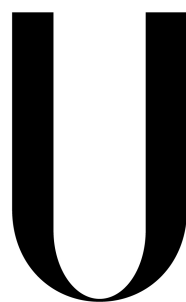


UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**VARIAÇÃO POLIMÓRFICA EM GENES DE PROTEÍNAS DE
SISTEMAS REDOX E BIOMARCADORES CIRCULANTES
ASSOCIADOS ENVOLVIDOS NA ETIOPATOGENIA DE
TUMORES GINECOLÓGICOS (CANCRO DO COLO DO ÚTERO
E LEIOMIOMAS UTERINOS)**

STÉPHANIE ANAÍS CASTALDO

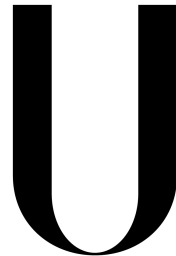
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA

2013

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

VARIAÇÃO POLIMÓRFICA EM GENES DE PROTEÍNAS DE SISTEMAS
REDOX E BIOMARCADORES CIRCULANTES ASSOCIADOS ENVOLVIDOS
NA ETIOPATOGENIA DE TUMORES GINECOLÓGICOS (CANCRO DO COLO
DO ÚTERO E LEIOMIOMAS UTERINOS)

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE ORIENTADA POR:
PROF. DOUTORA MARIA CLARA BICHO, FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE LISBOA E INSTITUTO DE MEDICINA MOLECULAR
PROF. DOUTORA ÂNGELA INÁCIO, FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
UNIVERSIDADE DE LISBOA

STÉPHANIE ANAÏS CASTALDO

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA

2013

Esta Dissertação não obedece ao Novo Acordo Ortográfico

“The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds the most discoveries, is not "Eureka!" (I found it!) but "That's funny..."

-

Isaac Asimov

AGRADECIMENTOS

É com grande sentido de concretização que concluo esta etapa tão importante da minha vida, e a qual só foi possível devido à contribuição e apoio de diversas pessoas, às quais quero deixar a minha profunda gratidão.

Em primeiro lugar, agradeço ao Professor Doutor Manuel Bicho, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina de Lisboa e Director do Laboratório de Genética, e à Professora Doutora Maria Clara Bicho pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pelo apoio concedido.

Ao Instituto Rocha Cabral pelo financiamento parcial deste trabalho.

À Professora Doutora Ângela Inácio e Dra Irina Alho por toda a orientação e dedicação.

Ao Professor Doutor João Pisco do Hospital St. Louis por ter fornecido as amostras dos leiomiomas e por toda a disponibilidade prestada.

À Dra. Alda Pereira da Silva pelo apoio na organização das bases de dados.

Ao Professor Doutor Rui Medeiros do Instituto de Oncologia do Porto por ter disponibilizado as amostras do Cancro do colo do útero.

A todas as colaboradoras do laboratório: Dras. Joana Ferreira, Andreia Matos, Técnica Conceição Afonso e Ângela Gil, por toda a ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho.

Queria expressar um agradecimento muito especial aos colegas que passaram a amigos: Rui Reis, Ridhi Prabhudas e Pedro Batista, por toda a ajuda, disponibilidade e convívio; e às que se tornaram mais do que meras amigas, as minhas miúdas: Cindy Castelão, Margarida Vaz, Filipa Coelho, pelas risadas que ajudaram a relaxar, pelo apoio, mesmo nos momentos de desespero, e, mais importante, por toda a amizade.

Agradeço ao Manuel Borges, pelo apoio incondicional, ajuda, paciência e companhia ao longo dos últimos meses.

Agradeço também ao Fernando Carreira, avô emprestado, por todo o carinho e disponibilidade.

Por fim, aos meus pais, a todos eles: Ginette Claude, Eric Castaldo, João Gomes e Sandra Carreira, pelo apoio incondicional, esforço e dedicação, sem vós não teria sido possível atingir este objectivo; e à minha irmã, a quem dedico este trabalho, por ser um exemplo de coragem e bravura.

A todos vós, um grande e sincero Obrigado!

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO	1
1. ETIOPATOLOGIA DO CANCRO DO COLO DO ÚTERO	1
2. ETIOPATOLOGIA DOS LEIOMIOMAS	3
3. ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO E STRESSE OXIDANTE	3
4. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E STRESSE OXIDANTE	5
5. ENZIMA CONVERSOR DA ANGIOTENSINA	6
6. SUBUNIDADE p22^{Phox} DA NADPH OXIDASE	7
7. CATALASE	7
8. HAPTOGLOBINA	8
9. GLUTATIONO	8
10. EPINEFRINA OXIDASE	9
OBJECTIVOS	9
MATERIAIS E MÉTODOS	10
1. POPULAÇÕES ESTUDADAS	10
2. ESTRACÇÃO DE DNA GENÓMICO	10
3. QUANTIFICAÇÃO DO DNA	10
4. PCR – RFLP	11
4.1 Polimorfismo CYBA C242T – p22^{phox}	11
4.2 Polimorfismo CAT 262C/T	12
4.3 Polimorfismo ECA 1	13
5. GENOTIPAGEM DA HAPTOGLOBINA	13
6. ACTIVIDADE DA EPINEFRINA OXIDASE	14
7. DOSEAMENTO DO GSH PLASMÁTICO	15
8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	15

RESULTADOS	16
1. ANÁLISE DO POLIMORFISMO CYBA C242T	16
2. ANÁLISE DO POLIMORFISMO CAT 262C/T	18
3. ANÁLISE POLIMORFISMO ECA 1	19
4. ANÁLISE DO POLIMORFISMO DA HAPTOGLOBINA	21
5. ANÁLISE DA ACTIVIDADE DA EPINEFRINA OXIDASE	22
6. ANÁLISE DO DOSEAMENTO DE GSH	23
DISCUSSÃO	24
CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
ANEXOS	36

LISTA DE ABREVIATURAS

O₂[•]	Anião superóxido
ΣO₂[•]	Singuleto de oxigénio
OH[•]	Radical hidroxílo
A	Adenina
Ang	Angiotensina
bp	Pares de bases
C	Citosina
CAT	Catalase
CYBA	Gene do p22 <i>phox</i>
CpG	Citocina-fosfato.Guanina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Desorribonucleotidos fosforilados
Duox	Dual Oxidase
ECA	Enzima conversor da angiotensina
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EO	Epinefrina oxidase
Fe²⁺	Ferro ferroso
Fe³⁺	Ferro férrico
G	Guanina
GPx	Glutationo peroxidase
GSH	Glutationo
GSHt	Glutationo Total
GSSG	Glutationo persulfato
GST	Glutationo-S-transferase
h	Hora
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
Hb	Hemoglobina
HCl	Ácido clorídico
Hp	Haptoglobina
HPV	Human papillomavirus

HSIL	High grade squamous intraepithelial lesion
ICC	Carcinoma Invasivo
LSIL	Low grade squamous intraepithelial lesion
MAO	Monoamina oxidase
mg	Miligramas
MgCl₂	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NADH	Dinucleotido de nicotinamida e adenina fosfato
NADPH	Dinucleotido de nicotinamida e adenina fosfato reduzido
NEM	N-etilmaleímida
ng	Nanograma
nm	Nanómetro
NOX	NADPH-oxidase
O₂	Oxigénio
OH⁻	Hidróxido
OPT	Orto-ftataldeído
p	p-value
PCR	Polimerase chain reaction
RAS	Sistema renina-angiotensina
REDOX	Sistema oxidação-redução
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
ROS	Reactive oxygen species
SINEs	Short interspersed elements
T	Timina
U	Unidades
V	Volts
µl	Microlitro
µM	Micromolar
pmol	Picomol
χ²	Qui-Quadrado

ÍNDICE DE FÍGURAS

Figura 1. Reacções antioxidantes	4
Figura 2. A acção das ROS nas células	5
Figura 3. Sistema renina-angiotensina	6
Figura 4. Sequência de restrição da endonucleases Rsa I	11
Figura 5. Genotipagem por PCR-RFLP do polimorfismo CYBA C242T	12
Figura 6. Sequência de restrição da endonucleases Sma I	12
Figura 7. Genotipagem por PCR-RFLP do polimorfismo CAT 262C/T	13
Figura 8. Genotipagem por PCR do polimorfismo em ECA 1.....	13
Figura 9. Padrão de bandas da Hp numa electroforese em gel de poliacrilamida.....	14
Figura 10. Actividades da EO nas populações controlo, e em mulheres com patologia do colo do útero e com leiomiomas.....	22
Figura 13. Razão GSht:GSSG nas populações controlo e em mulheres com patologia do colo do útero	23
Figura suplementar 1. Ciclo de infecção do HPV	37
Figura suplementar 2. Localização dos genes CYBA e HP no cromossoma 16	38
Figura suplementar 3. Localização do gene CAT no cromossoma 11	38
Figura suplementar 4. Localização do gene ECA no cromossoma 17	38
Figura suplementar 5. DNA Ladder 50bp	38
Figura suplementar 6. DNA Ladder 100bp	38
Figura suplementar 7. Concentrações de GSH total nas populações controlo e em mulheres com patologia do colo do útero.....	39
Figura suplementar 8. Concentrações de GSSG nas populações controlo e em mulheres com patologia do colo do útero.....	39

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Frequências genóticas e alélicas do polimorfismo CYBA C242T em mulheres controlo, com patologia do colo do útero e com leiomiomas	16
Tabela 2. <i>Odds Ratio</i> para a associação entre os alelos do polimorfismo CYBA C242T e os leiomiomas	17
Tabela 3. <i>Odds Ratio</i> para a associação entre os genótipos do polimorfismo CYBA C242T e o cancro do colo do útero.....	18
Tabela 4. Frequências genóticas e alélicas do polimorfismo CAT 262C/T em mulheres controlo, com patologia do colo do útero e com leiomiomas	18
Tabela 5. <i>Odds Ratio</i> para a associação entre os alelos e genótipos do polimorfismo CAT 262C/T e o cancro do colo do útero	19
Tabela 6. Frequências genóticas e alélicas do polimorfismo ECA 1 em mulheres controlo, com patologia do colo do útero e com leiomiomas.....	20
Tabela 7. Frequências fenotípicas e alélicas da Hp em mulheres controlo, com patologia do colo do útero e com leiomiomas.....	21
Tabela suplementar 1. Associação entre os polimorfismos do ECA 1 e a actividade do enzima em mulheres controlo.....	39
Tabela suplementar 2. Associação entre os polimorfismo do ECA 1 e a actividade do enzima em mulheres com cancro do colo do útero	39

RESUMO

Os tumores ginecológicos são a maior causa de morbidade e mortalidade nas mulheres em todo o mundo. A infecção pelo HPV é necessária, mas não suficiente, para o desenvolvimento do cancro do colo do útero. Para além do genótipo viral, é também importante a participação de outros factores no processo de infecção, transformação, imortalização celular e sua progressão.

Os leiomiomas, por outro lado, desenvolvem-se a partir de uma única célula de músculo liso. São bem diferenciados e constituídos por uma deposição excessiva de colagénio e proteínas da matriz extracelular. No útero desenvolvem-se sob a influência local de factores de crescimento e hormonas sexuais.

O papel do stresse oxidante em tumores tem sido associado à exposição de ROS que promove a carcinogénese e a sinalização metastática. Sabemos, também, que há uma associação entre o sistema renina-angiotensina e o stresse oxidante, tornando-se assim interessante estudar alguns dos seus componentes.

Os estudos genéticos permitem associar os polimorfismos ao risco de desenvolvimento da doença em estudo. Os estudos bioquímicos permitem verificar se existem enzimas (biomarcadores) circulantes cujas alterações ao nível da sua actividade e concentração sejam reflexo de qualquer distúrbio no metabolismo e/ou mecanismos de acção que afectem o desenvolvimento da doença. Assim o principal objectivo deste trabalho incide no estudo da contribuição de polimorfismos dos genes CYBA, CAT, ECA 1 e Hp e dos biomarcadores circulantes EO e GSH no desenvolvimento de tumores ginecológicos benignos (leiomiomas) e malignos (cancro do colo do útero).

Verificámos que no cancro do colo do útero, os polimorfismos CYBA C242T e CAT 262C/T podem estar associados a uma maior susceptibilidade a esta patologia. Existe ainda uma diferença significativa entre os níveis da actividade da EO e as concentrações plasmáticas de GSH das mulheres com patologia do colo do útero e das mulheres do grupo controlo. Em relação à população de mulheres com leiomiomas, o polimorfismo CYBA C242T pode estar associado a uma maior susceptibilidade de desenvolver leiomiomas. Existe também uma diferença significativa entre os níveis da actividade da EO das mulheres com leiomiomas e as mulheres controlo.

Palavras-chave: Cancro do colo do útero, leiomiomas, ROS, polimorfismos, biomarcadores

ABSTRACT

Gynecological tumors are the leading cause of morbidity and mortality in women worldwide. HPV infection is a necessary but not sufficient cause for the development of cervix cancer. In addition to the viral genotype, the involvement of other factors is also important in the process of infection, transformation, cell immortalization and tumor progression. Moreover, leiomyomas develop from a single smooth muscle cell. They are well differentiated and constituted by an excessive deposition of collagen and extracellular matrix proteins. They can develop the uterus under the local influence of growth factors and sex hormones.

Oxidative stress has been associated with tumors by the exposure to ROS, promoting carcinogenesis and metastatic signaling. It is also known that there is an association between the renin-angiotensin system and the oxidative stress, thus making it interesting to study some of its components.

Genetic studies allow association studies between polymorphisms and the risk of developing a disease. Biochemical studies are important in order to check whether there are enzymes whose current level changes in its activity and concentration may reflect any disorder in metabolism and/or action mechanisms affecting the development of the disease biomarkers. Thus the main objective of this work focuses on the study of the contribution of the polymorphisms from CYBA, CAT, ECA 1 and Hp genes and circulating biomarkers EO and GSH in the development of benign gynecologic tumors (leiomyomas) and malignant (cervix cancer).

We found that CYBA C242T and CAT 262C/T polymorphisms may be associated with increased susceptibility for cervix cancer, and there is a significant difference between the levels of EO activity and GSH plasma concentration in women with cervix cancer and control women.

We found that CYBA C242T may be associated with increased susceptibility for the development of leiomyomas. There is a significant difference between the levels of EO activity in women with leiomyomas and control women.

Keywords: Cervix cancer, leiomyomas, ROS, polymorphisms, biomarkers

INTRODUÇÃO

Os tumores ginecológicos, tanto benignos como malignos, são a maior causa de morbidade e mortalidade nas mulheres em todo o mundo. (Blake, 2007; Bicho, 2011; Perea, 2000). Os leiomiomas são os tumores ginecológicos benignos mais comuns, afectando entre 20 a 25% das mulheres (Sabry & Al-Hendy, 2012), sendo o cancro do colo do útero o segundo tumor maligno mais frequente e a segunda maior causa de morte nas mulheres (Ching *et al.*, 2001).

Os tumores começam quando uma célula adquire mutações que provocam a alteração do seu processo normal de diferenciação, crescimento e proliferação. O aparecimento do tumor resulta de interacções complexas entre o hospedeiro de que se destaca o fundo genético individual e factores ambientais. Nos tecidos ginecológicos, salientam-se alguns factores agravantes do desenvolvimento destes tumores, como os factores hormonais quer endógenos quer exógenos, o uso de terapia de substituição hormonal, a idade da menarca, nuliparidade, o número de parceiros, entre outros (Houston, Hunter, Hodges, & Walker, 2001; Perea, 2000).

