

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Animal



***Papel da Variação Polimórfica em Genes de
Proteínas da Via Oxidativa de Transformação
dos Estrogénios nos Leiomiomas Uterinos***

Rui Alberto dos Reis Martins
Dissertação
Mestrado em Biologia Humana e Ambiente
2014

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Animal



***Papel da Variação Polimórfica em Genes de
Proteínas da Via Oxidativa de Transformação
dos Estrogénios nos Leiomiomas Uterinos***

Dissertação para obtenção do grau de Mestre orientada por:

Professora Doutora Maria Clara Bicho, Faculdade de Medicina da Universidade de
Lisboa e Instituto de Medicina Molecular (IMM)

Professora Doutora Deodália Dias, Faculdade de Ciências da Universidade de
Lisboa (FCUL)

Rui Alberto dos Reis Martins
Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2014

:

O conteúdo desta tese de mestrado é da inteira responsabilidade do autor

Rui Alberto dos Reis Martins

Notas prévias

A escrita desta dissertação não segue as regras do novo acordo ortográfico da língua portuguesa.

A apresentação das figuras, tabelas e referências bibliográficas estão de acordo com o modelo de escrita seguido pela revista *Human Molecular Genetics*.

*“Antes pensávamos que o nosso futuro estava nas estrelas.
Agora sabemos que está nos nossos genes.”*

James Watson

Agradecimentos

A realização de um trabalho de investigação acarreta sempre muita disciplina, esforço e dedicação e após um ano de muito “stress”, dúvidas e inseguranças é com uma enorme satisfação e realização pessoal que vejo concluída esta etapa importante da minha formação académica.

Embora uma tese de mestrado, seja pela sua finalidade académica um trabalho individual, parte do seu sucesso e concretização deve-se ao contributo directo ou indirecto que várias pessoas e instituições providenciam na sua elaboração. Sem o seu apoio, incentivo e disponibilidade, este trabalho não teria sido possível. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos e profundo reconhecimento.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Professor Doutor Manuel Bicho e à Professora Doutora Maria Clara Bicho, pela oportunidade concedida ao me receberem como seu estagiário e por todo o entusiasmo demonstrado, dedicação, apoio e orientação prestados durante este trabalho de estágio.

À Professora Doutora Deodália Dias, por ter aceite ser a minha orientadora interna e por toda a atenção, dedicação e disponibilidade que sempre demonstrou desde o início do mestrado. Agradeço ainda a oportunidade e o privilégio que tive em frequentar este mestrado, e de uma forma geral a todos os professores do mestrado por toda a dedicação e novos conhecimentos transmitidos que contribuíram para o enriquecimento da minha formação académica e científica.

À Doutora Irina Alho por toda a paciência, disponibilidade e orientação prestada.

Ao pessoal do laboratório, Doutora Andreia Matos, Ângela Gil e Técnica Conceição Afonso pelo apoio técnico prestado e disponibilidade, e especialmente à Doutora Joana Ferreira por toda a paciência e dedicação inextinguíveis.

Ao Professor Doutor João Martins Pisco do Hospital Saint-Louis, pelo fornecimento das amostras de sangues das pacientes com leiomiomas e dados correspondentes, e pela disponibilidade demonstrada.

Ao instituto Rocha Cabral pelo financiamento parcial do projecto e pela cedência das instalações e equipamento necessários para desenvolver uma parte deste trabalho.

À Doutora Alda Pereira da Silva pelo apoio concedido na construção das bases de dados.

Às colegas de trabalho e de bancada, e agora amigas, Cindy Castelão, Ridhi Prabudhas e Stéphanie Castaldo, por toda a amizade, companheirismo, apoio, cooperação e momentos de descontração que me proporcionaram. Foi um prazer estar na vossa companhia durante este processo.

Às colegas Ana Correia, Ana Espinheira, Stephanie Barbosa, Janina Diogo e Sara Mota, pela amizade, apoio e por todos os momentos agradáveis que me proporcionaram ao longo do curso.

Aos meus pais e à minha princesa, por todo o carinho, apoio e preocupação. Mãe, és a maior força motriz da minha vida. Nunca pensei que me fosse custar assim tanto estar longe de casa e durante estes dois anos foram vários os momentos em que me faltou a motivação e simplesmente me apeteceu desistir, mas o teu amor e as tuas palavras de incentivo deram-me a força necessária para superar as minhas inseguranças e os momentos menos bons e continuar até ao fim.

Ao Rúben Andrade por me ter incentivado e dado o empurrão necessário para que eu me candidatasse ao mestrado. Apesar da distância, continuas sempre presente.

À Elisabete Pereira e à Elvira Vasconcelos, por todo o vosso carinho, amizade, apoio e preocupação. Fazem-me muita falta e tenho imensas saudades vossas.

