polymorphism is Associated with Lymph Node Metastases but not with Increased Risk of Breast Cancer. **J. Exp. Clin. Cancer Res.** 26:133-140, 2007

NATIONAL CANCER INSTITUTE – **NCI** (EUA) , 2011 .Disponível em: < <http://www.cancer.gov/>>. Acesso em: 14 de agosto de 2011

OBATA K, MORLAND SJ, WATSON RH, HITCHCOCK A, CHENEVIX-TRENCH G, THOMAS EJ, CAMPBELL IG. Frequent PTEN/MMAC Mutations in Endometrioid but not Serous or Mucinous Epithelial Ovarian Tumors. **Cancer Research**. 58:2095-2097, 1998

OLIVEIRA CF, AMARAL N. Rede Nacional de câncer familiar – Manual Operacional. **INCA**; 2009. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/inca/Arquivos/publicacoes/Cancer\\_Familiar\\_fim.pdf](http://www.inca.gov.br/inca/Arquivos/publicacoes/Cancer_Familiar_fim.pdf). Acesso em 23 de agosto de 2011.

PEEDICAYIL A, VIERKANT RA, HARTMANN LC, FRIDLEY BL, FREDERICKSEN ZS, WHITE KL, et al. Risk of ovarian cancer and inherited variants in relapse-associated genes. **PLoS One**. 5(1):e8884, 2010.

POLYAK K, LEE MH, ERDJUMENT-BROMAGE H, KOFF A, ROBERTS JM, TEMPST P & MASSAGUE J. Cloning of p27Kip1 a cyclin dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. **Cell**. 78: 59–66, 1994.

PORTER PL, MALONE K.E., HEAGERTY P.J., et al.: Expression of cell-cycle regulators p27KIP1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. **Nat. Med**. 3:222-225, 1997.

RISCH N, MERIKANGAS K. The future of genetic studies of complex human diseases. **Science** . 273, 1516–1517,1996.

SCHILDKRAUT JM, THOMPSON WD. Familial ovarian cancer: a population-based case-control study. **Am J Epidemiol**. 128 (3): 456- 66, 1988.

SPURDLE AB, DEANS AJ, DUFFY D, GOLDFAR DE, CHEN X, BEESLEY J, KCONFAB, EASTON DF, ANTONIOU AC, PEOCK S, COOK M, EMBRACE STUDY COLLABORATORS, NATHANSON KL, DOMCHEK SM, MACARTHUR GA, CHENEVIX-TRENCH G. No evidence that CDKN1B (p27) polymorphisms modify breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **Breast Cancer Res Treat** . 115:307–313, 2009.

SOUTH SA, VANCE H, FARRELL C, DICIOCCIO RA, FAHEY C, PIVER MS, et al. Consideration of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in BRCA mutation-negative familial ovarian cancers. **Cancer**. 15;115(2):324-33, 2009.

STECK, P.A.; PERSHOUSE, M.A.; JASSER, S.A.; YUNG, W.K.A.; LIN, H.; LIGON, A.H.; LANGFORD, L.A.; BAUMGARD, M.L.; HATTIER, T.; DAVIS, T.; FRYE, C.; HU, R.; SWEDLUND, B.; TENG, D.H.F.; TAYTIGIAN, S.V. Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. **Nature Genet.**, n. 15, p. 356-362, 1997.

SUAREZ BK, LIN J, BURMESTER JK, BROMAN KW, WEBER JL, BANERJEE TK, GODDARD KA, WITTE JS, ELSTON RC, CATALONA WJ. A genome screen of multiplex sibships with prostate cancer. **Am J Hum Genet**. 66: 933-44, 2000.

SUEBLINVONG T, CARNEY ME. Ovarian cancer: risks. **Hawaii Med J**. 68(2):40-6, 2009.

TAMURA M, GU J, TRAN H, YAMADA KM. PTEN Gene and Integrin Signaling in Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. Vol. 91, No. 21;1999.

TIGLI H., BUYRU N., DALAY N.: Molecular analysis of the p27/kip1 gene in breast cancer. **Mol. Diagn**. 9:17-21, 2005.



TONIN P, WEBER B, OFFIT K, COUCH F, REBBECK TR, NEUHAUSEN S, et al. Frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer families. **Nature Medicine**. 2, 1179 – 1183, 1996.

TOYOSHIMA H & HUNTER T. p27Kip1, a novel inhibitor of G1 cyclin- Cdk protein kinase activity, is related to p21. **Cell**. 78:67–74,1994.

TROPE C, DAVIDSON B, PAULSEN T, ABELER VM, KAERN J. Diagnosis and treatment of borderline ovarian neoplasms "the state of the art". **Eur J Gynaecol Oncol**. 30(5):471-82, 2009.

ZAGOURI F, DIMOPOULOS MA, BOURNAKIS E, PAPADIMITRIOU CA. Molecular markers in epithelial ovarian cancer: their role in prognosis and therapy. **Eur. J. Gin. Oncol**. XXXI, n3, 2010.

WEINBERG, ROBERT A. *Biologia do Câncer*. Porto Alegre , 1<sup>a</sup> ed. **Artmed**. 2008.

WHITTEMORE AS, HARRIS R, ITNYRE J. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case–control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. **Am. J. Epidemiol**. 136: 1184–1203, 1992