Devido à sua alta incidência, é de grande interesse conhecer os mecanismos biológicos e as susceptibilidades individuais que contribuem para o desenvolvimento destas doenças multifactoriais.

1. ETIOPATOGENIA DO CANCRO DO COLO DO ÚTERO

Os Papilomavírus Humano (HPV) são hoje reconhecidos como a principal causa do carcinoma do colo do útero, sendo a infecção necessária mas não suficiente para o desenvolvimento desta patologia. Papillomaviridae é uma família de vírus de DNA com uma grande complexidade genética e estrutural, mais conhecidos como Papilomavírus. Estes pequenos vírus são constituídos por uma cadeia dupla de DNA circular, com aproximadamente 8 Kb envolvida numa cápside proteica icosaédrica, composta pelas proteínas L1 e L2. O seu genoma está agrupado em 3 regiões contendo: os genes precoces (E), tardios (L) e reguladores (Perea, 2000).

Os HPV são classificados em tipos não-oncogénicos (baixo risco) ou oncogénicos (alto risco). Segundo a classificação filogenética e epidemiológica, os tipos oncogénicos mais frequentes em todo o mundo, por ordem decrescente, são: 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35. Os tipos 16 e 18 são responsáveis por 70 por cento dos cancros do colo do útero

e, codificam para duas oncoproteínas – E6 e E7 – responsáveis pela transformação epitelial, proliferação e imortalização celular (Doorbar, 2006; Muñoz, Castellsagué, de González, & Gissmann, 2006; Regateiro & Coimbra, 2001).

Estes vírus estão perfeitamente adaptados ao tecido que infectam – as células epiteliais pavimentosas da pele e mucosas (epiteliotrópicos) – e conseguem recrutar a maquinaria da célula hospedeira (Perea, 2000). O seu ciclo inicia-se após a entrada do vírus através de microlesões no epitélio do colo uterino. Após a sua introdução na célula estaminal na camada basal do epitélio, ocorre a expressão de proteínas virais não estruturais, ou proteínas precoces (E1 a E2). Uma vez alcançada esta camada, o vírus pode permanecer em forma episomal, em latência, ou aproveitar-se da diferenciação celular para a replicação viral (Perea, 2000; Muñoz et al., 2006). Numa fase posterior, quando as células basais alcançam a camada suprabasal, perdem a sua capacidade divisória e iniciam o programa de diferenciação terminal, os papilomavírus replicam-se neste compartimento e aproveitando-se da descamação natural das camadas superficiais são libertados (Figura suplementar 1– Anexo A) (Perea, 2000).

Estes vírus não têm actividade citolítica e, portanto, a sua infecção não se acompanha de inflamação mas sim de replicação viral, um fenómeno que pode explicar a infecção lenta e impedir uma resposta imunitária eficaz (Bicho, 2011).

Existem fases e evolução da infecção bem conhecidas clinicamente, que incluem as lesões intraepiteliais escamosas – de baixo (LSIL), de alto (HSIL) grau – e o carcinoma invasivo (ICC) (Au, 2004). No entanto, este longo processo de desenvolvimento pode ser interrompido pela regressão espontânea das lesões benignas e malignas iniciais (Woodman, Collins, & Young, 2007), o que leva a crer que a susceptibilidade imune antitumoral individual deverá ter um peso importante na infecção e transformação e progressão tumoral.

O cancro cervical inicia-se lentamente e, normalmente, é estabelecido uma década após a infecção com HPV oncogénico, e só se desenvolve em mulheres cujas lesões não se curam espontaneamente (Muñoz et al., 2006). Hoje sabemos que a infecção por HPV é condição necessária, mas não suficiente, para o desenvolvimento do cancro do colo do útero. Para além da infecção, a exposição a factores mutagénicos ambientais, tais como o fumo de tabaco, ou outros factores individuais, como a idade, a paridade e o comportamento sexual, são importantes para o início desta doença (Muñoz et al., 2006; Perea, 2000).

2. ETIOPATOGENIA DOS LEIOMIOMAS

Os leiomiomas, também conhecidos como fibróides, são tumores monoclonais, ou seja, desenvolvem-se a partir de uma única célula de músculo liso. São tipicamente bem diferenciados e têm uma taxa mitótica relativamente baixa, retendo o fenótipo de músculo liso, e são constituídos ainda por uma deposição excessiva de colagénio e proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina e o proteoglicano (Al-Hendy & Salama, 2006; Sabry & Al-Hendy, 2012).

No útero desenvolvem-se em qualquer parte que esteja sob a influência local de factores de crescimento e hormonas sexuais. Podem crescer no miométrio, chamados de leiomiomas intramurais; criar uma protuberância na cavidade uterina, designando-se de submucosos; ou projectarem-se através da camada serosa do útero na cavidade peritoneal, chamados leiomiomas subserosos. Apesar de raros, também aparecem no colo do útero e nas trompas de falópio (Blake, 2007; Sabry & Al-Hendy, 2012).

Apesar da sua etiologia ser ainda desconhecida, os leiomiomas são dependentes de hormonas sexuais, como a maioria dos tumores ginecológicos. São também conhecidos alguns factores de risco, como por exemplo: a idade, a menarca, a etnia, a exposição a estrogénios e a obesidade (Houston et al., 2001).

3. ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO E STRESSE OXIDANTE

As espécies reactivas de oxigénio (ROS) englobam uma grande variedade de moléculas sinalizadoras críticas, de que se destacam os radicais livres. Estes são uma espécie química que contém um ou mais electrões desemparelhados (Fruehauf & Meyskens, 2007; Halliwell, 1991). Os electrões desemparelhados do oxigénio molecular apresentam estruturas radicalares e não-radicalares, como o radical anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$); o radical hidroxilo (OH^{\cdot}); o peróxido de hidrogénio (H_2O_2); e o singuleto de oxigénio (ΣO_2^{\cdot}) (Manda, Nechifor, & Neagu, 2009; Pelicano, Carney, & Huang, 2004).

Estas ROS estão constantemente a ser geradas em organismos aeróbicos durante o metabolismo intracelular em resposta a estímulos ambientais (W.-S. Wu, 2006).

Nos sistemas de oxidação-redução (REDOX), as ROS são geradas através de reacções, enzimáticas e não-enzimáticas, altamente controladas, começando pelo superóxido e acabando no singuleto de oxigénio (Figura 1) (Manda et al., 2009).

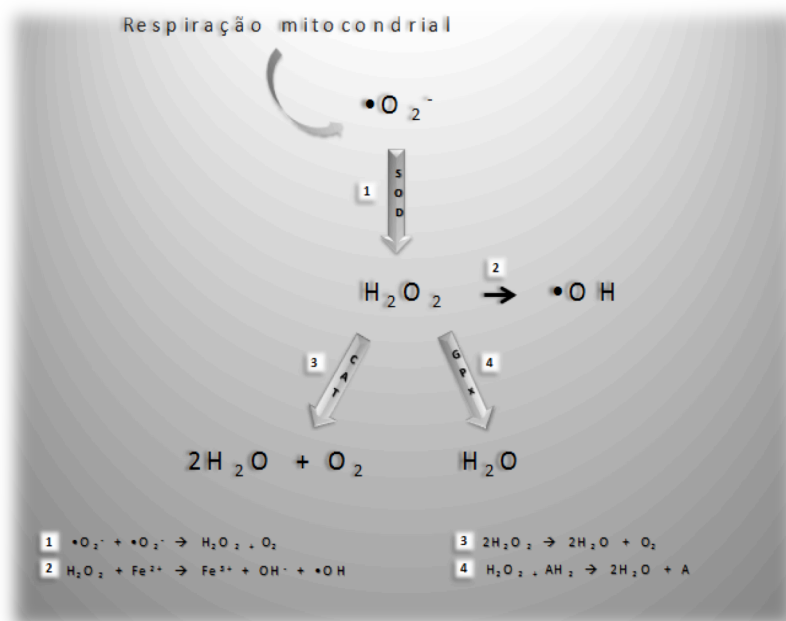


Figura 1. Reações antioxidantes: o ciclo começa com a produção do ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) através do metabolismo celular. Este é transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) através da SOD (1)- $\bullet\text{O}_2^- + \bullet\text{O}_2^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$. Este peróxido de hidrogênio é neutralizado pela CAT e por peroxidases, através das seguintes reações: CAT (3)- $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$; Peroxidases (4)- $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AH}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{A}$ (sendo A um aceitador de electrões); ou, o peróxido é transformado no radical hidroxil oxidado através da reação de Fenton (2).

Adaptado de: Manda *et al.*, 2009

O potencial tóxico das ROS é usado, principalmente, pelo sistema imunitário como uma arma de defesa contra agentes patogénicos. Para além disso, as ROS têm um papel chave em várias cascatas de sinalização e numa grande variedade de processos celulares importantes para a manutenção da homeostase (Manda *et al.*, 2009; W.-S. Wu, 2006). Em condições fisiológicas, existe um balanço REDOX cuidadosamente regulado que protege as células dos ataques tóxicos das ROS, mas se este balanço for alterado, promove o desenvolvimento de várias patologias (Manda *et al.*, 2009).

O stresse oxidante descreve a condição em que os mecanismos celulares antioxidantes de defesa são insuficientes para inactivar as ROS e/ou há produção excessiva de ROS. É sabido que o stresse oxidante leva a lesões graves em lípidos, proteínas, glícidos e, mais importante, em ácidos nucleicos, o que vai comprometer as funções e viabilidade celular, como por exemplo: progressão do ciclo celular, apoptose e isquémia (Manda *et al.*, 2009; W.-S. Wu, 2006).

O papel do stresse oxidante em tumores tem sido associado à exposição às ROS (Figura 2) através da promoção da carcinogénese e da sinalização metastática (W.-S. Wu, 2006), desta forma as ROS têm um papel pró-tumorigénico, ou, por outro lado, possuem um papel de supressão tumoral, quando o status oxidante é excessivo (Pan, 2009).

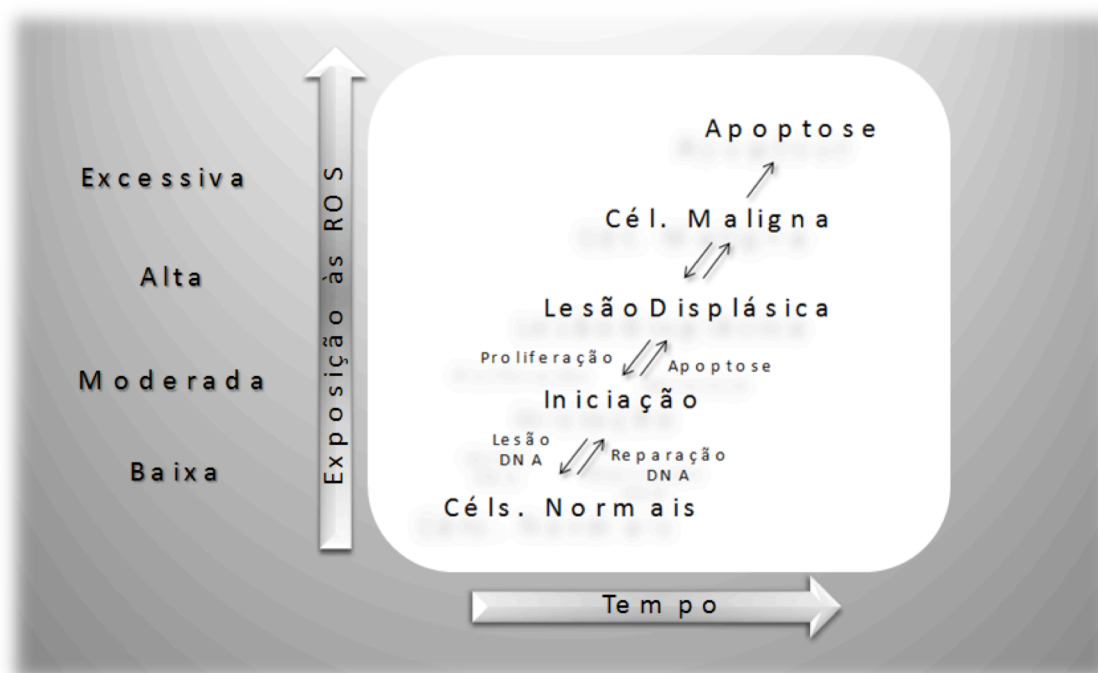


Figura 2. A acção das ROS nas células: A exposição crónica (de moderada a alta) de ROS é carcinogénica, mas uma exposição excessiva é tóxica para as células cancerígenas. Adaptado de: Fruehauf & Meyskens, 2007.

As células transformadas – tumorais – desenvolvem um stress oxidativo constitutivo que mantém o crescimento tumoral e impede sinais pró-apoptóticos, promovendo a progressão tumoral (Behrend et al., 2003; Manda et al., 2009; Pelicano et al., 2004).

Perceber a dualidade destas espécies como moléculas citotóxicas e actuando em pontos chave de cascatas de sinalização, pode ajudar a compreender o ponto de partida de várias patologias, como o cancro (Manda et al., 2009; W.-S. Wu, 2006).

4. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E O STRESSE OXIDANTE

O sistema renina-angiotensina (RAS) é um sistema de enzimas, péptidos e receptores envolvidos na regulação da pressão sanguínea e no balanço hidroelectrolítico, e está sumarizado na figura 3. A angiotensina (Ang) II é o componente activo deste sistema, e tem várias funções fisiológicas importantes, como vasoconstrição, proliferação, inflamação, stresse oxidante, trombogénese e fibrose (Fanelli & Zatz, 2011; Reid, Morris, & Ganong, 1978).

A Ang II é um potente estimulante da produção de ROS em células vasculares, portanto estas ROS podem promover várias respostas inflamatórias. Inibindo o ECA, a produção de Ang II é bloqueada e pode reduzir efectivamente o stresse oxidante

vascular (Fanelli & Zatz, 2011; Landmesser & Drexler, 2003). Há também prevenção da produção de ROS, estimulada pela Ang II, inibindo-se a expressão da subunidade p22phox da NADPH oxidase. Assim este complexo enzimático representa uma fonte importante de ROS e é crítica para a hipertrofia celular em respostas à Ang II (Landmesser & Drexler, 2003).

Sabendo que há uma associação entre este sistema e o stresse oxidante, torna-se interessante estudar alguns dos seus componentes.