Aos amigos Sandra Mendonça, Emanuel Barbeito, Minda Pereira, Dário Faria, Ricardo Lucas, Ricardo Gomes, Sandra Jesus, Eduardo Ramos, Domingos Gaspar, Murilo Guimarães, Ricardo Saboia, Joana, Luis Santos, Luis Custódio, Ricardo de Oliveira, José Carlos Cardoso, Rui Palminha, Alexandre Sousa, Paulo Almeida, João Brandão, Rui Soares, Vasco Vieira, Luis Miguel Silva, Fernando Pires, Rodrigo Lopes, Rui Botelho, Jorge Cerveira, Luis de Matos, Vítor Santos, Telmo Frazão, Tiago Figueiras, por todo o apoio, amizade, carinho, preocupação e companhia ao longo desta etapa. Foi muito importante sentir-vos comigo.

Um agradecimento especial ao João Baptista por estar sempre presente, pelo apoio incondicional e preocupação constante e por nunca me deixar perder e martirizar, muito para além da conta. És o que de melhor se pode ter na vida e considero-me um sortudo por te poder ter como amigo. Ao Manel Rodrigues e Matt, por me terem recebido em vossa casa e pela amizade, apoio, preocupação e estabilidade que me concederam nesta fase tão importante.

Ao pessoal da DSIP, em especial à Doutora Graça Faria, Doutora Adriana Alves, Doutora Ana Rita e à Nélia Gouveia, pelo apoio, amizade e carinho.

Finalmente, e não menos importante, gostaria de deixar uma palavra de carinho especial para a Ana Quintal. A doença pode ter-te vencido, mas não tirou de mim a memória do teu sorriso e de todos os momentos que partilhámos.

A todos vós, o meu mais sincero e sentido obrigado.

Resumo

Os leiomiomas uterinos, também conhecidos por fibróides ou miomas, são as neoplasias benignas ginecológicas mais frequentes nas mulheres em idade fértil, estimando-se que afetem mais de 30 % das mulheres que se encontram em período reprodutivo. Não se conhecem com clareza as causas do seu aparecimento nem como os leiomiomas crescem e se desenvolvem. Contudo, sabe-se que são extremamente dependentes dos estrogénios sexuais e dos seus respectivos receptores, já que são diagnosticados na sua grande maioria depois da ocorrência da menarca até ao período de menopausa.

A síntese e o metabolismo dos estrogénios são vias complexas que requerem a presença de vários enzimas que apresentam polimorfismos funcionais, como a Mieloperoxidase (MPO) e as Glutathione-S-transferases (GST), que desempenham funções protectoras importantes no nosso organismo contra o “stress” oxidante. Neste trabalho investigou-se sobre uma possível relação entre os polimorfismos funcionais destes enzimas e o aumento de susceptibilidade para o desenvolvimento dos leiomiomas uterinos. Determinou-se igualmente a actividade da redutase transmembranar (RTM), e os níveis circulatórios de glutatião (GSH) e 17 β -estradiol (E2), de forma a investigar se estes compostos podem exercer um papel no desenvolvimento deste tipo de tumores.

Verificou-se para o polimorfismo G463A da MPO, que o genótipo GA é um factor de risco para o desenvolvimento dos leiomiomas uterinos, tendo os resultados também sugerido que o genótipo AA, pode exercer um papel protector. No que diz respeito aos polimorfismos dos genes GSTM1 e GSTT1, apenas observou-se uma diferença significativa estatística entre os grupos de estudo para o GSTT1, tendo o seu genótipo positivo sido apontado como um factor de risco, sugerindo um possível papel deste no desenvolvimento dos leiomiomas uterinos.

Relativamente aos parâmetros bioquímicos, os níveis de estradiol circulantes foram superiores no grupo das doentes comparativamente ao grupo controlo, corroborando a ideia de os leiomiomas serem estrogénio dependentes. Quanto ao GSH, registou-se uma diferença estatística significativa entre o grupo das doentes e o grupo controlo, com os valores a serem superiores neste último. A actividade da RTM apresentou igualmente uma diferença significativa entre os dois grupos, sendo superior nas doentes. Os resultados referentes a estes dois últimos parâmetros sugerem que a resposta ao “stress” oxidante foi activada nas doentes, podendo estar associada ao desenvolvimento dos leiomiomas uterinos.

Palavras - chave:

Leiomiomas uterinos - estrogénio - “stress” oxidante - polimorfismos genéticos

Abstract

Uterine leiomyomas, also known as fibroids or myomas, are the most common gynecological benign tumors in women of childbearing age, and it is estimated to affect more than 30% of women who are in the reproductive period. The causes of their appearance are not clear nor how they grow and develop. However, it is known that they are extremely dependent on sexual estrogens and their respective receptors, since they are mostly diagnosed after the occurrence of menarche to the menopause period.

