

**U. PORTO**



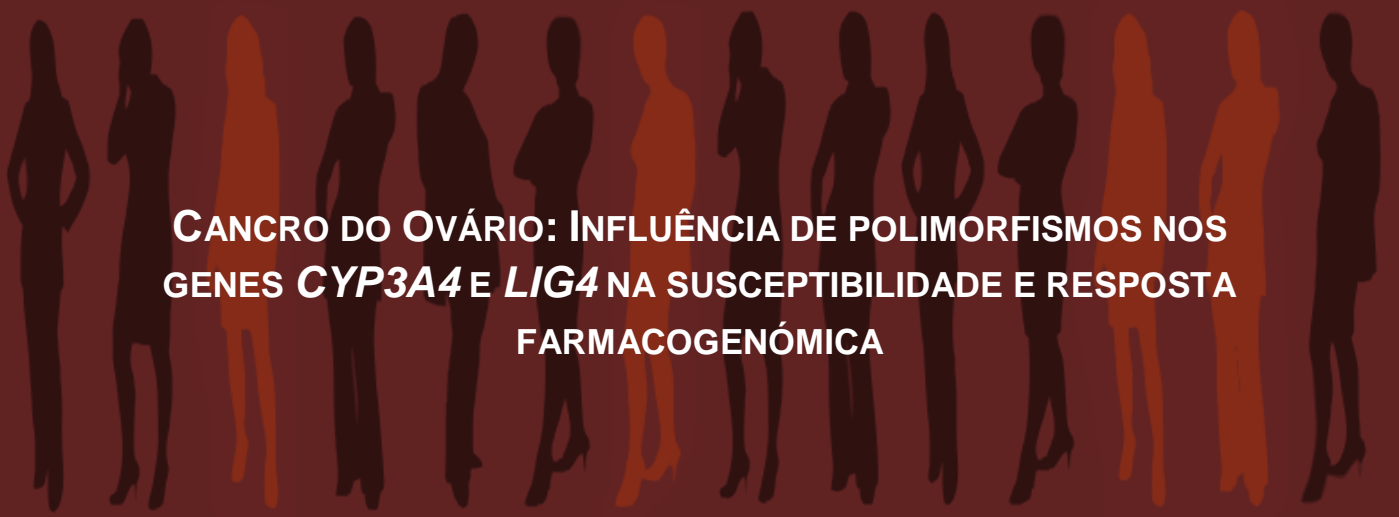
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO



Thomas  
Jefferson  
University



IPOPORTO



**CANCRO DO OVÁRIO: INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NOS  
GENES *CYP3A4* E *LIG4* NA SUSCEPTIBILIDADE E RESPOSTA  
FARMACOGENÓMICA**

JOANA ISABEL GOMES ASSIS

Dissertação de Mestrado em Oncologia

2011







**U. PORTO**



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO



Thomas  
Jefferson  
University



IPOPORTO

Joana Isabel Gomes Assis

## **Cancro do Ovário: Influência de polimorfismos nos genes *CYP3A4* e *LIG4* na susceptibilidade e resposta farmacogenómica**

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Oncologia, submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Professor Doutor Rui Manuel de Medeiros Melo Silva

Categoria – Professor Associado com Agregação

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto

## **INFORMAÇÃO TÉCNICA**

### **TÍTULO:**

Cancro do Ovário: Influência de polimorfismos nos genes *CYP3A4* e *LIG4* na susceptibilidade e resposta farmacogenómica

Dissertação de Candidatura ao Grau de Mestre em Oncologia, apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto

### **AUTOR:**

Joana Isabel Gomes Assis

### **DATA:**

Setembro de 2011

**EDITOR:** Joana Isabel Gomes Assis

**MORADA:** Rua 8, nº 15

**LOCALIDADE:** Areia – Árvore, Vila do Conde

**CÓDIGO POSTAL:** 4480-100 Árvore

**CORREIO ELECTRÓNICO:** joanaassis@gmail.com

**1ª EDIÇÃO:** Setembro de 2011

## AGRADECIMENTOS

Ao finalizar esta etapa da minha formação académica quero expressar o meu sincero reconhecimento e agradecimento a diversas pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho.

Desta forma, gostaria de agradecer à comissão de Coordenação do Mestrado em Oncologia, sob a pessoa do Professor Doutor Carlos Lopes, a oportunidade de ingressar neste mestrado e de enriquecer os meus conhecimentos científicos na área da oncologia.

Ao Professor Doutor Rui Medeiros, meu orientador, por me ter aceite no seu grupo de investigação e por me ter dado a oportunidade de desenvolver este trabalho. Obrigado por confiar e acreditar nos jovens investigadores e por nos proporcionar tudo o que estiver ao seu alcance.

À Liga Portuguesa Contra o Cancro – Núcleo Regional do Norte, na pessoa do Dr. Vítor Veloso, pelo apoio concedido para divulgação científica do presente trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Deolinda Pereira, pelo apoio fundamental na parte clínica, por acreditar e defender o nosso trabalho e por toda a disponibilidade e amabilidade que a caracterizam.

À Dr<sup>a</sup> Mónica Gomes, por me ter integrado no grupo de Oncologia Molecular, por todos os conhecimentos transmitidos e pela confiança depositada em mim. Um grande obrigado por toda a ajuda na elaboração deste trabalho, por estar sempre disponível para me aturar e por tudo o que fez e faz por mim. É um prazer *Feiticeira*...

À Dr<sup>a</sup> Raquel Catarino, por todo o apoio na elaboração deste trabalho e por estar sempre disponível para ajudar e ensinar.

A todos os investigadores do grupo de Oncologia Molecular, em especial ao Dr Augusto Nogueira, Dr<sup>a</sup> Andreia Azevedo, Dr<sup>a</sup> Joana Silva e Dr<sup>a</sup> Ana Luísa Teixeira por estarem sempre disponíveis, por todas as conversas mais ou menos sérias mas sobretudo por todas as gargalhadas partilhadas durante estes últimos dois anos. À Dr<sup>a</sup> Inês Marques por estarmos juntas desde o primeiro dia, pela amizade, pelo apoio mútuo,

por todas as conversas que permitiram ultrapassar momentos menos bons e por todas as peripécias por que passamos.

Ao Hugo Ribeiro, por toda a ajuda disponibilizada na elaboração desta tese e por ter *gramado* comigo em muitas ocasiões.

A todos os meus amigos, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim mesmo quando a disponibilidade para estarmos juntos era pouca. Àqueles que estão perto, obrigado por todos os cafés, por todas as *francesinhas* e por todos os momentos, em que até dentro do carro, ficávamos a conversar durante horas e horas. Aos que estão mais longe, estão sempre por perto e nunca serão esquecidos.

À minha família, que me têm apoiado desde sempre. Obrigado pela compreensão nos momentos em que tive que rejeitar tão apetitosos convites para me dedicar a este trabalho. A todas as crianças, que sendo ou não da família, me faziam esquecer de tudo e aproveitar o melhor da vida.

Aos meus pais, por estarem sempre presentes na minha vida e por me terem possibilitado investir na minha formação académica. Obrigado pela compreensão e apoio ao longo de todos estes anos. À minha mãe por todos os desabafos!

Ao Diogo, por seres o meu irmão preferido! *I wish nothing but the best for you...*

Ao Rui, por toda a ajuda na elaboração desta tese, por toda a compreensão, espírito de sacrifício, amizade e companheirismo. Por o todo ser maior que a soma das partes...

## Abreviaturas

### A

A	Adenina
ABC	<i>Adenosine triphosphate-Binding Cassete</i>
AMP	Adenosina monofosfato
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
ATP	Adenosina trifosfato

### B

BER	Reparação por Excisão de Bases
BRCA	<i>Breast Cancer</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer 2</i>
BRCT	<i>BRCA1 C Terminus</i>

### C

C	Citosina
CAR	<i>Constitutive Androgen Receptor</i>
CA125	Antigénio cancerígeno 125
CO	Cancro do Ovário
COE	Cancro do Ovário Epitelial
CYP	Citocromo P450
°C	Graus Célsius

### D

DC	Domínio Catalítico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNC	Domínio Não Catalítico
dNTP'S	Desoxirribonucleosídeo trifosfato
DSB	Quebra de Cadeia Dupla

### E

EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EOC	<i>Epithelial Ovarian Cancer</i>

### F

FIGO	<i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i>
FSH	<i>Follicle-stimulating hormone</i>

### G

G	Guanina
GR	<i>Glucocorticoid Receptor</i>

GST	Glutathiona S-transferase
<b>H</b>	
HR	Recombinação Homóloga
<b>I</b>	
IC	Intervalo de Confiança
<b>K</b>	
KDa	<i>KiloDalton</i>
<b>L</b>	
LH	<i>Luteinizing Hormone</i>
LIG1	DNA Ligase I
LIG3	DNA Ligase III
LIG4	DNA Ligase IV
<b>M</b>	
M	Concentração molar
mg/ml	Miligramas por mililitro
ml	Mililitro
MLH1	<i>mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)</i>
Mm	Concentração miniMolar
MMR	Reparação por mau emparelhamento
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
MSH2	<i>mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)</i>
<b>N</b>	
N	Tamanho da amostra
NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
NER	Reparação por Excisão de Nucleótidos
Ng	Nanogramas
NHEJ	União Terminal Não Homóloga
<b>O</b>	
OR	<i>Odds Ratio</i>
<b>P</b>	
P	Probabilidade
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
p/v	Peso por volume
PXR	<i>Pregnane X Receptor</i>

**R**

RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Acido Ribonucleico
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i>

**S**

SD	<i>Standard Deviation</i>
SLCO183	<i>Solute carrier organic anion transporter family, member 1B3</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SOPQ	Síndrome do Ovário Poliquístico
SSB	Quebra de Cadeia Simples

**T**

T	Timina
TBE	<i>Tris-borate EDTA buffer</i>

**U**

U	Unidade
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Concentração microMolar

**V**

VDR	<i>Vitamin D Receptor</i>
-----	---------------------------

**W**

WHO	Organização Mundial de Saúde
-----	------------------------------

**X**

$\chi^2$	Qui-Quadrado
XRCC4	<i>X-ray cross complementation 4</i>



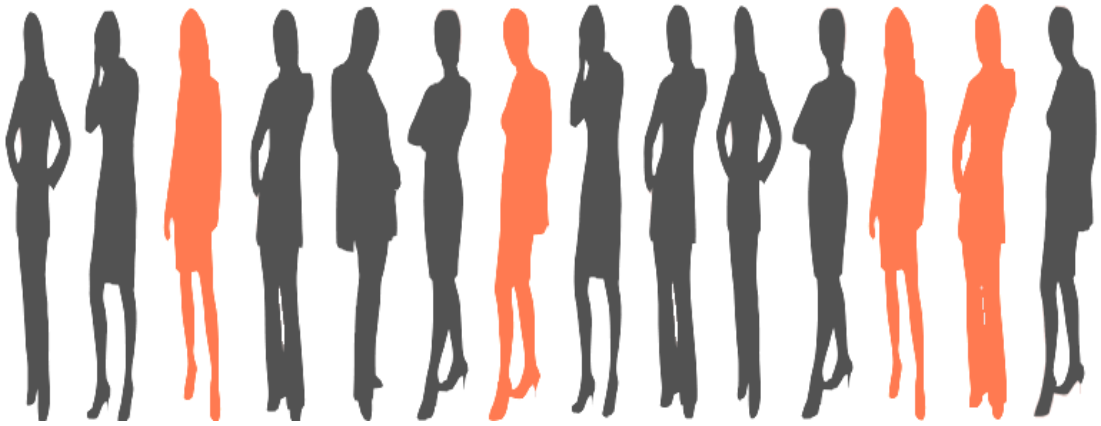
## Índice

AGRADECIMENTOS.....	V
Abreviaturas.....	VII
Resumo.....	XV
Abstract.....	XIX
1. Introdução.....	- 1 -
1.1. Oncobiologia e Epidemiologia Molecular.....	- 3 -
1.2. Variabilidade Genética Individual.....	- 5 -
1.3. Farmacogenómica.....	- 7 -
1.3.1. Enzimas Metabolizadoras.....	- 7 -
1.3.2. Enzimas do Citocromo P450.....	- 9 -
1.3.3. Enzima <i>CYP3A4</i> .....	- 12 -
1.3.4. Polimorfismos no gene <i>CYP3A4</i> .....	- 13 -
1.4. Mecanismos de Reparação do DNA.....	- 15 -
1.4.1. Enzima DNA Ligase IV.....	- 18 -
1.4.2. Polimorfismos no gene <i>LIG4</i> .....	- 20 -
1.5. Cancro do Ovário.....	- 22 -
1.6. Cancro do Ovário Epitelial, enzima <i>CYP3A4</i> e <i>LIG4</i> .....	- 28 -
2. Objectivos.....	- 29 -
2.1. Objectivo Geral.....	- 31 -
2.2. Objectivos Específicos.....	- 31 -
3. Material e Métodos.....	- 33 -
3.1. Caracterização da População.....	- 35 -
3.1.1. Doentes com Cancro do Ovário.....	- 35 -
3.1.2. Indivíduos do Grupo Controlo.....	- 35 -
3.2. Procedimentos Laboratoriais.....	- 37 -

3.2.1. Extracção de DNA Genómico.....	- 37 -
3.3. Genotipagem dos Polimorfismos <i>CYP3A4</i> -392 A/G e <i>LIG4</i> 1977 T/C.....	- 37 -
3.3.1. Genotipagem do Polimorfismo <i>CYP3A4</i> -392 A/G.....	- 37 -
3.3.2. Genotipagem do Polimorfismo <i>LIG4</i> 1977 T/C.....	- 40 -
3.4. Análise Estatística.....	- 42 -
4. Resultados.....	- 43 -
4.1. Associação do Polimorfismo -392 A/G no gene <i>CYP3A4</i> na susceptibilidade para Cancro do Ovário Epitelial.....	- 45 -
4.2. Associação do Polimorfismo 1977 T/C no gene <i>LIG4</i> na susceptibilidade para Cancro do Ovário Epitelial.....	- 46 -
4.3. Associação do Polimorfismo -392 A/G no gene <i>CYP3A4</i> na resposta farmacogenómica das doentes com Cancro do Ovário Epitelial.....	- 47 -
4.4. Associação do Polimorfismo 1977 T/C no gene <i>LIG4</i> na resposta farmacogenómica das doentes com Cancro do Ovário Epitelial.....	- 50 -
5. Discussão.....	- 53 -
5.1. Associação do Polimorfismo -392 A/G no gene <i>CYP3A4</i> na susceptibilidade para Cancro do Ovário Epitelial.....	- 57 -
5.2. Associação do Polimorfismo 1977 T/C no gene <i>LIG4</i> na susceptibilidade para Cancro do Ovário Epitelial.....	- 59 -
5.3. Associação do Polimorfismo -392 A/G no gene <i>CYP3A4</i> na resposta farmacogenómica das doentes com Cancro do Ovário Epitelial.....	- 60 -
5.4. Associação do Polimorfismo 1977 T/C no gene <i>LIG4</i> na resposta farmacogenómica das doentes com Cancro do Ovário Epitelial.....	- 63 -
6. Conclusão e Perspectivas Futuras.....	- 65 -
7. Referências Bibliográficas.....	- 69 -
8. Anexos.....	- 81 -
Anexo I.....	- 83 -
Anexo II.....	- 84 -

Anexo III.....	- 85 -
Anexo IV.....	- 87 -
Anexo V.....	- 89 -
Anexo VI.....	- 91 -
Anexo VII.....	- 93 -
Anexo VIII.....	- 95 -





# RESUMO



Nos últimos anos, com os avanços científicos alcançados, tornou-se evidente que a variabilidade genética do hospedeiro desempenha um papel crucial no desenvolvimento, progressão e conseqüente prognóstico dos doentes oncológicos. Os polimorfismos são variações na sequência de DNA que existem em indivíduos normais de uma população, cuja variante menos frequente está presente em pelo menos 1 % dessa população. Uma fracção considerável de polimorfismos apresenta significado funcional sendo capaz de alterar, entre outros mecanismos, o balanço entre os danos no DNA e a capacidade de resposta celular.

A *CYP3A4* é uma enzima essencial na biotransformação de compostos endógenos e exógenos, promovendo a sua transformação em metabolitos facilmente elimináveis pelo organismo. Contudo, antes que possam ser eliminados, os compostos podem perder actividade ou adquirir características de carácter carcinogénico. Variações na expressão da *CYP3A4* podem modificar as suas capacidades enzimáticas e, desta forma, influenciar a metabolização de agentes potencialmente etiológicos para determinadas neoplasias, como agentes hormonais, e de agentes quimioterapêuticos, como o paclitaxel.

Quando a célula normal é sujeita à acção de carcinogénios, uma resposta celular coordenada deve ocorrer de forma a identificar e corrigir o dano. Desta forma, enzimas envolvidas nas vias de reparação, como a enzima DNA Ligase IV (*LIG4*), são consideradas como *caretakers* do genoma. Variações na expressão enzimática da *LIG4* podem conduzir a uma hipersensibilidade ao dano no DNA, desregulação dos mecanismos de reparação e de apoptose, afectando a susceptibilidade para o desenvolvimento neoplásico bem como a resposta à terapia oncológica.

O cancro do ovário é a terceira neoplasia ginecológica mais frequente entre as mulheres a nível mundial. Na Europa, é a quinta neoplasia mais frequente na mulher mas a primeira causa de morte entre os tumores ginecológicos. O cancro do ovário epitelial (COE; 90 % dos tumores malignos do ovário) é altamente heterogéneo, podendo ser dividido em quatro principais sub-tipos histológicos: seroso, mucinoso, endometrióide e células-claras.

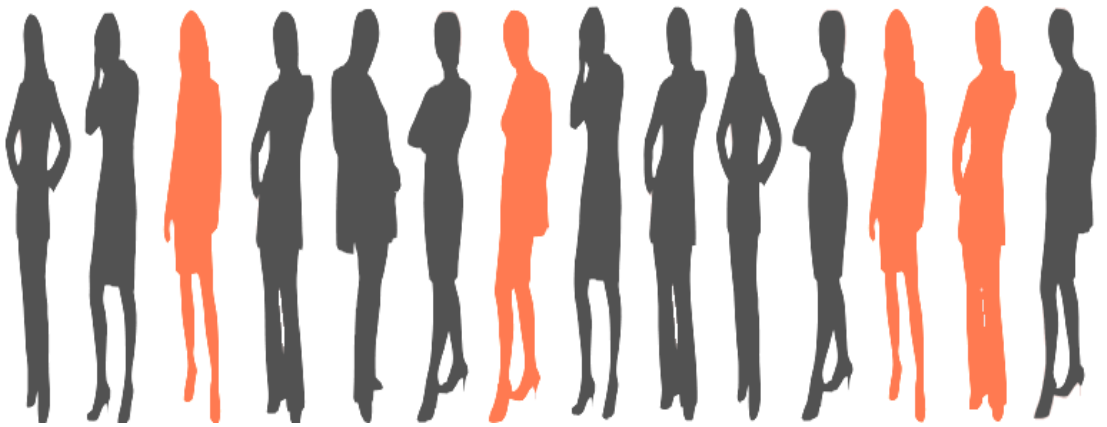
A etiologia e a carcinogénese do ovário carecem ainda de elucidação, embora eventos reprodutivos e hormonais possam ser determinantes. O tratamento *standard* do COE avançado baseia-se na cirurgia citoreductora seguida de quimioterapia à base de platinos e taxanos. Apesar de 80% das doentes responder à terapia de primeira linha, o

desenvolvimento de quimio-resistência é frequente e muitas das doentes acabam por desenvolver recidivas. Encontra-se estabelecido que polimorfismos em genes de enzimas envolvidas no metabolismo de agentes quimioterapêuticos e reparação do DNA podem alterar significativamente o *outcome* da terapia.

Neste trabalho foi desenvolvido um estudo do tipo caso-controlo com o objectivo de avaliar a influência dos polimorfismos -392 A/G no gene *CYP3A4* e 1977 T/C no gene *LIG4* na susceptibilidade para o desenvolvimento de COE. Foram recrutados para este estudo 252 doentes com diagnóstico histológico de COE (grupo de casos) e 250 indivíduos sem doença oncológica conhecida (grupo controlo). Paralelamente, foi desenvolvido um estudo do tipo *cohort* retrospectivo de forma a avaliar a influência dos polimorfismos referidos na resposta farmacogenómica das doentes com COE. Para este estudo, foram incluídas 222 doentes com COE submetidas a quimioterapia de primeira linha à base de paclitaxel e platinos, após cirurgia citoreductora. Os indivíduos de ambos os grupos foram genotipados por PCR-RFLP e *Real-Time* PCR relativamente ao polimorfismo -392 A/G no gene *CYP3A4* e 1977 T/C no gene *LIG4*, respectivamente. A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa estatístico SPSS.

Os resultados obtidos indicam que, apesar da importância biológica inerente a cada uma das enzimas, os polimorfismos referidos não parecem influenciar a susceptibilidade para COE. Os resultados farmacogenómicos demonstram uma associação entre o polimorfismo -392 A/G no gene *CYP3A4* e uma diminuição na sobrevivência global das doentes com COE, nomeadamente em doentes com tumores de histologia seroso ( $p=0,019$ ) e em fases avançadas (estadio III;  $p=0,050$ ). A presença do alelo G poderá ter como consequência funcional uma maior degradação do paclitaxel a metabolitos inactivos e, conseqüentemente, a uma menor efectividade da terapia. No que diz respeito ao polimorfismo 1977 T/C no gene *LIG4*, este parece estar associado com uma tendência na resposta à terapia das doentes com tumores de histologia seroso e em estadio III. Doentes portadoras do alelo C apresentam uma maior sobrevivência global ( $p=0,057$ ), o que pode estar relacionado com uma diminuição da actividade e eficácia enzimática da *LIG4* e, conseqüentemente, a uma maior sensibilidade à terapia.

Estes resultados podem ser importantes na monitorização de doentes com COE e na definição de um perfil farmacogenómico de forma a melhorar as estratégias clínicas aplicadas neste grupo de doentes.



**ABSTRACT**



In the last years, with the achieved scientific advances, it became clearer that the genetic variability of the host have a great role in the development, progression and consequent prognosis of the oncologic patient. Polymorphisms are variations in the DNA sequence that exist in normal individuals of a population, whose less frequent variant is present at least in 1 % of that population. A considerable fraction of polymorphisms have functional significance being capable to change, among other mechanisms, the balance between the DNA damage and the capability of cellular response.

*CYP3A4* is a fundamental enzyme involved in biotransformation of endogenous and exogenous compounds, promoting their transformation to metabolites easily eliminated by the organism. However, before their elimination, the compounds can lose their activity or acquire carcinogenic characteristics. Variation in expression of *CYP3A4* can modify their metabolic skills and, thus, affect the metabolism of potential etiologic agents to certain tumors, like hormonal agents, as well as in the metabolism of chemotherapeutic agents, like paclitaxel.

When a normal cell is subjected to a carcinogenic action, a coordinate cellular response takes place to identify and correct the damage. Thus, the enzymes involved in the repair pathways, like DNA Ligase IV enzyme (*LIG4*), are considered as genome caretakers. Variation in enzymatic activity of *LIG4* can conduct to a hyper-sensibility to DNA damage, deregulation of repair and apoptosis mechanisms, affecting the susceptibility to the cancer development as well as oncologic therapy response.

Ovarian cancer is the third most common gynecological cancer among women worldwide. In Europe, ovarian cancer is the fifth most incident cancer in women but the main cause of death among the gynecological cancers. The epithelial ovarian carcinoma (EOC; 90 % of all malignant ovarian) is highly heterogeneous and can be divided into four main subtypes: serous, mucinous, endometrioid and clear cell.

The etiology and the ovarian carcinogenesis still need clarification although some reproductive and hormonal events can be determinant. Standard treatment for EOC patients is based on cytoreductive surgery, followed by chemotherapy with a platinum agent and a taxane. Although 80 % of the patients respond to the first-line therapy, the development of resistance is common and several patients eventually recur. Polymorphisms in genes coding enzymes involved in the metabolism of chemotherapeutic agents and DNA repair can dramatically modify the therapy outcome.

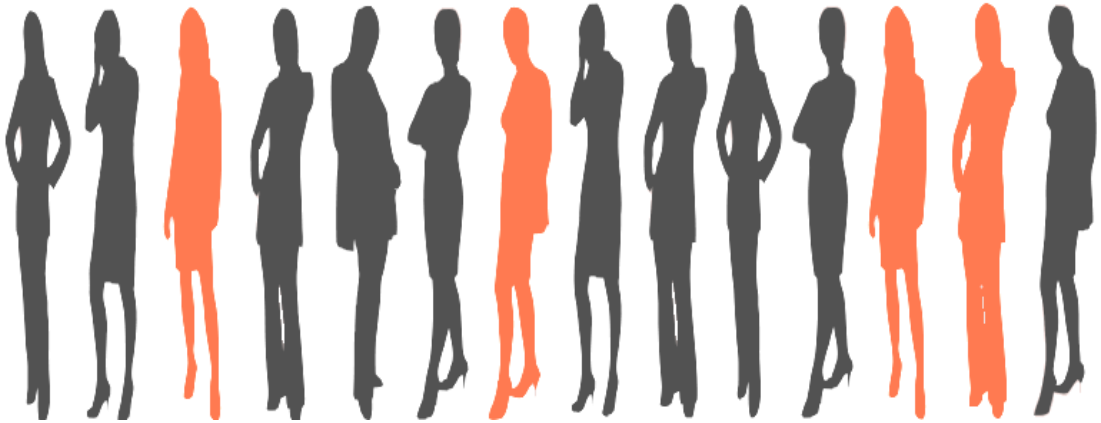
In this work we performed a case-control study in order to evaluate the influence of -392 A/G polymorphism in *CYP3A4* gene and 1977 T/C polymorphism in *LIG4* gene in the susceptibility to development of EOC. There were recruited 252 patients with histologically confirmed EOC (case group) and 250 healthy individual without any oncologic disease (control group). At the same time, it was also performed a retrospective cohort study to evaluate the influence of the polymorphisms in the pharmacogenomic response of the EOC patients. For this study, there were included 222 patients with EOC that underwent first-line chemotherapy with platinum agent and paclitaxel after citoreductive surgery. The analysis of -392 A/G polymorphism in *CYP3A4* gene and 1977 T/C polymorphism in *LIG4* gene were performed by PCR-RFLP and Real-Time PCR, respectively. Analysis of data was performed using the statistical program SPSS.

The results obtained show that, despite the biological importance inherent to each of these enzymes, the referred polymorphisms do not seem to influence the susceptibility to EOC.