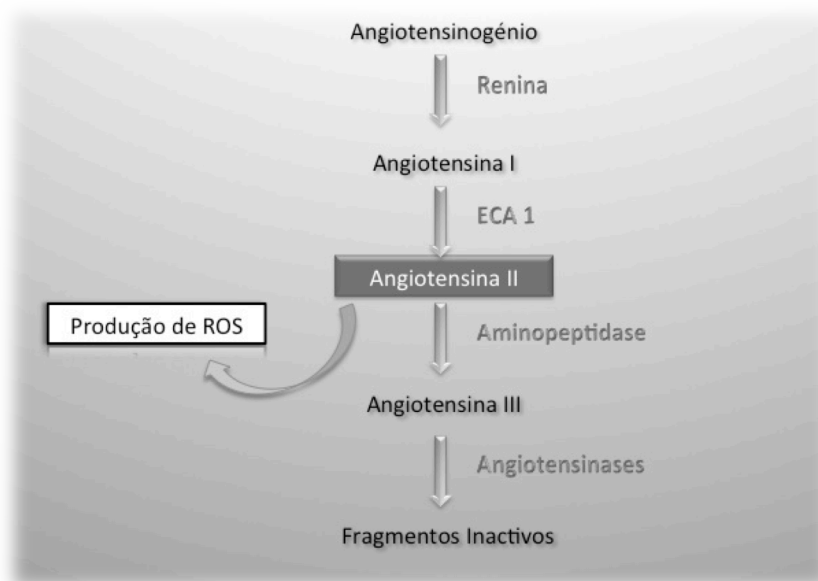


Figura 3. Sistema renina-angiotensina.
Adaptado de: Reid, Morris, & Ganong, 1978

5. ENZIMA CONVERSOR DA ANGIOTENSINA

O Enzima conversor da angiotensina (ECA) é um enzima importante no sistema renina-angiotensina, pois tem um papel chave na regulação da pressão sanguínea por catalisar a conversão de angiotensina I em angiotensina II, que é um potente vasoconstritor (Zhang et al., 2011). A angiotensina II foi identificada como um importante indutor da produção de ROS (Abd Alla, El Faramawy, & Quitterer, 2013). O ECA tem uma expressão diferencial em vários carcinomas, e, portanto, pode afectar a proliferação e migração de células tumorais e a angiogénese (Pei & Li, 2012). Esta expressão diferencial pode estar associada a polimorfismos genéticos.

O gene humano do ECA 1 está localizado no braço longo do cromossoma 17q23 (Figura suplementar 4 – Anexo A), e já foram identificados vários polimorfismos deste gene. O polimorfismo mais estudado do ECA 1 é gerado uma inserção/deleção (I/D) localizada no intrão 17, e é caracterizado pela presença (I) ou ausência (D) de uma

sequência repetitiva Alu¹ de 287 bp, que resulta em 3 genótipos (II, ID e DD) com alterações no nível de enzima circulante (Pei & Li, 2012; Zhang et al., 2011). É possível que neste intrão esteja um elemento de ligação a um factor de transcrição, mas ainda não foi determinado que factores podem ter efeito na expressão do ECA (Hamilton, Tammen, & Raadsma, 2013).

6. SUBUNIDADE p22*Phox* DA NADPH OXIDASE

O p22*Phox* é um dos elementos responsáveis pela transferência de electrões da NADPH-oxidase (NOX) (Schächinger, Britten, Dimmeler, & Zeiher, 2001). A família de proteínas NOX é responsável pela transferência de electrões através das membranas biológicas. Esta família é composta por sete membros: NOX1-NOX5, Dual Oxidase (Duox) 1 e Duox2) (Bedard & Krause, 2007; Gorin & Block, 2013).

Estas oxidases são complexos multi-proteicos associadas à membrana celular que produzem superóxido (O₂⁻) para defesa do hospedeiro. Estes complexos estão bem caracterizados em células fagocíticas, onde o citocromo b₅₅₈ funciona como transportador final de electrões do NADPH para o oxigénio molecular. Esta proteína consiste numa subunidade α com 22-kDa, o p22*phox*, e uma subunidade β glicosilada (subunidade catalítica) de 91-kDa, o gp91*phox*, que estão intimamente ligadas (Sardina et al., 2010; Ushio-fukai, Zafari, Fukui, Ishizaka, & Griendling, 1996).

No homem, esta proteína encontra-se codificada pelo gene CYBA no braço longo do cromossoma 16q24 (Figura suplementar 2 – Anexo A). Até à data já foram identificados vários polimorfismos neste gene, mas o mais estudados é o C242T, onde há uma substituição não conservativa² da histidina-72 por um resíduo de tirosina. Esta variação polimórfica diminui a actividade funcional da NOX, ou seja, aumenta o seu potencial oxidante (Najafi, Alipoor, Shabani, Amirfarhangi, & Ghasemi, 2012; Schreiber et al., 2011).

7. CATALASE

A catalase é uma enzima com um papel predominante no controlo da concentração de H₂O₂, convertendo-o em H₂O e O₂, protegendo as células do stresse oxidante (Chang et al., 2012). É tipicamente homotetramérica com pequenas (55 a 65-

¹ A família Alu é uma família de elementos repetitivos do genoma humano, classificada como SINEs. A estrutura típica é 5' A-A5TACA6-B 3', onde A e B são sequências similares mas de direcção oposta.

² Mutação não sin nima – substitui o de um aminoácido por outro com uma natureza química diferente e que pode levar a uma altera o grave na estrutura prote ica.

kDa) ou grandes subunidades (80 a 84-kDa) subunidades associadas ao grupo heme, o qual consiste no centro activo (Chelikani, Ramana, & Radhakrishnan, 2005). Nos hepatócitos, é encontrada predominantemente em peroxissomas e, nos eritrócitos, no citosol.

O gene humano da catalase tem, aproximadamente, 34 kb e está localizado no braço curto do cromossoma 11p13 (Figura suplementar 3 – Anexo A). O polimorfismo mais comum (C262T) é na região promotora, que resulta de uma substituição de C para T. Esta ligação influencia a ligação de factores de transcrição, alterando assim a expressão basal desta enzima e, conseqüentemente, o status oxidativo das células (Khodayari et al., 2013).

8. HAPTOGLOBINA

A haptoglobina é uma glicoproteína do plasma sanguíneo, sintetizada no fígado e em células de epitélios pavimentosos, em resposta a citocinas inflamatórias, que forma um complexo com a hemoglobina livre. A sua função mais conhecida é a captura da hemoglobina para prevenção da perda de ferro e de lesões nos rins durante a hemólise extravascular. É uma proteína de fase aguda que tem um papel de protecção contra os radicais hidroxil da hemoglobina livre gerados através da reacção de Fenton³; o que previne lesões celulares e no DNA gerados por estes radicais (Langlois & Delanghe, 1996; Mahmud et al., 2007; Melamed-Frank, 2001).

Em humanos, o locus da haptoglobina está localizado no cromossoma 16q22 (Figura suplementar 2 – Anexo A), e é polimórfico com dois alelos (Hp 1 e Hp 2), dando origem a três fenótipos estrutural e funcionalmente distintos. Os produtos destes alelos diferem na sua capacidade de ligar à hemoglobina e nas suas capacidades anti-inflamatórias e antioxidantes (Bicho et al., 2013; Mahmud et al., 2007; Quaye, 2008).

9. GLUTATIONO

O glutationo (GSH) é um tripéptido solúvel, composto por ácido glutâmico, cisteína e glicina. O GSH ajuda na defesa celular antioxidante, neutralizando ROS como os radicais hidroxil e peroxil, o H₂O₂, , entre outros, através de reacções enzimáticas catalizadas pelo glutationo-S-transferase (GST) e glutationo peroxidase (GPx) (Sies, 1999; G. Wu, Fang, Yang, Lupton, & Turner, 2004). Nestes processos, o GSH é

³ Reacção de Fenton: $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \cdot OH$

convertido para a sua forma oxidada, glutathione persulfureto (GSSG), e, uma vez oxidada pode, facilmente, voltar à sua forma reduzida (GSH) através de um dador de electrões, o NADPH, catalisado pela glutathione reductase (G. Wu et al., 2004).

Este par REDOX GSH/GSSG tem um papel muito importante na defesa antioxidante, no metabolismo de nutrientes e na regulação de cascatas de sinalização essenciais na homeostase. Por isso, deficiências nesta razão contribuem para o aumento do stresse oxidante e para a patogenia de várias doenças (Townsend, Tew, & Tapiero, 2003).

10. EPINEFRINA OXIDASE

A epinefrina oxidase é uma oxidase da adrenalina ou epinefrina. As MAOs são uma família de flavoproteínas que catalizam a oxidação de amins de fontes endógenas e exógenas, influenciando as concentrações de neurotransmissores, como a epinefrina (ou adrenalina), evitando que se acumulem. A oxidação das amins dá-se pela remoção de um grupo amina através do oxigénio, dando origem a um aldeído ou a amónia (Kaludercic, Carpi, Menabò, Di Lisa, & Paolocci, 2011; M. Bortolato & J. Shih, 2011). No caso da epinefrina, esta é facilmente oxidada no anel a adrenocrómio pelo intermédio de ROS (Adak, Bandyopadhyay, Bandyopadhyay, & Banerjee, 1998). A função da MAO é crítica para a regulação REDOX intracelular, pois um dos produtos da reacção de oxidação, o peróxido de hidrogénio (H₂O₂), um potente oxidante (M. Bortolato & J. Shih, 2011).

OBJECTIVOS

Este trabalho teve como objectivos:

1. Estudar a influência da variação genética de genes de proteínas associadas à biodisponibilidade das ROS, respectivamente do *p22phox* das NOX, da catalase (CAT), do enzima conversor da angiotensina (ECA) e da haptoglobina (Hp), na etiopatogenia de tumores ginecológicos benignos (leiomiomas uterinos) e malignos (cancro do colo do útero);
2. Optimizar as técnicas de determinação da actividade das enzimas epinefrina oxidase (EO) e dos níveis circulantes de glutathione no plasma, e avaliar os seus níveis em tumores ginecológicos benignos (leiomiomas) e malignos (cancro do colo do útero).

MATERIAIS E MÉTODOS

1. POPULAÇÕES ESTUDADAS

Para a realização deste trabalho foram estudados três grupos de mulheres:

- Um grupo controlo de 158 mulheres que não apresentavam qualquer das patologias em estudo. Estas mulheres são provenientes da Faculdade de Motricidade Humana e têm um intervalo de idades entre os 18 e os 79 anos, com mediana de 54 anos de idade;

- Um grupo “Cancro do colo do útero” de 134 mulheres com esta patologia resultante de infecção por HPV, com um intervalo de idade entre os 19 e 81 anos e mediana de 44 anos. Estas mulheres recorreram aos Serviços de Ginecologia do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil (IPOFG) delegações de Lisboa (disponibilizadas pela Professora Doutora Maria Clara Bicho) e do Porto (disponibilizadas pelo Professor Doutor Rui Medeiros);

- Um grupo “Leiomiomas patológicos” de 123 mulheres com intervalo de idades entre os 24 e os 57 anos e mediana de 40 anos. Estas mulheres recorreram ao Serviço de Radiologia de Intervenção do Hospital Saint Louis de Lisboa. Estas amostras foram disponibilizadas pelo Director Professor Doutor João Pisco.

2. EXTRAÇÃO DE DNA GENÓMICO

As amostras de sangue total foram colhidas em tubos com EDTA e guardadas a -20°C. O DNA foi obtido a partir de 2 ml de sangue, usando um método não enzimático designado de *salting-out*, adaptado do método de D. K. Lahiri e J. I. Nurnberger Jr. (1991) (Nucleic Acid Research volume 19 nº 19 pag.5444) que pode ser consultado no Anexo B.

3. QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A quantificação (ng/μl) e determinação da pureza do DNA genómico foram obtidas por método espectrofotométrico nos comprimentos de onda 260 e 280 nm, realizado no equipamento NanoDrop® ND-2000.

4. PCR-RFLP

A amplificação do DNA foi conseguida através do método de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) num termociclador Gene Amp® PCR System 2700 utilizando diferentes condições para cada gene conforme descrito abaixo.

Para os polimorfismos dos genes CYBA e CAT a genotipagem dos indivíduos foi efectuada por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), uma técnica de restrição enzimática que permite a discriminação dos alelos após separação por electroforese em gel de agarose (SeaKem® LE Agarose) em TAE (20mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH8,0) corado com brometo de etídeo (10 mg/ml).

A visualização das bandas de DNA, após electroforese, foi efectuada num transiluminador de ultravioleta (Geno Smart VWR®).

4.1. Polimorfismo CYBA C242T – p22phox

O polimorfismo C242T do gene CYBA foi analisado por PCR-RFLP a partir de DNA genómico. O PCR foi realizado com a seguinte mistura reaccional de 25 µl: 10 mM de cada *primer forward* e *reverse* com as sequências 5'-TGCTTGTGGGTAAACCAAGGCCGGTG-3' e 5'-AACACTGAGGTAAGTGGGGGTGGCTCCGT-3', respectivamente; 200µM de PCR *nucleotide Mix* (Thermo Scientific® *DreamTaq Green*), contendo quatro dNTPs; 1,5 mM de MgCl₂; 1 U de *Taq* polymerase; e 200 ng de DNA genómico. As condições de PCR usadas foram *hot start* a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 1 minuto a 54°C, 1 minuto e 30 segundos a 72°C e uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

O produto da reacção é de 348 pares de bases e foi digerido com endonuclease RsaI 10 U/µl (Thermo Scientific®) a 37°C durante 16 horas. Esta enzima reconhece a sequência GTAC e cliva-a entre o T e A, criando uma extremidade cega (Figura 4). Os fragmentos hidrolisados foram submetidos a electroforese em gel de agarose (SeaKem® LE Agarose) a 3% (m/v) em TAE (20mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH8,0), com 10 µg/ml de brometo de etídeo, durante 50 min a 90 V (Figura 5).

Figura 4. Sequência de restrição da endonuclease Rsa I. A sequência só é hidrolisada se estiver um T na posição assinalado a preto.



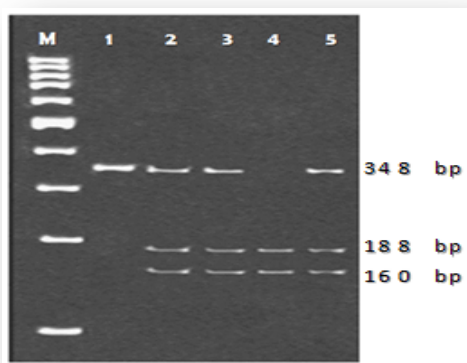


Figura 5. Genotipagem por PCR-RFLP do polimorfismo CYBA C242T

M – marcador de pesos moleculares de DNA; 1 – homocigótico CC (348 bp); 2, 3 e 5 – heterocigótico CT (348 bp + 188 bp + 160 bp); 4 - homocigótico TT (188 bp + 160 bp)

4.2. Polimorfismo CAT 262C/T

O polimorfismo 262 C/T do gene da Catalase foi analisado por PCR-RFLP a partir de DNA genómico. O PCR foi realizado com a seguinte mistura reaccional de 25 µl: 10 mM de cada *primer forward* e *reverse* com sequências 5'-AGAGCCTCGCCCCGCCGGACCG-3' e 5'-TAAGAGCTGAGAAAGCATAGCT-3', respectivamente; 200µM de PCR *nucleotide Mix* (Thermo Scientific® *DreamTaq Green*), contendo os quatro dNTPs; 1,5 mM de MgCl₂; 1 U de *Taq* polymerase; e 200 ng de DNA genómico. As condições de PCR usadas foram *hot start* a 94°C por 2 minutos, seguido de 5 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 52°C, 1 minuto a 72°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 52°C, 30 segundos a 72°C e uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

O produto da reacção é de 185 pares de bases e foi digerido com endonuclease *Sma* I 10 U/µl (Thermo Scientific®) a 30°C durante 16 horas. Esta enzima reconhece a sequência CCCGGG e cliva-a no CpG interno de maneira a criar uma extremidade cega (Figura 6). Os fragmentos hidrolisados foram submetidos a electroforese em gel de agarose (SeaKem® LE Agarose) a 3% (m/v) em TAE (20mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH8,0), com 10 µg/ml de brometo de etídio, durante 90 min a 50 V (Figura 7).

Figura 6. Sequência de restrição da endonuclease *Sma* I. A sequência só é hidrolisada se estiver um C na posição assinalado a preto.