Estrogen biosynthesis and metabolism are complex pathways that require the presence of several enzymes that have functional polymorphisms, such as myeloperoxidase (MPO) and glutathione-S-transferase (GST), which play important roles in the body protection against oxidative stress. This research focused on the investigation of the possible relationship between the functional polymorphisms of these enzymes and the susceptibility to the development of uterine leiomyomas. It was also determined the transmembrane reductase activity (RTM) and circulating levels of glutathione (GSH) and 17 β -estradiol (E2), to investigate whether these compounds may play a role in the development of such tumors.

It was found for MPO G463A polymorphism, that GA genotype is a risk factor for the development of uterine leiomyomas, with the results also suggesting that AA genotype may exert a protective factor. Concerning GSTM1 and GSTT1 polymorphisms, there was only a significant statistical difference between the study groups for GSTT1, with its positive genotype being identified as a risk factor, suggesting a possible role in this development of uterine leiomyomas.

Regarding biochemical parameters, circulating estradiol levels were higher in the experimental group compared to the control group, endorsing the idea that leiomyomas are estrogen dependent. As to GSH, it was observed a significant statistical difference between the experimental group and control group, it being higher in the latter. The activity of RTM also showed a significant statistical difference between the two groups, it being higher in the experimental group. The results for the latter two parameters suggested that the response to oxidative stress was activated in patients and may be associated with the development of uterine leiomyomas.

Keywords:

Uterine leiomyomas - estrogen - oxidative stress - genetic polymorphisms

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo	iii
<i>Abstract</i>	iv
Lista de Abreviaturas	viii
Índice de Figuras	xii
Índice de Tabelas	xiii
1. Introdução	1
1.1. Neoplasias: Características Gerais e Etiologia	2
1.2. Leiomiomas Uterinos	3
1.2.1. Características Gerais	3
1.2.2. Tipos de Leiomiomas Uterinos	3
1.2.3. Epidemiologia e Patologia dos Leiomiomas Uterinos	4
1.2.4. Diagnóstico e Tratamento dos Leiomiomas Uterinos: Técnica de Embolização das Artérias Uterinas.	5
1.3. Estrogénios	6
1.3.1. Características Gerais e Formas de Estrogénio: 17 β -Estradiol (E2)	6
1.3.2. Relação Entre os Leiomiomas Uterinos e os Estrogénios	7
1.3.3. Mecanismo de Acção dos Estrogénios	8
1.3.4. Biossíntese e Metabolismo dos Estrogénios	9
1.3.5. Estrogénios e o Processos de Cancerigénese	11
1.4. “Stress” Oxidante	12
1.5. Biomarcadores	14
1.5.1. Polimorfismos Genéticos	15
1.5.1.1. Gene da MPO	15
1.5.1.1.1. Caracterização e Acção da MPO	15
1.5.1.1.2. Caracterização e Expressão do Gene da MPO	17

1.5.1.2. Genes das GSTs	18
1.5.1.2.1. Caracterização e Acção das GSTs	18
1.5.1.2.2. Caracterização e Expressão dos Genes das GSTs	20
1.5.2. Parâmetros Bioquímicos de Variação Contínua	22
1.5.2.1. GSH	23
1.5.2.1.1. Características Gerais	23
1.5.2.1.2. Biossíntese, Metabolismo e Mecanismo de Acção do GSH	23
1.5.2.2. Redutase Transmembranar (RTM) Dependente de NADH	25
2. Objectivos	28
3. Material e Métodos	30
3.1. Grupos de Estudo	31
3.1.1. Caracterização dos Grupos de Estudo	31
3.2. Metodologia	32
3.2.1. Colheita das Amostras de Sangue dos Grupos de Estudo	32
3.2.2. Extração de DNA	32
3.2.2.1. Método Experimental	33
3.2.3. Análise Genética: Genotipagem dos Grupos de Estudo	34
3.2.3.1. Identificação do Polimorfismo G463A do Gene da MPO	34
3.2.3.2. Identificação dos Polimorfismos dos genes das GSTM1 e GSTT1	36
3.2.4. Determinação da Actividade da RTM Eritrocitária	37
3.2.4.1. Método Experimental	38
3.2.4.1.1. Determinação da Curva de Calibração do Ferrocianeto	38
3.2.4.1.2. Determinação da Actividade da RTM	38
3.2.4.1.3. Hematócrito	39
3.2.5. Determinação da Concentração Plasmática de GSht e da Razão GSht/GSSG	40
3.2.5.1. Método Experimental	40
3.2.5.1.1. Cálculo das Curvas de Calibração de GSH e GSSG	40
3.2.5.1.2. Precipitação das Proteínas para Determinar as Concentrações	