The pharmacogenomic results show an association between the -392 A/G polymorphism in *CYP3A4* gene and a diminished overall survival of the EOC patients, namely in patients with serous tumors ( $p=0,019$ ) and in advanced stages (stage III;  $p=0,050$ ). The presence of G allele may have as functional consequence a greater degradation of paclitaxel to less active metabolites and, consequently, a worse therapy efficacy.

With respect to 1977 T/C polymorphism in *LIG4*, it seems to be associated with a tendency in the therapy response of EOC patients with serous tumors and in stage III. Patients carrying G allele genotypes have a great overall survival ( $p=0,057$ ), which may be associated with a decrease enzymatic activity and efficacy of *LIG4* and, consequently, to a great sensibility to the therapy.

These results could help in the monitorization of patients with EOC and could help to define a pharmacogenomic profile of EOC to improve the clinical strategies applied in this group of patients.



# 1. INTRODUÇÃO



## 1.1. Oncobiologia e Epidemiologia Molecular

O cancro, considerado como a doença do genoma, é um dos graves problemas de saúde pública que permanece por resolver, apesar de todos os avanços científicos [1]. O cancro é encarado como uma doença heterogénea, complexa e multifactorial, cujas características, desenvolvimento e prognóstico variam de indivíduo para indivíduo [2-3]. Contudo, é actualmente aceite que a maioria dos tumores, se não a sua totalidade, partilha um pequeno número de propriedades moleculares, bioquímicas e celulares [4]. Por conseguinte, existem seis alterações essenciais na fisiologia celular que ajudam a atingir o fenótipo maligno: auto-suficiência em relação a factores de crescimento, insensibilidade a factores inibidores do crescimento, fuga à apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogénese e invasão tecidual e metastização. Uma década após a publicação da primeira sugestão dos *hallmarks* do cancro, torna-se cada vez mais evidente que outros factores poderão também ser cruciais e transversais à maioria dos tumores como o papel da imunidade, inflamação ou a regulação por moléculas biológicas, como os microRNAs [5-6].

O processo de desenvolvimento tumoral, ou carcinogénese, é um processo complexo que envolve uma progressiva acumulação de alterações genéticas que conduzem à transformação de uma célula normal numa célula neoplásica [4]. De uma forma geral, a carcinogénese pode ser dividida em três etapas principais: iniciação, promoção e progressão. A iniciação consiste na aquisição de lesões genéticas não letais pelas células somáticas, através da acção de agentes carcinogénicos (químicos, físicos ou biológicos), alterações epigenéticas ou pela herança de alterações nas células da linhagem germinativa [7].

Se a célula iniciada for devidamente estimulada por agentes promotores, como agentes químicos ou hormonais, ocorre uma acumulação sucessiva de alterações genéticas que proporcionam uma vantagem selectiva da célula iniciada sob as restantes células normais. A promoção caracteriza-se, portanto, pela expansão clonal selectiva de células iniciadas e, como tal, em risco de sofrerem alterações genéticas adicionais e de atingirem um estado de malignidade [7]. Por último, a fase de progressão consiste na expressão do fenótipo maligno e na aquisição de características de maior agressividade por parte das células neoplásicas. Durante este processo, e mediante a interacção com

factores ambientais, podem ocorrer alterações genéticas e epigenéticas, proporcionando a activação de proto-oncogenes e a inactivação de genes supressores tumorais [7].

Estudos epidemiológicos demonstram um aumento substancial no número de casos de cancro diagnosticados nos últimos anos. Estes dados podem ser associados ao aumento da população e da esperança média de vida, melhoria dos métodos de diagnóstico assim como ao aumento da exposição a agentes etiológicos, como o tabaco [3]. Desta forma, estima-se que, no ano de 2008, tenham ocorrido cerca de 12,7 milhões de novos casos de cancro e 7,6 milhões de mortes por esta doença, a nível mundial. O cancro da mama na mulher e o cancro do pulmão no homem são os cancros mais frequentes e mais mortais a nível mundial [8].

Tendo em conta a forte associação entre a idade e o cancro, estima-se que em 2015, usando como referência dados de 2000, a taxa de incidência e de mortalidade por cancro aumente significativamente, já que o número de indivíduos com mais de 65 e 80 anos será, respectivamente, 22 % e 50 % superior [9].

Pela sua importância epidemiológica, o cancro tem sido alvo de estudo exhaustivo, embora muitas questões permaneçam ainda por esclarecer.

## 1.2. Variabilidade Genética Individual

A sequenciação do genoma humano permitiu identificar alterações ao nível da sequência de DNA (Ácido Desoxirribonucleico) e esclarecer de que forma é que estas poderão estar associadas a diferentes susceptibilidades, quer para o desenvolvimento neoplásico, quer nas variadas respostas ao tratamento e consequente prognóstico [10]. Com a excepção dos cancros hereditários, cuja frequência é de 5-10 %, e resultantes de mutações específicas, o desenvolvimento de uma neoplasia resulta de um conjunto de factores na qual a variabilidade genética do hospedeiro desempenha um papel crucial [2].

Os genes envolvidos na susceptibilidade para cancro podem ser estratificados, de acordo com a sua penetrância, em genes de elevada penetrância, geralmente envolvidos nos cancros hereditários, como os genes *BRCA1* (*Breast Cancer 1*) e *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), e genes de baixa penetrância, geralmente envolvidos nos tumores esporádicos [11].

Os genes considerados de baixa penetrância são genes comuns, com uma acentuada interacção gene-ambiente e capazes de interagir com outros genes [11]. Embora estes genes apresentem um baixo impacto em termos de risco individual para cancro, poderão ser importantes na análise do risco atribuível a nível populacional, permitindo a definição de grupos de risco, e assim auxiliar no desenvolvimento de estratégias de prevenção e de tratamento para indivíduos com risco aumentado [12].

As variações na sequência de DNA que existem em indivíduos normais de uma população, cuja variante menos frequente está presente em pelo menos 1 % dessa população, são classificadas como polimorfismos [11]. Os polimorfismos eram inicialmente entendidos como funcionalmente insignificantes, embora evidências recentes enfatizem que uma fracção considerável de polimorfismos é capaz de afectar as propriedades intrínsecas e a função proteica num grau variável, apresentando por isso significado funcional [13].

Nos últimos anos assistiu-se a um interesse renovado pelos polimorfismos genéticos, dos quais 90 % são considerados *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), ou seja, polimorfismos em que a variação ocorre num único nucleótido [14]. Evidências apontam para que o risco para determinadas doenças, tais como o cancro, seja bastante influenciado pelos padrões de SNPs de um indivíduo. Provavelmente, será o efeito combinado de um conjunto de SNPs e factores ambientais que contribuirá para o

diferente risco de desenvolvimento de uma determinada neoplasia, bem como para a resposta a uma terapia [14-15].

Desta forma, a definição de perfis genéticos de susceptibilidade podem proporcionar melhorias significativas na eficácia de programas de prevenção de doenças, assim como possibilitar um diagnóstico precoce, bem como a optimização de estratégias terapêuticas, permitindo atingir uma medicina personalizada [16].

### 1.3. Farmacogenómica

Os polimorfismos, e nomeadamente os SNPs, podem ser considerados como um meio para que se atinja a meta da medicina personalizada, tendo em conta as características genéticas únicas de cada indivíduo. Estas variações genéticas são também uma ferramenta necessária para liderar o desenvolvimento de novas e melhores drogas, com a expectativa que estas se traduzam num tratamento mais efectivo, seguro e bem tolerado pelos doentes [17].

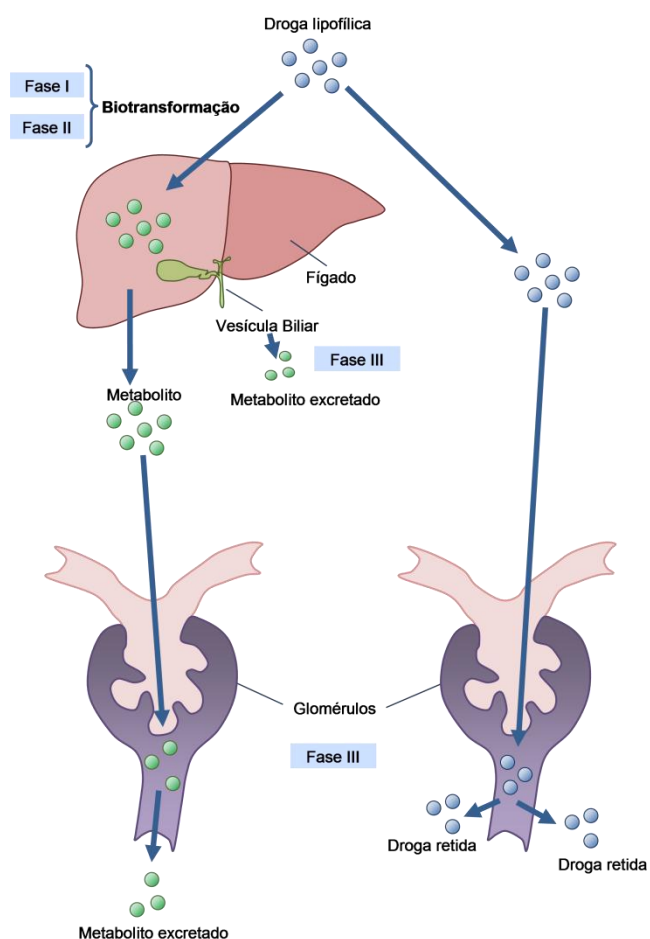
A influência da componente genética na resposta à terapia foi pela primeira vez documentada na década de 50, dando origem à Farmacogenética. Posteriormente, com os avanços no conhecimento do Genoma Humano e melhoria das ferramentas bioinformáticas, surge a Farmacogenómica [18]. Este campo de investigação define-se como o estudo das bases hereditárias capazes de provocar diferenças inter-individuais na resposta à terapia, tendo como objectivo final a passagem de “uma droga para todos” para a “droga certa, na dose e tempo correctos, para cada paciente” [19-20]. Como consequência, espera-se que haja um maior entendimento acerca da multiplicidade e complexidade da interacção entre a droga e o gene [17].

A Farmacogenómica tem a capacidade de subdividir uma população de doentes com um mesmo diagnóstico em subgrupos, de acordo com as diferenças metabólicas herdadas e/ou sensibilidade para a resposta a fármacos. A definição de um perfil farmacogenómico terá em conta a informação genética do paciente relativamente à Farmacocinética e Farmacodinâmica, incluindo diferenças herdadas ao nível dos alvos da medicação, como receptores membranares, e ao nível da disposição e distribuição da droga, como enzimas metabolizadoras e transportadores [18,21].

#### 1.3.1. Enzimas Metabolizadoras

A maioria dos xenobióticos, como os compostos farmacológicos, é de natureza lipofílica o que facilita a sua passagem através das membranas celulares e o acesso aos locais de acção. Contudo, para que possam ser eliminados pelo organismo, os compostos têm que sofrer uma transformação enzimática, para que se tornem metabolitos mais hidrofílicos, num processo designado por biotransformação [22].

A metabolização destes compostos ocorre preferencialmente no fígado, resultando num aumento da capacidade de excreção dos metabolitos a nível renal e biliar (Figura 1). Atendendo à capacidade de reduzir o risco de acumulação dos metabolitos a níveis tóxicos no organismo, torna-se num processo essencial na manutenção da homeostase celular [23].



**Figura 1.** Representação esquemática do processo de biotransformação. Compostos lipofílicos são metabolizados, essencialmente a nível hepático, para dar origem a metabolitos mais hidrofílicos, que possam ser facilmente excretados na urina ou nas fezes (adaptado de [24]).

A biotransformação é conduzida por um grande grupo de enzimas metabolizadoras de drogas, as quais são responsáveis pela metabolização de uma vasta gama de xenobióticos, como drogas, e endobióticos, como hormonas, num processo que envolve três fases. As reacções de Fase I envolvem a funcionalização dos metabolitos,

isto é, a introdução ou exposição de grupos funcionais através de reacções de oxidação, redução ou hidrólise. De uma forma geral, esta etapa torna os metabolitos em intermediários reactivos e/ou espécies reactivas capazes de provocar danos nos tecidos, sendo geralmente mais tóxicos ou carcinogénicos que o composto inicial [23]. Alguns exemplos de enzimas envolvidas nesta primeira fase da transformação são as enzimas do Citocromo P450 (CYP) [23].

As reacções de Fase II convertem os metabolitos intermediários da Fase I em produtos finais, cuja molécula resultante é geralmente menos activa e menos lipofílica que o seu precursor, facilitando a sua excreção, sobretudo, a nível renal ou biliar [22,25]. Nesta etapa, são características as reacções de conjugação ou adição de compostos endógenos bem como metilação ou acetilação. A Glutathione S-transferase (GST) é um exemplo de enzima envolvida nesta fase [23]. As reacções de Fase I e II ocorrem essencialmente a nível hepático, embora possam também ocorrer a nível digestivo, renal ou pulmonar [23].

A última fase, a Fase III, é caracterizada pela absorção, distribuição e excreção dos metabolitos [22]. As enzimas participantes nesta fase são expressas em muitos tecidos, como o fígado, intestino, rins e cérebro. Uma fracção das enzimas transportadoras diz respeito à família enzimática ABC (*Adenosine triphosphate-binding cassette*) [23].

As três fases que caracterizam o processo de biotransformação são independentes e podem, ou não, ser sequenciais. É apenas necessário que as reacções estejam balanceadas entre si para minimizar a presença de metabolitos intermediários reactivos (Figura 1) [23].

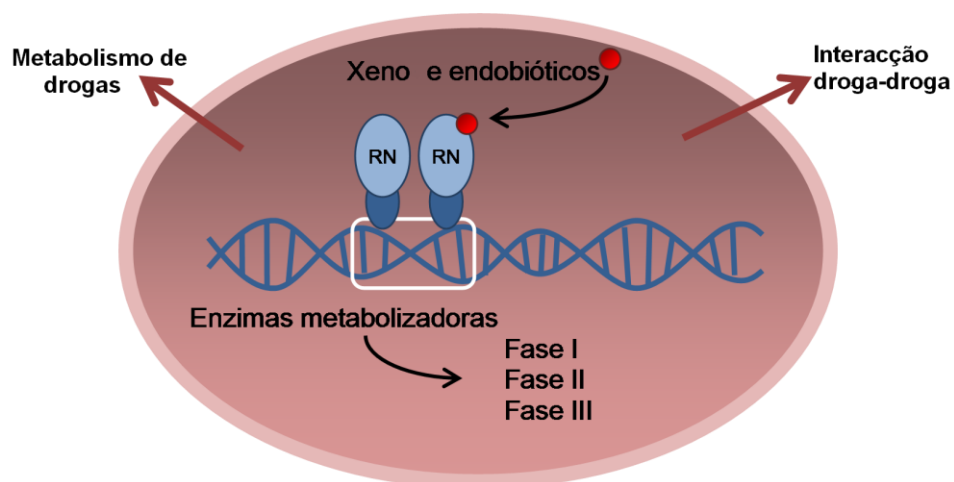
De todas as famílias de enzimas envolvidas na primeira fase da biotransformação, as pertencentes à família CYP são das mais importantes, quer pelo elevado número de compostos que metabolizam quer pela versatilidade catalítica que apresentam [26].

### 1.3.2. Enzimas do Citocromo P450

Descobertas em 1958, por Martin Klingenberg, as enzimas CYP são hemoproteínas existentes, a nível celular, na membrana do retículo endoplasmático, de

microsomas e das mitocôndrias. Estas proteínas fazem parte do grupo de enzimas mono-oxigenases capazes de levar a cabo reacções de oxidação, como hidroxilação ou oxigenação [27-28].

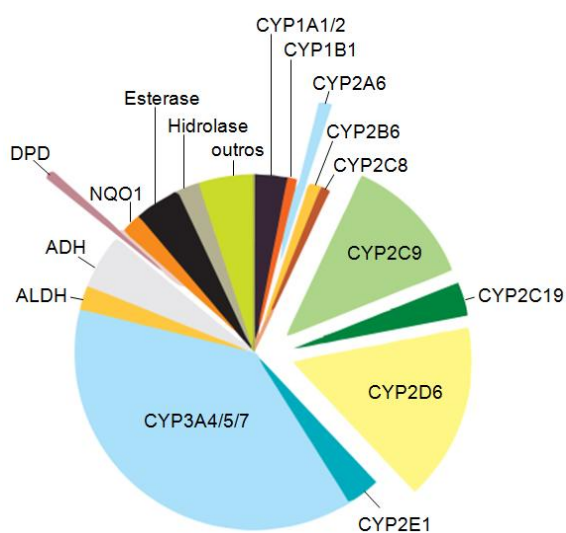
A expressão genética das enzimas CYP é frequentemente regulada pelos compostos endógenos e exógenos que metabolizam [29-30]. Estes compostos são capazes de se ligar e activar receptores nucleares como o PXR (*Pregnane X Receptor*), CAR (*Constitutive Androgen Receptor*), RXR (*Retinoid X Receptor*), VDR (*Vitamin D Receptor*) ou o GR (*Glucocorticoid Receptor*), que interagem com a região promotora dos genes da família CYP, bem como de outras enzimas envolvidas na biotransformação (Figura 2) [31]. Por interagirem com vários xenobióticos e medirem uma resposta celular como factores de transcrição, os receptores nucleares envolvidos neste processo são geralmente designados como xenosensores [22,32].



**Figura 2.** Representação esquemática da regulação genética das enzimas envolvidas na biotransformação. Os receptores nucleares (RN), activados por xeno e endobióticos, são capazes de regular a expressão de enzimas metabolizadoras condicionando, desta forma, o metabolismo e a interacção entre drogas (adaptado de [33]).

As enzimas CYP podem ser agrupadas em diversas famílias e sub-famílias, de acordo com a percentagem de homologia da sequência aminoacídica, podendo ser divididas em três grandes grupos [22]. No primeiro grupo, agrupam-se as famílias 1 a 3, as quais apresentam menor afinidade para os seus substratos e são menos conservadas a nível evolutivo. Estas famílias são responsáveis por 70 a 80 % de todo o metabolismo de Fase I de fármacos utilizados na prática clínica (Figura 3). O segundo grupo diz

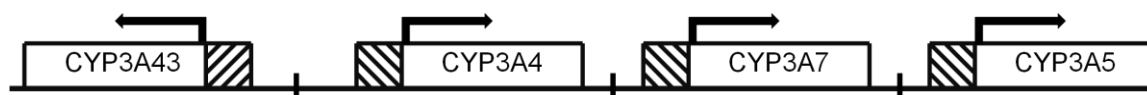
respeito à família CYP4, responsável pelo metabolismo de ácidos gordos, substratos relacionados e alguns xenobióticos. Por último, as famílias 5 a 51 apresentam uma grande afinidade para substratos endógenos e permanecem bem conservadas ao longo da evolução [34].



**Figura 3.** Enzimas envolvidas na Fase I do processo de biotransformação e a respectiva contribuição para o metabolismo de xenobióticos (adaptado de [31]).

Dentro do grupo das enzimas CYP, a família CYP3 e, a sua única sub-família, a CYP3A, parecem ser das mais importantes a nível clínico. Esta sub-família está envolvida na metabolização, pelo menos de forma parcial, de 45-60 % de todas as drogas, sendo determinante a nível da interacção droga-droga [31,35].

Os genes *CYP3A* estão localizados num *cluster* no cromossoma 7, num agrupamento que contém quatro genes funcionais: *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* e *CYP3A43* (Figura 4) [36-37].



**Figura 4.** Organização esquemática do *locus CYP3A* (adaptado de [31]).

Enquanto a enzima CYP3A7 é predominantemente expressa na vida fetal e a enzima CYP3A43 não apresenta uma contribuição significativa na expressão hepática desta sub-família, as enzimas CYP3A4 e CYP3A5 parecem ser as isoenzimas mais

abundantes e funcionalmente relevantes a nível metabólico [38-39]. Apesar da CYP3A5 ser expressa no fígado, intestino e rins e apresentar uma especificidade em termos de substratos semelhante à CYP3A4, encontra-se, geralmente, expressa numa baixa frequência em caucasianos [39-40].

### 1.3.3. Enzima CYP3A4

A enzima CYP3A4, pertencente à sub-família CYP3A, é bastante importante já que catalisa o metabolismo oxidativo de uma grande variedade de compostos incluindo, pelo menos, 50 % de todas as drogas terapêuticas e substratos endógenos [41-42]. Os compostos metabolizados por esta enzima distribuem-se por várias classes, das quais se destacam os anticoagulantes, antidepressivos, anti-histamínicos, bloqueadores de canais de cálcio, agentes quimioterapêuticos, contraceptivos orais, entre muitos outros [43-44]. A CYP3A4 apresenta também um papel importante no metabolismo de esteróides endógenos como a testosterona, a progesterona e estrogénio [43].

O gene *CYP3A4* localiza-se no cromossoma 7q21.3-q22.1, sendo constituído por 13 exões, numa estrutura exão-intrão bem conservada, e codifica uma proteína membranar com 503 aminoácidos [45]. A enzima CYP3A4 é maioritariamente expressa no fígado, sendo a proteína CYP mais abundante neste órgão, embora a sua expressão também possa ser detectada noutros locais extra-hepáticos especialmente a nível intestinal [43,46].

Relativamente à sua regulação genética, estudos demonstraram que o PXR é o regulador predominante do gene *CYP3A4*, embora o CAR ou o VDR possam ter também um papel importante [47-49]. Para que ocorra a transcrição do gene, quer em níveis basais quer aumentados, os compostos indutores ligam-se ao receptor PXR. Este, na presença do ligando, forma um heterodímero com o RXR, tendo assim a capacidade de se ligar a elementos específicos na região promotora do gene *CYP3A4* de forma a induzir a transcrição genética [30-31,50].

Pela variedade de compostos que metaboliza, a CYP3A4 é uma enzima que se reveste de grande importância, quer a nível fisiológico quer a nível patológico. Como exemplo do seu papel a nível oncológico, esta enzima encontra-se envolvida na metabolização de agentes potencialmente etiológicos para determinadas neoplasias.

Diversos estudos demonstram que, pela capacidade de metabolizar hormonas endógenas, como a testosterona e estrogénios, a enzima *CYP3A4* poderá influenciar o risco para cancro da próstata e do ovário/mama, respectivamente [25,41,51]. Por outro lado, estudos farmacogenómicos indicam que a enzima em estudo é capaz de condicionar a resposta a diversos agentes quimioterapêuticos, nomeadamente tamoxifeno e paclitaxel [52-53].

Para além de ser regulada a nível transcripcional, estima-se que 60 a 90 % da variabilidade inter-individual na actividade hepática desta enzima seja determinada a nível genético e, nomeadamente, pelo efeito de polimorfismos [31,54-55].

#### 1.3.4. Polimorfismos no gene *CYP3A4*

No gene da *CYP3A4*, os polimorfismos genéticos eram desconhecidos até 1996. Contudo, desde essa data, já foram identificados mais de 30 SNPs na sua sequência nucleotídica, englobando desde o polimorfismo *CYP3A4\*1* ao *CYP3A4\*21* [43,55-56]. Contudo, a maioria destas variações são bastante raras, e como tal, a grande maioria é ainda de significado desconhecido [22,55].

No ano de 1998, Rebbeck e colaboradores descreveram uma variação na região promotora do gene *CYP3A4* que consiste numa transição de uma adenina para uma guanina (-392 A/G) [51]. Esta variante, designada por *CYP3A4\*1B*, apresenta uma grande variação inter-étnica na sua frequência, com 2,8-9,6 % em caucasianos, 48-67,2 % em afro-americanos, 69-81 % em africanos e estando ausente na população asiática [53,57-61]. Na população portuguesa, a frequência descrita para a variante *CYP3A4\*1B* é de 4-7 % [62-64].

O significado biológico do polimorfismo é controverso [46]. Alguns estudos apontam que a presença da variante tenha como consequência uma diminuta expressão ou actividade da enzima [31,51,65-67]. Como consequência, o polimorfismo poderá estar relacionado com formas mais agressivas de cancro da próstata, já que a redução da expressão da enzima e a consequente diminuição geral da sua actividade resultará num aumento da biodisponibilidade de testosterona para conversão em di-hidrotestosterona [41,51,60,68-69]. Por outro lado, pode ser considerado como factor de protecção para o desenvolvimento de leucemias secundárias associadas a tratamentos quimioterapêuticos

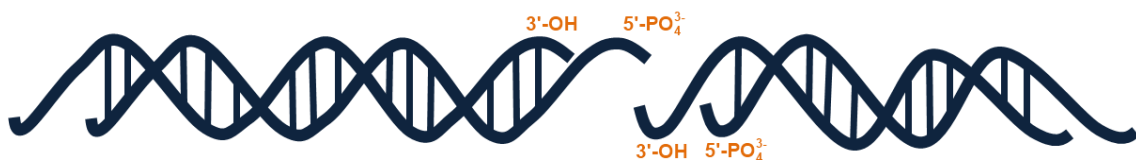
já que, possivelmente, a presença do genótipo variante conduz a uma diminuição da produção de metabolitos leucemogénicos prejudiciais [41,66]. No entanto, alguns estudos funcionais associaram a presença da variante com uma expressão aumentada da enzima [46,58,70-71]. Contudo, apesar deste polimorfismo se encontrar na região promotora do gene, alguns estudos não comprovaram o seu efeito a nível da expressão ou actividade enzimática [41,72-74].

#### 1.4. Mecanismos de Reparação do DNA

Ao longo do ciclo celular, e durante todo o tempo de vida de uma célula, o genoma está continuamente exposto a uma grande variedade de agentes e processos capazes de danificar o DNA. A manutenção da estabilidade genética é necessária e passa não só por mecanismos precisos de replicação do DNA, como por mecanismos eficazes que detectem e reparem os possíveis danos. Muitas das lesões que ocorrem no genoma são temporárias já que, depois do seu reconhecimento, uma resposta celular coordenada ocorre de forma a interromper o ciclo celular, para que a lesão seja reparada ou, caso a extensão do dano seja excessiva, conduzir à apoptose, assegurando desta forma a integridade genómica [75].

Existem inúmeras vias de reparação do DNA, que utilizam diferentes enzimas para reparar diferentes tipos de lesões. Processos como a reparação por excisão de bases (BER), reparação por excisão de nucleótidos (NER) ou reparação por mau emparelhamento (MMR) são alguns exemplos de vias que entram em acção quando ocorrem lesões numa cadeia simples de DNA (SSBs), servindo a cadeia não-danificada como molde para a reparação [76-77].

Contudo, alguns danos podem afectar as duas cadeias de DNA conduzindo a quebras de cadeia dupla (DSBs). As DSBs são geradas quando as duas cadeias complementares são quebradas simultaneamente e em locais próximos, sem que o emparelhamento das bases e a estrutura da cromatina sejam capazes de manter as extremidades justapostas (Figura 5). Como consequência, as duas extremidades geradas pela quebra podem dissociar-se fisicamente uma da outra, dificultando assim a subsequente reparação e fornecendo uma oportunidade para a recombinação inapropriada [78].