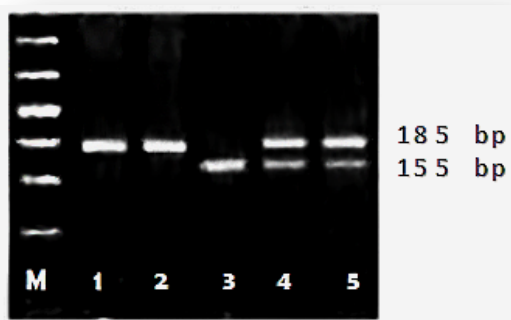


Figura 7. Genotipagem por PCR-RFLP do polimorfismo CAT 262C/T.

M – marcador de peso molecular de DNA; 1 e 2–homozigótico TT (185 bp); 3- homozigótico CC (155 bp + 30 bp); 4 e 5 –heterozigótico CT (185 bp + 155 bp + 30 bp);

4.3. Polimorfismo ECA 1

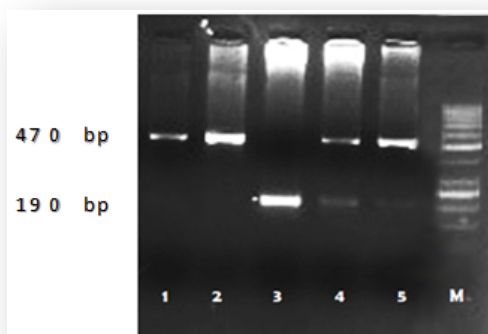
O polimorfismo do gene do ECA foi analisado por PCR a partir de DNA genómico.

O PCR foi realizado com a seguinte mistura reaccional 25 µl: 10 mM de cada *primer forward e reverse* com sequências 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3' e 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3', respectivamente; 200µM de PCR *nucleotide Mix*, contendo os quatro dNTPs e 5 % de DMSO; 1,5 mM de MgCl₂; 2 U de *Taq polymerase*; e 200 ng de DNA genómico. As condições de PCR usadas foram *hot start* a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 66°C, 45 segundos a 72°C e uma extensão final de 30 segundos a 72°C.

Através do produto da reacção é possível identificar imediatamente a presença ou ausência da sequência repetitiva *Alu* de 287 pares de bases. Os fragmentos foram então submetidos a electroforese em gel de agarose (SeaKem® LE Agarose) a 2% (m/v) em TAE (20 mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH8,0), com 10 µg/ml de brometo de etídio, durante 45 min a 80 V (Figura 7).

Figura 8. Genotipagem por PCR-RFLP do polimorfismo em ECA 1.

1 e 2 – fenótipo com inserção I/I (470 bp); 3 – fenótipo com deleção D/D (190 bp); 4 e 5 - fenótipo heterozigótico I/D (477 bp + 190 bp); M – marcador de pesos moleculares de DNA.



5. GENOTIPAGEM DA HAPTOGLOBINA

A determinação do polimorfismo genético da haptoglobina foi feita através de electroforese em gel de poliacrilamida tomando partido da propriedade peroxidásica do

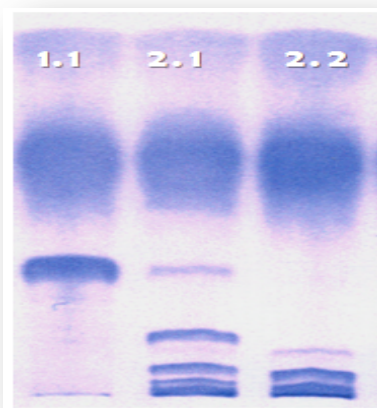
complexo da haptoglobina com a hemoglobina (Hp-Hb) para revelação das bandas, seguindo as modificações dos métodos descritos previamente por Baumgarten (1963).

As amostras para aplicação no gel são preparadas utilizando sacarose 40 % (p/v), hemoglobina 10% (v/v) e plasma, na proporção de 3:2:4, para um volume final de 45 µl.

Os fenótipos de Hp são determinados por electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 4,7% em solução tampão TRIS-HCl 0,504 M, pH 8,9. A electroforese foi realizada com voltagem constante de 250 V durante quatro horas.

Depois de completada a electroforese, é feita a coloração das bandas resultantes da electroforese através do método de coloração por contacto, usando o-dianisidina 16mM em ácido acético 50% (v/v) e, posteriormente, peróxido de hidrogénio 0,6% (v/v).

Figura 9. Padrão de bandas da Hp numa electroforese em gel de poliacrilamida. Visualizam-se os três fenótipos: Hp 1.1, caracterizado por uma banda de migração rápida; Hp 2.2, caracterizado por várias bandas de migração mais lenta; e Hp 2.1, caracterizado por um padrão misto das duas formas alélicas.



6. ACTIVIDADE DA EPINEFRINA OXIDASE

O método desenvolvido para a determinação da actividade da epinefrina oxidase (EO) tem por base a reacção de oxidação da epinefrina a adrenocrómio.

A actividade do enzima é determinado espectrofotometricamente, através da diferença de absorvência entre o ensaio com adrenalina sujeito a incubação durante 2 horas (T2h), que permite avaliar a concentração de adrenocrómio formado, e o ensaio do instante zero (T0h), que funciona como branco e permite determinar a contribuição dos componentes do ensaio para a absorvência final, em que a mistura reaccional é composta por plasma, sal sódico de bitartarato de epinefrina (Sigma®) e água, na proporção de 2:4:2.

Segundo Matthews et al. (1984), o coeficiente de absorvidade molar para o adrenocrómio é $\epsilon_{480\text{nm}}=4020 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, sendo utilizado para o cálculo da actividade a fórmula:

$$\text{Actividade} \left(\frac{\mu\text{M}}{\text{hora}} \right) = \frac{\text{Abs}_{480\text{nm}}(\text{T2h}) - \text{Abs}_{480\text{nm}}(\text{T0h})}{\epsilon_{480\text{nm}} \times 2} \times 10^6$$

7. DOSEAMENTO DO GSH PLASMÁTICO

As concentrações de glutatono reduzido (GSH) e oxidado (GSSG) foram determinadas usando um espectrofluorímetro Shimadzu RF-5000, após precipitação de proteínas do plasma com ácido meta-fosfórico a 25% (v/v). Este método é adaptado de Hissin and Hilf (1976) que usa a reacção entre o GSH e o orto-ftaldéido (OPT) 1 mg/mL em tampão de fosfato 0,1 M-EDTA 0,005 M, pH 8; e entre o GSSG e o OPT em NaOH 0,1N, pH 12, na presença de N-etilmaleímida (NEM) 0,04M, para evitar a interferência de GSH na quantificação de GSSG. Os comprimentos de onda de excitação e emissão do GSH e GSSG são nos máximos a 340nm e 430nm, respectivamente. Os dados são apresentados pela média \pm desvio padrão. O protocolo pode ser consultado no anexo B.

8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi construída uma base de dados com uma plataforma IBM SPSS Statistics 20.

A análise estatística dos dados obtidos foi efectuada nos softwares IBM SPSS Statistics 20 bem como no Primer of Biostatistics (Glantz, 2002), estabelecendo-se o nível de significância de $p < 0.05$.

Para os parâmetros com variáveis contínuas, como é o caso da actividade da epinefrina oxidase e das concentrações do glutatono, realizaram-se testes de normalidade *Shapiro-Wilk* ou *Kolmogorov-Smirnov* para as populações controlo e doentes, e procedeu-se a um teste *T-student* ou *Mann-Whitney*, conforme o caso, para avaliar as diferenças entre as populações. Foram avaliadas as possíveis diferenças na distribuição da actividade da EO entre as mulheres controlo e doentes dos dois grupos (Cancro do colo do útero e Leiomiomas) e concentrações do GSH entre as mulheres controlo e doentes com cancro do colo do útero.

No caso de dados discretos, como é o caso dos génotipos tanto dos controlos como dos doentes, foi utilizado o teste de Qui-quadrado (χ^2) de Pearson para verificar se as populações se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Calculamos, também, o *Odds Ratio* para determinar o risco relativo dos diferentes génotipos para a patologia em questão.

De modo a avaliar a relação entre os génotipos do ECA 1 e a actividade da mesma enzima procedeu-se a uma análise paramétrica ANOVA.

RESULTADOS

Através de um estudo de associação caso/controlado das frequências das formas polimórficas, neste caso mais concretamente no cancro do colo do útero versus controlos e nos leiomiomas versus controlos, averiguou-se a possível existência de associação relativa, para cada variação polimórfica, entre o grupo de doentes com cancro do colo do útero ou leiomiomas e o grupo de controlo.

1. ANÁLISE DO POLIMORFISMO CYBA C242T

No que diz respeito ao polimorfismo CYBA C242T, observa-se que no grupo controlo as frequências dos genótipos CC, CT e TT foram, respectivamente 35,3%, 58,8% e 5,9%. Foi efectuado um teste *qui-quadrado* (χ^2) para testar se esta população se encontrava em equilíbrio de Hardy-Weinberg, tendo se observado que, para este polimorfismo, as frequências genóticas não se encontram em equilíbrio ($\chi^2 = 12.680$ e $p = 0.0004$).

Na tabela 1 encontra-se a distribuição dos genótipos por controlo e doentes tanto com cancro de colo do útero como de leiomiomas. Neste polimorfismo, a população de mulheres com cancro do colo do útero encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, relativamente a este polimorfismo ($\chi^2 = 0.110$ e $p = 0.740$), assim como a população de mulheres com leiomiomas ($\chi^2 = 1.920$ e $p = 0.166$).

Tabela 1. Frequências genóticas e alélicas do polimorfismo CYBA C242T em mulheres controlo, com patologia do colo do útero e com leiomiomas.

	Total	CC	CT	TT	p^a	Alelo C	Alelo T	p^b
	N	N (%)	N (%)	N (%)		N (%)	N (%)	
Cancro do colo	100	48 (48%)	41 (41%)	11 (11%)	0,017	68,5 (68,5%)	31,5 (31,5%)	0,432
Controlos	153	54 (35,3%)	90 (58,8%)	9 (5,9%)		99 (64,7%)	54 (35,3%)	
Leiomiomas	101	47 (46,5%)	48 (47,5%)	6 (5,9%)	0,186	71 (70,3%)	30 (29,7%)	0,017

^a valor da significância do teste χ^2 para os genótipos; nível de significância de 0.05

^b valor da significância do teste χ^2 para os alelos; nível de significância de 0.05

As frequências alélicas são constituídas maioritariamente pelo alelo Citosina em todas as 3 populações, controlos, cancro do colo do útero e leiomiomas, sendo de

64,7%, 68,5% e 70,3%, respectivamente. Não existe diferença significativa entre as frequências alélicas da população de mulheres com cancro do colo do útero e a população controlo ($\chi^2= 0,618$, $p= 0.432$). No entanto entre as mulheres com leiomiomas e controlo há uma diferença significativa entre as frequências alélicas destas populações ($\chi^2=1,475$, $p=0.017$).

Como existe esta diferença, foi efectuada uma análise de *Odds Ratio*, com intuito de perceber se algum dos alelos exerce um efeito protector ou de risco para o desenvolvimento desta doença (Tabela 2). A associação sugere que o alelo C pode ser considerado um factor de risco para o desenvolvimento de leiomiomas (OR = 1,291; IC (95%) = 0,881 – 1,892; $p = 0,190$).

Tabela 2. *Odds Ratio* para a associação entre os alelos do polimorfismo CYBA C242T e os leiomiomas

	Controlo (%)	Doentes (%)	OR	IC (95%)	p
Alelo C	99 (64,7%)	71 (70,3%)	1,291	0,881 – 1,892	0,190
Alelo T	54 (35,3%)	30 (29,7%)	0,775	0,529 – 1,135	

Realizou-se o teste *qui* quadrado (χ^2) comparando as frequências genótípicas dos dois grupos de populações (cancro do colo do útero vs controlos; leiomiomas vs controlos), e observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre as mulheres controlo e as com patologia do colo do útero ($\chi^2= 8,135$ e $p = 0, 017$). No entanto, não existe diferença estatisticamente significativa entre mulheres controlo e com leiomiomas ($\chi^2= 3,363$ e $p = 0.186$). É importante sublinhar a diferença entre as frequências de heterozigotos (CT) do grupo de mulheres controlo e das mulheres com patologia do colo do útero.

Por último, e uma vez que as frequências genótípicas do grupo de mulheres com patologia do colo do útero apresentaram uma diferença significativa das do grupo controlo, foi efectuada uma análise do *Odds Ratio*, com o intuito de se perceber se algum dos genótipos exerce um efeito protector ou de risco para o desenvolvimento da desta doença (Tabela 3). A associação sugere que os genótipos CC e TT são factores de risco para o desenvolvimento do cancro do colo do útero (OR= 1,692; IC (95%)= 1,013 – 2,829); $p= 0,044$ e OR= 2,983; IC (95%)= 1,175 – 7,573; $p= 0,017$, respectivamente), e o genótipo CT é um factor protector (OR= 0,486; IC (95%)= 0,291–0,812; $p= 0,006$).

Tabela 3. Odds Ratio para a associação entre os genótipos do polimorfismo CYBA C242T e o cancro do colo do útero.

	Controlo (%)	Doentes (%)	OR	IC (95%)	p
Genótipo CC	54 (35,3%)	48 (48%)	1,692	1,013 – 2,829	0,044
Genótipo CT	90 (58,8%)	41 (41%)	0,486	0,291 – 0,812	0,006
Genótipo TT	9 (5,9%)	11 (11%)	2,983	1,175 – 7,573	0,017

2. ANÁLISE DO POLIMORFISMO CAT 262C/T

Relativamente ao polimorfismo CAT 262C/T, na tabela 4 encontra-se a distribuição dos genótipos no grupo controlo e nos dois grupos de doentes, tanto de cancro de colo do útero como de leiomiomas. Para este polimorfismo, foi efectuado um teste *qui-quadrado* (χ^2) para testar se as populações se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg: nenhuma das três populações de mulheres – controlo ($\chi^2= 12.680$ e $p= 0.0004$), com patologia do colo do útero ($\chi^2 = 37.980$ e $p = 0.000$) e com leiomiomas ($\chi^2 = 9.880$ e $p = 0.002$) - demonstrou esta condição.

Tabela 4. Frequências genóticas e alélicas do polimorfismo CAT 262C/T em mulheres controlo, com patologia do colo do útero e com leiomiomas.

	Total	CC	CT	TT	p ^a	Alelo C	Alelo T	p ^b
	N	N (%)	N (%)	N (%)		N (%)	N (%)	
Cancro do colo	119	58 (48,7%)	25 (21,0%)	36 (30,3%)	0,009	70,5 (59,2%)	48,5 (40,8%)	0,001
Controlos	106	65 (61,3%)	27 (25,5%)	14 (13,2%)		78,5 (74,1%)	27,5 (25,9%)	
Leiomiomas	104	70 (67,3%)	24 (23,1%)	10 (9,6%)	0,604	82 (78,8%)	22 (21,2%)	0,298

^a valor da significância do teste χ^2 para os genótipos; nível de significância de 0.05

^b valor da significância do teste χ^2 para os alelos; nível de significância de 0.05

As frequências alélicas são constituídas maioritariamente pelo alelo Citosina em todas as 3 populações, controlos, do útero e leiomiomas, sendo de 74,1%, 59,2% e 78,8%, respectivamente. Contudo, existe uma diferença significativa ($\chi^2=10.347$, $p=0.001$), entre as frequências alélicas das populações de mulheres com patologia do

colo do útero e controlo, com um aumento da frequência do alelo Timina nas mulheres com cancro do colo do útero.

Realizou-se o teste *qui* quadrado (χ^2) comparando as frequências genótípicas dos dois grupos de populações (cancro do colo do útero vs controlos; leiomiomas vs controlos), e observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre as mulheres controlo e as com patologia do colo do útero ($\chi^2= 9.436$ e $p = 0.009$). No entanto, não existe diferença estatisticamente significativa entre mulheres controlo e mulheres com leiomiomas ($\chi^2= 1,009$ e $p = 0.604$).

Por último, e uma vez que o grupo de mulheres com patologia do colo do útero apresentou uma diferença significativa do grupo controlo, quer para as frequências genótípicas, quer para as alélicas, foi efectuada uma análise do *Odds Ratio*, com o intuito de se perceber se algum dos alelos ou génotipos exerce um efeito protector ou de risco para o desenvolvimento desta doença (Tabela 5). A associação sugere que o alelo T é um factor de risco para o desenvolvimento do cancro do colo do útero (OR = 1,964; IC (95%) = 1,314 – 2,934; $p = 0,001$), assim como o génotipo TT (OR= 2,850; IC (95%)= 1,437 – 5,654; $p= 0,002$)

Tabela 5. *Odds Ratio* para a associação entre os alelos e génotipos do polimorfismo CAT 262C/T e o cancro do colo do útero

	Controlo (%)	Doentes (%)	OR	IC (95%)	p
Alelo C	78,5 (74,1%)	70,5 (59,2%)	0,509	0,341 – 0,761	0,001
Alelo T	27,5 (25,9%)	48,5 (40,8%)	1,964	1,314 – 2,934	
Génótipo CC	65 (61,3%)	58 (48,7%)	0,600	0,353 – 1,020	0,058
Génótipo CT	27 (25,5%)	25 (21%)	0,778	0,418 – 1,448	0,428
Génótipo TT	14 (13,2%)	36 (30,3%)	2,850	1,437 – 5,654	0,002

3. ANÁLISE DO POLIMORFISMO ECA 1

Relativamente ao polimorfismo ECA 1, na tabela 6 encontra-se a distribuição dos génotipos por controlo e pacientes tanto de cancro de colo do útero como de leiomiomas. Para este polimorfismo, foi efectuada um teste *qui*-quadrado (χ^2) para testar se as populações se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg: nenhuma das

três populações de mulheres – controlo ($\chi^2= 7.440$ e $p= 0.006$), com patologia do colo do útero ($\chi^2= 5.710$ e $p= 0.016$) e com leiomiomas ($\chi^2 = 6.140$ e $p = 0.013$) – se encontra em equilíbrio.

Relativamente às frequências alélicas, estas são constituídas maioritariamente pela variante com deleção (D) em todas as 3 populações, controlos, cancro do colo do útero e leiomiomas, sendo de 72,5%, 73% e 72,1%, respectivamente. Não existe tendência para uma diferença significativa entre os valores alélicos das populações, tanto de mulheres com cancro do colo do útero ($\chi^2= 0,001$; $p= 0,999$), como de mulheres com leiomiomas ($\chi^2= 0,000$, $p= 0.999$).

Tabela 6. Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo ECA 1 em mulheres controlo, com patologia do colo do útero e com leiomiomas.

	Total	DD	ID	II	p^a	Alelo D	Alelo I	p^b
	N	N (%)	N (%)	N (%)		N (%)	N (%)	
Cancro do colo	100	58 (58%)	30 (30%)	12 (12%)	0,517	73 (73%)	27 (27%)	0,999
Controlos	100	58 (58%)	29 (29%)	13 (13%)		72,5 (72,5%)	27,5 (27,5%)	
Leiomiomas	102	58 (56,9%)	31 (30,4%)	13 (12,7%)	0,977	73,5 (72,1%)	28,5 (27,9%)	0,999

^a valor da significância do teste χ^2 para os genótipos; nível de significância de 0.05

^b valor da significância do teste χ^2 para os alelos; nível de significância de 0.05

Realizou-se o teste *qui* quadrado (χ^2) comparando as frequências genótípicas dos dois grupos de populações (cancro do colo do útero vs controlos; leiomiomas vs controlos), e observou-se que não existe diferença estatisticamente significativa tanto entre as mulheres controlo e as com patologia do colo do útero ($\chi^2= 1,321$ e $p = 0.517$), nem entre mulheres controlo e com leiomiomas ($\chi^2= 0,047$ e $p= 0.977$).

Efectuamos um teste de associação entre estes genótipos e a actividade do ECA, na população de mulheres controlo e na de mulheres com cancro do colo do útero, uma vez que esta actividade foi determinada num estudo anterior. Os resultados obtidos não indicam a existência de qualquer associação significativa na comparação da distribuição dos valores da actividade do ECA pelos genótipos da mesma, tanto na população de mulheres com cancro do colo do útero ($p= 0,451$) como na população de mulheres controlo ($p= 0,575$) (Tabela suplementares 1 e 2 – Anexo A).

4. ANÁLISE DO POLIMORFISMO DA HAPTOGLOBINA

No que diz respeito ao polimorfismo da haptoglobina, observou-se que no grupo controlo as frequências dos fenótipos 1.1, 2.1 e 2.2 foram, respectivamente 16,7%, 46,9% e 36,5%. Foi efectuado um teste *qui*-quadrado (χ^2) para testar se esta população se encontrava em equilíbrio de Hardy-Weinberg, tendo-se observado que, para este polimorfismo, a população se encontra em equilíbrio ($\chi^2= 0.060$ e $p= 0.806$).

Na tabela 7 observa-se a distribuição dos fenótipos por controlo e pacientes tanto de cancro de colo do útero como de leiomiomas. Neste polimorfismo, a população de mulheres com cancro do colo do útero encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, relativamente a este polimorfismo ($\chi^2= 1$ e $p= 0.317$), assim como a população de mulheres com leiomiomas ($\chi^2= 0.000$ e $p= 0.997$).

Dentro deste grupo, as frequências alélicas são constituídas maioritariamente pelo alelo 2 na população controlos e na população de mulheres com cancro do colo do útero, sendo de 59,1% e 62,5%, respectivamente; na população de mulheres com leiomiomas, as frequências alélicas são constituídas maioritariamente pelo alelo 1, sendo de 52,3%. Não existe uma diferença significativa entre os valores alélicos das populações, tanto de mulheres com cancro do colo do útero ($\chi^2= 0,098$; $p= 0,754$), como de mulheres com leiomiomas ($\chi^2= 3,150$, $p= 0,076$).

Tabela 7. Frequências fenotípicas e alélicas da Hp em mulheres controlo, com patologia do colo do útero e com leiomiomas

	Total	1.1	2.1	2.2	p^a	Alelo 1	Alelo 2	p^b
	N	N (%)	N (%)	N (%)		N (%)	N (%)	
Cancro do colo	52	9 (17,3%)	21 (40,4%)	22 (42,3%)	0,731	19,5 (37,5%)	32,5 (62,5%)	0,754
Controlos	96	16 (16,7%)	45 (46,9%)	35 (36,5%)		38,5 (40,1%)	57,5 (59,1%)	
Leiomiomas	44	12 (27,3%)	22 (50%)	10 (22,7%)	0,171	23 (52,3%)	21 (47,7%)	0,076

^a valor da significância do teste χ^2 para os genótipos; nível de significância de 0.05

^b valor da significância do teste χ^2 para os alelos; nível de significância de 0.05

Realizou-se o teste *qui* quadrado (χ^2) comparando os dois grupos de populações (HPV vs controlos; leiomiomas vs controlos), e observou-se que não existe diferença estatisticamente significativa tanto no grupo cancro do colo do útero ($\chi^2= 0,626$ e $p = 0,731$), como no grupo leiomiomas ($\chi^2= 3,528$ e $p = 0.171$).

5. ANÁLISE DA ACTIVIDADE DA EPINEFRINA OXIDASE

Inicialmente estudou-se a normalidade da variável Actividade da Epinefrina Oxidase (EO) para a população Total (controlo + doentes). Observa-se então que a variável EO apresenta uma distribuição não normal ($p= 0,00001$). Observou-se que parte da população usada como controlo para a análise da actividade da EO (129 indivíduos) tem como média de actividade da EO $0,314\pm 0,163 \mu\text{M/h}$. No caso da população de mulheres com patologia do colo do útero (51 indivíduos), observou-se que esta apresenta uma distribuição normal ($p= 0,200$) e tem como média de actividades da EO $0,345\pm 0,122 \mu\text{M/h}$. No caso da população de mulheres com leiomiomas (44 indivíduos), observou-se que esta apresenta uma distribuição normal ($p= 0,200$) e tem como média de actividades da EO $0,156\pm 0,069 \mu\text{M/h}$.

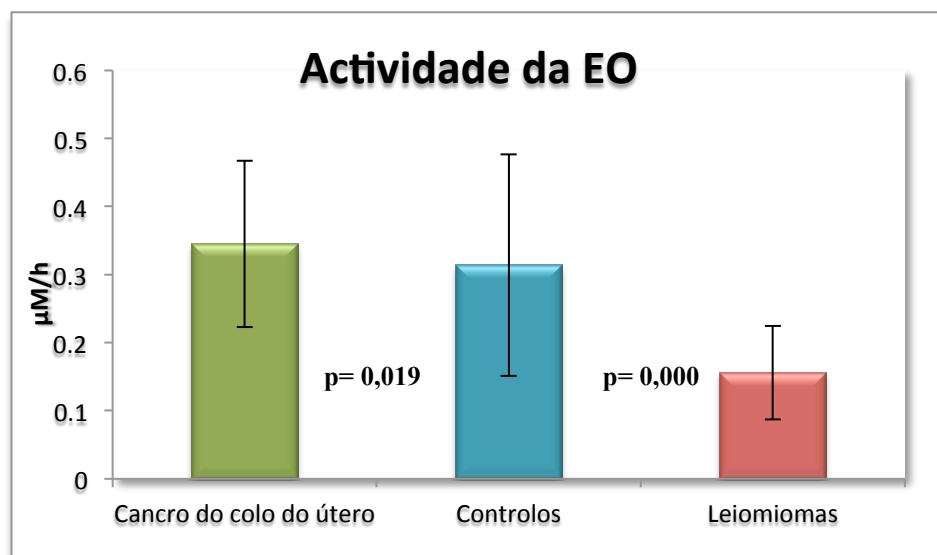


Figura 10. Actividades da EO nas populações controlo, e em mulheres com patologia do colo do útero e com leiomiomas.

Para fazer a comparação entre as médias da actividade da EO entre as populações controlo e doentes, e perceber se existem diferenças significativas entre estas, efectuou-se um teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. Os resultados obtidos demonstram diferenças significativas entre as populações no que respeita às médias de actividade da EO entre a população de mulheres controlo e mulheres com patologia do colo do útero. ($p= 0,019$) e, também entre a população de mulheres controlo e as mulheres com leiomiomas ($p= 0,000$).

6. ANÁLISE DO DOSEAMENTO DE GSH

Inicialmente estudou-se a normalidade das variáveis: concentração de GSht, GSSG e a razão GSht:GSSG, para a população Total (controles + doentes com cancro do colo do útero). Observou-se então que as variáveis GSht e a razão GSht:GSSG apresentam uma distribuição normal (ambas $p=0,200$), mas a variável GSSG não apresenta uma distribuição normal ($p=0,000$). Desta forma efectuou-se uma análise descritiva de modo a saber a média de GSht, GSSG e a razão entre ambos, para as populações controlo e doentes. Observou-se que a população usada como controlo (46 indivíduos) tem como médias: $32,332\pm 12,219 \mu\text{M}$ para o GSH, $5,386\pm 2,355 \mu\text{M}$ para o GSSG e $6,598\pm 3,308 \mu\text{M}$ para a razão GSht:GSSG. No caso da população de mulheres com patologia do colo do útero (39 indivíduos), temos as médias: $30,779\pm 10,768 \mu\text{M}$ para o GSH (Figura suplementar 7 – Anexo A), $3,413\pm 0,830 \mu\text{M}$ para o GSSG (Figura Suplementar 8 – Anexo A) e $9,263\pm 3,160 \mu\text{M}$ para a razão GSht:GSSG (Figura 11).

Para fazer a comparação entre as médias das concentrações entre as populações controlo e doentes, e perceber se existem diferenças significativas entre estas, efectuou-se um teste paramétrico *T-Student* para as variáveis normais e um teste não-paramétrico *Mann-Whitney* para a variável não normal. Os resultados obtidos não demonstram diferença significativa entre as populações de mulheres controlo e de mulheres com patologia do colo do útero para a variável GSht ($p=0,968$), mas apresentam diferenças significativas para as variáveis GSSG e razão GSht:GSSG ($p=0,000$ para ambas).

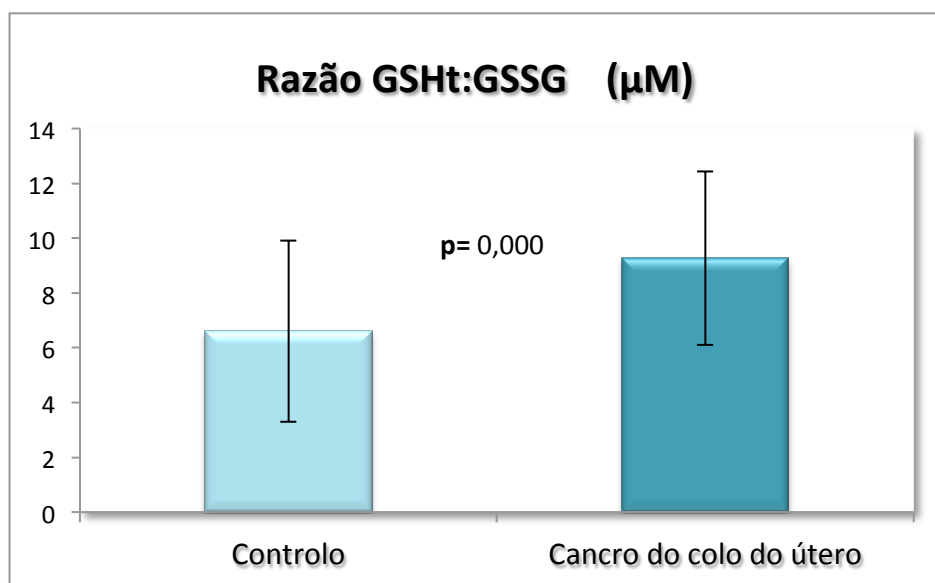


Figura 11. Razão GSht:GSSG nas populações controlo e em mulheres com patologia do colo do útero.

DISCUSSÃO

As neoplasias são caracterizadas por proliferação exagerada e descontrolada das células que perdem a capacidade de se diferenciar assim como de sofrerem um processo de apoptose devido a alterações genéticas e celulares. As neoplasias do útero podem ser benignas, como é o caso dos leiomiomas, ou malignas, como caso do cancro do colo do útero (Einstein et al., 2009; Flake, Andersen, & Dixon, 2002). Devido ao facto de estas neoplasias ginecológicas terem uma prevalência elevada, faz sentido entender alguns mecanismos moleculares e genéticos possivelmente responsáveis pela etiopatogenia destas situações.