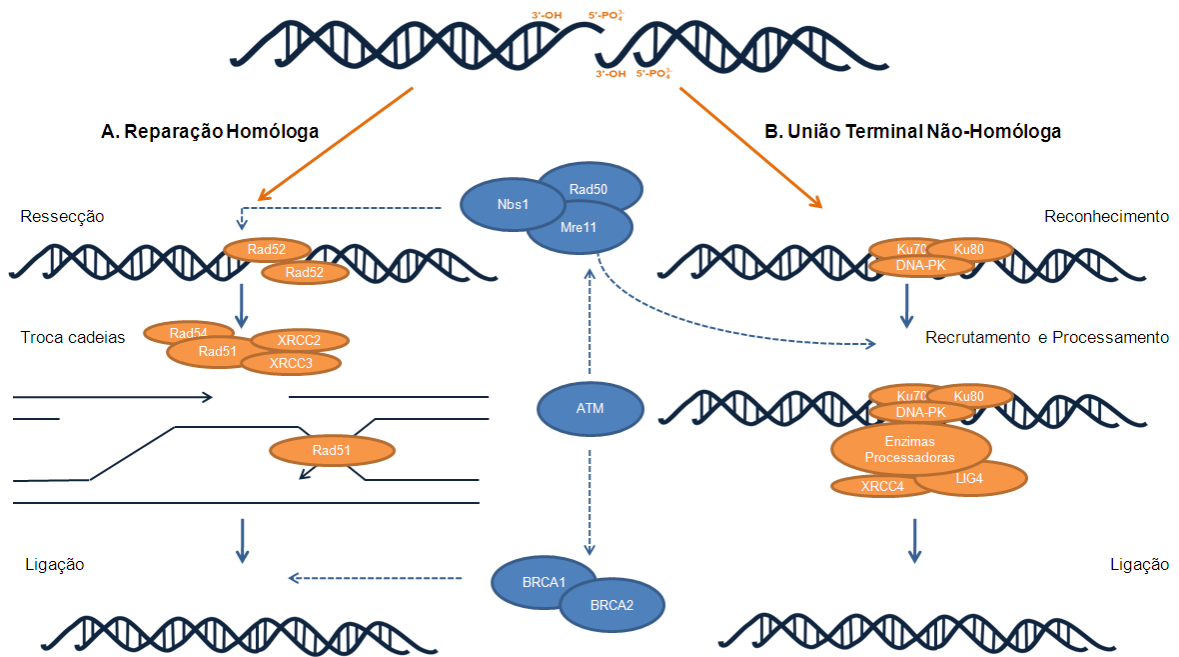
**Figura 5.** Representação esquemática de uma quebra de cadeia dupla (DSB) (adaptado de [79]).

Abreviaturas: 3'-OH (grupo hidroxilo na extremidade 3'); 5-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (grupo fosfato na extremidade 5')

As DSBs são particularmente prejudiciais já que, se não forem reparadas ou forem incorrectamente reparadas, podem resultar em alterações cromossómicas, como fusão de telómeros ou cromossomas dicêntricos, que potenciam a instabilidade genética, um *hallmark* das células cancerígenas [80-84]. Estas quebras podem decorrer do metabolismo celular normal, por acção de espécies reactivas de oxigénio, ou de processos celulares programados, como a recombinação V(D)J, replicação do DNA ou durante a meiose. Por outro lado, fontes exógenas responsáveis pelas DSBs englobam a radiação ionizante ou agentes quimioterapêuticos [82-83].

Nas células eucariotas, a reparação das DSBs pode ser conduzida principalmente por duas vias distintas: Recombinação Homóloga (HR) e União Terminal Não Homóloga (NHEJ) [85-86]. No processo de HR, a quebra é reparada utilizando como molde o cromossoma homólogo ou a cromátide irmã e, por isso, é considerado como um processo altamente fidedigno [82]. Por necessitar de um molde para que haja reparação, esta via parece ser particularmente importante na fase S/G2 do ciclo celular. Por outro lado, o processo de NHEJ une as extremidades do DNA num local com nenhuma ou pouca homologia, resultando frequentemente em pequenas alterações no local de fusão, sendo por isso considerado como propenso a erros (Figura 6) [82]. Embora possa actuar em todas as fases do ciclo celular, a via NHEJ predomina na fase G0, G1 e S precoce [83,87].

As proteínas envolvidas nestes dois mecanismos estão altamente conservadas e são expressas de forma ubíqua em organismos multi-celulares, sendo que a HR deverá ser a via de reparação predominante nas leveduras e a NHEJ em organismos superiores como os mamíferos [80,82-83].



**Figura 6.** Vias de reparação de DSBs: Reparação Homóloga (A) e União Terminal Não-Homóloga (B) (adaptado de [88]).

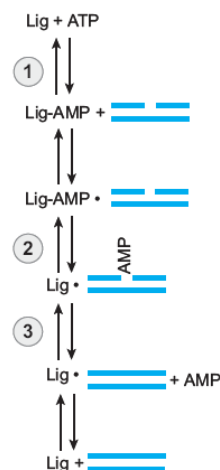
Todas as proteínas envolvidas nas vias de reparação do DNA são consideradas como *caretakers* do genoma [83]. Como consequência, alterações genéticas em genes que codifiquem proteínas envolvidas nas principais vias de reparação do DNA, como a NHEJ, podem causar instabilidade genética, defeitos nos telómeros e pré-disposição para cancro [75,80].

Estudos moleculares identificaram já inúmeros SNPs nos diferentes componentes da via NHEJ [83]. Evidências recentes sugerem que estas variantes comuns possam ser relevantes para modificar o risco de desenvolvimento de várias neoplasias, nomeadamente de mieloma múltiplo [89], glioma [90], cancro da mama [91-93], cancro do pulmão [85,94] ou cancro da bexiga [95], entre outras. De entre os componentes envolvidos na via NHEJ, um dos que apresenta extrema importância é a enzima Ligase IV (LIG4), embora poucos trabalhos tenham sido desenvolvidos de forma a compreender a relação desta enzimas com o desenvolvimento neoplásico.

### 1.4.1. Enzima DNA Ligase IV

As enzimas DNA ligases são uma família de proteínas que são relacionadas em termos evolutivos e que estão envolvidas em inúmeros processos celulares como a replicação, recombinação e reparação do DNA, quer em eucariotas quer em bactérias [96].

Pertencendo ao grupo das nucleotidiltransferases, as DNA ligases utilizam uma fonte energética para catalisar a formação de ligações fosfodiéster, num mecanismo que envolve três passos catalíticos distintos (Figura 7) [97]. A reacção de ligação tem um rendimento energético elevado, no qual um grupo adenilado, adenosina monofosfato (AMP), é sequencialmente transferido entre substratos. Numa primeira fase, a AMP é transferida da fonte de energia, ATP (Adenosina trifosfato) ou NAD<sup>+</sup> (dinucleótido de nicotinamida-adenina), para uma lisina no local activo da DNA ligase (Passo 1), com a formação de um intermediário covalente enzima-adenilado, numa reacção independente de DNA. Posteriormente, o AMP é transferido para a extremidade 5'-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> do substrato de DNA para que ocorra a formação de um intermediário covalente DNA-adenilado (Passo 2). Na fase final, a DNA ligase não-adenilada catalisa a formação de uma ligação fosfodiéster, numa reacção que envolve o ataque nucleofílico do grupo 3'-OH no intermediário activado da extremidade 5' e a libertação de AMP (Passo 3) [96-98].



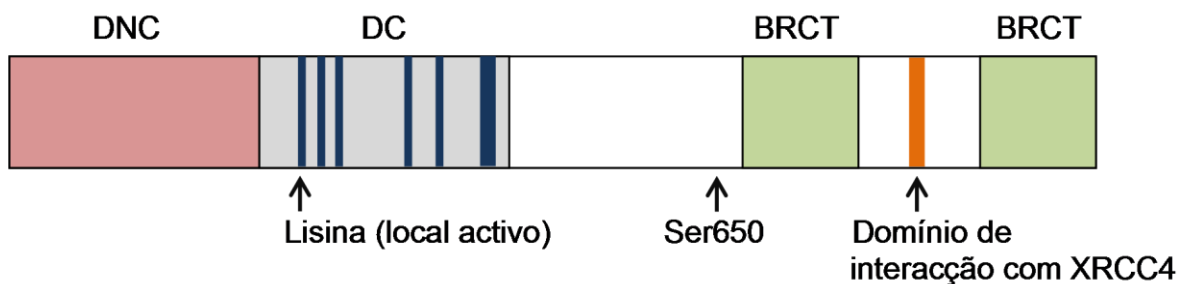
**Figura 7.** Representação esquemática do mecanismo de acção das DNA Ligases: transferência sequencial de AMP (Adenosina mono-fosfato) para a lisina no local activo da enzima (1) e posteriormente para a extremidade 5'-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> do DNA (2). Na última etapa (3), a DNA ligase catalisa a formação de uma ligação fosfodiéster e a libertação de AMP (adaptado de [97]).

Tendo em conta que o equilíbrio da reacção é favorável, cada passo químico torna a reacção sequencial irreversível, demonstrando mais uma vez a importância da reparação de lesões no DNA [97]. As DNA ligases tem a capacidade de alterar a sua conformação durante a reacção de ligação de forma a acomodar as múltiplas reacções que catalisam, sendo que os múltiplos domínios existentes nestas enzimas fornecem a flexibilidade necessária e permitem provavelmente a união/desunião ao DNA [97].

No genoma humano, existem três genes que codificam quatro DNA Ligases: *LIG1*, *LIG3* e *LIG4*, com as DNA Ligases II e III a serem expressas por *splicing* alternativo do mRNA do gene *LIG3* [97-101]. Consistentes com uma evolução comum, todas as ligases eucariotas são dependentes de ATP e são relacionadas em termos de sequência e estrutura [97,102].

O gene *LIG4*, localizado no cromossoma 13q33, codifica uma proteína exclusivamente nuclear, com aproximadamente 100 kDa, que partilha homologia com as restantes ligases na região N-terminal mas difere delas na região C-terminal. O seu domínio catalítico (DC) compreende 6 motivos conservados (I, III, IIIa, IV, V, VI) que definem a família de nucleotidiltransferases (Figura 8). O motivo I inclui o resíduo de lisina que está adenilado no primeiro passo da reacção de ligação. O domínio não-catalítico (DNC), que é conservado debilmente entre os diferentes membros da família, ainda não possui função conhecida [96].

A enzima *LIG4* é caracterizada por uma extensão C-terminal que inclui dois motivos BRCT (*BRCA1 C Terminus*), um domínio homólogo encontrado noutras proteínas de reparação [103]. Estes motivos estão separados por uma pequena sequência *linker* que contém um local de ligação conservado presumivelmente necessário para a interacção com *XRCC4* (*X-ray cross complementation 4*) [104].



**Figura 8.** Representação esquemática dos domínios da Ligase IV (adaptado de [97]).

Abreviaturas: DNC (domínio não catalítico); DC (domínio catalítico); BRCT (*BRCA1 C Terminus*); *XRCC4* (*X-ray cross complementation 4*); Ser650 (Serina na posição aminoacídica 650)

Na via de reparação NHEJ, a *LIG4* encontra-se associada com a proteína *XRCC4*, sendo esta última responsável pela estabilização e estimulação da actividade de ligase por parte da *LIG4*, como a adenilação, e protecção contra a sua degradação [83,98,105]. Adicionalmente, a fosforilação no aminoácido de serina (posição 650) da *LIG4* serve também como regulador da sua estabilidade [97].

Em condições normais, o genoma humano é replicado e estabilizado por uma complexa maquinaria de replicação e reparação altamente precisa. O aumento na incidência de determinadas patologias, como o cancro, associadas com síndromes humanas incapazes de reparar o DNA, ilustra o papel fulcral que as vias de reparação apresentam na protecção contra a instabilidade genómica [83,91].

A importância da *LIG4* ao nível da manutenção da estabilidade genómica depreende-se com o facto de mutações neste gene estarem associadas com uma síndrome autossómica rara (OMIM 606593) caracterizada por radiosensibilidade celular, imunodeficiência, microcefalopatia, anomalias neurológicas e aumento de susceptibilidade para outras doenças genéticas graves que poderão culminar em cancro [106].

Embora as síndromes hereditárias sejam conferidas por mutações com grande impacto na função proteica, alterações de menor impacto, como os polimorfismos, podem contribuir para cancro esporádico [107]. Os polimorfismos ao nível da sequência do gene *LIG4* poderão conduzir a uma hipersensibilidade ao dano no DNA e, desta forma, afectar o risco para o desenvolvimento neoplásico. Para além disso, a desregulação dos mecanismos de reparação das DBSs, e a consequente influência na activação da apoptose, poderão afectar a sensibilidade ou resistência das células tumorais durante e após a quimio e radioterapia [108-109].

#### **1.4.2. Polimorfismos no gene *LIG4***

Apesar da sua importância para a via de reparação NHEJ, poucos estudos ao nível da epidemiologia molecular têm sido desenvolvidos para o gene da *LIG4*. Um dos polimorfismos estudados diz respeito a uma transição de uma Timina (T) por uma Citosina (C) (1977 T/C), embora este não envolva uma alteração ao nível da sequência aminoacídica (D501D), sendo por isso, um polimorfismo sinónimo [108].

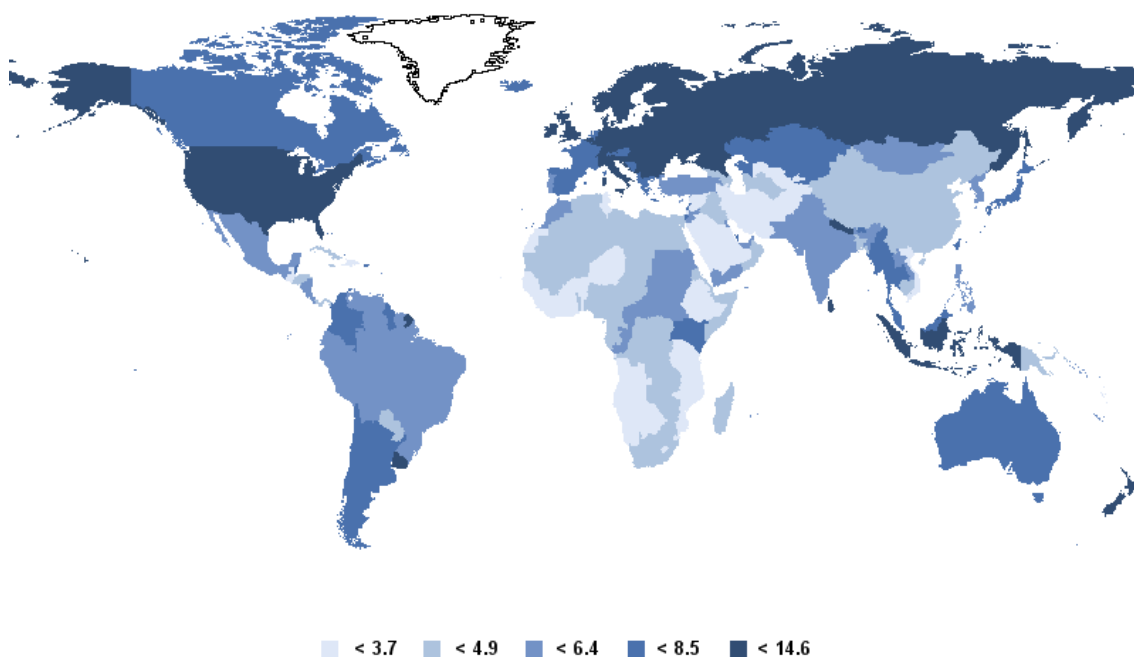
O polimorfismo 1977 T/C do gene da *LIG4* tem sido principalmente avaliado num contexto de risco para cancro da mama, embora com resultados controversos. Alguns estudos apontam que a presença do polimorfismo está associado com um risco aumentado para o desenvolvimento e mortalidade por cancro da mama [93,108,110], embora outros estudos contrariem estes resultados [92-93,111]. Algumas investigações indicam que o polimorfismo 1977 T/C no gene *LIG4* parece ser um marcador importante associado com a radiosensibilidade dos doentes [112].

Para além da análise do polimorfismo isolado, estudos sugerem que combinações de polimorfismos neste gene podem ser especialmente importantes bem como a associação de polimorfismos com mutações no gene da *LIG4* [107].

Na população caucasiana, a frequência descrita para o alelo menos frequente é de 15 – 18 % [92-93,108,112-113].

## 1.5. Cancro do Ovário

A nível mundial, estima-se que, no ano de 2008, tenham ocorrido cerca de 225 000 novos casos de cancro do ovário (CO) e aproximadamente 140 000 mortes por esta doença [8]. No caso de Portugal, e para esse mesmo ano, o CO foi a quinta neoplasia mais frequente apresentando uma taxa de incidência ajustada à idade de 7,3 casos por cada 100 000 mulheres (Figura 9). A taxa de mortalidade ajustada à idade foi de 4,7 casos por cada 100 000 mulheres, representando o cancro ginecológico mais letal [114].



**Figura 9.** Taxa de incidência anual de CO, por 100 000 habitantes, para o ano de 2008 (Globocan 2008 (IARC)).

Na sua constituição, o CO apresenta uma elevada heterogeneidade celular, podendo ter origem em três tipos de células distintas: células germinativas, células estromais e células epiteliais. Embora a superfície epitelial do ovário represente apenas uma pequena fracção de todos os tipos celulares presentes neste órgão, cerca de 85 a 90 % das neoplasias do ovário são do tipo epitelial [115-117]. Segundo a Organização Mundial de Saúde, os tumores epiteliais do ovário podem ser classificados como benignos (em 50 % dos casos), malignos (33 %) ou tumores de baixo potencial maligno (*borderline*) (17 %) [118].

Uma das características mais interessantes relativamente ao cancro do ovário epitelial (COE) é o facto de, à medida que o processo de transformação ocorre, o epitélio do ovário se tornar cada vez mais diferenciado, tendo a capacidade de sofrer uma transformação metaplásica para epitélio do tipo mulleriano [115,119-120]. Esta diferenciação aberrante ocorre na grande maioria dos COE e serve de base para a sua classificação histológica em tumores serosos (50 % dos casos), mucinosos (25 %) e endometrióides (15 %) consoante apresentem características morfológicas das trompas de Falópio, cérvix e endométrio, respectivamente. Outros tipos histológicos menos frequentes são os tumores de células claras, tumores de Brenner e tumores indiferenciados [115,121-123].

Os tumores do ovário, tal como outras neoplasias ginecológicas, são também classificados consoante o seu padrão de disseminação aquando do diagnóstico. O sistema internacional de estadiamento utilizado é o estadiamento FIGO (*International Federation of Gynecology and Obstetrics*) e, de forma geral, divide o CO em quatro fases: Estadio I (o tumor está limitado ao(s) ovário(s)), Estadio II (o tumor envolve um ou ambos os ovários, com extensão pélvica), Estadio III (o tumor envolve um ou ambos os ovários, com metastização peritoneal confirmada fora da pelve e/ou metastização ganglionar) e Estadio IV (metastização à distância, excluindo metastização peritoneal) [122].

A incidência do COE está relacionada com a idade e é geralmente uma doença característica da mulher pós-menopáusica, já que a maioria dos casos surge em mulheres com mais de 40 anos [117,124-125]. Pela falta de modelos experimentais adequados para o estudo desta neoplasia, a etiologia e os eventos iniciais da carcinogénese do ovário permanecem ainda pouco conhecidos [120]. Desta forma, foram colocadas várias hipóteses que, baseadas em aspectos epidemiológicos e fisiológicos, pretendem explicar, pelo menos em parte, a origem do COE. É de referir que, embora as hipóteses tenham como ponto de partida diferentes etiologias, as mesmas podem ser inter-relacionáveis e não são mutuamente exclusivas, podendo variar de acordo com a idade da paciente.

O reconhecimento da importância da superfície epitelial do ovário na carcinogénese foi atribuído a Sir Spencer Wells, em 1872 e, um século depois, Fathalla, propôs a hipótese da 'Ovulação Incessante' como ponto de partida para o desenvolvimento de COE [126]. Esta hipótese postula que a ovulação repetitiva, sem longos períodos de repouso, é capaz de conduzir à transformação de epitélio do ovário e,

por isso, eventos que suprimam a ovulação são factores protectores para o desenvolvimento desta neoplasia [115,126-128]. Contudo, a hipótese da ovulação cumulativa é classificada como simplista. Proposta em 1975 por Stadel, a ‘Hipótese das Gonadotropinas’ foi a primeira hipótese hormonal que surgiu na tentativa de explicar a origem do COE como consequência da excessiva estimulação do epitélio do ovário pelas gonadotropinas pituitárias FSH (*Follicle-stimulating hormone*) e LH (*Luteinizing Hormone*) [115,129].

Tal como é postulado pelas duas hipóteses anteriores e, embora exista um consenso relativamente ao efeito protector de eventos não ovulatórios na protecção contra o CO, a supressão ovulatória excede o efeito esperado da anovulação e as hipóteses falham no fornecimento de explicações para os efeitos diferenciais de acordo com o tipo de evento inibitório [130-131]. Assim, em 1998, Risch coloca a ‘Hipótese da Estimulação Hormonal’ em que concentrações elevadas de androgénios serão prejudiciais e um aumento nos níveis de progesterona protegerá o ovário, o que ajuda a explicar o efeito protector da multiparidade e dos contraceptivos orais [115,132-133].

Ao longo do tempo, a ovulação continua a desempenhar um papel essencial na etiologia do COE. Contudo, para colmatar algumas falhas da hipótese original, algumas expansões têm sido sugeridas, nomeadamente tendo em conta a contribuição da inflamação [134]. Desta forma, será a combinação das várias hipóteses propostas que permitirá formular uma possível etiologia para o COE e definir com uma maior precisão quais os factores de risco e eventos protectores para esta neoplasia maligna. As principais hipóteses postuladas e respectivos mecanismos biológicos e evidências epidemiológicas encontram-se resumidos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Principais hipóteses formuladas para a etiologia do cancro do ovário epitelial.

Hipótese	Mecanismo biológico proposto	Evidências Epidemiológicas
<b>Ovulação Incessante</b> [126]	<p>Ovulação repetitiva e a rápida proliferação celular para reparação pós-ovulação fornece um ambiente favorável para a iniciação da carcinogénese pelo acumular de alterações genéticas e desenvolvimento de quistos de inclusão [121,135-136].</p> <p>A redução do número de ovulações conduz a uma diminuição dos níveis de gonadotropinas, de stress oxidativo, ao abrandamento da depleção dos folículos ováricos e à diminuição da formação de quistos de inclusão no epitélio do ovário [124,137-139].</p>	Eventos que suprimam a ovulação, como a gravidez, lactação e uso de contraceptivos orais, são factores protectores [115,126-127].
<b>Gonadotropinas</b> [140]	<p>A excessiva estimulação do epitélio do ovário pelas gonadotropinas pituitárias FSH e LH conduz à activação de genes <i>downstream</i> e à estimulação da produção hormonal pelo ovário (como produção de estrogénio) de forma a aumentar a proliferação e divisão celular e, assim, conduzir à transformação maligna/angiogénese tumoral [115,129].</p> <p>A formação de um <i>protective progestagenic hormonal milieu</i> poderá estimular a apoptose das células epiteliais do ovário geneticamente alteradas que de outra forma poderiam evoluir para um fenótipo maligno [139].</p>	O uso de contraceptivos orais e a gravidez são factores protectores. Condições hipergonadótropicas são comuns em mulheres inférteis, com SOPQ e pós-menopáusicas [115,119].
<b>Estimulação Hormonal</b> [133]	Concentrações elevadas de androgénios são prejudiciais enquanto que um aumento na concentração de progesterona é benéfico [115].	Efeito protector da multiparidade e dos contraceptivos orais. Situações associadas com níveis elevados de androgénios, como SOPQ, conduzem a um aumento no risco de CO [132-133].
<b>Inflamação</b> [134]	Processo de ovulação é acompanhado por uma resposta inflamatória: alteração do potencial redox, infiltração celular e libertação de citoquinas que podem induzir dano no DNA das células epiteliais envolvidas no processo de ruptura/reparação do ovário [115,123].	Doenças inflamatórias ginecológicas, como a endometriose, podem aumentar o risco de COE. A toma de drogas anti-inflamatórias não esteróides será um factor protector [141].

Abreviaturas: FSH (*Follicle-stimulating hormone*); LH (*Luteinizing Hormone*); COE (Cancro do Ovário Epitelial); SOPQ (Síndrome do Ovário Poliquístico).

Contudo, um dos factores de risco mais conhecidos para o CO é a história familiar [123,142]. Cerca de 5 a 10 % dos casos de CO são atribuídos a mutações herdadas em genes de elevada penetrância associados com formas hereditárias de

cancro da mama e do ovário, gene *BRCA1* (3-6 %) e *BRCA2* (1-3 %), e Síndrome de Lynch, geralmente atribuído a mutações nos genes *MLH1* e *MSH2* (1-2 %) [137,143].

O risco de desenvolvimento de CO de forma esporádica, ao longo da vida, é cerca de 1,7 % enquanto que a herança de mutações nos genes *BRCA* aumenta o risco para cerca de 20-40 % em portadores de mutações no gene *BRCA1* e 15-25 % em portadores de mutações no gene *BRCA2* [137,144]. No que diz respeito a indivíduos portadores de mutações características do Síndrome de Lynch, estes apresentam um risco estimado de 7 % de virem a desenvolver a doença ao longo da vida [142].

Uma história familiar de CO em parentes de primeiro grau (mãe, filha ou irmã) pode triplicar o risco de uma mulher desenvolver a doença ao longo da vida [128,145], com uma heritabilidade estimada de 22 % [146].

Apesar de não existirem modelos detalhados e validados para a carcinogénese do COE, Kurman e colaboradores (2004) propuseram uma sub-classificação dos tumores do ovário de acordo com o seu padrão de comportamento clínico, progressão tumoral, aspectos morfológicos e genéticos. Desta forma, os tumores epiteliais do ovário são divididos em dois grupos designados de Tipo I (25 % dos casos), considerado de baixo grau, e Tipo II (75% dos casos), considerado de alto grau [147].

Os tumores de Tipo I incluem aqueles que derivam de lesões precursoras, bem caracterizadas, como tumores *borderline*. Estes tumores apresentam um crescimento variável, no caso dos tumores mucinosos e endometrióides, ou um crescimento lento, como no caso dos carcinomas serosos de baixo grau [122]. Pelo seu crescimento ser lento, geralmente são diagnosticados num estadio precoce embora seja comum uma baixa resposta à terapia. Os tumores do Tipo I caracterizam-se por relativa estabilidade genética embora sejam frequentes mutações somáticas em genes como *KRAS*, *BRAF*, *PTEN* e *β-Catenina* [122].