As espécies reactivas de oxigénio (ROS) mostraram ter um papel como moléculas mensageiras reguladoras da expressão génica, induzindo modificações proteicas, proliferação, diferenciação e migração celular, entre outras (Lambeth, 2007; Mesquita et al., 2010). O seu papel na tumorigénese já foi investigado mostrando a existência de uma regulação anormal das ROS nesta e em outras patologias. As células normais possuem um vasto sistema de defesa antioxidante que serve de prevenção ao stresse oxidante e ao desenvolvimento de neoplasias.

É importante sublinhar que 70% das mulheres da população controlo utilizada neste estudo são obesas, alterando o equilíbrio desta população. O facto de uma população não se encontrar em equilíbrio de Hardy-Weinberg pode indicar que não existe uma distribuição aleatória dos genótipos, não sendo possível inferir com certeza acerca dos dados (Hung et al., 2004).

As NADPH-oxidases são a maior fonte não-mitocondrial de ROS. Estas são complexos multiproteicos associados à membrana que produzem superóxido (O_2^-) (Babior, 1999; Sardina et al., 2010; Schächinger et al., 2001). A subunidade **p22phox** está relacionada com a quantidade de superóxido produzida nas células; se esta componente for inibida, a produção de O_2^- é diminuída (Wyche et al., 2004).

Sabe-se que o polimorfismo C242T provoca uma substituição não sinónima com alteração do resíduo de histidina -72 a tirosina. No entanto, o papel do alelo 242T ainda não foi clarificado: Guzik *et al.* afirma que este está associado a uma actividade

reduzida da NADPH oxidase, havendo assim menos produção de ROS, pelo contrário, Schreiber *et al.* descreve uma actividade aumentada da oxidase, resultando numa maior produção de ROS. Existem vários estudos no sentido de caracterizar e relacionar este polimorfismo com outras patologias, no entanto a associação deste com tumores ginecológicos não é ainda conhecida. Comparando as frequências obtidas neste estudo com estudos semelhantes, verifica-se no que diz respeito às frequências genótípicas da população controlo serem semelhantes às apresentadas por Vlachopoulos *et al.* em 2012 numa população grega, sendo elas de 33,5% CC, 51,6% CT e 15% TT, e também às apresentadas por Najafi *et al.*, também em 2012, numa população Iraniana, sendo elas de 35,3% CC, 47,1% CT e 17,6% TT.

Um dos objectivos deste trabalho foi determinar se o polimorfismo C242T do gene CYBA está associado com a susceptibilidade de desenvolvimento de tumores ginecológicos. Uma vez que se obteve uma diferença significativa na distribuição dos genótipos ($p= 0,017$) e a análise de risco mostrou um risco associado ao genótipo CC e TT (OR= 1,692 e OR= 2,983), por outro lado, a análise de risco mostrou que o genótipo CT actua como um factor protector (OR= 0,486), a este fenómeno chamamos de heterose. A heterose molecular pode ser baseada numa curva de resposta em U, onde há um alelo com muita actividade e outro com pouca actividade (Comings & MacMurray, 2000). Neste caso, o genótipo homocigótico CC provoca um aumento de produção de ROS, que por sua vez resulta num crescimento celular excessivo, por outro lado o genótipo homocigótico TT baixa a produção de ROS, diminuindo a capacidade apoptótica celular, havendo um risco elevado para o desenvolvimento de neoplasias em ambos os casos. Este fenómeno torna o genótipo heterocigótico CT um factor protector da neoplasia. Assim, podemos sugerir que o estudo demonstra uma relação entre o polimorfismo e o desenvolvimento do cancro do colo do útero. O mesmo não acontece relativamente ao desenvolvimento de leiomiomas, onde não se obteve uma diferença significativa na distribuição dos genótipos entre a população de mulheres com leiomiomas e a controlo ($p= 0,186$), no entanto existe uma diferença significativa em termos de frequências alélicas ($p= 0,017$), para a qual foi efectuada a análise de risco que mostrou haver risco associado ao alelo C (OR= 1,291) mas, uma vez que o *p-value* não é estatisticamente significativo ($p>0,05$), não podemos considerar este resultado como relevante.

A **catalase** participa em mecanismos de defesa contra o stress oxidativo, controlando a concentração intracelular de peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Sabe-se que o polimorfismo CAT 262C/T, mais especificamente a variante T, foi associado com uma actividade diminuída da enzima, gerando um nível elevado de ROS (Fabre et al., 2008; Funke et al., 2009). A importância da catalase para uma série de patologias, relacionadas com a sua má função, já foi estabelecida (Chelikani et al., 2005).

Ainda não é conhecida a associação deste polimorfismo com tumores ginecológicos, portanto não podemos comparar os resultados com outros estudos, podemos no entanto comparar frequências genóticas da população controlo. Komina *et al.* verificou em 2012, numa população Russa, que as frequências genóticas de dadores saudáveis eram de 69% CC, 25% CT e 6%TT. Abu-Amero *et al.*, em 2013, verificou que numa população controlo Saudita, as frequências genóticas eram 71,7% CC, 25,6% CT e 2,7% TT; ambos os estudos têm frequências semelhantes às obtidas neste estudo.

O objectivo deste trabalho relativamente ao polimorfismo 262C/T da CAT foi determinar se existe uma associação entre este e o desenvolvimento de tumores ginecológicos. Obtivemos uma diferença significativa na distribuição dos genótipos ($p=0,009$) entre o polimorfismo e o desenvolvimento do cancro do colo do útero, e a análise de risco mostrou uma tendência para risco associado ao alelo T ($OR=1,964$). Por outro lado, não acontece o mesmo relativamente ao desenvolvimento de leiomiomas, onde não se obteve uma diferença significativa na distribuição dos genótipos entre a população de mulheres com leiomiomas e as controlo ($p=0,604$).

O **enzima conversor da angiotensina** (ECA) já foi implicado na patogénese de vários cancros, como o cancro do pulmão, da mama, da próstata, cancro gástrico e oral (Haiman et al.,2003; Vairaktaris et al.,2007, Yigit et al., 2007). A sua expressão está alterada em vários destes cancros e, quando a sua actividade é inibida esta suprime o crescimento tumoral e a angiogénese *in vitro* e *in vivo* (Zhang et al., 2011).

Relativamente ao polimorfismo de inserção ou deleção, tivemos como objectivo estudar a existência de associação entre este e o desenvolvimento de cancro do colo do útero e, também, o desenvolvimento de leiomiomas uterinos. Já foi investigada a associação entre o polimorfismo ECA 1 e o risco de desenvolvimento de cancro (Pei & Li, 2012) não tendo sido encontrada nenhuma associação significativa e,

semelhantemente ao presente estudo, não foi encontrada qualquer associação entre este polimorfismo e o desenvolvimento dos tumores ginecológicos em estudo.

A **haptoglobina** (Hp) é uma glicoproteína de fase aguda que serve de biomarcador a várias patologias (Langlois & Delanghe, 1996; Mahmud et al., 2007), e possui um polimorfismo genético que provoca uma variação interindividual nas suas funções de regulação da imunidade inata e adquirida, assim como da capacidade e intensidade angiogénica (Bicho, 2011).

Estudo *in vitro* e *in vivo* estabeleceram que o fenótipo Hp 1.1 tem maior capacidade de resistir ao stresse oxidante celular, em comparação ao fenótipo Hp 2.2 (Melamed-Frank, 2001; Quaye, 2008). Em outros estudos, o alelo Hp1 está sobre representado em casos de cancro da mama, do ovário, da bexiga e do pulmão (Bicho et al., 2013), o que mostra que este fenótipo pode estar relacionado com o desenvolvimento desta patologia.

Tivemos como objectivo determinar se existe uma associação entre o fenótipo da Hp e o desenvolvimento de tumores ginecológicos. No caso de uma população de mulheres Canadianas HPV positivas existe uma diferença estatística entre estas e o seu grupo controlo, sendo que o fenótipo Hp 1.1 está associado a um maior risco de cancro do colo do útero (Mahmud et al., 2007). É de sublinhar que, apesar dos valores das frequências fenotípicas obtidas no grupo controlo de Mahmud *et al.* serem semelhantes às obtidas neste estudo – sendo elas 15,9% Hp 1.1, 46,6% Hp 2.1 e 37,4% Hp 2.2 – não verificamos qualquer associação entre os fenótipos da Hp e o desenvolvimento de patologia do colo do útero ($p= 0,731$). O mesmo acontece em relação ao estudo entre o grupo de mulheres controlo e mulheres com leiomiomas, onde não é evidente qualquer associação entre estas ($p= 0,171$). Estes resultados podem ser reflexo do tamanho da amostra.

As MAO-A, como a **epinefrina oxidase** (EO), estão localizados na membrana externa da mitocôndria e produzem grandes quantidades de ROS, através do processo de degradação de monoaminas, como é o caso da epinefrina. Quando os níveis de actividade da EO são elevadas, existe uma grande produção de H_2O_2 que aumenta a proliferação e hipertrofia celular (Kaludercic et al., 2011).

Foi demonstrado, em estudos prévios, que cerca de 67% dos pacientes com cancro tinham níveis de MAO-A estavam aumentados, o que mostrou que este enzima

pode ser considerado um biomarcador ou até um factor associado ao desenvolvimento e proliferação de vários cancros (Fekkes et al., 2009; Rybaczyk, Bashaw, Pathak, & Huang, 2008).

No presente estudo, observamos diferenças estatísticas significativas entre as médias da actividade da EO em todas as populações - mulheres com patologia do colo do útero vs mulheres controlo ($p= 0,019$) e mulheres com leiomiomas vs mulheres controlo ($p= 0,000$). Apesar de no caso das mulheres com cancro do colo do útero a média da actividade da EO ser superior à da população controlo, a população de mulheres com leiomiomas está de acordo com o estudo de Rybaczyk *et al.*, em que a média de actividade da EO nas pacientes é inferior às mulheres controlo. Deste modo, parece existir uma associação entre a actividade de EO e a existência destas patologias ginecológicas, sendo que a actividade da EO poderá ser um biomarcador das mesmas.

O **glutationo** (GSH) tem um papel importante dentro dos sistemas enzimáticos que mantêm o balanço REDOX intracelular, pois este participa em mecanismos de defesa antioxidantes e em vários processos metabólicos (Traverso et al., 2013).

O GSH já é conhecido com um factor de quimioresistência em células cancerígenas há algum tempo (Du, Zhang, Meng, Guan, & Wang, 2009). Já foram observados níveis elevados de GSH em vários tumores, como no cancro do fígado, da mama e no melanoma metastático, onde o status de GSH foi correlacionado com o crescimento e, foi também demonstrado que existe uma associação directa entre o nível de GSH e a proliferação celular e a actividade metastática (Traverso et al., 2013; Yeh et al., 2006). Du *et al.*, mostrou também que baixos níveis de GSH podem sensibilizar as células malignas para os efeitos apoptóticos dos químicos.

Neste estudo observamos uma diferença estatística entre as médias da razão GSHt:GSSG, entre a população de mulheres controlo e as mulheres com patologia do colo do útero ($p= 0,000$). Deste modo, parece existir uma associação entre a concentração plasmática de GSH e a existência deste tumor ginecológico maligno. Esta análise não foi efectuada na população de mulheres com leiomiomas por insuficiência de amostras.

CONCLUSÃO

O principal objectivo deste trabalho incidiu no estudo da contribuição genética de polimorfismos genéticos dos *p22phox*, CAT, ECA 1 e Hp e dos biomarcadores circulantes EO e GSH no desenvolvimento de tumores ginecológicos benignos (leiomiomas) e malignos (cancro do colo do útero).

Este estudo apresenta a hipótese de que uma maior concentração intracelular de ROS proveniente de uma fraca defesa antioxidante, resultante de polimorfismos em genes de enzimas com funções antioxidantes ou de produção de ROS, traduzir-se num maior risco de desenvolvimento de neoplasias.

No que diz respeito ao cancro do colo do útero, esta hipótese é suportada pelos resultados obtidos no presente estudo, onde se verificou que:

- O genótipo CC e TT do polimorfismo CYBA C242T e o genótipo TT do polimorfismo CAT 262C/T estão associados a uma maior susceptibilidade a esta patologia, existe, também, uma heterose no polimorfismo CYBA C242T, conferindo uma protecção para esta patologia;

- Os níveis de actividade da EO e as concentrações plasmáticas de GSH apresentam uma diferença estatística significativa em relação aos controlos, o que significa que estes podem servir como biomarcadores do cancro do colo do útero.

Em relação à população de mulheres com leiomiomas, verificamos que:

- O alelo C do polimorfismo CYBA C242T está associado a uma maior susceptibilidade a desenvolver leiomiomas;

- Os níveis de actividade da EO apresentam uma diferença estatística significativa em relação aos controlos, o que significa que estes podem servir como biomarcadores para esta patologia.

No entanto, são necessários estudos mais abrangentes em termos clínicos e estatísticos, nomeadamente um aumento do número de doentes de modo a melhorar o poder da amostra e, consequentemente conseguir obter dados mais representativos.

No caso do polimorfismo ECA 1 e da Hp não foi possível estabelecer qualquer relação entre estes e qualquer uma das patologias em estudo.

É importante salientar que, até à data, não está publicado qualquer estudo, referente à população portuguesa, que relacione os polimorfismos *p22phox*, CAT e ECA1 com estes tumores ginecológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd Alla, J., El Faramawy, Y., & Quitterer, U. (2013). Microarray gene expression profiling reveals antioxidant-like effects of angiotensin II inhibition in atherosclerosis. *Frontiers in physiology*, 4(June), 148.
- Abu-Amero, K. K., Azad, T. A., Mousa, A., Osman, E. a, Sultan, T., & Al-Obeidan, S. a. (2013). A catalase promoter variant rs1001179 is associated with visual acuity but not with primary angle closure glaucoma in Saudi patients. *BMC medical genetics*, 14(1), 84.
- Adak, S., Bandyopadhyay, U., Bandyopadhyay, D., & Banerjee, R. K. (1998). Mechanism of horseradish peroxidase catalyzed epinephrine oxidation: obligatory role of endogenous O₂- and H₂O₂. *Biochemistry*, 37(48), 16922–33.
- Al-Hendy, A., & Salama, S. (2006). Gene therapy and uterine leiomyoma: a review. *Human reproduction update*, 12(4), 385–400.
- Au, W. W. (2004). Life style, environmental and genetic susceptibility to cervical cancer. *Toxicology*, 198(1-3), 117–20.
- Babior, B. M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood*, 93(5), 1464–76.
- Baumgarten, A. (1963) Micro method of haptoglobin typing using acrylamide gels. *Nature* 199: 490-1.
- Bedard, K., & Krause, K. (2007). The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases : Physiology and Pathophysiology. *Physiology Rev*, 87, 245–313.
- Behrend, L., Henderson, G., Zwacka, R. M. (2003). Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochemical Society Transactions*, Vol 31, part 6.
- Bicho, Maria Clara Gomes: Contribuição para o Estudo e Biomarcadores e Co-factores no Cancro do Colo do Útero, Porto: [s.n], 2011. Tese de Doutoramento
- Bicho, M. C., Silva, A. P., Medeiros, R., Bicho, M. (2013) The Role of Haptoglobin and Its Genetic Polymorphism in Cancer: A Review, *Acute Phase Proteins*, Prof. Sabina Janciauskiene (Ed.), ISBN: 978-953-51-1185-6, InTech.
- Blake, R. E. (2007). Leiomyomata uteri: hormonal and molecular determinants of growth. *Journal of the National Medical Association*, 99(10), 1170–84.
- Chang, D., Hu, Z. L., Zhang, L., Zhao, Y. S., Meng, Q. H., Guan, Q. B., Zhou, J., Pan, H. Z. (2012). Association of catalase genotype with oxidative stress in the predication of colorectal cancer: modification by epidemiological factors. *Biomedical and environmental sciences* : 25(2), 156–62.

- Chelikani, P., Ramana, T., & Radhakrishnan, T. M. (2005). Catalase: A repertoire of unusual features. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, 20(2), 131–5.
- Comings, D.E., MacMurray, J. P. (2000) Molecular Heterosis: A Review. *Molecular Genetics and Metabolism*: 71, 19-31.
- Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical science (London, England : 1979)*, 110(5), 525–41.
- Du, Z., Zhang, H., Meng, X., Guan, Y., & Wang, Q. (2009). Role of oxidative stress and intracellular glutathione in the sensitivity to apoptosis induced by proteasome inhibitor in thyroid cancer cells. *BMC cancer*, 9(56).
- Einstein, M. H., Schiller, J. T., Viscidi, R. P., Strickler, H. D., Coursaget, P., Tan, T., Halsey, N., Jenkins, D. (2009). Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns. *The Lancet infectious diseases*, 9(6), 347–56.
- Fabre, E., Raynaud-Simon, A., Golmard, J., Hebert, M., Dulcire, X., Succari, M., Myara, J., Duran, D., Nivet-Antoine, V. (2008). Gene polymorphisms of oxidative stress enzymes : prediction of elderly renutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, (4), 1504–1512.
- Fanelli, C., & Zatz, R. (2011). Linking oxidative stress, the renin-angiotensin system, and hypertension. *Hypertension*, 57(3), 373–4.
- Fekkes, D., Van Gool, A., Bannink, M., Sleijfer, S., Kruit, W., van der Holt, B., Eggermont, A., Hendeveld, M., Stoter, G. (2009). Nitric oxide production and monoamine oxidase activity in cancer patients during interferon- a therapy. *Amino Acids*, 37, 703–708.
- Flake, G. P., Andersen, J., & Dixon, D. (2002). Etiology and Pathogenesis of Uterine Leiomyomas: A Review. *Environmental Health Perspectives*, 111(8), 1037–1054.
- Fruehauf, J. P., & Meyskens, F. L. (2007). Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(3), 789–94.
- Funke, S., Risch, A., Nieters, A., Hoffmeister, M., Stegmaier, C., Seiler, C. M., Brenner, H., Chang-Claude, J. (2009). Genetic Polymorphisms in Genes Related to Oxidative Stress (GSTP1, GSTM1, GSTT1, CAT, MnSOD, MPO, eNOS) and Survival of Rectal Cancer Patients after Radiotherapy. *Journal of cancer epidemiology*, 2009, 302047.
- Glantz, S. A. (2002) *Primer of biostatistics* (Fifth Edition ed.). USA: McGraw-Hill - Medical Publishing Division.

- Gorin, Y., & Block, K. (2013). Nox as a target for diabetic complications. *Clinical science*, 125(8), 361–82.
- Guzik, T. J., West, N. E. J., Black, E., McDonald, D., Ratnatunga, C., Pillai, R., & Channon, K. M. (2000). Functional Effect of the C242T Polymorphism in the NAD(P)H Oxidase p22phox Gene on Vascular Superoxide Production in Atherosclerosis. *Circulation*, 102(15), 1744–1747.
- Haiman, C., Henderson, S., Bretsky, P., Kolonel, L., Henderson, B. (2003) Genetic variation in angiotensin I-converting enzyme (ACE) and breast cancer risk: the multiethnic cohort. *Cancer Res*, 63: 6984-6987.
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American journal of medicine*, 91(3C), 14S–22S.
- Hamilton, N. a, Tammen, I., & Raadsma, H. W. (2013). Multi-species comparative analysis of the equine ACE gene identifies a highly conserved potential transcription factor binding site in intron 16. *PloS one*, 8(2), e55434.
- Hissin, P. J., Hilf, R. (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. 129. *Anal Biochem*, Jul;74(1):214-26.
- Houston, K. D., Hunter, D. S., Hodges, L. C., & Walker, C. L. (2001). Uterine Leiomyomas: Mechanisms of Tumorigenesis. *Toxicologic Pathology*, 29(1), 100–104.
- Hung, R. J., Boffetta, P., Brennan, P., Malaveille, C., Gelatti, U., Placidi, D., Carta, A.(2004) Genetic polymorphism of MPO, COMT, MnSOD, NQO1, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk. *Carcinogenesis*, 25(6), 973-8.
- Kaludercic, N., Carpi, A., Menabò, R., Di Lisa, F., & Paolocci, N. (2011). Monoamine oxidases (MAO) in the pathogenesis of heart failure and ischemia/reperfusion injury. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(7), 1323–32.
- Komina, a V, Korostileva, K. a, Gyrylova, S. N., Belonogov, R. N., & Ruksha, T. G. (2012). Interaction between single nucleotide polymorphism in catalase gene and catalase activity under the conditions of oxidative stress. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 61(6), 655–8.
- Khodayari, S., Salehi, Z., Fakhrieh Asl, S., Aminian, K., Mirzaei Gisomi, N., & Torabi Dalivandan, S. (2013). Catalase gene C-262T polymorphism: Importance in ulcerative colitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 28(5), 819–22.
- Lambeth, J. D. (2007). Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free radical biology & medicine*, 43(3), 332–47.

- Landmesser, U., & Drexler, H. (2003). Oxidative stress , the renin-angiotensin system , and atherosclerosis. *European Heart Journal Supplements*, 5(Supplement A), 3–7.
- Langlois, M. R., & Delanghe, J. R. (1996). Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clinical chemistry*, 42(10), 1589–600.
- Lahiri, D. K., Numberger, J. I. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW ADN from blood for 164. RFLP studies. *Nucleic Acid Research*
- M. Bortolato & J. Shih. (2011). Behavioral outcomes of monoamine oxidase deficiency: preclinical and clinical evidence. *International Review Neurobiology*, 100, 13–42.
- Mahmud, S. M., Koushik, A., Duarte-Franco, E., Costa, J., Fontes, G., Bicho, M., Coutlée, F., Franco, E. L. (2007). Haptoglobin phenotype and risk of cervical neoplasia: a case-control study. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 385(1-2), 67–72.
- Manda, G., Nechifor, M. T., & Neagu, T.-M. (2009). Reactive Oxygen Species, Cancer and Anti-Cancer Therapies. *Current Chemical Biology*, 3(1), 342–366.
- Matthews R.G., Vanoni M. A, Hainfeld J. F., Wall J. (1984) 259. 11647-11650.9
- Melamed-Frank, M. (2001). Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. *Blood*, 98(13), 3693–3698.
- Mesquita, F. S., Dyer, S. N., Heinrich, D., Bulun, S. E., Marsh, E., Nowak, R. a. (2010). Reactive oxygen species mediate mitogenic growth factor signaling pathways in human leiomyoma smooth muscle cells. *Biology of reproduction*, 82(2), 341–51.
- Muñoz, N., Castellsagué, X., de González, A. B., & Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24 Suppl 3, S3/1–10.
- Najafi, M., Alipoor, B., Shabani, M., Amirfarhangi, A., & Ghasemi, H. (2012). Association between rs4673 (C/T) and rs13306294 (A/G) haplotypes of NAD(P)H oxidase p22phox gene and severity of stenosis in coronary arteries. *Gene*, 499(1), 213–7.
- Pan, J.-S. (2009). Reactive oxygen species: A double-edged sword in oncogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 15(14), 1702.
- Pei, X.-H., & Li, H.-X. (2012). Insertion/deletion (I/D) in the angiotensin-converting enzyme gene and breast cancer risk: lack of association in a meta- analysis. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 13(11), 5633–6.

- Pelicano, H., Carney, D., & Huang, P. (2004). ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 7(2), 97–110.
- Perea, E. J., Etiología de la infección VPH. En “Infección VPH en el Área Genital Clínica, diagnóstico y tratamiento” Ed Virgilio Palacio López, 2000:25-33.
- Quaye, I. K. (2008). Haptoglobin, inflammation and disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(8), 735–42.
- Reid, I. A., Morris, B. J., & Ganong, W. F. (1978). The Renin-Angiotensin System. *Ann. Rev. Physiol*, 40, 377–410.
- Regateiro, F. J., & Coimbra, H. A. (2001). Genetics of hereditary cervical cancer. *Journal of Gynecologic Oncology*, 6(19), 371–376.
- Rybaczuk, L. A., Bashaw, M. J., Pathak, D. R., & Huang, K. (2008). An indicator of cancer: downregulation of Monoamine Oxidase-A in multiple organs and species. *BMC genomics*, 9(134), 1–9.
- Sabry, M., & Al-Hendy, A. (2012). Medical treatment of uterine leiomyoma. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 19(4), 339–53.
- Sardina, J. L., López-Ruano, G., Sánchez-Abarca, L. I., Pérez-Simón, J. A., Gaztelumendi, A., Trigueros, C., Sánchez-Yague, J., Hernández-Hernández, A. (2010). p22phox-dependent NADPH oxidase activity is required for megakaryocytic differentiation. *Cell death and differentiation*, 17(12), 1842–54.
- Schächinger, V., Britten, M. B., Dimmeler, S., & Zeiher, a M. (2001). NADH/NADPH oxidase p22 phox gene polymorphism is associated with improved coronary endothelial vasodilator function. *European heart journal*, 22(1), 96–101.
- Schreiber, R., Ferreira-Sae, M. C., Ronchi, J. A., Pio-Magalhães, J. A., Cipolli, J. A., Matos-Souza, J. R., Mill, J. G., Vercesi, A. E., Krieger, J. E., Franchini, K. G., Pereira, A. C., Nadruz Junior, W. (2011). The C242T polymorphism of the p22-phox gene (CYBA) is associated with higher left ventricular mass in Brazilian hypertensive patients. *BMC medical genetics*, 12(1), 114.
- Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free radical biology & medicine*, 27(9), 916–921.
- Townsend, D. M., Tew, K. D., & Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(3-4), 145–155.
- Traverso, N., Ricciarelli, R., Nitti, M., Marengo, B., Furfaro, A. L., Pronzato, M. A., Marinari, U., Domenicotti, C. (2013). Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013.

- Ushio-fukai, M., Zafari, A. M., Fukui, T., Ishizaka, N., & Griendling, K. K. (1996). p22 phox Is a Critical Component of the Superoxide-generating NADH / NADPH Oxidase System and Regulates Angiotensin II- induced Hypertrophy in Vascular Smooth Muscle Cells. *the Journal of Biological Chemistry*, 271(38), 23317–23321.
- Vairaktaris, E., Yapijakis, C., Tsigris, C., Vassilou, S., Derka, S., Nkenke, E., Spyridonidou, S., Vylliotis, A., Vorriss, E., Ragos, V., *et al.* (2007) Association of angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism with increased risk for oral cancer. *Acta Oncol*, 46: 1097-1102.
- Vlachopoulos, C., Xaplanteris, P., Baou, K., Vassiliadou, C., Dima, I., Ioakeimidis, N., & Stefanadis, C. (2012). Common Single Nucleotide Polymorphisms of the p22phox NADPH Oxidase Subunit do not Influence Aortic Stiffness in Young, Healthy Adults. *Hellenic Journal of Cardiology*, 53, 352–356.
- Woodman, C. B. J., Collins, S. I., & Young, L. S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature reviews. Cancer*, 7(1), 11–22.
- Wu, G., Fang, Y., Yang, S., Lupton, J. R., & Turner, N. D. (2004). Recent Advances in Nutritional Sciences Glutathione Metabolism and Its Implications for Health 1. *The Journal of Nutrition*, (December 2003), 489–492.
- Wu, W.-S. (2006). The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer metastasis reviews*, 25(4), 695–705.
- Wyche, K. E., Wang, S., Griendling, K., Dikalov, S., Austin, H., Rao, S., Fink, B., Harrison, D., Zafari, M. (2004). C242T CYBA polymorphism of the NADPH oxidase is associated with reduced respiratory burst in human neutrophils. *Hypertension*, 43(6), 1246–51.
- Yeh, C., Hou, M., Wu, S., Tsai, S., Lin, S., Hou, L., Ma, H., Tsai, L. (2006) Study of glutathione status in the blood and tissues of patients with breast cancer. *Cell biochemistry an function*, Volume 24:6 555-559.
- Yigit, B., Bozhurt, N., Narter, F., Yilmaz, H., Yucebas, E., Isbir, T. (2007) Effects of ACE I/D polymorphism on prostate cancer risk, tumor grade and metastasis. *Anticancer Res*, 27: 933-936
- Zhang, Y., He, J., Deng, Y., Zhang, J., Li, X., Xiang, Z., Huang, H., Tian, C., Huang, J., Fan, H. (2011). The insertion/deletion (I/D) polymorphism in the Angiotensin-converting enzyme gene and cancer risk: a meta-analysis. *BMC medical genetics*, 12(1), 159.

ANEXOS

Anexo A – Figuras e tabelas suplementares

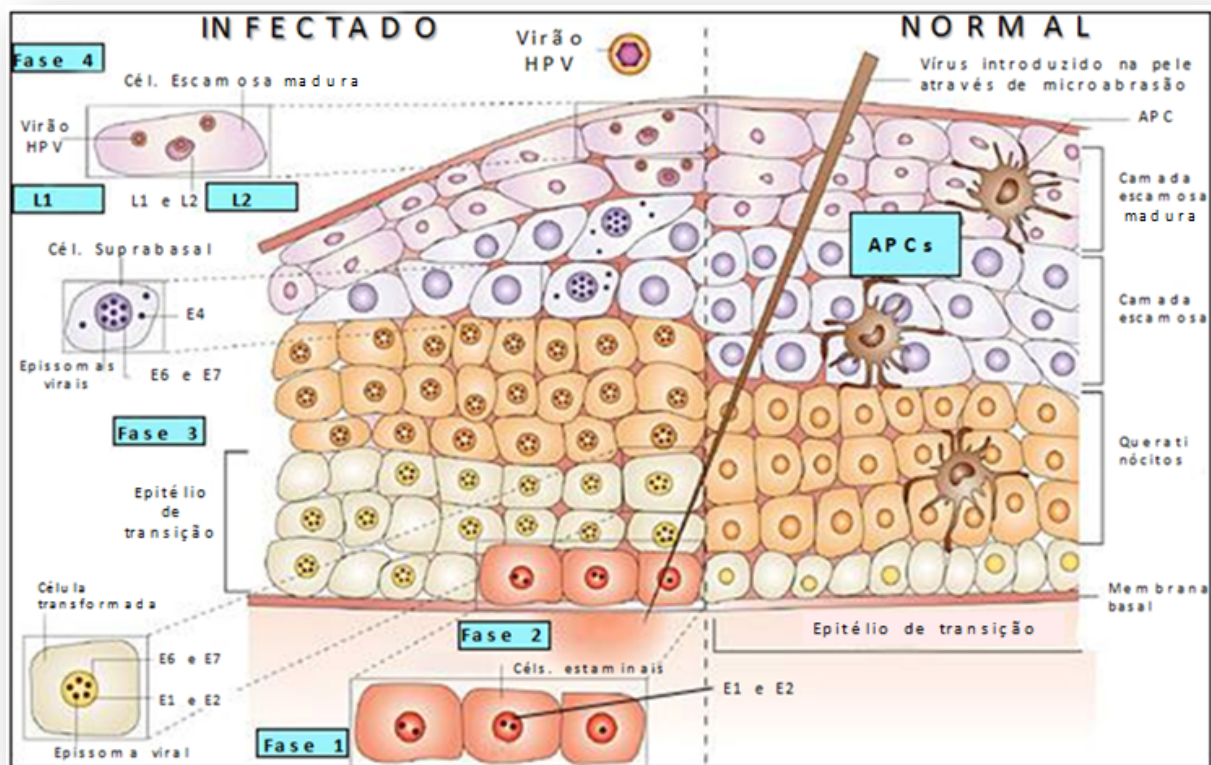


Figura Suplementar 1. Ciclo de infecção do HPV. Fase 1 – Após infecção basal bem sucedida, o vírus expressa as proteínas E1 e E2, que servem para a replicação e manutenção do DNA viral como um epissoma circular; Fase 2 – As células estaminais basais na camada basal mantém o genoma do papiloma vírus durante décadas. O HPV pode permanecer nas células por tempo indefinido, em estado de latência, mas ocasionalmente produz sintomas ou doença se o sistema imunitário estiver debilitado; Fase 3 – Os oncogenes virais E6 e E7 promove o crescimento celular inativando as proteínas supressoras tumorais p53 e pRb. A expressão dos genes tardios, L1 e L2, é exclusiva das células basais assim que elas começam a dividir e se tornam cada vez mais diferenciadas nas camadas mais superficiais do epitélio; Fase 4 – Nas camadas superiores do epitélio, os genes L1 e L2 são transcritos/traduzidos e servem como proteínas estruturais para encapsidação do genoma viral. Os novos viriões são libertados através da descamação das células mortas do epitélio e, assim, o ciclo viral continua.