Por outro lado, os tumores de Tipo II surgem de forma espontânea e agressiva, sem lesões precursoras identificáveis, sendo geralmente quimio-sensíveis. Deste grupo fazem parte a maioria dos carcinomas serosos de alto grau (90 % dos tumores serosos), carcinomas de células claras, carcinomas de células de transição, tumores mullerianos mistos malignos e carcinomas indiferenciados [122,148]. Os tumores do Tipo II caracterizam-se por instabilidade genética e por apresentarem uma elevada frequência de mutações no gene *p53*. Dentro deste grupo, englobam-se também os tumores de origem hereditária associados com mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Segundo este

modelo de divisão da carcinogénese, a designação dos tumores em Tipo I e II refere-se apenas a alterações moleculares e não são termos histopatológicos específicos [148].

Tal como já foi referido anteriormente, o CO é considerado como o cancro ginecológico mais letal [114]. A elevada mortalidade que lhe está associada deve-se, essencialmente, ao diagnóstico tardio desta doença já que, em 75 % dos casos, este apenas é realizado numa fase avançada do desenvolvimento tumoral, em que o tumor já não se encontra apenas confinado ao ovário [121,142,149].

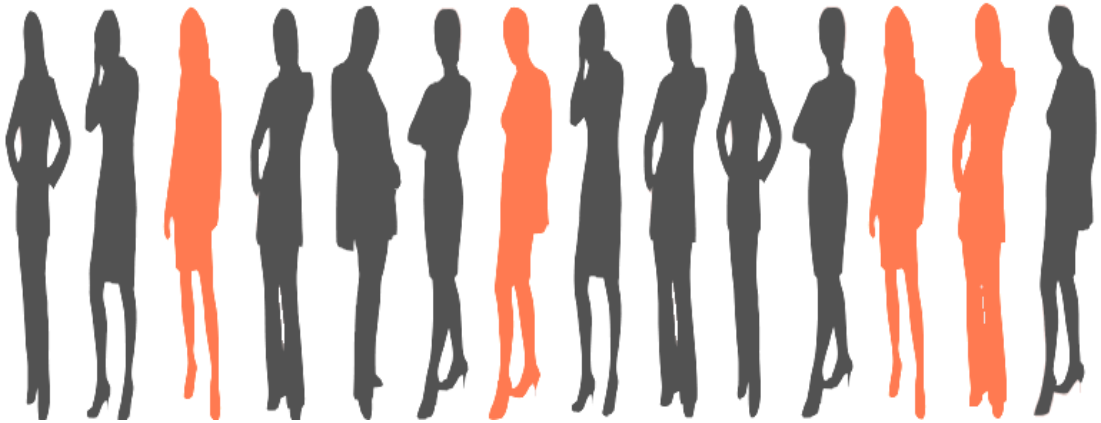
Apesar das estratégias de diagnóstico e prevenção, vários obstáculos para a detecção precoce do CO existem e passam pela sua relativa raridade, pela localização oculta dos ovários, pela falta de lesões pré-invasivas bem definidas e por ser geralmente assintomático [137]. Sintomas mais comuns passam pela dor abdominal ou pélvica, inchaço e alterações gastrointestinais/urinárias [150].

Até à data, a primeira linha de tratamento de CO avançado baseia-se na cirurgia citoreductora seguida de quimioterapia, que geralmente inclui uma combinação de platinos (carboplatina ou cisplatina) e taxanos (paclitaxel ou docetaxel) [125,151]. Análogos de platinos, como a carboplatina e cisplatina, são dos agentes mais activos no tratamento desta doença e exercem o seu efeito pela formação de ligações entre as cadeias de DNA. Os taxanos, como o paclitaxel e docetaxel, medeiam o seu efeito citotóxico através da polimerização e estabilização dos microtúbulos, que irá resultar numa paragem do ciclo celular na transição G2/M e, em última análise, irá conduzir à apoptose [125].

## 1.6. Cancro do Ovário Epitelial, enzima CYP3A4 e LIG4

O gene *CYP3A4* codifica uma enzima essencial ao nível metabólico de compostos endógenos, nomeadamente na oxidação dos estrogénios. Tendo em conta que a exposição aos estrogénios está associada com o risco de COE, e que a inibição da enzima *CYP3A4* resulta em níveis circulantes aumentados desta hormona, é plausível que o polimorfismo -392 *A/G* no gene *CYP3A4* possa influenciar o risco de desenvolvimento de COE. Para além disso, tendo em conta o seu papel na metabolização de agentes quimioterapêuticos, como o paclitaxel, diferenças inter-individuais na expressão da enzima *CYP3A4* podem condicionar diferentes respostas à terapia, afectando a sobrevivência global das doentes com COE [52-53].

Por outro lado, a ovulação poderá estar associada com um risco acrescido para COE, em parte, devido ao provável aumento de alterações genéticas no epitélio do ovário, provocadas por erros espontâneos na replicação do DNA ou pelo stress oxidativo gerado pela ovulação. A enzima Ligase IV está envolvida na reparação de DSBs e, por isso, o polimorfismo 1977 *T/C* no gene *LIG4* poderá influenciar o seu efeito funcional e, consequentemente, o risco para o desenvolvimento de COE. Pela interacção com a maquinaria de apoptose, qualquer variação na actividade enzimática, condicionada pelo polimorfismo, poderá influenciar a resposta à terapia de doentes com COE [108-109].



## **2. OBJETIVOS**



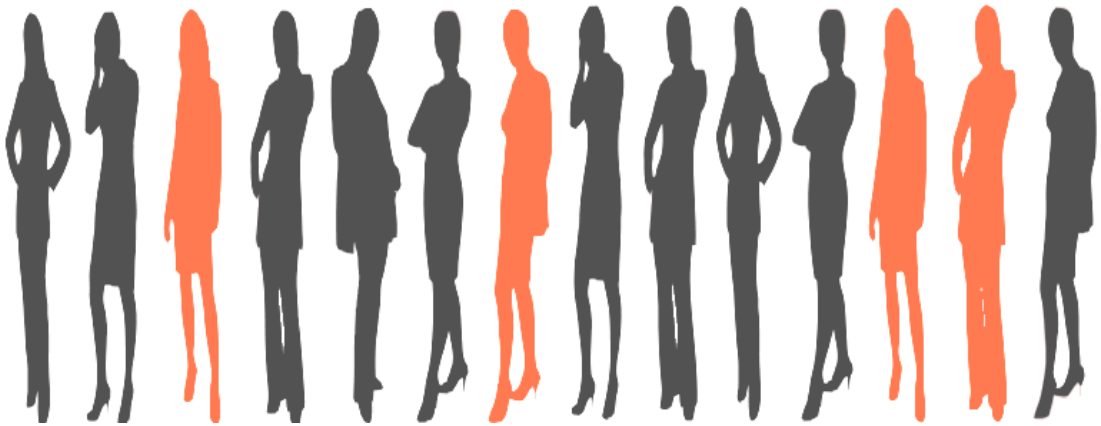
## 2.1. Objectivo Geral

Compreender a relevância dos polimorfismos genéticos -392 A/G do gene *CYP3A4* e 1977 T/C do gene *LIG4* na susceptibilidade para o desenvolvimento de cancro do ovário epitelial (COE) e na repercussão farmacogenómica em doentes com esta patologia.

## 2.2. Objectivos Específicos

- Analisar a frequência dos polimorfismos genéticos *CYP3A4* -392 A/G e *LIG4* 1977 T/C em indivíduos com COE e indivíduos sem doença oncológica conhecida;
- Avaliar a associação entre a frequência dos referidos polimorfismos e a susceptibilidade para o desenvolvimento COE;
- Avaliar a associação dos polimorfismos estudados com características clínico-patológicas das doentes com COE;
- Determinar a influência dos polimorfismos no perfil farmacogenómico e sobrevivência global de doentes com COE;
- Avaliar a associação dos polimorfismos estudados no perfil farmacogenómico com as características clínico-patológicas das doentes com COE.





### **3. MATERIAL E MÉTODOS**



### 3.1. Caracterização da População

Para a realização deste trabalho experimental, foi realizado um estudo de base hospitalar, que consistiu em duas partes: um estudo tipo caso-controlo e um estudo tipo *cohort* retrospectivo. Desta forma, foram recrutados 252 doentes do Instituto Português de Oncologia – Porto (IPO-Porto), caucasianos, com diagnóstico histopatológico de cancro do ovário epitelial (grupo de casos) e 250 indivíduos sem doença oncológica conhecida, caucasianos, dadores de sangue do IPO-Porto (grupo controlo), perfazendo um total de 502 indivíduos, todos do sexo feminino. Apenas foram incluídos neste estudo indivíduos sem qualquer história clínica familiar de doença oncológica.

Os indivíduos participantes neste estudo (casos e controlos) são residentes na região Norte de Portugal, sendo que todas as amostras utilizadas foram obtidas com o seu conhecimento e consentimento, de acordo com a declaração de Helsínquia.

#### 3.1.1 Doentes com Cancro do Ovário

Foram analisadas amostras referentes a 252 mulheres diagnosticados com cancro do ovário epitelial no Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil – Centro Regional de Oncologia do Porto, E.P.E., entre 1996 e 2009. A idade média das doentes é de 47,6 anos (desvio padrão de 7,4 anos). Foram avaliados alguns parâmetros clínico-patológicos, tais como o estadio FIGO, tipo histológico e *status* hormonal, tal como descrito na Tabela 2.

Para o estudo tipo *cohort* retrospectivo foram seleccionadas as doentes submetidas a quimioterapia de primeira linha à base de paclitaxel e cisplatina ou carboplatina, após cirurgia citoreductora.

#### 3.1.2. Indivíduos do Grupo Controlo

O grupo controlo inclui 250 mulheres sem qualquer patologia oncológica conhecida, sendo estes dadores de sangue do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil – Centro Regional de Oncologia do Porto, E.P.E., com uma idade média de 54,1 anos (desvio padrão de 12,4 anos), descrito na Tabela 2.

**Tabela 2.** Características clínico-patológicas do grupo de casos com COE e características gerais do grupo controlo.

	Casos (n=252)		Controlos (n=250)	
	N	%	N	%
<b>Idade</b>				
Média ± SD	47,6 ± 7,4		54,1 ± 12,4	
<b>Status Hormonal</b>				
Pré-menopausa	94	37,3		
Pós-menopausa	123	48,8		
Sem informação	35	13,9		
<b>Total</b>	<b>252</b>	<b>100,0</b>		
<b>Tipo Histológico</b>				
Endometrióide	28	11,1		
Mucinoso	31	12,3		
Seroso	132	52,4		
Células Claras	30	11,9		
Outros	31	12,3		
<b>Total</b>	<b>252</b>	<b>100,0</b>		
<b>Estadio FIGO</b>				
I	80	31,7		
II	13	5,2		
III	118	46,8		
IV	41	16,3		
<b>Total</b>	<b>252</b>	<b>100,0</b>		
<b>Esquema Quimioterapia</b>				
Paclitaxel e Platinos	222	88,1		
Outros	13	5,2		
Não efecuada	3	1,2		
Sem informação	14	5,5		
<b>Total</b>	<b>252</b>	<b>100,0</b>		

## 3.2. Procedimentos Laboratoriais

### 3.2.1. Extracção de DNA Genómico

Foram recolhidos cerca de 8 mL de sangue venoso periférico dos indivíduos envolvidos neste estudo, através de uma técnica padronizada de colheita intravenosa, para tubos com EDTA. A partir das células nucleadas do sangue periférico, foi isolado o DNA genómico através de um *Kit* de extracção da Qiagen®, *QIAmp® DNA Blood Mini Kit* (Qiagen® 51106), executando o procedimento laboratorial fornecido pelo fabricante.

## 3.3. Genotipagem dos Polimorfismos *CYP3A4 -392 A/G* e *LIG4 1977 T/C*

### 3.3.1. Genotipagem do Polimorfismo *CYP3A4 -392 A/G*

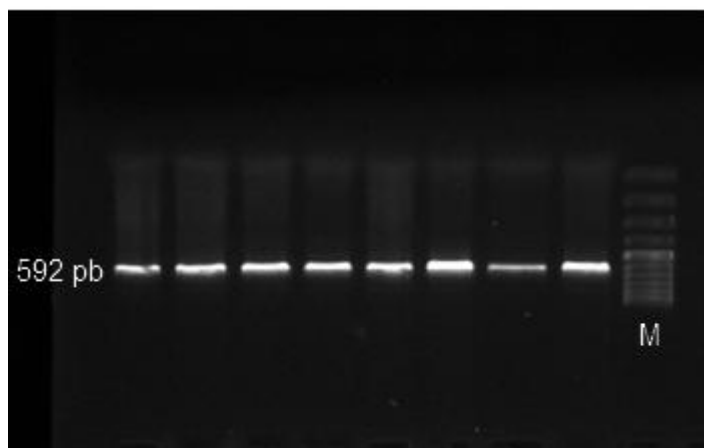
Para a caracterização genotípica das participantes envolvidas neste estudo relativamente ao polimorfismo *CYP3A4 -392 A/G* foi realizada a técnica de *Nested PCR-RFLP* (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*), com base no protocolo descrito por Zeigler-Johnson [152].

Submeteram-se, a uma primeira reacção de PCR, cerca de 20 ng de DNA de cada caso, correspondendo a um volume de 2 µL de cada amostra. O volume de reacção foi de 50 µL e a mistura de reacção incluiu 5 µL de Tampão de Reacção de PCR (1x), 1U de DreamTaq DNA Polymerase (*Fermentas, #EP0712*), 0,2 mM de dNTP's (dinucleótidos trifosfato) (*Fermentas, #R0192*) e 0,3 µM de cada um dos *primers* (*forward* 5'– AAC AGG GGT GGA AAC ACA AT – 3' e *reverse* 5' – CTT TCC TGC CCT GCA CAG – 3').

As condições de amplificação utilizadas basearam-se numa desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 65°C (emparelhamento) e 1 minuto a 72°C (extensão) aos quais se seguiu um passo de extensão final de 10 minutos a 72°C.

Para confirmar a correcta amplificação dos fragmentos de DNA obtidos na primeira reacção de PCR e o seu respectivo peso molecular (592 pb), analisaram-se 15 µL do produto de PCR por electroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v), corado com brometo de etídeo (10 µg/ml). Os géis foram preparados em tampão TBE (Anexo I),

sendo este também utilizado como tampão de electroforese. As amostras foram aplicadas no gel e foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb (*Fermentas #SM0243*). A visualização dos géis foi efectuada recorrendo a um transiluminador Gel DocXR, usando o *software Quantaty One* (BioRad®) (Figura 10).

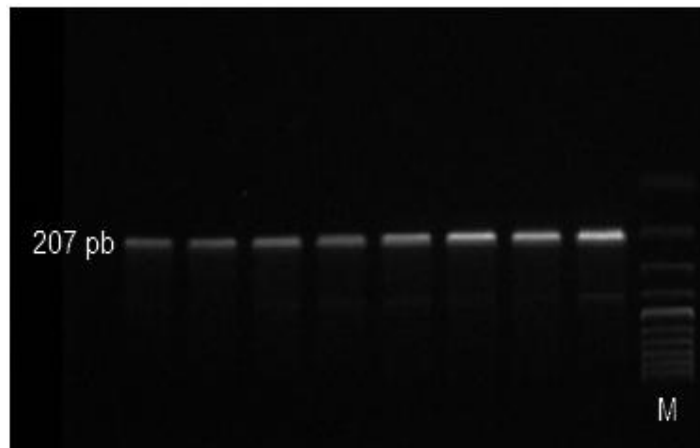


**Figura 10.** Gel de agarose a 1,5% (p/v) com o produto de PCR da região *CYP3A4* -392 A/G (banda de 592 pb) (M- marcador de peso molecular de 100 pb).

Confirmada a correcta amplificação da primeira reacção, o produto resultante foi diluído em água bidestilada estéril (Braun®) segundo a razão de 1/70. Neste caso, submeteu-se a novo PCR, 2  $\mu$ L do produto de PCR diluído de cada amostra sendo que a mistura de reacção obedeceu às mesmas condições da primeira reacção. Os *primers* utilizados foram os seguintes: *forward* 5' – AGC CAT AGA GAC AAG GCC A – 3' e *reverse* 5' – AGG CTT CTC CAC CTT GGA AG – 3'.

As condições de amplificação utilizadas basearam-se numa desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 62°C (emparelhamento) e 1 minuto a 72°C (extensão) aos quais se seguiu um passo de extensão final de 10 minutos a 72°C.

Tal como aconteceu no final da primeira reacção, também neste caso foi confirmada a correcta amplificação dos fragmentos de DNA obtidos e o seu respectivo peso molecular (207 pb), tal como descrito anteriormente (Figura 11).



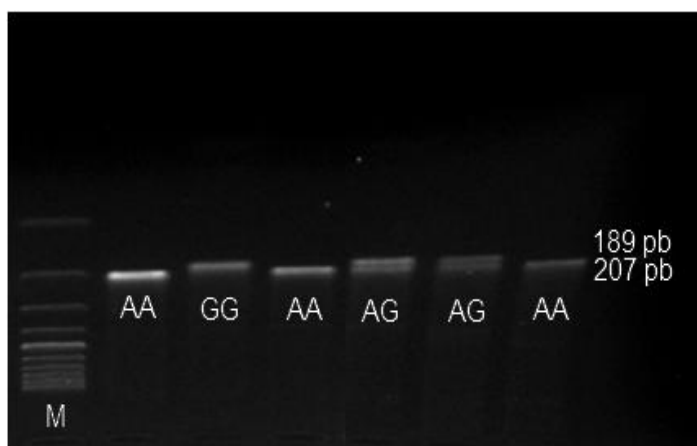
**Figura 11.** Gel de agarose a 1,5% (p/v) com o produto de *Nested-PCR* da região *CYP3A4* -392 A/G (banda de 207 pb) (M- marcador de peso molecular de 100 pb).

Ambas as reacções de PCR foram efectuadas num termociclador programável BioRad®.

Posteriormente, para a análise dos genótipos do polimorfismo foram utilizados 10  $\mu$ L de produto de PCR de cada amostra para restrição com a enzima *Bme1390I* (*ScrFI*) (5 U) (*Fermentas*, #ER1422), num volume final de reacção de 25,5  $\mu$ L. As amostras foram incubadas a 37°C durante 12 horas (*overnight*). O resultado da digestão do fragmento amplificado do gene *CYP3A4*, contendo o *locus* de interesse, foi observado por electroforese em gel de agarose a 3% (p/v), corado com brometo de etídeo (10  $\mu$ g/mL).

A digestão do fragmento do gene *CYP3A4* resulta em 3 padrões de bandas distintos, que permite identificar os diferentes genótipos do polimorfismo -392 A/G: banda de 207 pb correspondente ao genótipo AA; padrão de bandas com 207, 189 e 18 pb (não é possível visualizar) correspondente ao genótipo heterozigótico AG; bandas de 189 e 18 pb (não é possível visualizar) correspondente ao genótipo GG (Figura 12).

Os resultados de discriminação genotípica foram repetidos em 10% dos casos e foram analisados e confirmados por dois investigadores independentes.



**Figura 12.** Gel de agarose a 3% (p/v) com o produto de PCR-RFLP da região *CYP3A4* -392 A/G, observando-se os três genótipos possíveis do polimorfismo (M- marcador de peso molecular de 100 pb).

### 3.3.2. Genotipagem do Polimorfismo *LIG4* 1977 T/C

A caracterização do polimorfismo *LIG4* 1977 T/C na população estudada foi realizada por discriminação alélica, através de tecnologia *TaqMan* (*Applied Biosystems*), utilizando a técnica de *Real-Time PCR* (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*). O assay utilizado foi o C\_\_11427968\_10, em que as sondas marcadas com fluorocromos eram específicas para cada alelo: VIC – alelo A, FAM – alelo G (GCAAGGTGCAGCCAGTTTTATACAT [A/G] TCACTGGGTACGATCTCTGCTGCTT). É de realçar que assay disponível detectava o polimorfismo na cadeia *reverse* e, por isso, aquando da discriminação alélica, em vez de uma alteração T/C foi detectada uma alteração A/G.

A reacção de amplificação, que perfez um volume de reacção final de 6  $\mu$ L/caso, continha 2,5  $\mu$ L de 2x *Taqman Universal Master Mix*, 0,125  $\mu$ L de 40x *Single Nucleotide Polymorphism Genotyping Assay*, 2,375  $\mu$ L de água bidestilada estéril (Braun®) e 1  $\mu$ L de DNA (~20 ng). As condições de amplificação basearam-se na activação da Taq DNA Polimerase a 95°C durante 10 minutos, seguindo-se 45 ciclos de 92°C por 15 segundos para desnaturação e de 60°C durante 1 minuto para emparelhamento dos *primers* e extensão.

A amplificação foi detectada e analisada com recurso ao aparelho *Real-Time* 7300 ABI e através do *software* 7300System Sequence Detection (versão 1.2.3. *Applied Biosystems*), tal como se encontra demonstrado na Figura 13.

Os resultados de discriminação genotípica foram repetidos em 10% dos casos e foram analisados e confirmados por dois investigadores independentes.

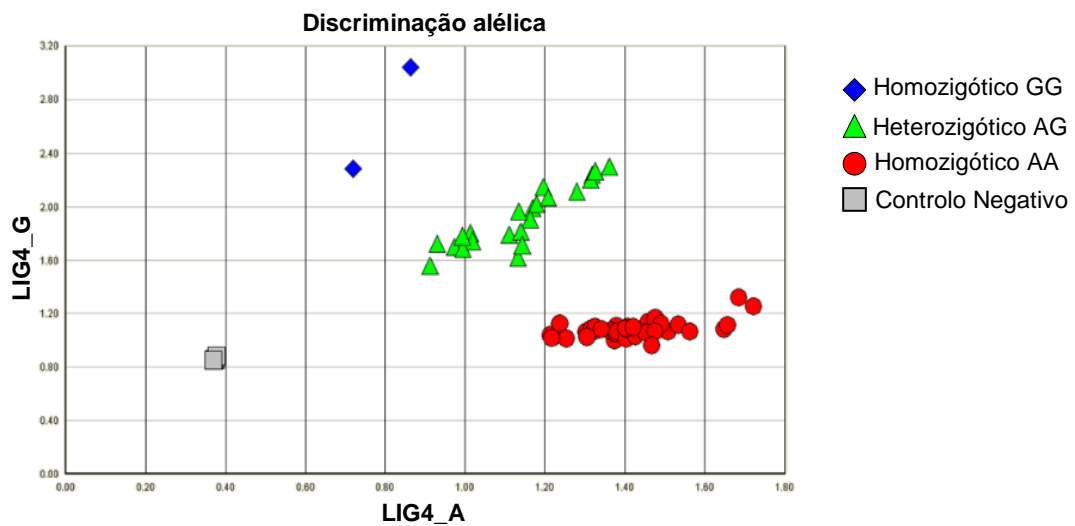


Figura 13. Resultados de um *Real-Time* PCR para o polimorfismo 1977 T/C no gene *LIG4*.

### 3.4. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa estatístico SPSS (versão 15.0, SPSS Inc, 2004) e Epi Info (Versão 6).

A análise pelo teste Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizada para comparação das diferentes variáveis categóricas. O valor de  $p$  foi obtido pelo teste de  $\chi^2$  e considerado estatisticamente significativo quando inferior a 0,05.

O valor de *Odds Ratio* (OR), indicativo do risco relativo para determinado acontecimento num estudo tipo caso-controlo, foi calculado juntamente com o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) como medida da associação entre os alelos e genótipos de *CYP3A4* e *LIG4* e o risco para cancro do ovário. A frequência genotípica foi ajustada para as possíveis variáveis de confundimento.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado através de um teste *goodness of fit* de Pearson, de forma a comparar as frequências observadas com as esperadas.

Obtiveram-se as curvas de probabilidade de sobrevivência (sobrevivência global) após tratamento quimioterapêutico combinado (paclitaxel e platinos), usando o teste estatístico de Kaplan-Meier e o teste de Breslow para comparação entre as curvas. A duração da sobrevivência global foi definida como o intervalo de tempo entre o diagnóstico e a morte ou última avaliação clínica da paciente. A causa de morte foi determinada a partir dos registos da doente.



## 4. RESULTADOS



#### 4.1. Associação do Polimorfismo -392 A/G no gene *CYP3A4* na susceptibilidade para Cancro do Ovário Epitelial

A distribuição das frequências dos vários genótipos do polimorfismo -392 A/G no gene *CYP3A4* (AA, AG e GG) para o grupo controlo e grupo de casos com COE encontra-se descrito na Tabela 3. A distribuição das frequências genotípicas de ambos os grupos está de acordo com o esperado segundo os princípios de Hardy-Weinberg.

Relativamente ao grupo controlo, 90,4 % dos indivíduos apresenta o genótipo AA e os restantes 9,6 % o genótipo AG, não tendo sido obtido nenhum indivíduo homocigótico recessivo para a variante (genótipo GG). No grupo de casos com COE, 89,2 % dos indivíduos apresenta o genótipo AA, 10,0 % o genótipo AG e 0,8 % o genótipo GG. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de casos e o grupo controlo, tendo em conta os vários genótipos do polimorfismo.

As frequências genotípicas do polimorfismo em estudo no grupo controlo e no grupo de doentes com COE, tendo em conta o Modelo Recessivo, estão descritas na Tabela 3. Os resultados mostram que, para o grupo controlo, 90,4 % dos indivíduos apresenta o genótipo AA e 9,6 % é portador do alelo G. Relativamente ao grupo de casos, 89,2 % dos indivíduos apresenta o genótipo AA e 10,8 % são portadores do alelo G. Não se verificaram associações estatisticamente significativas entre estes dois grupos (OR=1,14; IC 95%= 0,63-2,05;  $p=0,66$ ) (Tabela 3). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes genótipos e as características clínico-patológicas das doentes com COE (dados não apresentados).