Adaptado de: Muñoz *et al.* (2006)

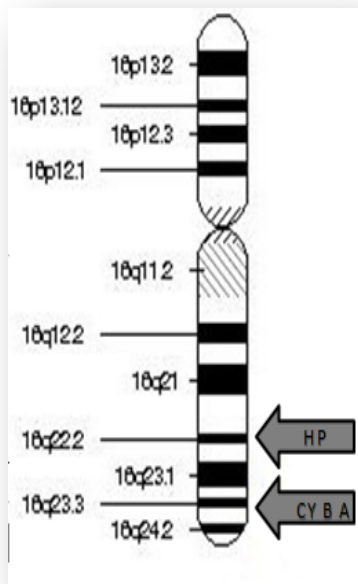


Figura Suplementar 2. Localização dos genes CYBA e HP no cromossoma 16.

Adaptado de: <http://ghr.nlm.nih.gov>

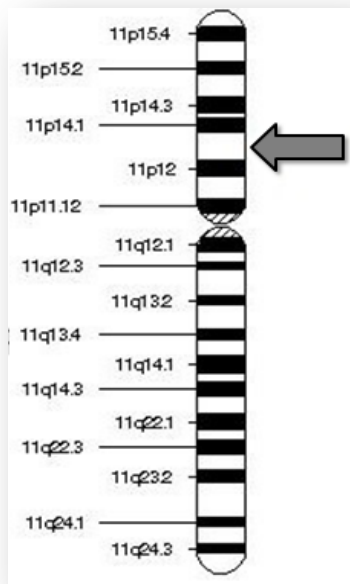


Figura Suplementar 3. Localização do gene CAT no cromossoma 11.

Adaptado de: <http://ghr.nlm.nih.gov>

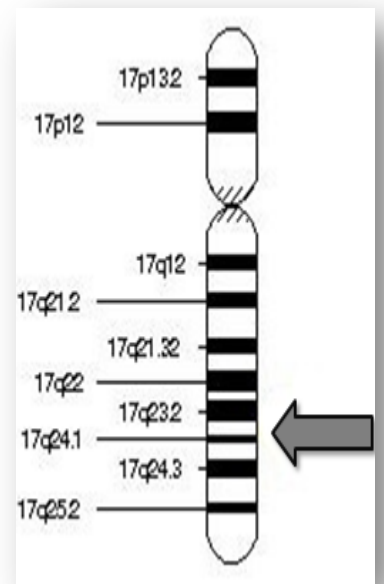


Figura Suplementar 4. Localização do gene ECA 1 no cromossoma 17.

Adaptado de: <http://ghr.nlm.nih.gov>

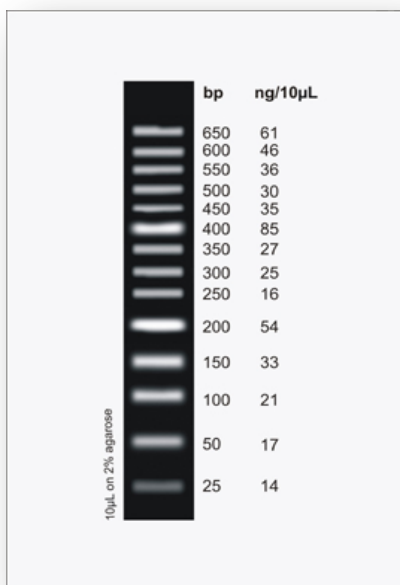


Figura Suplementar 5. DNA Ladder 50 bp.

Adaptado de <http://norgenbiotek.com>

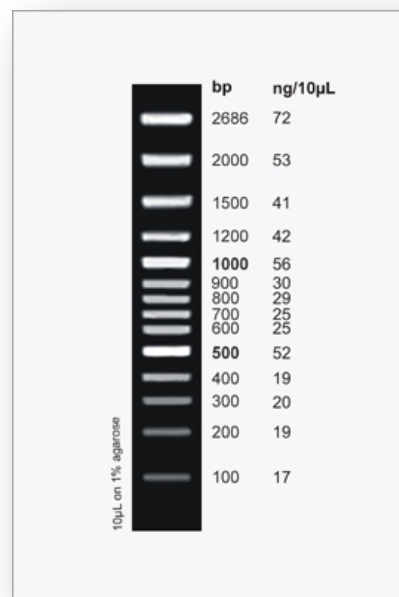


Figura Suplementar 6. DNA Ladder 100 bp.

Adaptado de <http://norgenbiotek.com>

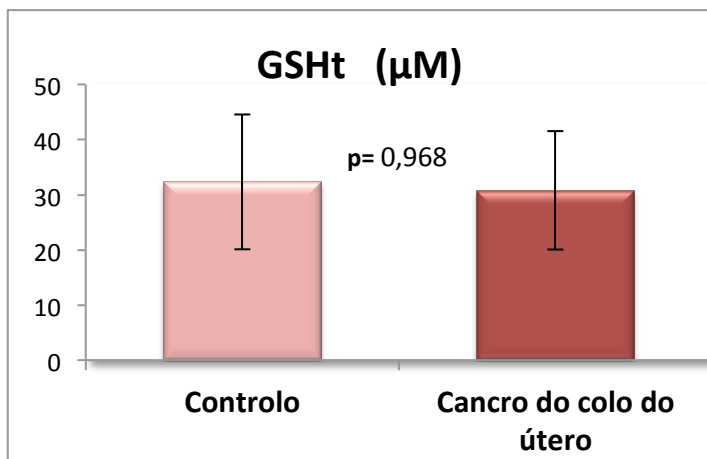


Figura Suplementar 7. Concentrações de GSH total nas populações controlo e em mulheres com patologia do colo do útero.

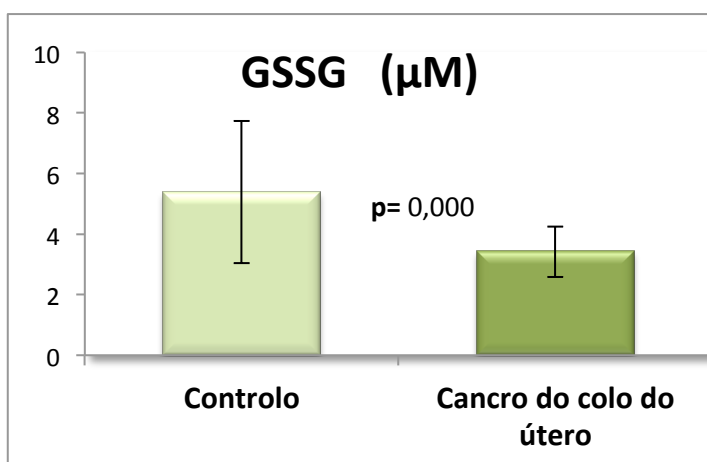


Figura Suplementar 8. Concentrações de GSSG nas populações controlo e em mulheres com patologia do colo do útero.

Tabela Suplementar 1. Associação entre os polimorfismos do ECA 1 e a actividade do enzima em mulheres controlo.

	N	Actividade do ECA (UI/L)		p*
		Média	Desvio Padrão	
DD	23	27,665	15,267	0,575
ID	12	23,742	8,789	
II	6	22,950	4,394	

*Nível de significância do ANOVA de 0,05

Tabela Suplementar 2. Associação entre os polimorfismos do ECA 1 e a actividade do enzima em mulheres com cancro do colo do útero.

	N	Actividade do ECA (UI/L)		p*
		Média	Desvio Padrão	
DD	7	20,629	5,234	0,451
ID	5	27,420	14,198	
II	2	26,700	3,111	

*Nível de significância do ANOVA de 0,05

Anexo B - Protocolos

Protocolo Experimental: Extração de DNA pelo método de *salting-out*

1. O sangue periférico é colhido num tubo com anticoagulante EDTA.
2. Transfere-se 2mL para um tubo rolhado e graduado de 10mL.
3. Adiciona-se 1 volume de TKM X-100 , por cada volume de sangue.
4. Adiciona-se 25mL de IPGEPAL CA 630 por cada mL de sangue; este componente lisa as células, libertando os componentes intra-celulares.
5. O tubo é agitado 4-5 vezes por inversão vigorosa.
6. Segue-se uma centrifugação a 2200rpm, à temperatura de aproximadamente 4°C, durante 15min, que deve ser repetida caso o *pellet* formado não adira ao fundo do tubo.
7. O sobrenadante é rejeitado. Conserva-se o *pellet* que contém, entre outros constituintes, DNA. Adiciona-se 1mL de tampão TKM 1 por cada mL de sangue.
8. Centrifuga-se à mesma temperatura, a 1600rpm e por um período de 10min, descartando-se o sobrenadante.
9. O passo anterior é repetido no máximo 2 vezes, de forma a obter um *pellet* branco, evitando assim perdas excessivas de DNA.
10. Ressuspende-se o *pellet* (vórtex) na solução TKM 2 numa proporção de 160µL de tampão por mL de sangue.
11. Adiciona-se 10µL de SDS 10% por mL de sangue e a mistura é ressuspendida com o auxílio de uma micropipeta. Este reagente dissolve as proteínas ainda existentes em solução.
12. Incuba-se a 55°C durante 10min.
13. Ao fim deste intervalo de tempo o conteúdo do tubo é transferido para um *ependorf* ao qual se adicionam 60µL de NaCl saturado por mL de sangue. Visualiza-se de imediato a precipitação de proteínas existentes na suspensão de DNA que formam uma fase branca opaca distinta de outra completamente transparente (suspensão de DNA); este tubo é agitado através do vórtex.
14. Centrifuga-se (centrífuga de *ependorfs*) a 1200rpm, à temperatura ambiente e por 30min (*salting-out*).
16. Verte-se o sobrenadante, que contém o DNA, resultante da centrifugação anterior para um tubo de vidro e adicionam-se 2 volumes de etanol absoluto gelado (colocado a -20°C, cerca de 5min antes de ser utilizado).
17. O tubo, devidamente selado, é invertido suavemente até precipitação do DNA.
18. Ressuspende-se o DNA em 200µL de tampão TE previamente colocados no tubo *ependorf* devidamente rotulado e armazena-se a 4°C.

Protocolo Experimental: Determinação da concentração plasmática de glutatióno total

A. Precipitação das proteínas

A 50 µl de plasma adicionaram-se 50 µl de ácido metafosfórico (25 % m/v) e 187,5 µl de tampão fosfato 0,1M-EDTA 0,005 M pH 8.0 num tubo de reacção de X µl. Centrifugaram-se os tubos a 8800 g durante 30 minutos à temperatura ambiente. Do sobrenadante obtido após a centrifugação, retiraram-se para um novo tubo de reacção de X µl, 50 µl para efectuar o doseamento do GSH reduzido e 50 µl para efectuar o doseamento do GSSG.

B. Determinação da concentração de GSH reduzido

Diluíram-se 50 µl de sobrenadante em 450 µl de tampão fosfato 0,1M - EDTA 0,005 M (pH 8.0), obtendo uma solução com uma diluição de 1/10, a ser utilizada no ensaio.

Para proceder à determinação do GSH reduzido colocaram-se 1900 µl Tampão Fosfato 0,1M - EDTA 0,005 M (pH 8.0) e 100 µl de *o*-ftaldialdeído (OPT) 1mg/ml em metanol num tubo de ensaio correspondente ao branco e 1800 µl Tampão Fosfato 0,1M - EDTA 0,005 M (pH 8.0), 100 µl de OPT e 100 µl de sobrenadante anteriormente diluído, em tubos de ensaio devidamente identificados para cada amostra.

Incubaram-se os tubos de ensaio durante 15 minutos à temperatura ambiente para que a reacção ocorresse e posteriormente procedeu-se à leitura espectrofluorimétrica a um comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) de 340 nm e comprimento de onda de emissão (λ_{em}) de 430 nm. Registaram-se os valores verificados.

C. Determinação da concentração de GSSG

Incubaram-se 50 µl do sobrenadante com 20 µl de N-etilmaleímida 0,04 M (NEM) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Diluiu-se a mistura efectuada anteriormente em 430 µl de NaOH 0,1 M, obtendo uma solução com uma diluição de 1/10.

Para proceder à determinação do GSSG colocaram-se 1900 µl de NaOH 0,1 M e 100 µl de OPT num tubo de ensaio correspondente ao branco e 1800 µl NaOH 0,1 M, 100 µl de OPT e 100 µl de sobrenadante anteriormente diluído, em tubos de ensaio devidamente identificados para cada amostra.

Incubaram-se os tubos de ensaio durante 15 minutos à temperatura ambiente para que a reacção ocorresse e posteriormente procedeu-se à leitura espectrofluorimétrica a um comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) de 340 nm e comprimento de onda de emissão (λ_{em}) de 430 nm. Registaram-se os valores.

D. Cálculo da curva de calibração de GSH e GSSG

Preparou-se uma solução padrão de GSH 5 µg/ml em tampão fosfato 0,1 M – EDTA 0,005 M, pH 8,0 e uma solução padrão de GSSG 5 µg/ml em NaOH 0,1 M. Quantidades conhecidas destas soluções foram adicionadas a 100 µl da solução OPT e o volume final ajustado para 2 mL com tampão de fosfatos-EDTA pH 8,0.

E. Cálculo da concentração plasmática de GSH total

Subtraiu-se o valor do branco (valor médio dos triplicados) a cada um dos ensaios.

Calcularam-se as concentrações de GSH e GSSG em µg/ml a partir das respectivas curvas de calibração, sabendo que:

$$C = \frac{A - b}{m}$$

sendo que, **b** é a ordenada na origem e **m** o declive da recta.

Os valores obtidos foram multiplicados pelo factor de diluição e convertidos de µg/ml a µmol/dm³.