**Tabela 3.** Frequências genotípicas do polimorfismo *CYP3A4* -392 A/G nos grupos controlo e casos com COE

Genótipo	<i>CYP3A4</i> -392 A/G				OR	IC 95%	p
	Controlo (n= 250)		Casos (n=241)				
	N	%	N	%			
AA	226	90,4	215	89,2	1,00	Referência	-
AG	24	9,6	24	10,0	1,05	0,56-1,98	0,87
GG	0	0	2	0,8	- <sup>a)</sup>	- <sup>a)</sup>	- <sup>a)</sup>
<b>Modelo Recessivo</b>							
AA	226	90,4	215	89,2	1,00	Referência	-
Portador G	24	9,6	26	10,8	1,14	0,63-2,05	0,66

a) Não calculável

Abreviaturas: p (valor de p obtido pelo teste de  $\chi^2$ ); OR (*Odds Ratio*); IC 95% (Intervalo de Confiança 95%);

#### 4.2. Associação do Polimorfismo 1977 T/C no gene *LIG4* na susceptibilidade para Cancro do Ovário Epitelial

A distribuição das frequências dos vários genótipos do polimorfismo 1977 T/C do gene *LIG4* (TT, TC e CC) no grupo controlo e no grupo de casos com COE está descrito na tabela 4. A distribuição das frequências genotípicas de ambos os grupos está de acordo com o esperado segundo os princípios de Hardy-Weinberg para populações em equilíbrio.

Relativamente ao grupo controlo, 66,0 % dos indivíduos apresenta o genótipo TT, 28,8 % o genótipo TC e 5,2 % o genótipo CC. No grupo dos indivíduos com COE, as frequências dos genótipos TT, TC e CC são 66,9 %, 27,8 % e 5,2 %, respectivamente.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de casos e o grupo controlo, tendo em conta os vários genótipos do polimorfismo.

Adoptando, novamente, o Modelo Recessivo, no grupo controlo, 66,0 % dos indivíduos apresenta um genótipo TT enquanto 34,0 % é portador do alelo C. Para o grupo das doentes com COE, 66,9 % dos indivíduos apresenta um genótipo TT e 31,1 % é portador do alelo C. Também para este caso não foram encontrados resultados estatisticamente significativos (OR=0,96; IC 95%= 0,65-1,42;  $p=0,83$ ) (Tabela 4).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes genótipos e as características clínico-patológicas das doentes com COE (dados não apresentados).

**Tabela 4.** Frequências genotípicas do polimorfismo *LIG4* 1977 T/C nos grupos controlo e casos com COE

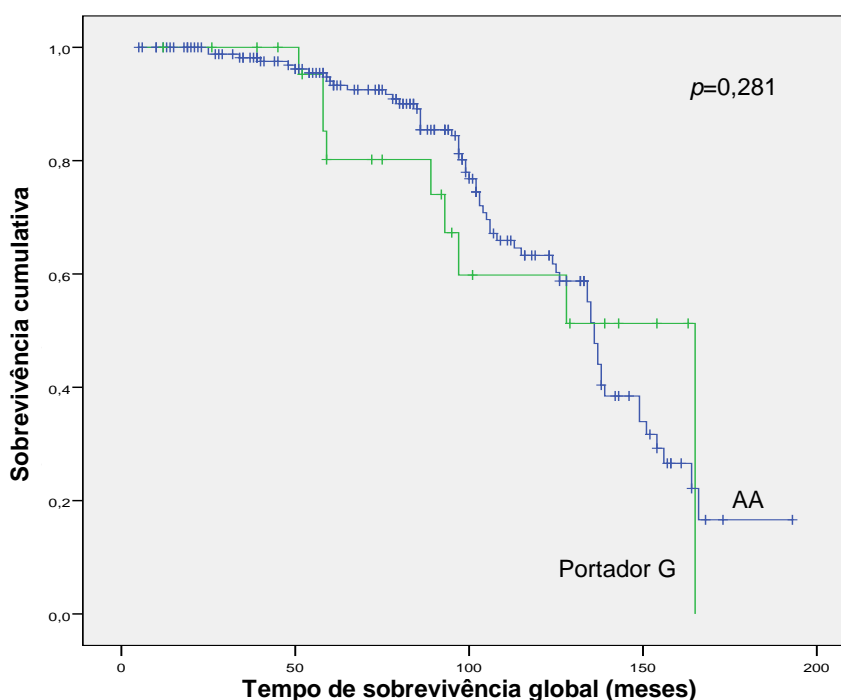
	<i>LIG4</i> 1977 T/C				OR	IC 95%	<i>p</i>
	Controlos (n= 250)		Casos (n=248)				
	N	%	N	%			
<b>Genótipo</b>							
TT	165	66,0	166	66,9	1,00	Referência	-
TC	72	28,8	69	27,8	0,95	0,63-1,44	0,81
CC	13	5,2	13	5,2	0,99	0,42-2,36	0,99
<b>Modelo Recessivo</b>							
TT	165	66,0	166	66,9	1,00	Referência	-
Portador C	85	34,0	82	33,1	0,96	0,65-1,42	0,83

Abreviaturas: *p* (valor de *p* obtido pelo teste de  $\chi^2$ ); OR (*Odds Ratio*); IC 95% (Intervalo de Confiança 95%);

### 4.3. Associação do Polimorfismo -392 A/G no gene *CYP3A4* na resposta farmacogenómica das doentes com Cancro do Ovário Epitelial

Na avaliação da influência do polimorfismo -392 A/G no gene *CYP3A4* na resposta farmacogenómica das doentes, apenas foram analisados indivíduos do grupo de casos que tinham sido submetidos a tratamentos quimioterapêuticos à base de platinos e paclitaxel (n=206; 93 % dos casos inicialmente propostos).

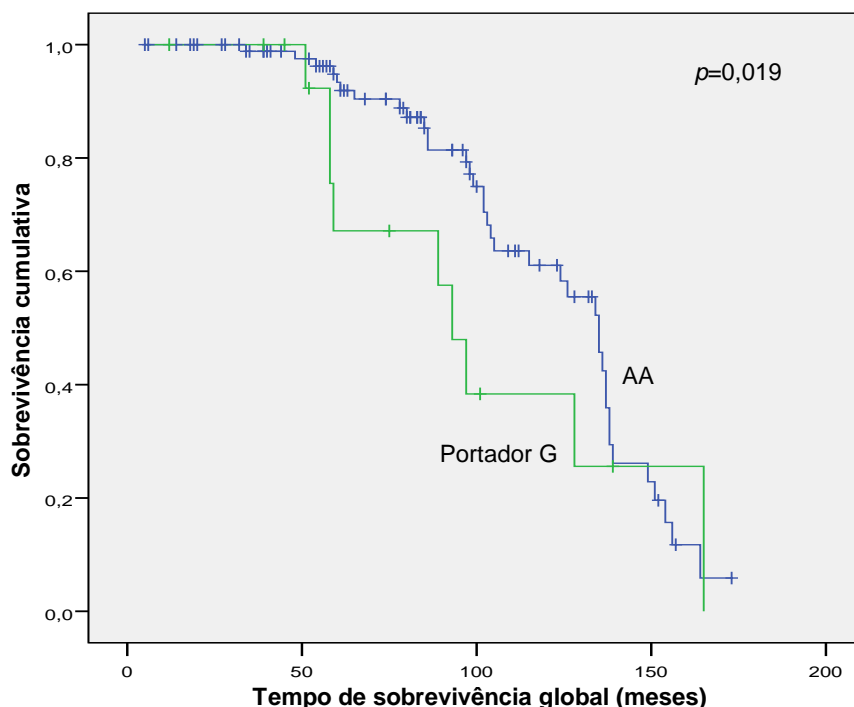
Num contexto geral, não foi encontrada significância estatística entre os diferentes genótipos de *CYP3A4\*1B* e o tempo de sobrevivência das doentes ( $p=0,164$ ) nem mesmo utilizando o modelo recessivo ( $p=0,281$ ) (Figura 14).



**Figura 14.** Curvas de Kaplan-Meier para o tempo de sobrevivência global das doentes com COE, após esquema quimioterapêutico à base de platinos e paclitaxel, consoante os diferentes genótipos do polimorfismo do gene *CYP3A4* (homozigótico AA vs portador G). A sobrevivência global média é de 132,22 meses para doentes com genótipo AA e 125,76 meses para doentes portadoras do alelo G ( $p=0,281$ ).

No entanto, quando se efectua a análise estatística de acordo com o tipo histológico, os resultados demonstraram uma associação estatisticamente significativa entre os diferentes genótipos (homozigótico AA *versus* portador G) relativamente ao tipo

histológico predominante nestas doentes (carcinoma seroso;  $n=109$ ) e o tempo de sobrevivência global. Assim, doentes com genótipo AA apresentam uma sobrevivência global de 122,56 meses comparada com 103,93 meses para portadoras do alelo G ( $p=0,019$ ) (Figura 15).



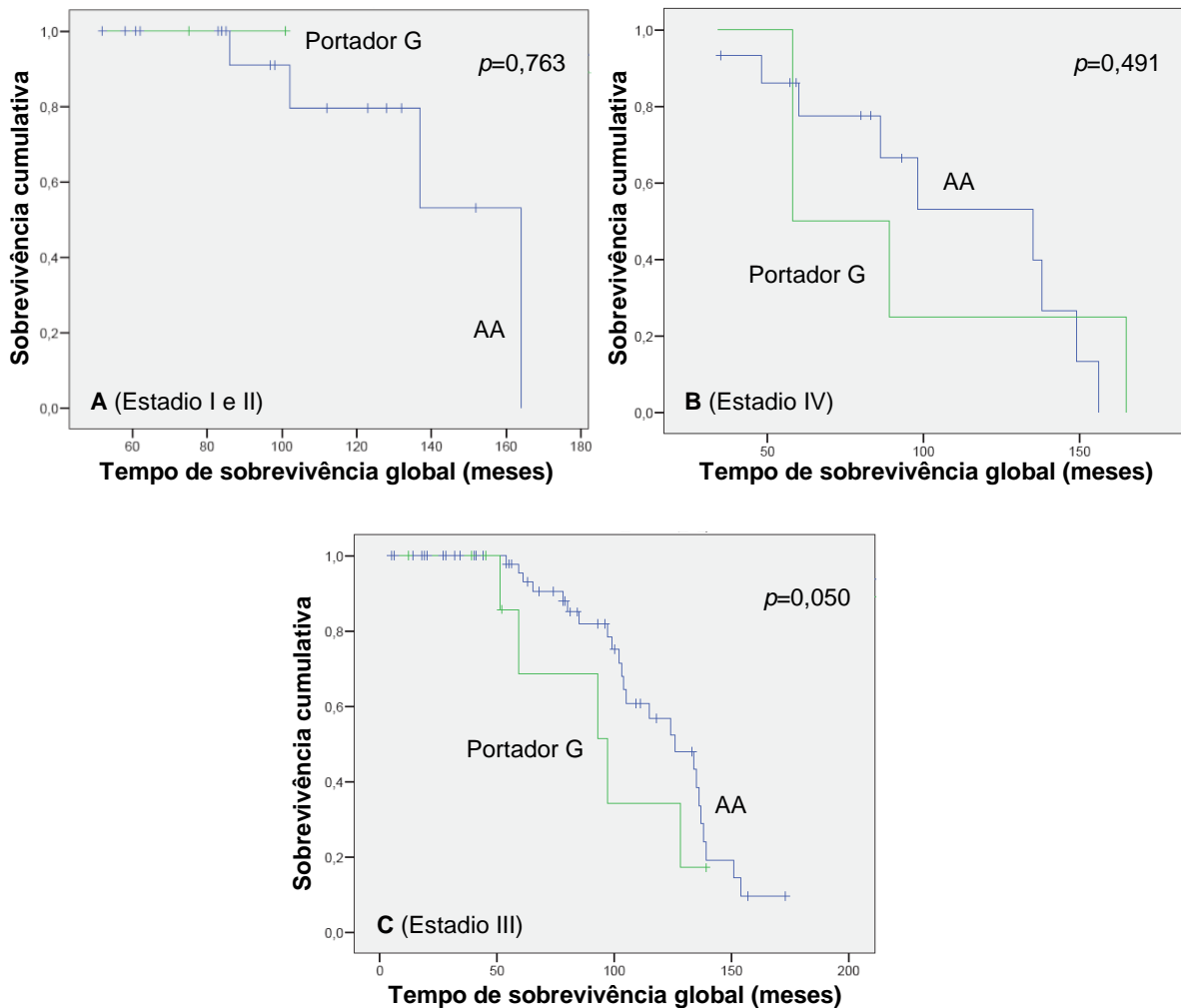
**Figura 15.** Curvas de Kaplan-Meier para o tempo de sobrevivência global das doentes com COE do tipo seroso, após esquema quimioterapêutico à base de platinos e paclitaxel, consoante os diferentes genótipos do polimorfismo do gene *CYP3A4* (homozigótico AA vs portador G). A sobrevivência global média é de 122,56 meses para doentes com genótipo AA e 103,93 meses para doentes portadoras do alelo G ( $p=0,019$ ).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, observa-se que a sobrevivência global aos 5 anos para os indivíduos que apresentam um diagnóstico histológico de COE do tipo seroso é de 0,93 e 0,67 nos indivíduos com genótipo AA e portadores do alelo G, respectivamente.

No grupo de doentes com tumores de histologia seroso, subdividiu-se as doentes de acordo com o estadió FIGO. O agrupamento dos estadios precoces (I e II) não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre a sobrevivência global das doentes de acordo com os diferentes genótipos ( $p=0,763$ ) (Figura 16.A). Relativamente ao grupo de doentes com metastização à distância (estadió IV), também não foi

encontrada significância estatística no que diz respeito à sobrevivência global ( $P=0,491$ ) (Figura 16.B).

Contudo, para o grupo de doentes com tumores em estadio III (o mais frequente;  $n=70$ ), doentes com genótipo AA apresentam uma sobrevivência global de 120,30 meses ao invés de 95,74 para as doentes portadoras do alelo G ( $p=0,05$ ) (Figura 16. C).

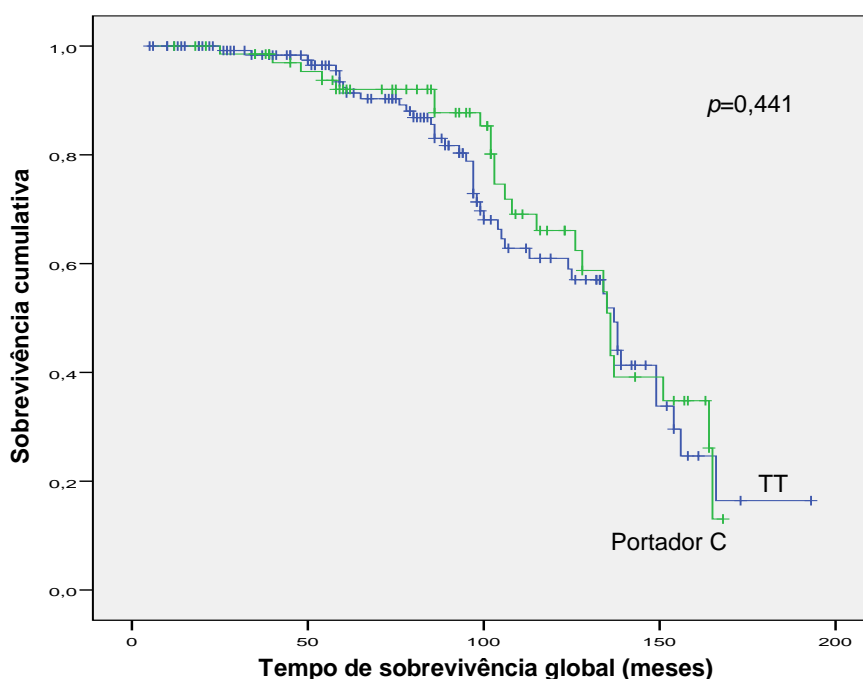


**Figura 16.** Curvas de Kaplan-Meier para o tempo de sobrevivência global das doentes com COE do tipo seroso e de acordo com o estadio FIGO, após esquema quimioterapêutico à base de platino e paclitaxel, consoante os diferentes genótipos do polimorfismo do gene *CYP3A4* (homozigótico AA vs portador G). **A.** Estadio I e II ( $p=0,763$ ); **B.** Estadio IV ( $p=0,491$ ); **C.** Estadio III ( $p=0,050$ ).

#### 4.4. Associação do Polimorfismo 1977 T/C no gene *LIG4* na resposta farmacogenómica das doentes com Cancro do Ovário Epitelial

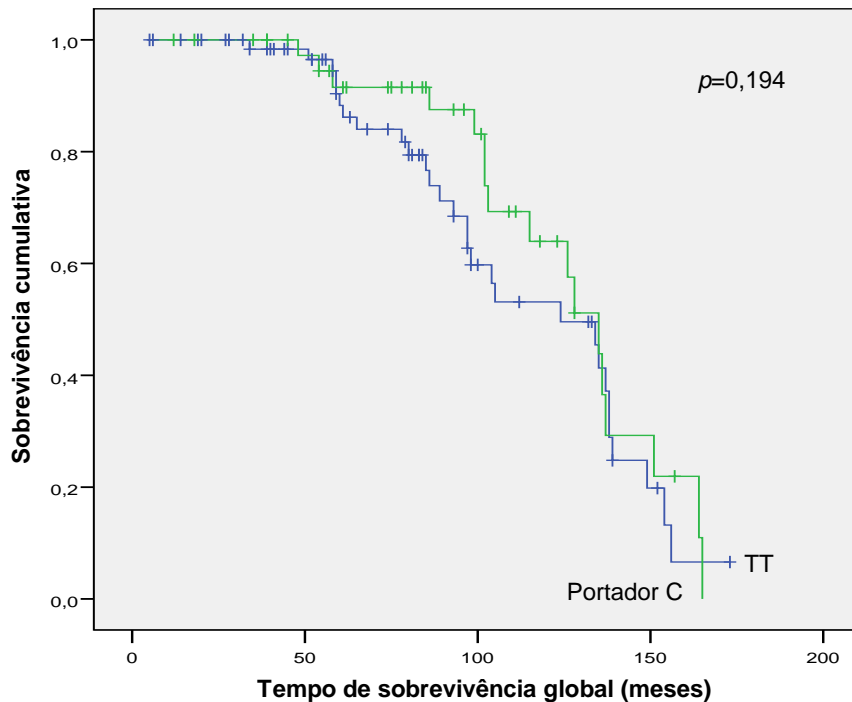
Na avaliação da influência do polimorfismo 1977 T/C no gene *LIG4* na resposta farmacogenómica das doentes, apenas foram analisados indivíduos do grupo de casos que tinham sido submetidos a tratamentos quimioterapêuticos à base de platinos e paclitaxel ( $n=207$ ; 93 % dos casos inicialmente propostos).

Num contexto geral, não foi encontrada significância estatística entre os diferentes genótipos de *LIG4* e o tempo de sobrevivência das doentes ( $p=0,536$ ), nem mesmo utilizando o modelo recessivo ( $p=0,441$ ) (Figura 17).



**Figura 17.** Curvas de Kaplan-Meier para o tempo de sobrevivência global das doentes com COE, após esquema quimioterapêutico à base de platinos e paclitaxel, consoante os diferentes genótipos do polimorfismo do gene *LIG4* (homozigótico TT vs portador C). A sobrevivência global média é de 130,311 meses para doentes com genótipo TT e 130,246 meses para doentes portadoras do alelo C ( $p=0,441$ ).

Com a estratificação das doentes de acordo com o tipo histológico, não se verificou associação significativa entre os diferentes tipos histológicos e os diferentes genótipos no que diz respeito à sobrevivência global, nem mesmo para o tipo histológico seroso ( $p=0,194$ ) (Figura 18).



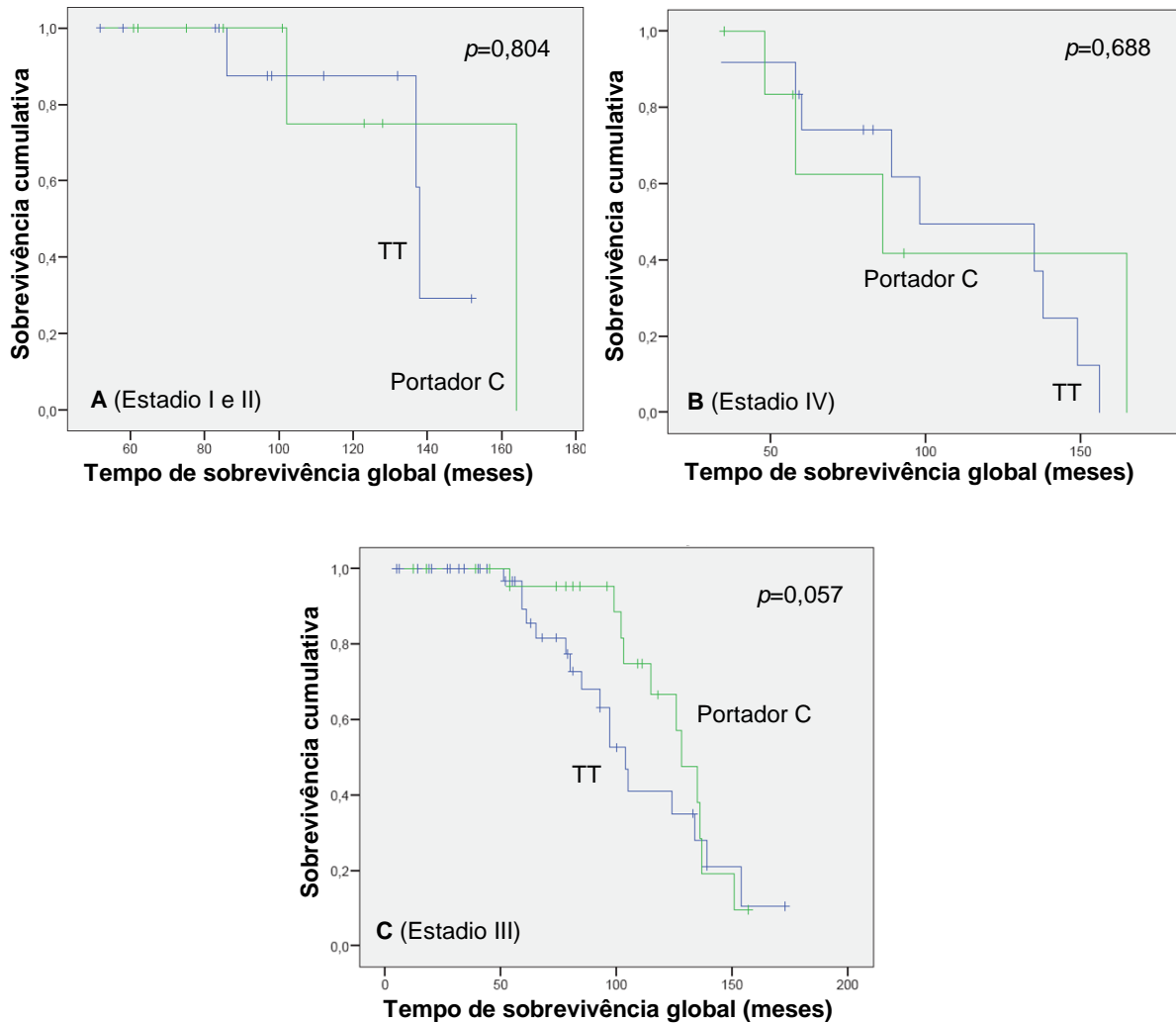
**Figura 18.** Curvas de Kaplan-Meier para o tempo de sobrevivência global das doentes com COE do tipo seroso, após esquema quimioterapêutico à base de platinos e paclitaxel, consoante os diferentes genótipos do polimorfismo do gene *LIG4* (homozigótico TT vs portador C). A sobrevivência global média é de 115,369 meses para doentes com genótipo TT e 125,778 meses para doentes portadoras do alelo C ( $p=0,194$ ).

As doentes que apresentam um diagnóstico histológico de COE do tipo seroso, e atendendo aos resultados obtidos neste trabalho, apresentam uma sobrevivência global aos 5 anos de 0,88 e 0,91 nos indivíduos com genótipo TT e portadores do alelo C, respectivamente.

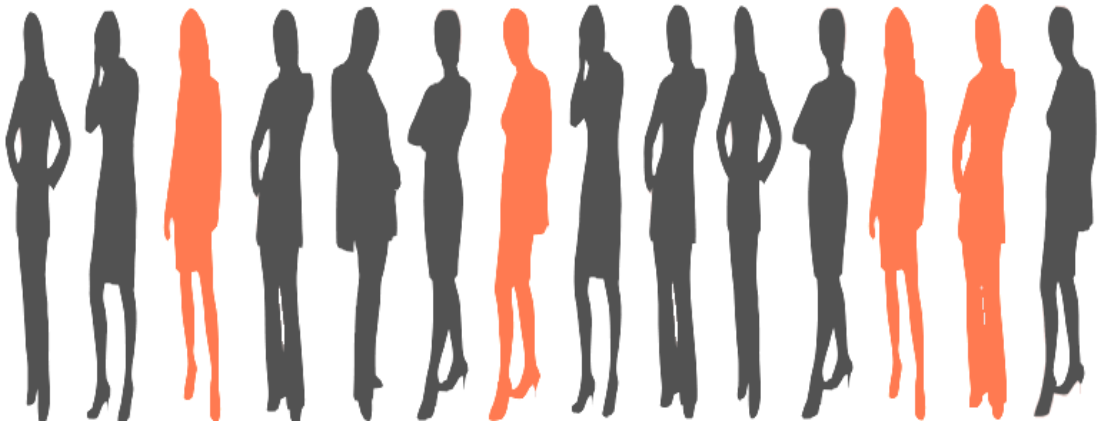
Na sub-divisão do grupo de doentes com tumores de histologia seroso de acordo com o estadio FIGO, nem os estadios precoces ( $P=0,804$ ) nem o estadio IV ( $p=0,688$ ) apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre a sobrevivência global e os diferentes genótipos (Figura 19.A e 19.B, respectivamente).

Relativamente ao estadio III, no caso do polimorfismo 1977 T/C no gene *LIG4*, verifica-se uma tendência na associação entre os diferentes genótipos e a sobrevivência global já que doentes com genótipo TT apresentam uma sobrevivência global média de

109,665 meses ao contrário dos 124,985 meses apresentados pelas portadoras do alelo C ( $p=0,057$ ) (Figura 19.C).



**Figura 19.** Curvas de Kaplan-Meier para o tempo de sobrevivência global das doentes com COE do tipo seroso e de acordo com o estadio FIGO, após esquema quimioterapêutico à base de platino e paclitaxel, consoante os diferentes genótipos do polimorfismo do gene *LIG4* (homozigótico TT vs portador C). **A.** Estadio I e II ( $p=0,804$ ); **B.** Estadio IV ( $p=0,688$ ); **C.** Estadio III ( $p=0,057$ ).



## **5. DISCUSSÃO**



Nos últimos anos, muitos têm sido os avanços científicos ao nível da medicina oncológica e da investigação translacional. Pelo seu carácter complexo, heterogéneo e multifactorial, o cancro estabelece-se como um desafio para a elaboração de estratégias de intervenção e prevenção, bem como no desenvolvimento de novos e melhorados meios de diagnóstico e tratamento [153].

A carcinogénese é um processo dinâmico e não-linear, sendo considerado como um dos fenómenos biológicos mais complexos [153]. O cancro esporádico é, por isso, uma doença multifactorial, resultante de múltiplas e complexas interacções entre factores genéticos e ambientais. Torna-se cada vez mais evidente que um dos aspectos fundamentais na carcinogénese será o balanço entre a lesão no DNA e a capacidade de resposta por parte do organismo [76].

A enzima *CYP3A4*, essencial no metabolismo de Fase I, actua sobre uma panóplia de compostos endógenos e exógenos, promovendo a sua transformação em compostos facilmente eliminados pelo organismo. Contudo, antes que possam ser eliminados, os compostos podem perder actividade ou adquirir capacidades carcinogénicas. Por isso, qualquer desregulação ao nível metabólico poderá contribuir para a formação de dano genómico e promover o processo de carcinogénese [154].

Se a célula afectada pela acção dos carcinogénios não for capaz de identificar e mediar uma resposta celular coordenada de forma a corrigir o dano, o processo de carcinogénese pode avançar e conduzir à conseqüente transformação neoplásica. Para que tal não aconteça, a célula possui inúmeros sistemas de reparação capazes de actuar e eliminar possíveis danos. Enzimas participantes nas vias de reparação do DNA são, por isso, consideradas como *caretakers* do genoma. A enzima DNA Ligase IV apresenta um papel essencial na via de reparação NHEJ, sendo responsável pelo processo de união final das extremidades após a reparação. O insucesso desta etapa poderá impulsionar a transformação neoplásica [88].

Os principais objectivos deste estudo consistiram na análise da frequência dos polimorfismos em *CYP3A4* e *LIG4* em indivíduos sem doença oncológica conhecida e num grupo de doentes com COE, e na avaliação da existência de associação entre as frequências dos polimorfismos em questão e a susceptibilidade para a doença e com as suas características clínico-patológicas. Adicionalmente, pretendeu-se avaliar a influência dos referidos polimorfismos na resposta farmacogenómica das doentes à quimioterapia de primeira linha, também de acordo com as características clínico-patológicas.

Pelas hipóteses propostas para a etiologia do CO, factores genéticos, ambientais e hormonais são capazes de afectar, directa ou indirectamente, a carcinogénese [155]. A sub-classificação dos tumores do ovário em Tipo I e Tipo II, proposta por Kurman e colaboradores (2004), continua a enfatizar a heterogeneidade do CO mas fornece suporte para estudos morfológicos e moleculares futuros, de forma a melhorar o nosso conhecimento sobre a carcinogénese do COE e desenvolvimento de estratégias mais efectivas para uma detecção precoce [156].

Inúmeros estudos indicam que o estadio FIGO e o tipo histológico são factores de prognóstico independentes para o COE [122,157]. De acordo com o tipo histológico dos tumores epiteliais do ovário, os sub-tipos endometrióide e mucinoso são geralmente de melhor prognóstico enquanto os tumores serosos e tumores indiferenciados apresentam pior prognóstico [157]. Como já foi referido, o sub-tipo seroso corresponde à maioria dos casos de COE e, já que a maioria deles pertence ao grupo de tumores do Tipo II, estes são geralmente bastante agressivos embora quimio-sensíveis. Contudo, pelo seu rápido crescimento, menos de 25% dos casos são diagnosticados em estadios precoces (Estadio I e II) [115].

Apesar dos avanços na cirurgia citoreductora e na combinação de agentes quimioterapêuticos reflectir uma melhoria na sobrevivência a 5 anos, com 45 % das doentes a atingir esta meta, menos de 30 % das doentes com COE sobrevive a longo prazo [119,150]. Embora 80 % dos doentes responda inicialmente à terapia de primeira linha, o desenvolvimento de resistência é frequente e muitas das doentes acaba por desenvolver recidivas [121,124].

Apesar dos mecanismos adjacentes ao desenvolvimento de resistência ainda não estejam completamente elucidados, estes podem passar pela falha na farmacocinética da medicação, pelo micro-ambiente tumoral e factores específicos das células neoplásicas [158]. Contudo, o fenótipo de resistência é geralmente o resultado de uma interacção entre os três factores e, por isso, qualquer estratégia para ultrapassar a resistência à medicação deverá ter em conta mais do que um alvo [144]. Actualmente, está já comprovado que polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos e reparação do DNA podem alterar significativamente a eficácia, efeitos tóxicos e *outcome* da terapia [129]. Assim, é plausível que os polimorfismos, ao afectarem o mecanismo de resposta à terapia, possam influenciar a sobrevivência dos doentes com COE e auxiliar na predição da resposta clínica [159].

### 5.1. Associação do Polimorfismo -392 A/G no gene *CYP3A4* na susceptibilidade para Cancro do Ovário Epitelial

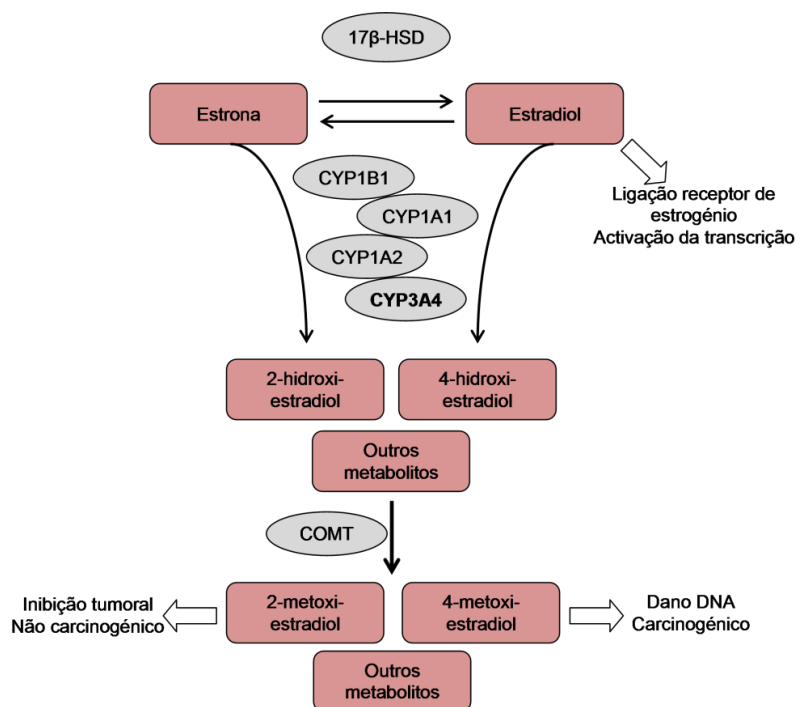
As diferenças inter-individuais ao nível do metabolismo de xenobióticos e endobióticos estão documentadas e são, em grande parte, atribuídas a polimorfismos genéticos em genes de enzimas envolvidas no processo de biotransformação. Pela importância ao nível metabólico, variações mínimas ao nível da actividade enzimática da *CYP3A4* podem condicionar grandemente a sua acção a nível fisiológico [46].

Atendendo à importância da enzima *CYP3A4* na metabolização de compostos endógenos, como compostos hormonais, o polimorfismo *CYP3A4\*1B* pode revelar-se um importante biomarcador, num painel de factores genéticos, na susceptibilidade para o desenvolvimento de COE. Este polimorfismo foi já intensivamente estudado em tumores com uma relação hormonal, como no caso do cancro da próstata e da mama [25,51]. Relativamente ao ovário, existem poucos estudos que avaliem a associação entre a presença do polimorfismo *CYP3A4\*1B* e o risco de desenvolvimento de COE.

Uma vez sintetizados nos ovários, os estrogénios são extensivamente metabolizados, inclusive pela enzima *CYP3A4* (Figura 20). A biotransformação do estrogénio leva à formação de metabolitos biologicamente menos activos (pela hidroxilação em C-2) ou em metabolitos com elevado potencial mutagénico (por hidroxilação em C-4 ou C-16) pela capacidade de estimularem a proliferação celular e a genotoxicidade [41,160].

Variações na actividade da enzima *CYP3A4* poderão resultar em níveis circulantes alterados dos metabolitos hormonais e assim contribuir para o desenvolvimento de COE. Para além disso, já que a enzima *CYP3A4* está expressa no ovário, a variação na sua actividade poderá também influenciar o impacto local da metabolização hormonal [41,160].

Assim, pela relevância metabólica da *CYP3A4* e pela sua possível intervenção na etiologia do COE, um dos objectivos em que este trabalho se centrou foi na análise da frequência do polimorfismo -392 A/G no gene *CYP3A4* em indivíduos sem doença oncológica conhecida e em doentes com diagnóstico de COE e na avaliação de possíveis associações entre as frequências genótípicas observadas e a susceptibilidade para o desenvolvimento de COE.



**Figura 20.** Via metabólica (parcial) dos estrogénios (adaptado de [160]).

Abreviaturas: 17β-HSD (17β-hidroxiesteroide dehidrogenase); COMT (catecol-orto-metiltransferase)

As frequências observadas para o polimorfismo *CYP3A4\*1B* foram de 90,4 %, 9,6 % e 0 % para os genótipos AA, AG e GG, respectivamente, no grupo controlo e 89,2 %, 10,0 % e 0,8 % para os genótipos AA, AG e GG, respectivamente, no grupo de casos com COE. Estas frequências estão de acordo com outros estudos em populações caucasianas saudáveis [62-63].

Tendo em conta que a frequência genotípica GG do polimorfismo é bastante reduzida, estudos como o de Spurdle e colaboradores (2002), optam por combinar os genótipos AG e GG e comparar com o genótipo AA, realizando assim uma análise segundo o modelo recessivo. No entanto, no nosso estudo, não se verificou nenhuma associação estatisticamente significativa entre os diferentes genótipos (homozigótico AA *versus* portador G) e a susceptibilidade para o desenvolvimento de COE (OR=1,14; IC95%=0,63-2,05;  $p=0,66$ ).

Os nossos resultados são concordantes com outros estudos similares, confirmando que o polimorfismo *CYP3A4\*1B* poderá não estar associado com o risco de COE, na população caucasiana, apesar da sua importância biológica inerente ao desenvolvimento desta neoplasia.

## 5.2. Associação do Polimorfismo 1977 T/C no gene *LIG4* na susceptibilidade para Cancro do Ovário Epitelial

Durante a ovulação mensal, a superfície epitelial do ovário é degradada enzimaticamente de forma a libertar o ócito, sendo a lesão resultante posteriormente reparada. Este processo biológico é considerado como potenciador da transformação maligna já que as células do ovário terão que se dividir e propagar rapidamente, depois de terem sido sujeitas à acção de espécies reactivas capazes de danificar o DNA [161].

O papel das hormonas reprodutivas na carcinogénese do ovário tem sido bastante debatido, sugerindo-se que o estrogénio e os seus metabolitos poderão ser potentes carcinogénios capazes de provocar alterações genéticas, nomeadamente pela formação de DSBs, e assim estimular a iniciação tumoral [162]. A ligação do DNA é uma etapa ubíqua a nível celular, já que é utilizada em mecanismos como a replicação, reparação e recombinação genética [32,97]. Os polimorfismos no gene *LIG4* têm sido associados com alterações na capacidade de reparação do DNA que, em última análise, serão capazes de influenciar o risco de desenvolvimento tumoral [76].

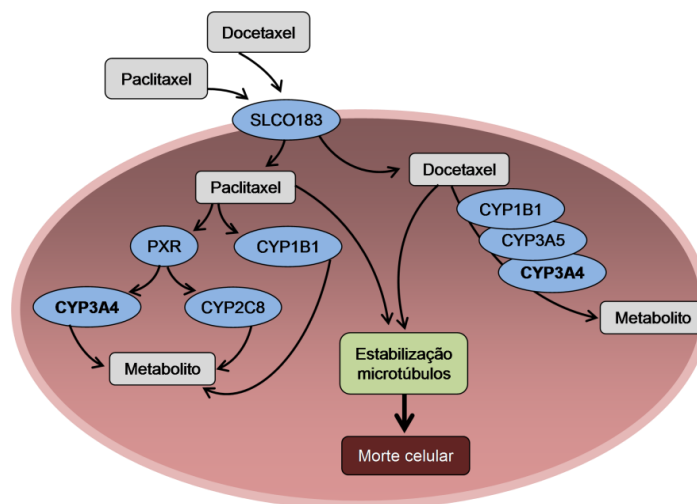
Pela relevância das vias de reparação do DNA no CO, a via de reparação NHEJ e, nomeadamente a *LIG4*, podem ter um papel crucial na etiologia desta neoplasia. Desta forma, foi objectivo deste estudo a análise da frequência do polimorfismo 1977 T/C no gene *LIG4* em indivíduos sem doença oncológica conhecida e em doentes com diagnóstico de COE e na avaliação de possíveis associações entre as frequências observadas do polimorfismo e a susceptibilidade para o desenvolvimento de COE.

As frequências observadas para este polimorfismo foram de 66,0 %, 28,8 % e 5,2 % para os genótipos TT, TC e CC, respectivamente, no grupo controlo e 66,9 %, 27,8 % e 5,2 % para os genótipos TT, TC e CC, respectivamente, no grupo de casos. Estas frequências estão de acordo com outros estudos realizados em populações caucasianas e saudáveis [92]. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de casos e o grupo controlo, tendo em conta os vários genótipos do polimorfismo. Adoptando novamente o modelo recessivo, também para este caso não foram encontrados resultados estatisticamente significativos (OR=0,96; IC 95%= 0,65-1,42;  $p=0,83$ ). Na literatura, os resultados descritos para este polimorfismo eram bastante distintos e este estudo veio juntar-se aqueles que indicam que a alteração 1977 T/C no gene *LIG4* não está associado com o risco de COE em mulheres caucasianas.

### 5.3. Associação do Polimorfismo -392 A/G no gene *CYP3A4* na resposta farmacogenómica das doentes com Cancro do Ovário Epitelial

A Farmacogenómica tem como propósito identificar as bases hereditárias que condicionam diferenças inter-individuais significativas na resposta à terapia, com a finalidade de individualizar a terapêutica [18,163].

Uma das classes de fármacos mais utilizadas no tratamento de doenças oncológicas, e nomeadamente no COE, são os taxanos, da qual fazem parte o paclitaxel e o docetaxel [29,40]. Para esta classe de fármacos, o metabolismo de Fase I pelas enzimas CYP representa a maior via de inactivação e eliminação dos mesmos, já que os metabolitos resultantes são menos tóxicos e estão presentes em menor concentração no plasma que os compostos iniciais, não parecendo exercer nenhum efeito clínico na inibição do crescimento tumoral (Figura 21) [52].



**Figura 21.** Representação esquemática do metabolismo e mecanismo de acção dos taxanos (adaptado de [164]).

Abreviaturas: SLCO183 (*solute carrier organic anion transporter family, member 1B3*); PXR (*Pregnane X Receptor*)

Estudos recentes demonstram que os taxanos apresentam a capacidade de activar o *PXR* humano e, desta forma, conduzir a uma efectiva indução da expressão da enzima *CYP3A4* [29]. Alguns estudos *in vitro* demonstram que a activação do *PXR* conduz ao aumento de expressão da *CYP3A4* e que esta alteração aumenta a resistência das linhas celulares aos agentes quimioterapêuticos referidos. Por outro lado,

a repressão da expressão e actividade do *PXR/CYP3A4* aumenta a sensibilidade das linhas celulares à terapêutica [32].

A enzima *CYP3A4* é uma das enzimas mais relevantes e mais expressa ao nível do ovário [27]. Em condições patológicas, esta enzima apresenta um papel ainda mais fulcral, por ser capaz de metabolizar fármacos utilizados no tratamento da neoplasia do ovário. Apesar da maioria do metabolismo dos agentes quimioterapêuticos ocorrer a nível hepático, a expressão das enzimas *CYP3A4* nas células tumorais do ovário pode conferir às células tumorais a habilidade para inactivar os substratos da enzima, como o paclitaxel, e desta forma diminuir a resposta do tumor aos agentes quimioterapêuticos [39].

O polimorfismo -392 A/G no gene *CYP3A4* pode influenciar a actividade da enzima em estudo, uma vez que a presença do alelo G pode aumentar a actividade da mesma e, desta forma, afectar a resposta à terapia das doentes com COE. Assim, um dos objectivos deste estudo foi avaliar a presença do polimorfismo como factor de prognóstico para doentes com COE, que foram sujeitas a quimioterapia de primeira linha à base de platinos e paclitaxel. Desta forma, após análise estatística, os resultados mostram que, num contexto geral, não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre os diferentes genótipos de *CYP3A4\*1B* e o tempo de sobrevivência das doentes ( $p=0,164$ ) nem mesmo utilizando o modelo recessivo ( $p=0,281$ ). De acordo com estes resultados, as doentes portadoras do alelo G apresentam uma sobrevivência global inferior em comparação com as doentes com genótipo AA. Esta diferença, apesar de não significativa, poderá ter como consequência funcional uma maior degradação do paclitaxel e, conseqüentemente, uma menor efectividade da terapia.

Contudo, quando o grupo de casos foi estratificado de acordo com o tipo histológico, os resultados demonstraram uma associação estatisticamente significativa entre os diferentes genótipos (homozigótico AA *versus* portador G) e o tempo de sobrevivência para doentes com o tipo histológico seroso. Os doentes com genótipo AA apresentam uma sobrevivência global média de 122,56 meses quando comparada com os portadores do alelo G que apresentam uma sobrevivência global média de 103,93 meses ( $p=0,019$ ), o que se traduz numa diminuição da sobrevivência global em cerca de 18,6 meses para as portadoras do alelo G. Apesar de tumores do tipo seroso serem geralmente quimio-sensíveis, estes resultados apontam para que a presença do alelo G aumente a capacidade de metabolização dos agentes quimioterapêuticos pela *CYP3A4*

e, por esta razão, os tumores do ovário do tipo seroso adquirem características de resistência à terapia, afectando, assim, a sobrevivência global das doentes.

No grupo de doentes com tumores do tipo seroso, a maioria apresentava tumores em estado avançado (Estadio III). Também para esta análise, a presença do alelo G condiciona uma sobrevivência média de 95,74 meses em comparação com os 120,30 meses apresentados nas doentes com genótipo AA ( $p=0,05$ ). Neste caso, doentes com genótipo AA apresentam uma sobrevivência global média 24,6 meses superior às doentes portadoras do alelo G.

Este resultado vem de encontro ao descrito na literatura, uma vez que estudos prévios demonstram que os estrogénios são capazes de estimular a proliferação dos tumores do ovário, particularmente os do subtipo histológico seroso [148,165]. Assim, o elevado índice proliferativo provocado pelos estrogénios é particularmente intenso em tumores em fases avançadas que invadem o peritoneu e que estão mais expostos a estrogénios circulantes. Estes tumores altamente proliferativos são mais susceptíveis a agentes quimioterapêuticos [160,166]. Doentes portadoras do alelo G apresentam uma diminuição da sobrevivência global, o que pode ser indicador que este polimorfismo, por conferir um aumento da actividade da enzima *CYP3A4*, para além de aumentar o metabolismo do paclitaxel, poderá aumentar a metabolização dos estrogénios para metabolitos intermediários mais inactivos. Assim, pela diminuição da estimulação proliferativa pelos estrogénios, os COE do tipo seroso em estadio III apresentam um menor índice proliferativo e a terapia torna-se menos efectiva, promovendo uma menor sobrevivência global de doentes portadoras do alelo G.

#### **5.4. Associação do Polimorfismo 1977 T/C no gene *LIG4* na resposta farmacogenómica das doentes com Cancro do Ovário Epitelial**

Embora a taxa de resposta inicial das doentes à quimioterapia seja boa, muitas doentes acabam por desenvolver recidivas e, possivelmente, clones de células resistentes à terapia. Os agentes quimioterapêuticos actuam em células com elevado índice proliferativo, sendo capazes de introduzir danos no DNA. No caso dos análogos de platinos, como a carboplatina e cisplatina, estes agentes exercem o seu efeito quimioterapêutico pela formação de ligações entre as cadeias de DNA [113].

O reconhecimento do dano no DNA e os mecanismos de reparação consequentes são essenciais para a sensibilidade e resistência das células tumorais durante o tratamento. Defeitos ao nível da reparação do DNA podem proporcionar uma hipersensibilidade aos agentes quimioterapêuticos estimando-se que, quanto menor for a capacidade celular em corrigir o dano, maior será a sensibilidade das células para os agentes terapêuticos [109,113].

Um dos objectivos deste trabalho foi avaliar a influência do polimorfismo 1977 T/C no gene *LIG4* na sobrevivência das doentes sujeitas a quimioterapia de primeira linha à base de platinos e paclitaxel. De uma forma geral, doentes portadoras do alelo C apresentam uma sobrevivência global média superior às doentes com genótipo TT, embora os resultados não sejam estatisticamente significativos. Relativamente às doentes com tumores do tipo seroso, geralmente caracterizados por apresentarem instabilidade genética e por serem quimio-sensíveis, as doentes portadoras do alelo C, apresentam também uma sobrevivência global média superior comparativamente com as doentes com genótipo TT. Esta associação, embora não significativa, parece indicar que a presença do alelo C diminui a actividade e a eficácia enzimática da *LIG4*, conduzindo a uma diminuição da reparação do DNA e, por conseguinte, ao aumento da hipersensibilidade aos agentes quimioterapêuticos característica dos tumores serosos.

No grupo de doentes com tumores serosos em estadio III, os resultados obtidos indicam uma tendência na associação dos diferentes genótipos e a sobrevivência global. Relativamente aos doentes portadores do alelo C, estes apresentam uma sobrevivência global média de 124,985 meses quando comparados com as doentes com o genótipo TT (109,665 meses) ( $p=0,057$ ). Desta forma, as doentes portadores do alelo C apresentam uma sobrevivência global média superior de 15,3 meses quando comparadas com as

doentes com o genótipo TT. Este resultado está de acordo com o descrito na literatura, já que, apesar deste grupo de doentes apresentar tumores com elevado índice proliferativo, a presença do alelo C do polimorfismo 1977 T/C no gene *LIG4* parece facilitar adicionalmente a acção da terapia e, por conseguinte, conduzir a uma melhor resposta farmacogenómica por parte das doentes.

De uma forma geral, com a presença do alelo C do polimorfismo 1977 T/C no gene *LIG4*, a célula deverá apresentar mecanismos de reparação menos eficazes e, por essa razão, poderá ter uma menor capacidade de corrigir os danos citotóxicos provocados pelos agentes quimioterapêuticos, levando à acumulação de quebras no DNA. Por outro lado, estudos com linhas celulares resistentes à quimioterapia demonstram que os mecanismos de reparação estão sobre-regulados e a activação da apoptose modulada pelas caspases está bloqueada. Desta forma, a sub-actividade enzimática da *LIG4*, poderá conduzir à activação de caspases e, por conseguinte, à indução da apoptose. Os mecanismos referidos poderão proporcionar uma sensibilidade aumentada aos agentes quimioterapêuticos e, consequentemente, uma melhor resposta global a nível terapêutico para portadoras do alelo menos frequente (alelo C).



## **6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS**



Ao longo dos últimos anos, a investigação translacional tem assumido um papel bastante crucial na área da medicina oncológica. Desta forma, com este tipo de estudos, pretende-se identificar um painel de polimorfismos genéticos, que em combinação com factores de risco estabelecidos, possam ser encarados como possíveis marcadores de susceptibilidade ou como potenciais factores de prognóstico. Em última análise, a definição de perfis de susceptibilidade/prognóstico poderá ser uma ferramenta útil na implementação de estratégias de rastreio/prevenção e, desta forma, diminuir a incidência e mortalidade por cancro.

Uma variabilidade inter-individual considerável tem sido registada ao nível de genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos, bem como nas vias de biossíntese e metabolismo de endobióticos. Estas diferenças poderão ajudar a implementar as hipóteses postuladas na etiologia do COE tendo em conta os eventos reprodutivos e a exposição hormonal. Para além de influenciar o risco, os SNPs em enzimas metabolizadoras, podem condicionar a actividade de agentes quimioterapêuticos e consequentemente modificar o risco de recidiva, toxicidade e mesmo a sobrevivência das doentes.

Neste estudo, a enzima metabolizadora *CYP3A4* parece não influenciar o risco de desenvolvimento de COE, embora estes resultados sugiram que esta enzima possa ser um bom indicador de prognóstico para a neoplasia maligna estudada. Os resultados deste trabalho encontram-se de acordo com outros descritos na literatura no que diz respeito à susceptibilidade para COE. Relativamente ao estudo farmacogenómico, este é pioneiro na avaliação da associação do polimorfismo e a resposta farmacogenómica das doentes, relativamente à sobrevivência global.

Contudo, é ainda controverso o efeito funcional do polimorfismo e alguns estudos realçam o facto de que, para além da variabilidade individual na expressão da enzima *CYP3A4*, a variabilidade inter-individual nos genes dos receptores nucleares que regulam a transcrição desta enzima poderá também ser importante a nível metabólico. Por isso, polimorfismos genéticos em enzimas envolvidas na biotransformação e na sua regulação poderão ser de extrema importância não só na metabolização de compostos mas também na protecção do genoma, ao evitar a formação de danos no DNA.

Os genes envolvidos nas vias de reparação são considerados como *caretakers* do genoma, e mutações nestes genes são responsáveis pelo desenvolvimento de

tumores e por várias doenças hereditárias, caracterizadas por alterações metabólicas complexas.

Apesar da importância celular da enzima *LIG4*, o polimorfismo 1977 T/C neste gene parece não estar relacionado com a susceptibilidade para COE, o que está de acordo com alguns estudos existentes. A nível farmacogenómico, o polimorfismo parece estar associado com a resposta à terapia por parte das doentes, sugerindo que as portadoras do alelo C possam apresentar uma maior sensibilidade para a quimioterapia *standard* para o COE. Contudo, estudos referem que, pelo facto do polimorfismo dar origem a uma alteração sinónima, é improvável que apresente algum efeito funcional, indicando que o mesmo possa estar em *linkage disequilibrium* com outros polimorfismos funcionais. Para além disso, a análise deste polimorfismo poderá ser mais relevante em tumores cujo tratamento envolva a radioterapia, já que a enzima *LIG4* poderá contribuir para uma hipersensibilidade para a radiação ionizante, uma fonte de DSBs.

Como objectivo futuro pretende-se aumentar a casuística deste trabalho de forma a permitir a análise da interacção entre os polimorfismos estudados e factores etiológicos, como a ovulação. Pelo carácter dúbio de ambos os polimorfismos em termos funcionais, estudos posteriores passarão pela realização de ensaios funcionais, como a quantificação de mRNA ou avaliação da expressão proteica por imunohistoquímica. Por outro lado, poderão ser quantificados os níveis de agentes quimioterapêuticos e seus metabolitos no plasma dos doentes, de forma a avaliar a actividade enzimática e relacioná-la com a análise genotípica realizada para o grupo de casos. Adicionalmente, poderão ser avaliados outros factores associados com as enzimas estudadas. No caso da *CYP3A4*, o PXR poderá ser um alvo de estudo, bem como outras moléculas envolvidas na biotransformação dos taxanos. Associado à Ligase IV, poderá ser analisada a sua interacção com moléculas envolvidas na apoptose, o que poderá trazer novos conhecimentos relativamente à resposta farmacogenómica por parte das doentes.

Embora os resultados obtidos neste trabalho não sejam de magnitude suficiente para modificar a decisão clínica, são consistentes com os efeitos de genes de baixa penetrância, cujos efeitos fenotípicos são, geralmente, considerados baixos a moderados. Contudo, o crescente conhecimento sobre a genética e biologia das enzimas envolvidas em processos celulares de extrema importância poderá auxiliar no entendimento dos eventos relacionados com a etiologia e carcinogénese do COE bem como na aquisição de resistência ao tratamento por parte das doentes.



## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



1. Weber, B.L. (2002) Cancer genomics. *Cancer Cell*, **1**, 37-47.
2. Loktionov, A. (2004) Common gene polymorphisms, cancer progression and prognosis. *Cancer Lett*, **208**, 1-33.
3. Boyle, P. and Levin, B. (2008) *World Cancer Report 2008*. International Agency for Research on Cancer (IARC).
4. Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
5. Cavallo, F., De Giovanni, C., Nanni, P., Forni, G. and Lollini, P.L. (2011) 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol Immunother*, **60**, 319-326.
6. Ruan, K., Fang, X. and Ouyang, G. (2009) MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett*, **285**, 116-126.
7. Abbas, K. and Mitchell, F. (2007) *Robbins Basic Pathology*. 8th ed. Saunders Elsevier.
8. Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. and Parkin, D.M. (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*.
9. Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M. and Boyle, P. (2007) Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*, **18**, 581-592.
10. Chakravarti, A. (2001) To a future of genetic medicine. *Nature*, **409**, 822-823.
11. Knudsen, L.E., Loft, S.H. and Autrup, H. (2001) Risk assessment: the importance of genetic polymorphisms in man. *Mutat Res*, **482**, 83-88.
12. Brennan, P. (2002) Gene-environment interaction and aetiology of cancer: what does it mean and how can we measure it? *Carcinogenesis*, **23**, 381-387.
13. Andreassen, C.N., Alsner, J. and Overgaard, J. (2002) Does variability in normal tissue reactions after radiotherapy have a genetic basis--where and how to look for it? *Radiother Oncol*, **64**, 131-140.
14. Brookes, A.J. (1999) The essence of SNPs. *Gene*, **234**, 177-186.
15. Baye, T.M. and Wilke, R.A. (2010) Mapping genes that predict treatment outcome in admixed populations. *Pharmacogenomics J*, **10**, 465-477.
16. Pharoah, P.D., Antoniou, A., Bobrow, M., Zimmern, R.L., Easton, D.F. and Ponder, B.A. (2002) Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat Genet*, **31**, 33-36.
17. Innocenti, F. (2005) *Pharmacogenomics: Methods and Protocols*. Humana Press.
18. Evans, W.E. and McLeod, H.L. (2003) Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med*, **348**, 538-549.
19. Sadee, W. and Dai, Z. (2005) Pharmacogenetics/genomics and personalized medicine. *Hum Mol Genet*, **14 Spec No. 2**, R207-214.
20. Erichsen, H.C. and Chanock, S.J. (2004) SNPs in cancer research and treatment. *Br J Cancer*, **90**, 747-751.
21. Medeiros, R., Pereira, D., Afonso, N., Palmeira, C., Faleiro, C., Afonso-Lopes, C., Freitas-Silva, M., Vasconcelos, A., Costa, S., Osorio, T. *et al.* (2003) Platinum/paclitaxel-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma: glutathione S-transferase genetic polymorphisms as predictive biomarkers of disease outcome. *Int J Clin Oncol*, **8**, 156-161.
22. Bozina, N., Bradamante, V. and Lovric, M. (2009) Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arh Hig Rada Toksikol*, **60**, 217-242.
23. Klaassen, C.D. (2008) *Casarett & Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons*. 7th ed. McGraw-Hill.

24. Weinshilboum, R. (2003) Inheritance and drug response. *N Engl J Med*, **348**, 529-537.
25. (2010) Genetic polymorphisms in phase I and phase II enzymes and breast cancer risk associated with menopausal hormone therapy in postmenopausal women. *Breast Cancer Res Treat*, **119**, 463-474.
26. Nebert, D.W. and Russell, D.W. (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*, **360**, 1155-1162.
27. Downie, D., McFadyen, M.C., Rooney, P.H., Cruickshank, M.E., Parkin, D.E., Miller, I.D., Telfer, C., Melvin, W.T. and Murray, G.I. (2005) Profiling cytochrome P450 expression in ovarian cancer: identification of prognostic markers. *Clin Cancer Res*, **11**, 7369-7375.
28. Lewis, D.F. and Sheridan, G. (2001) Cytochromes P450, oxygen, and evolution. *ScientificWorldJournal*, **1**, 151-167.
29. Nallani, S.C., Goodwin, B., Maglich, J.M., Buckley, D.J., Buckley, A.R. and Desai, P.B. (2003) Induction of cytochrome P450 3A by paclitaxel in mice: pivotal role of the nuclear xenobiotic receptor, pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos*, **31**, 681-684.
30. Tham, L.S., Holford, N.H., Hor, S.Y., Tan, T., Wang, L., Lim, R.C., Lee, H.S., Lee, S.C. and Goh, B.C. (2007) Lack of association of single-nucleotide polymorphisms in pregnane X receptor, hepatic nuclear factor 4alpha, and constitutive androstane receptor with docetaxel pharmacokinetics. *Clin Cancer Res*, **13**, 7126-7132.
31. Burk, O. and Wojnowski, L. (2004) Cytochrome P450 3A and their regulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **369**, 105-124.
32. Chen, T. (2008) Nuclear receptor drug discovery. *Curr Opin Chem Biol*, **12**, 418-426.
33. Zhang, B., Xie, W. and Krasowski, M.D. (2008) PXR: a xenobiotic receptor of diverse function implicated in pharmacogenetics. *Pharmacogenomics*, **9**, 1695-1709.
34. Ingelman-Sundberg, M., Oscarson, M. and McLellan, R.A. (1999) Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci*, **20**, 342-349.
35. Wrighton, S.A., Schuetz, E.G., Thummel, K.E., Shen, D.D., Korzekwa, K.R. and Watkins, P.B. (2000) The human CYP3A subfamily: practical considerations. *Drug Metab Rev*, **32**, 339-361.
36. Domanski, T.L. and Halpert, J.R. (2001) Analysis of mammalian cytochrome P450 structure and function by site-directed mutagenesis. *Curr Drug Metab*, **2**, 117-137.
37. Gellner, K., Eiselt, R., Hustert, E., Arnold, H., Koch, I., Haberl, M., Deglmann, C.J., Burk, O., Buntefuss, D., Escher, S. *et al.* (2001) Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene. *Pharmacogenetics*, **11**, 111-121.
38. Hu, Y.F., He, J., Chen, G.L., Wang, D., Liu, Z.Q., Zhang, C., Duan, L.F. and Zhou, H.H. (2005) CYP3A5\*3 and CYP3A4\*18 single nucleotide polymorphisms in a Chinese population. *Clin Chim Acta*, **353**, 187-192.
39. DeLoia, J.A., Zamboni, W.C., Jones, J.M., Strychor, S., Kelley, J.L. and Gallion, H.H. (2008) Expression and activity of taxane-metabolizing enzymes in ovarian tumors. *Gynecol Oncol*, **108**, 355-360.
40. Rodriguez-Antona, C. and Ingelman-Sundberg, M. (2006) Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene*, **25**, 1679-1691.

41. Spurdle, A.B., Goodwin, B., Hodgson, E., Hopper, J.L., Chen, X., Purdie, D.M., McCredie, M.R., Giles, G.G., Chenevix-Trench, G. and Liddle, C. (2002) The CYP3A4\*1B polymorphism has no functional significance and is not associated with risk of breast or ovarian cancer. *Pharmacogenetics*, **12**, 355-366.
42. Ma, X., Cheung, C., Krausz, K.W., Shah, Y.M., Wang, T., Idle, J.R. and Gonzalez, F.J. (2008) A double transgenic mouse model expressing human pregnane X receptor and cytochrome P450 3A4. *Drug Metab Dispos*, **36**, 2506-2512.
43. van Schaik, R.H. (2005) Cancer treatment and pharmacogenetics of cytochrome P450 enzymes. *Invest New Drugs*, **23**, 513-522.
44. Apro, M.S. and Walko, C.M. (2010) Aprepitant: drug-drug interactions in perspective. *Ann Oncol*, **21**, 2316-2323.
45. Hashimoto, H., Toide, K., Kitamura, R., Fujita, M., Tagawa, S., Itoh, S. and Kamataki, T. (1993) Gene structure of CYP3A4, an adult-specific form of cytochrome P450 in human livers, and its transcriptional control. *Eur J Biochem*, **218**, 585-595.
46. Amirimani, B., Ning, B., Deitz, A.C., Weber, B.L., Kadlubar, F.F. and Rebbeck, T.R. (2003) Increased transcriptional activity of the CYP3A4\*1B promoter variant. *Environ Mol Mutagen*, **42**, 299-305.
47. Robertson, G.R., Field, J., Goodwin, B., Bierach, S., Tran, M., Lehnert, A. and Liddle, C. (2003) Transgenic mouse models of human CYP3A4 gene regulation. *Mol Pharmacol*, **64**, 42-50.
48. Goodwin, B., Hodgson, E., D'Costa, D.J., Robertson, G.R. and Liddle, C. (2002) Transcriptional regulation of the human CYP3A4 gene by the constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol*, **62**, 359-365.
49. Pan, Y.Z., Gao, W. and Yu, A.M. (2009) MicroRNAs regulate CYP3A4 expression via direct and indirect targeting. *Drug Metab Dispos*, **37**, 2112-2117.
50. Moore, D.D. (2001) Regulation of drug transport by new xenobiotic receptors. *Pharmacogenomics J*, **1**, 224-225.
51. Rebbeck, T.R., Jaffe, J.M., Walker, A.H., Wein, A.J. and Malkowicz, S.B. (1998) Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst*, **90**, 1225-1229.
52. Green, H., Soderkvist, P., Rosenberg, P., Mirghani, R.A., Rymark, P., Lundqvist, E.A. and Peterson, C. (2009) Pharmacogenetic studies of Paclitaxel in the treatment of ovarian cancer. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **104**, 130-137.
53. Chu, W., Fyles, A., Sellers, E.M., McCready, D.R., Murphy, J., Pal, T. and Narod, S.A. (2007) Association between CYP3A4 genotype and risk of endometrial cancer following tamoxifen use. *Carcinogenesis*, **28**, 2139-2142.
54. Ozdemir, V., Kalow, W., Tang, B.K., Paterson, A.D., Walker, S.E., Endrenyi, L. and Kashuba, A.D. (2000) Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method. *Pharmacogenetics*, **10**, 373-388.
55. Baker, S.D., van Schaik, R.H., Rivory, L.P., Ten Tije, A.J., Dinh, K., Graveland, W.J., Schenk, P.W., Charles, K.A., Clarke, S.J., Carducci, M.A. et al. (2004) Factors affecting cytochrome P-450 3A activity in cancer patients. *Clin Cancer Res*, **10**, 8341-8350.
56. Nagata, K. and Yamazoe, Y. (2002) Genetic polymorphism of human cytochrome p450 involved in drug metabolism. *Drug Metab Pharmacokinet*, **17**, 167-189.
57. Mathijssen, R.H. and van Schaik, R.H. (2006) Genotyping and phenotyping cytochrome P450: perspectives for cancer treatment. *Eur J Cancer*, **42**, 141-148.

58. Amirimani, B., Walker, A.H., Weber, B.L. and Rebbeck, T.R. (1999) RESPONSE: re: modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst*, **91**, 1588-1590.
59. Keshava, C., McCanlies, E.C. and Weston, A. (2004) CYP3A4 polymorphisms--potential risk factors for breast and prostate cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, **160**, 825-841.
60. Paris, P.L., Kupelian, P.A., Hall, J.M., Williams, T.L., Levin, H., Klein, E.A., Casey, G. and Witte, J.S. (1999) Association between a CYP3A4 genetic variant and clinical presentation in African-American prostate cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **8**, 901-905.
61. Tayeb, M.T., Clark, C., Sharp, L., Haites, N.E., Rooney, P.H., Murray, G.I., Payne, S.N. and McLeod, H.L. (2002) CYP3A4 promoter variant is associated with prostate cancer risk in men with benign prostate hyperplasia. *Oncol Rep*, **9**, 653-655.
62. Cavaco, I., Gil, J.P., Gil-Berglund, E. and Ribeiro, V. (2003) CYP3A4 and MDR1 alleles in a Portuguese population. *Clin Chem Lab Med*, **41**, 1345-1350.
63. Nogal, A., Coelho, A., Catarino, R., Morais, A., Lobo, F. and Medeiros, R. (2007) The CYP3A4 \*1B polymorphism and prostate cancer susceptibility in a Portuguese population. *Cancer Genet Cytogenet*, **177**, 149-152.
64. Oliveira, E., Marsh, S., van Booven, D.J., Amorim, A., Prata, M.J. and McLeod, H.L. (2007) Pharmacogenetically relevant polymorphisms in Portugal. *Pharmacogenomics*, **8**, 703-712.
65. Lamba, J.K., Lin, Y.S., Thummel, K., Daly, A., Watkins, P.B., Strom, S., Zhang, J. and Schuetz, E.G. (2002) Common allelic variants of cytochrome P4503A4 and their prevalence in different populations. *Pharmacogenetics*, **12**, 121-132.
66. Felix, C.A., Walker, A.H., Lange, B.J., Williams, T.M., Winick, N.J., Cheung, N.K., Lovett, B.D., Nowell, P.C., Blair, I.A. and Rebbeck, T.R. (1998) Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13176-13181.
67. Garcia-Martin, E., Martinez, C., Pizarro, R.M., Garcia-Gamito, F.J., Gullsten, H., Raunio, H. and Agundez, J.A. (2002) CYP3A4 variant alleles in white individuals with low CYP3A4 enzyme activity. *Clin Pharmacol Ther*, **71**, 196-204.
68. Zeigler-Johnson, C., Friebel, T., Walker, A.H., Wang, Y., Spangler, E., Panossian, S., Patacsil, M., Aplenc, R., Wein, A.J., Malkowicz, S.B. et al. (2004) CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A43 genotypes and haplotypes in the etiology and severity of prostate cancer. *Cancer Res*, **64**, 8461-8467.
69. Cavalli, S.A., Hirata, M.H. and Hirata, R.D. (2001) Detection of MbolI polymorphism at the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin Chem*, **47**, 348-351.
70. Rebbeck, T.R. (2000) More about: modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst*, **92**, 76.
71. Schirmer, M., Toliat, M.R., Haberl, M., Suk, A., Kamdem, L.K., Klein, K., Brockmoller, J., Nurnberg, P., Zanger, U.M. and Wojnowski, L. (2006) Genetic signature consistent with selection against the CYP3A4\*1B allele in non-African populations. *Pharmacogenet Genomics*, **16**, 59-71.
72. Ando, Y., Tateishi, T., Sekido, Y., Yamamoto, T., Satoh, T., Hasegawa, Y., Kobayashi, S., Katsumata, Y., Shimokata, K. and Saito, H. (1999) Re: Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst*, **91**, 1587-1590.

73. Westlind, A., Lofberg, L., Tindberg, N., Andersson, T.B. and Ingelman-Sundberg, M. (1999) Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region. *Biochem Biophys Res Commun*, **259**, 201-205.
74. Wandel, C., Witte, J.S., Hall, J.M., Stein, C.M., Wood, A.J. and Wilkinson, G.R. (2000) CYP3A activity in African American and European American men: population differences and functional effect of the CYP3A4\*1B5'-promoter region polymorphism. *Clin Pharmacol Ther*, **68**, 82-91.
75. Biard, D.S. (2007) Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones. *Nucleic Acids Res*, **35**, 3535-3550.
76. Kiyohara, C., Takayama, K. and Nakanishi, Y. (2010) Lung cancer risk and genetic polymorphisms in DNA repair pathways: a meta-analysis. *J Nucleic Acids*, **2010**, 701760.
77. Belitsky, G.A. and Yakubovskaya, M.G. (2008) Genetic polymorphism and variability of chemical carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)*, **73**, 543-554.
78. Jackson, S.P. (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, **23**, 687-696.
79. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K. and Linn, S. (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, **73**, 39-85.
80. Bassing, C.H. and Alt, F.W. (2004) The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 781-796.
81. Shrivastav, M., De Haro, L.P. and Nickoloff, J.A. (2008) Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res*, **18**, 134-147.
82. Auranen, A., Song, H., Waterfall, C., Dicioccio, R.A., Kuschel, B., Kjaer, S.K., Hogdall, E., Hogdall, C., Stratton, J., Whittemore, A.S. *et al.* (2005) Polymorphisms in DNA repair genes and epithelial ovarian cancer risk. *Int J Cancer*, **117**, 611-618.
83. Burma, S., Chen, B.P. and Chen, D.J. (2006) Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)*, **5**, 1042-1048.
84. Rucci, F., Notarangelo, L.D., Fazeli, A., Patrizi, L., Hickernell, T., Paganini, T., Coakley, K.M., Detre, C., Keszei, M., Walter, J.E. *et al.* (2010) Homozygous DNA ligase IV R278H mutation in mice leads to leaky SCID and represents a model for human LIG4 syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 3024-3029.
85. Tseng, R.C., Hsieh, F.J., Shih, C.M., Hsu, H.S., Chen, C.Y. and Wang, Y.C. (2009) Lung cancer susceptibility and prognosis associated with polymorphisms in the nonhomologous end-joining pathway genes: a multiple genotype-phenotype study. *Cancer*, **115**, 2939-2948.
86. Wyman, C. and Kanaar, R. (2006) DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet*, **40**, 363-383.
87. Jayaram, S., Ketner, G., Adachi, N. and Hanakahi, L.A. (2008) Loss of DNA ligase IV prevents recognition of DNA by double-strand break repair proteins XRCC4 and XLF. *Nucleic Acids Res*, **36**, 5773-5786.
88. Goode, E.L., Ulrich, C.M. and Potter, J.D. (2002) Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **11**, 1513-1530.
89. Roddam, P.L., Rollinson, S., O'Driscoll, M., Jeggo, P.A., Jack, A. and Morgan, G.J. (2002) Genetic variants of NHEJ DNA ligase IV can affect the risk of developing

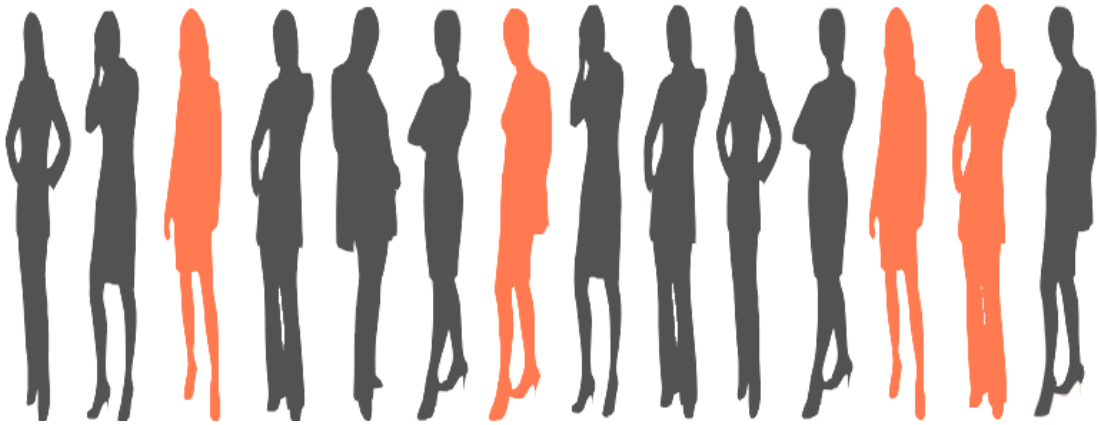
- multiple myeloma, a tumour characterised by aberrant class switch recombination. *J Med Genet*, **39**, 900-905.
90. Liu, Y., Zhou, K., Zhang, H., Shugart, Y.Y., Chen, L., Xu, Z., Zhong, Y., Liu, H., Jin, L., Wei, Q. *et al.* (2008) Polymorphisms of *LIG4* and *XRCC4* involved in the NHEJ pathway interact to modify risk of glioma. *Hum Mutat*, **29**, 381-389.
  91. Fu, Y.P., Yu, J.C., Cheng, T.C., Lou, M.A., Hsu, G.C., Wu, C.Y., Chen, S.T., Wu, H.S., Wu, P.E. and Shen, C.Y. (2003) Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the nonhomologous end-joining genes: a multigenic study on cancer susceptibility. *Cancer Res*, **63**, 2440-2446.
  92. Kuschel, B., Auranen, A., McBride, S., Novik, K.L., Antoniou, A., Lipscombe, J.M., Day, N.E., Easton, D.F., Ponder, B.A., Pharoah, P.D. *et al.* (2002) Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. *Hum Mol Genet*, **11**, 1399-1407.
  93. Garcia-Closas, M., Egan, K.M., Newcomb, P.A., Brinton, L.A., Titus-Ernstoff, L., Chanock, S., Welch, R., Lissowska, J., Peplonska, B., Szeszenia-Dabrowska, N. *et al.* (2006) Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and risk of breast cancer: two population-based studies in USA and Poland, and meta-analyses. *Hum Genet*, **119**, 376-388.
  94. Zienolddiny, S., Campa, D., Lind, H., Ryberg, D., Skaug, V., Stangeland, L.B., Canzian, F. and Haugen, A. (2008) A comprehensive analysis of phase I and phase II metabolism gene polymorphisms and risk of non-small cell lung cancer in smokers. *Carcinogenesis*, **29**, 1164-1169.
  95. Figueroa, J.D., Malats, N., Rothman, N., Real, F.X., Silverman, D., Kogevinas, M., Chanock, S., Yeager, M., Welch, R., Dosemeci, M. *et al.* (2007) Evaluation of genetic variation in the double-strand break repair pathway and bladder cancer risk. *Carcinogenesis*, **28**, 1788-1793.
  96. Martin, I.V. and MacNeill, S.A. (2002) ATP-dependent DNA ligases. *Genome Biol*, **3**.
  97. Ellenberger, T. and Tomkinson, A.E. (2008) Eukaryotic DNA ligases: structural and functional insights. *Annu Rev Biochem*, **77**, 313-338.
  98. Chen, X., Ballin, J.D., Della-Maria, J., Tsai, M.S., White, E.J., Tomkinson, A.E. and Wilson, G.M. (2009) Distinct kinetics of human DNA ligases I, IIIalpha, IIIbeta, and IV reveal direct DNA sensing ability and differential physiological functions in DNA repair. *DNA Repair (Amst)*, **8**, 961-968.
  99. Chen, X., Zhong, S., Zhu, X., Dziegielewska, B., Ellenberger, T., Wilson, G.M., MacKerell, A.D., Jr. and Tomkinson, A.E. (2008) Rational design of human DNA ligase inhibitors that target cellular DNA replication and repair. *Cancer Res*, **68**, 3169-3177.
  100. Tomkinson, A.E., Vijayakumar, S., Pascal, J.M. and Ellenberger, T. (2006) DNA ligases: structure, reaction mechanism, and function. *Chem Rev*, **106**, 687-699.
  101. Grawunder, U., Zimmer, D., Fugmann, S., Schwarz, K. and Lieber, M.R. (1998) DNA ligase IV is essential for V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in human precursor lymphocytes. *Mol Cell*, **2**, 477-484.
  102. Critchlow, S.E., Bowater, R.P. and Jackson, S.P. (1997) Mammalian DNA double-strand break repair protein *XRCC4* interacts with DNA ligase IV. *Curr Biol*, **7**, 588-598.
  103. Critchlow, S.E. and Jackson, S.P. (1998) DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem Sci*, **23**, 394-398.

104. Grawunder, U., Zimmer, D. and Leiber, M.R. (1998) DNA ligase IV binds to XRCC4 via a motif located between rather than within its BRCT domains. *Curr Biol*, **8**, 873-876.
105. Wu, P.Y., Frit, P., Meesala, S., Dauvillier, S., Modesti, M., Andres, S.N., Huang, Y., Sekiguchi, J., Calsou, P., Salles, B. *et al.* (2009) Structural and functional interaction between the human DNA repair proteins DNA ligase IV and XRCC4. *Mol Cell Biol*, **29**, 3163-3172.
106. Riballo, E., Critchlow, S.E., Teo, S.H., Doherty, A.J., Priestley, A., Broughton, B., Kysela, B., Beamish, H., Plowman, N., Arlett, C.F. *et al.* (1999) Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Curr Biol*, **9**, 699-702.
107. Girard, P.M., Kysela, B., Harer, C.J., Doherty, A.J. and Jeggo, P.A. (2004) Analysis of DNA ligase IV mutations found in LIG4 syndrome patients: the impact of two linked polymorphisms. *Hum Mol Genet*, **13**, 2369-2376.
108. Goode, E.L., Dunning, A.M., Kuschel, B., Healey, C.S., Day, N.E., Ponder, B.A., Easton, D.F. and Pharoah, P.P. (2002) Effect of germ-line genetic variation on breast cancer survival in a population-based study. *Cancer Res*, **62**, 3052-3057.
109. Friesen, C., Uhl, M., Pannicke, U., Schwarz, K., Miltner, E. and Debatin, K.M. (2008) DNA-ligase IV and DNA-protein kinase play a critical role in deficient caspases activation in apoptosis-resistant cancer cells by using doxorubicin. *Mol Biol Cell*, **19**, 3283-3289.
110. Han, J., Hankinson, S.E., Ranu, H., De Vivo, I. and Hunter, D.J. (2004) Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and breast cancer risk in the Nurses' Health Study. *Carcinogenesis*, **25**, 189-195.
111. (2006) Commonly studied single-nucleotide polymorphisms and breast cancer: results from the Breast Cancer Association Consortium. *J Natl Cancer Inst*, **98**, 1382-1396.
112. Damaraju, S., Murray, D., Dufour, J., Carandang, D., Myrehaug, S., Fallone, G., Field, C., Greiner, R., Hanson, J., Cass, C.E. *et al.* (2006) Association of DNA repair and steroid metabolism gene polymorphisms with clinical late toxicity in patients treated with conformal radiotherapy for prostate cancer. *Clin Cancer Res*, **12**, 2545-2554.
113. de las Penas, R., Sanchez-Ronco, M., Alberola, V., Taron, M., Camps, C., Garcia-Carbonero, R., Massuti, B., Queralt, C., Botia, M., Garcia-Gomez, R. *et al.* (2006) Polymorphisms in DNA repair genes modulate survival in cisplatin/gemcitabine-treated non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol*, **17**, 668-675.
114. Ferlay, J., Parkin, D.M. and Steliarova-Foucher, E. (2010) Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*, **46**, 765-781.
115. Levanon, K., Crum, C. and Drapkin, R. (2008) New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact. *J Clin Oncol*, **26**, 5284-5293.
116. Fauci, A.S., Braunwald, E., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L. and Loscalzo, J. (2008) *Harrison's: Principles of Internal Medicine*. 17th ed.
117. Holschneider, C.H. and Berek, J.S. (2000) Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol*, **19**, 3-10.
118. Mok, S.C., Kwong, J., Welch, W.R., Samimi, G., Ozbun, L., Bonome, T., Birrer, M.J., Berkowitz, R.S. and Wong, K.K. (2007) Etiology and pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *Dis Markers*, **23**, 367-376.
119. Landen, C.N., Jr., Birrer, M.J. and Sood, A.K. (2008) Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol*, **26**, 995-1005.

120. Auersperg, N., Wong, A.S., Choi, K.C., Kang, S.K. and Leung, P.C. (2001) Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev*, **22**, 255-288.
121. Farley, J., Ozbun, L.L. and Birrer, M.J. (2008) Genomic analysis of epithelial ovarian cancer. *Cell Res*, **18**, 538-548.
122. Cho, K.R. and Shih, M. (2009) Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol*, **4**, 287-313.
123. Hennessy, B.T., Coleman, R.L. and Markman, M. (2009) Ovarian cancer. *Lancet*, **374**, 1371-1382.
124. Bhoola, S. and Hoskins, W.J. (2006) Diagnosis and management of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol*, **107**, 1399-1410.
125. Cannistra, S.A. (2004) Cancer of the ovary. *N Engl J Med*, **351**, 2519-2529.
126. Fathalla, M.F. (1971) Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet*, **2**, 163.
127. Murdoch, W.J. (2005) Carcinogenic potential of ovulatory genotoxicity. *Biol Reprod*, **73**, 586-590.
128. Murdoch, W.J. and McDonnell, A.C. (2002) Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. *Reproduction*, **123**, 743-750.
129. Lukanova, A. and Kaaks, R. (2005) Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **14**, 98-107.
130. Tung, K.H., Wilkens, L.R., Wu, A.H., McDuffie, K., Nomura, A.M., Kolonel, L.N., Terada, K.Y. and Goodman, M.T. (2005) Effect of anovulation factors on pre- and postmenopausal ovarian cancer risk: revisiting the incessant ovulation hypothesis. *Am J Epidemiol*, **161**, 321-329.
131. Purdie, D.M., Bain, C.J., Siskind, V., Webb, P.M. and Green, A.C. (2003) Ovulation and risk of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*, **104**, 228-232.
132. Roett, M.A. and Evans, P. (2009) Ovarian cancer: an overview. *Am Fam Physician*, **80**, 609-616.
133. Risch, H.A. (1998) Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. *J Natl Cancer Inst*, **90**, 1774-1786.
134. Merritt, M.A., Green, A.C., Nagle, C.M. and Webb, P.M. (2008) Talcum powder, chronic pelvic inflammation and NSAIDs in relation to risk of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*, **122**, 170-176.
135. Fairfield, K.M., Willett, W.C., Rosner, B.A., Manson, J.E., Speizer, F.E. and Hankinson, S.E. (2002) Obesity, weight gain, and ovarian cancer. *Obstet Gynecol*, **100**, 288-296.
136. Whiteman, D.C., Siskind, V., Purdie, D.M. and Green, A.C. (2003) Timing of pregnancy and the risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **12**, 42-46.
137. Fasching, P.A., Gayther, S., Pearce, L., Schildkraut, J.M., Goode, E., Thiel, F., Chenevix-Trench, G., Chang-Claude, J., Wang-Gohrke, S., Ramus, S. *et al.* (2009) Role of genetic polymorphisms and ovarian cancer susceptibility. *Mol Oncol*, **3**, 171-181.
138. Smith, E.R. and Xu, X.X. (2008) Ovarian ageing, follicle depletion, and cancer: a hypothesis for the aetiology of epithelial ovarian cancer involving follicle depletion. *Lancet Oncol*, **9**, 1108-1111.
139. Rodriguez, G.C., Nagarsheth, N.P., Lee, K.L., Bentley, R.C., Walmer, D.K., Cline, M., Whitaker, R.S., Isner, P., Berchuck, A., Dodge, R.K. *et al.* (2002) Progesterin-

- induced apoptosis in the Macaque ovarian epithelium: differential regulation of transforming growth factor-beta. *J Natl Cancer Inst*, **94**, 50-60.
140. Stadel, B.V. (1975) Letter: The etiology and prevention of ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol*, **123**, 772-774.
  141. Ness, R.B., Grisso, J.A., Cotteau, C., Klapper, J., Vergona, R., Wheeler, J.E., Morgan, M. and Schlesselman, J.J. (2000) Factors related to inflammation of the ovarian epithelium and risk of ovarian cancer. *Epidemiology*, **11**, 111-117.
  142. Bast, R.C., Jr., Hennesy, B. and Mills, G.B. (2009) The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer*, **9**, 415-428.
  143. Bast, R.C., Jr., Brewer, M., Zou, C., Hernandez, M.A., Daley, M., Ozols, R., Lu, K., Lu, Z., Badgwell, D., Mills, G.B. *et al.* (2007) Prevention and early detection of ovarian cancer: mission impossible? *Recent Results Cancer Res*, **174**, 91-100.
  144. Coukos, G., Berchuck, A. and Ozols, R. (2008) *Ovarian Cancer: State of the Art and Future Directions in Translational Research*. Springer.
  145. Schorge, J.O., Modesitt, S.C., Coleman, R.L., Cohn, D.E., Kauff, N.D., Duska, L.R. and Herzog, T.J. (2010) SGO White Paper on ovarian cancer: etiology, screening and surveillance. *Gynecol Oncol*, **119**, 7-17.
  146. Lichtenstein, P., Holm, N.V., Verkasalo, P.K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A. and Hemminki, K. (2000) Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*, **343**, 78-85.
  147. Shih Ie, M. and Kurman, R.J. (2004) Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol*, **164**, 1511-1518.
  148. Kurman, R.J. and Shih Ie, M. (2008) Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int J Gynecol Pathol*, **27**, 151-160.
  149. Medel, N.I.B., Wright, J.D. and Herzog, T.J. (2010) Targeted therapies in epithelial ovarian cancer. *J Oncol*, **2010**, 314326.
  150. Badgwell, D. and Bast, R.C., Jr. (2007) Early detection of ovarian cancer. *Dis Markers*, **23**, 397-410.
  151. Bookman, M.A. (2003) Developmental chemotherapy and management of recurrent ovarian cancer. *J Clin Oncol*, **21**, 149s-167s.
  152. Zeigler-Johnson, C.M., Walker, A.H., Mancke, B., Spangler, E., Jalloh, M., McBride, S., Deitz, A., Malkowicz, S.B., Ofori-Adjei, D., Gueye, S.M. *et al.* (2002) Ethnic differences in the frequency of prostate cancer susceptibility alleles at SRD5A2 and CYP3A4. *Hum Hered*, **54**, 13-21.
  153. Grizzi, F. and Chiriva-Internati, M. (2006) Cancer: looking for simplicity and finding complexity. *Cancer Cell Int*, **6**, 4.
  154. Pearce, C.L., Near, A.M., Van Den Berg, D.J., Ramus, S.J., Gentry-Maharaj, A., Menon, U., Gayther, S.A., Anderson, A.R., Edlund, C.K., Wu, A.H. *et al.* (2009) Validating genetic risk associations for ovarian cancer through the international Ovarian Cancer Association Consortium. *Br J Cancer*, **100**, 412-420.
  155. Celik, C., Gezginc, K., Aktan, M., Acar, A., Yaman, S.T., Gungor, S. and Akyurek, C. (2004) Effects of ovulation induction on ovarian morphology: an animal study. *Int J Gynecol Cancer*, **14**, 600-606.
  156. Cho, K.R. (2009) Ovarian cancer update: lessons from morphology, molecules, and mice. *Arch Pathol Lab Med*, **133**, 1775-1781.

157. Gilks, C.B., Ionescu, D.N., Kalloger, S.E., Kobel, M., Irving, J., Clarke, B., Santos, J., Le, N., Moravan, V. and Swenerton, K. (2008) Tumor cell type can be reproducibly diagnosed and is of independent prognostic significance in patients with maximally debulked ovarian carcinoma. *Hum Pathol*, **39**, 1239-1251.
158. Meyer, U.A. (2000) Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet*, **356**, 1667-1671.
159. Quaye, L., Gayther, S.A., Ramus, S.J., Di Cioccio, R.A., McGuire, V., Hogdall, E., Hogdall, C., Blaaup, J., Easton, D.F., Ponder, B.A. *et al.* (2008) The effects of common genetic variants in oncogenes on ovarian cancer survival. *Clin Cancer Res*, **14**, 5833-5839.
160. Tsuchiya, Y., Nakajima, M. and Yokoi, T. (2005) Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett*, **227**, 115-124.
161. Martinek, I., Haldar, K., Gaitskell, K., Bryant, A., Nicum, S., Kehoe, S. and Morrison, J. (2010) DNA-repair pathway inhibitors for the treatment of ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, CD007929.
162. Jakubowska, A., Gronwald, J., Menkiszak, J., Gorski, B., Huzarski, T., Byrski, T., Toloczko-Grabarek, A., Gilbert, M., Edler, L., Zapatka, M. *et al.* (2010) BRCA1-associated breast and ovarian cancer risks in Poland: no association with commonly studied polymorphisms. *Breast Cancer Res Treat*, **119**, 201-211.
163. Marsh, S. and McLeod, H.L. (2004) Cancer pharmacogenetics. *Br J Cancer*, **90**, 8-11.
164. Klein, T.E., Chang, J.T., Cho, M.K., Easton, K.L., Ferguson, R., Hewett, M., Lin, Z., Liu, Y., Liu, S., Oliver, D.E. *et al.* (2001) Integrating genotype and phenotype information: an overview of the PharmGKB project. Pharmacogenetics Research Network and Knowledge Base. *Pharmacogenomics J*, **1**, 167-170.
165. Rebbeck, T.R., Troxel, A.B., Wang, Y., Walker, A.H., Panossian, S., Gallagher, S., Shatalova, E.G., Blanchard, R., Bunin, G., DeMichele, A. *et al.* (2006) Estrogen sulfation genes, hormone replacement therapy, and endometrial cancer risk. *J Natl Cancer Inst*, **98**, 1311-1320.
166. Yager, J.D. (2000) Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 67-73.



## **8. ANEXOS**



## **Anexo I**

### **TBE 10X**

Tris Base 108 g/L (Merck 1083821000)

Ácido Bórico 55 g/L (Merck 1001651000)

EDTA 6,72 g/L (Sigma E-1644)

## **Anexo II**

Artigo intitulado *Influence of CYP3A4\*1B polymorphism in overall survival of epithelial ovarian cancer patients treated with paclitaxel/platinum first-line chemotherapy*, submetido para publicação na revista *European Journal of Clinical Pharmacology*.

## Anexo III

*Abstract* aceite para publicação sob a forma de poster no 2011 *European Multidisciplinary Cancer Congress – ECCO 16/ESMO 36*, em Estocolmo (Setembro de 2011).

### **CYP3A4\*1B Polymorphism: a prognostic value in Ovarian Cancer?**

Joana Assis<sup>1,2</sup>, Mónica Gomes<sup>1,2</sup>, Dânia Marques<sup>2,3</sup>, Inês Marques<sup>1,2</sup>, Raquel Catarino<sup>1</sup>, Deolinda Pereira<sup>3</sup>, Rui Medeiros<sup>1,2</sup>

- 1- Grupo de Oncologia Molecular-CI, Instituto Português de Oncologia-Porto
- 2- Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto-ICBAS
- 3- Serviço de Oncologia Médica, Instituto Português de Oncologia-Porto

### **Background:**

Ovarian cancer (OC) is the sixth most common cancer and the seventh cause of death from cancer in women, representing the most lethal gynecological cancer. The survival of patients with OC stands at 46% at 5 years despite advances in surgery and chemotherapy.

Given that exposure to estrogen is associated with OC it is plausible that enzymes involved in metabolism of these hormones might influence the development and progression of this disease. *CYP3A4* encodes a critical enzyme for oxidation of estrogens and its inhibition results in higher circulating estrogen levels. Furthermore, *CYP3A4* is one of the most important metabolizing enzymes being involved in metabolism of clinic drugs.

The *CYP3A4\*1B* polymorphism (-392 A/G) has been related with increased risk of development of OC but no previous studies evaluated the prognostic value of this polymorphism in patients with OC.

The aim of this study was to evaluate the influence of *CYP3A4\*1B* polymorphism as prognostic factor in patients with OC.

### **Material and Methods:**

DNA was extracted from peripheral blood of 206 patients diagnosed with OC submitted to a platinum based chemotherapy (Platin and Paclitaxel). Patients were first divided by histologic subtype and then by FIGO stage in: stage I/II, stage III and stage IV. The characterization of *CYP3A4\*1B* genotypes was performed by RFLP-PCR.

### **Results:**

The frequencies obtained for the AA, AG and GG genotypes were 88 %, 11 % and 1 %, respectively. The *CYP3A4\*1B* polymorphism genotypes were grouped as AA genotype and G carrier genotypes. The polymorphism was significantly associated with overall survival in patients with Papillary serous tumors (PST): patients with genotypes carrying G allele (GG/GA) had significantly diminished survival when compared with patients with AA genotype (103,93 months and 122,56, respectively,  $P=0,019$ ). When stratified by FIGO stage, patients with PST and in stage III subgroup with genotypes carrying G allele had significantly diminished overall survival when compared with AA genotypes (95,74 months and 120,30 months, respectively,  $P=0,050$ ).

### **Conclusion:**

*CYP3A4* shows great importance in a metabolic level and is greatly studied in the field of translational research. Our results exhibit an association between *CYP3A4\*1B* and a diminished survival of patients with OC. Due to this prognostic value, these results could help in the monitorization of patients with OC and to define the role of this genetic variant in the pharmacogenomic profile of OC.

## Anexo IV

Abstract aceite para publicação sob a forma de poster no *17th Internatinal Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology*, em Milão (Setembro de 2011).

### **LIG4 1977 T/C polymorphism: a prognostic value in Ovarian Cancer?**

Joana Assis<sup>1,2</sup>, Mónica Gomes<sup>1,2</sup>, Dânia Marques<sup>2,3</sup>, Inês Marques<sup>1,2</sup>, Raquel Catarino<sup>1</sup>, Deolinda Pereira<sup>3</sup>, Rui Medeiros<sup>1,2</sup>

1- Grupo de Oncologia Molecular-CI, Instituto Português de Oncologia-Porto

2- Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto-ICBAS

3- Serviço de Oncologia Médica, Instituto Português de Oncologia-Porto

#### **Background:**

Ovarian cancer (OC) is the sixth most common cancer and the seventh cause of death from cancer in women. The survival of patients with OC stands at 46% at 5 years despite advances in surgery and chemotherapy.

DNA double-strand breaks (DSBs) are among the most cytotoxic DNA damages and failure to repair these injuries results in genomic instability. Therefore, genes coding for DNA repair molecules, like Ligase IV (LIG4), have great significance. However, no previous studies evaluated the prognostic value of Lig4 in patients with OC.

The aim of this study was to evaluate the influence of the 1977 T/C polymorphism of the *LIG4* gene (rs1805386) as prognostic marker OC patients.

#### **Methods:**

DNA was extracted from peripheral blood of 207 patients diagnosed with OC submitted to a platinum-based chemotherapy (cisplatin and paclitaxel). Patients were first divided by histologic subtype and then by FIGO stage. The characterization of *LIG4* 1977 T/C genotypes was performed by Real-Time PCR.

**Results:**

The *LIG4* 1977 T/C polymorphism genotypes were grouped as TT genotype and C carrier genotypes. The *LIG4* 1977 T/C polymorphism was significantly associated with overall survival in stage III patients with papillary serous tumors. Patients with genotypes carrying the C allele (CC/CT) had an increased overall survival when compared with patients with TT genotype (124,98 months and 109,66, respectively, P=0,057).

**Conclusion:**

LIG4 plays an important role in DSB pathway and has been significantly associated with the etiology and prognostic of many cancers. Due to its prognostic value, these results could help to monitor OC patients and to help to define pharmacogenomic profile of OC.

## Anexo V

Resumo apresentado sob a forma de poster nas Jornadas de Oncologia, em Espinho (Julho de 2011).

### **POLIMORFISMO *CYP3A4\*1B*: FACTOR DE PROGNÓSTICO NO CANCRO DO OVÁRIO?**

Joana Assis<sup>1,2</sup>, Mónica Gomes<sup>1,2</sup>, Dânia Marques<sup>2,3</sup>, Inês Marques<sup>1,2</sup>, Raquel Catarino<sup>1</sup>, Deolinda Pereira<sup>3</sup>, Rui Medeiros<sup>1,2</sup>

1- Grupo de Oncologia Molecular-CI, Instituto Português de Oncologia-Porto

2- Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto-ICBAS

3- Serviço de Oncologia Médica, Instituto Português de Oncologia-Porto

#### **Introdução:**

O cancro do ovário (CO) é a sexta neoplasia maligna mais comum e a sétima causa de morte por cancro na mulher. Tendo em conta que a exposição hormonal está associada com o CO, é plausível que enzimas envolvidas no metabolismo hormonal, como a *CYP3A4*, possam influenciar o desenvolvimento e progressão da doença.

O objectivo deste estudo foi avaliar o polimorfismo *CYP3A4\*1B* como factor de prognóstico em doentes com CO.

#### **Material e Métodos:**

O DNA foi extraído a partir de sangue periférico de 206 pacientes diagnosticadas com CO. A caracterização dos génotipos foi realizada por PCR-RFLP.

#### **Resultados:**

O polimorfismo está associado de forma significativa com a sobrevivência global em doentes com tumor papilar-seroso (TPS) já que portadoras do alelo G apresentam uma menor sobrevivência global que doentes com genótipo AA (103,93 e 122,56 meses, respectivamente,  $P=0,019$ ). Doentes com TPS em estadio III portadoras do alelo G

apresentam sobrevivência global inferior às pacientes com genótipo AA (95,74 e 120,30 meses, respectivamente,  $P=0,050$ ).

**Conclusão:**

Os nossos resultados mostram uma associação entre o polimorfismo *CYP3A4\*1B* e uma menor sobrevivência das doentes com CO. Pelo seu papel como factor de prognóstico, estes resultados podem ajudar na monitorização e na definição de um perfil farmacogenómico em doentes com CO.

## Anexo VI

*Abstract* aceite para publicação sob a forma de poster no 35th Internatinal ESMO Congress, em Milão (Outubro de 2010) e publicado na revista *Annals of Oncology* (Volume 21, Suplemento 8, viii310).

### ***CYP3A4\*1B* (rs2740574) Gene Polymorphism has prognostic value in Ovarian Cancer**

D.S.N.M. Santos<sup>1</sup>, J. Assis<sup>2</sup>, M. Gomes<sup>2</sup>, A.C.F. Rodrigues<sup>1</sup>, J. Oliveira<sup>1</sup>, D. Pereira, R. Medeiros<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Medical Oncology Department and <sup>2</sup>Molecular Oncology Unit of Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil, Porto, Portugal

#### **Introduction:**

*CYP3A4* encodes an enzyme critical for oxidation of oestrogens and its inhibition results in higher circulating oestrogen levels. In the *CYP3A4\*1B* (rs2740574) variant, GG genotype has been associated with increased risk of developing invasive ovarian cancer. There is no available information about the prognostic value of this genotype in this patients (pts). The aim of this study is to evaluate the *CYP3A4\*1B* gene polymorphism as prognostic factor in pts with epithelial ovarian cancer.

#### **Material and methods:**

Retrospective cohort study. Exposure was defined as *CYP3A4\*1B* GG/AG genotype. *CYP3A4\*1B* gene polymorphism was analyzed by polymerase chain reaction of DNA samples from peripheral blood of pts with epithelial ovarian cancer treated in Instituto Português de Oncologia, Porto, Portugal, between June 1992 and November 2009. The following confounding factors were considered: FIGO stage, volume of residual disease after cytoreductive surgery, histologic subtype, histologic grade, age and malignant

ascites. Survival analysis was performed with Kaplan-Meier method. A p value < 0.05 was considered significant.

### **Results:**

There were 185 DNA blood samples of pts with epithelial ovarian cancer available for analysis. Median age was 53 years (range: 22 – 80). No statistically significant differences were found regarding the association of CYP3A4\*1B genetic polymorphism for any of the confounding factors analyzed between exposure groups (p > 0.05). The GG/AG genotype had no prognostic value when all histologic subtypes were analyzed. Pts with serous carcinoma histologic subtype carrying the GG/AG genotype had significantly decreased overall survival (median OS for GG/AG genotype of 50.0 months and median OS for AA genotype of 109 months; p = 0.005).

### **Conclusion:**

Our results suggest that CYP3A4\*1B GG genotype may be a prognostic factor in pts with ovarian serous carcinoma. Further studies may help to define the role of this genetic variant in the pharmacogenomic profile of epithelial ovarian cancer.

### **Disclosure:**

All authors have declared no conflicts of interest.

## Anexo VII

Abstract publicado na revista *Annals of Oncology* (Volume 21, Suplemento 8, viii59).

### **Influence of *LIG4* 1977 T/C polymorphism in Ovarian Cancer (OC) susceptibility**

Joana Assis<sup>1,2</sup>, Mónica Gomes<sup>1,2</sup>, Dânia Marques<sup>3</sup>, Deolinda Pereira<sup>3</sup>, Rui Medeiros<sup>1,2</sup>

- 1- Grupo de Oncologia Molecular-CI, Instituto Português de Oncologia-Porto
- 2- Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto-ICBAS
- 3- Serviço de Oncologia Médica, Instituto Português de Oncologia-Porto

#### **Background:**

Ovarian cancer (OC) is the sixth most common cancer and the seventh cause of death from cancer in women. It has been proposed that ovulation may increase OC risk by increasing mutations in the epithelium which occur due to spontaneous errors in DNA synthesis or oxidative stress at the ovulatory site.

DNA double-strand breaks (DSBs) are among the most cytotoxic of DNA damages and failure to repair them results in genomic instability and subsequent malignant transformation. Due to the importance of genomic integrity maintenance, genes coding for DNA repair molecules have been proposed as candidate cancer-susceptibility genes.

The T/C polymorphism in codon 501 (D501D) of the Ligase IV gene (*LIG4*) does not alter the amino acid sequence of the protein and is therefore unlikely to have any functional effect but may be in linkage disequilibrium with neighboring genes. The aim of this preliminary study was to evaluate the influence of this polymorphism in the susceptibility to OC.

### **Methods:**

DNA was extracted from peripheral blood of 324 individuals (126 patients diagnosed with OC and a control group of 198 individuals without cancer). The characterization of *LIG4* 1977 T/C genotypes was performed by Real-Time PCR.

### **Results:**

The frequencies obtained for the TT, CT and CC genotypes were 65,7%, 28,8% and 5,6%, respectively, in the control group and 67,5%, 30,2% and 2,4%, respectively, in the case group. The *LIG4* 1977 T/C polymorphism genotypes were grouped as TT genotype and C carrier genotypes. We did not observe any statistically significant differences in the distribution of *LIG4* 1977 T/C genotypes between case and control groups (OR=1,084: 95% CI= 0,675-1,742).

### **Conclusion:**

In this study, *LIG4* 1977 T/C did not show an association statistically significant with ovarian cancer risk. However, *LIG4* plays an important role in DSB pathway, also been found to be significantly associated with the etiology of many neoplasias, like breast cancer. Further functional studies regarding *LIG4* expression according to *LIG4* 1977 T/C polymorphism genotypes should be conducted in order to validate this hypothesis as well as studies to detect linkage disequilibrium with other functional variants in the same or adjoining genes.

## Anexo VIII

Resumo apresentado sob a forma de poster nas Jornadas de Oncologia, em Espinho (Julho de 2010).

### INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO 1977 T/C NO GENE *LIG4* NO CANCRO DO OVÁRIO

Joana Assis<sup>1,2</sup>, Mónica Gomes<sup>1,2</sup>, Dânia Marques<sup>3</sup>, Deolinda Pereira<sup>3</sup>, Rui Medeiros<sup>1,2</sup>

- 1- Grupo de Oncologia Molecular-CI, Instituto Português de Oncologia-Porto
- 2- Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto-ICBAS
- 3- Serviço de Oncologia Médica, Instituto Português de Oncologia-Porto

#### Introdução:

O cancro do ovário (CaO) é a sexta neoplasia mais comum e a sétima causa de morte por cancro na mulher. A ovulação poderá aumentar o risco de CaO pelo aumento de mutações no epitélio as quais ocorrem devido a erros espontâneos na síntese de DNA.

Quebras na cadeia dupla de DNA (DSBs) estão entre as formas mais citotóxicas de danos no DNA e a falha na reparação das mesmas resulta numa instabilidade genómica e a subsequente transformação maligna. Assim, genes que codificam estas moléculas têm sido propostos como genes de susceptibilidade para cancro.

O objectivo deste estudo preliminar foi avaliar a influência do polimorfismo T/C no codão 501 do gene da Ligase IV (*LIG4*) na susceptibilidade para CaO.

#### Material e Métodos:

O DNA foi extraído a partir de sangue periférico de 324 indivíduos (126 pacientes com CaO e 198 indivíduos sem cancro). A caracterização genotípica foi realizada por *Real-time* PCR.

### **Resultados:**

A análise estatística foi realizada agrupando os genótipos do polimorfismo 1977 T/C no gene *LIG4*, em genótipo TT e portadores do alelo C. No entanto, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas na distribuição de genótipos entre os grupos de casos e controlo (OR=1,084; 95% CI=0,675-1,742).

### **Conclusão:**

Neste estudo, o polimorfismo 1977 T/C no gene *LIG4* não apresenta uma associação estatisticamente significativa com o risco de CaO. No entanto, estudos funcionais adicionais deverão ser realizados bem como estudos para a detecção de *linkage disequilibrium* com outras variantes funcionais do mesmo ou de genes adjacentes.







Joana Isabel Gomes Assis

Porto, 2011