Plasmáticas de GSH e de GSSG	41
3.2.5.1.3. Determinação da Concentração Plasmática de GSH	41
3.2.5.1.4. Determinação da concentração plasmática de GSSG	41
3.2.5.1.5. Cálculo da Concentração Plasmática de GSht, GSSG e da Razão GSht/ GSSG	42
3.2.6. Determinação da Concentração Plasmática de E2	42
3.3. Análise Estatística dos Resultados Obtidos	43
4. Resultados	44
4.1. Caracterização dos Grupos de Estudo	45
4.2. Identificação do Polimorfismo G463A do Gene da MPO	46
4.3. Identificação dos Polimorfismos dos genes da GSTM1 e GSTT1	48
4.4. Interação epistática entre os polimorfismos dos genes da GSTM1 e GSTT1	51
4.5. Determinação da Actividade da RTM Eritrocitária	52
4.6. Determinação da Concentração Plasmática de GSht e da Razão GSht/GSSG	53
4.7. Determinação da Concentração Plasmática de E2	54
5. Discussão	55
6. Considerações Finais	61
7. Referências Bibliográficas	63
8. Anexo A - Material, Reagentes e Soluções	73
Anexo A.1. Equipamento de Laboratório	74
Anexo A.2. Reagentes	74
Anexo A.3. Soluções	75
Anexo A.4. Kits	76
Anexo A.5. Programas Informáticos	76
9. Anexo B - Tabelas	77
10. Anexo C - Figuras	79

Lista de Abreviaturas e Símbolos

° C	Graus Celsius
% (m/m)	Percentagem de massa de soluto por massa de solução
% (m/v)	Percentagem de massa de soluto por volume de solução
% (v/v)	Percentagem de volume de soluto por volume de solução
¹O₂	Singleto de oxigénio
2-ME-O-E	2-metoxiestrogénio
2-OH-CE	2-hidroxiestrogénio
4-ME-O-E	4-metoxiestrogénio
4-OH-CE	4-hidroxiestrogénio
A	Adenina
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CE	Catecolestrogénios
CE-Q	Quinonas de catecolestrogénios
Cl⁻	Cloreto
CO₂	Dióxido de carbono
COMT	Catecol-o-metiltransferase
CYP	Citocromo P450
CYP19A1	Aromatase
CYP1A1	Citocromo P450, família 1, subfamília A, polipéptido 1
CYP1B1	Citocromo P450, família 1, subfamília B, polipéptido 1
CYP3A4	Citocromo P450, família 3, subfamília A, polipéptido 4
CYP3A5	Citocromo P450, família 3, subfamília A, polipéptido 5
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Deoxinucleótidos
DP	Cis-gli Dipeptidase
E1	Estrona
E2	17β-Estradiol
E3	Estriol
EC	<i>Enzyme Commission Number</i>
e.g.	Exempli gratia

EGF	Factor epidermal de crescimento
EGF-R	Receptor do factor epidermal de crescimento
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Receptor de estrogénio
ERE	Elementos de resposta ao estrogénio
ERα	Receptor de estrogénio α
ERβ	Receptor de estrogénio β
ESR1	Gene do receptor de estrogénio α
ESR2	Gene do receptor de estrogénio β
G	Guanina
g	Gramma
GCL	Glutamilo-cisteína-ligase
GnRH	Hormona libertadora de gonadotropina
GPR30	Receptor acoplado à proteína G
GPx	Glutationo peroxidase
GR	Glutationo redutase
Grx	Glutaredoxina
GS	Glutationo sintetase
GS$^-$	Anião tiolato
GSH	Glutationo
GSHt	Glutationo total
GSR	Conjugado do glutaciono com o substrato
GSSG	Glutationo persulfato
GST	Glutationo-S-transferase
h	hora
H$_2$O$_2$	Peróxido de oxigénio
HO\cdot	Radical hidroxilo
HOCl	Ácido hipercloroso
HRP	Peroxidase do rábano-de-cavalo ou raíz-forte, <i>Horseradish Peroxidase</i>
HSD17B1	17 β -hidroxiesteroíde desidrogenase
IC	Intervalo de confiança
IGF	Factor de crescimento semelhante à insulina
IGF-R	Receptor do factor de crescimento semelhante à insulina
Kb	Quilobases
kDa	Quilodalton

Lcél	Litro de células
M	Molar (mol/L)
MAPEG	Proteínas de membrana associadas ao metabolismo dos eicosanoídes e glutatióno
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
NAOH	Hidróxido de sódio
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MPO	Mieloperoxidase
NEM	N-etilmaleímida
ng	Nanograma
nm	Nanómetro
NO·	Óxido nítrico
NO₂·	Dióxido de azoto
O₂·	Radical superóxido
O₃	Ozono
OPT	Orto-ftaldeído
OR	Odds ratio
p	Probabilidade
pb	Pares de bases
PCR	Reacção em cadeia da polimerase, <i>Polimerase chain reaction</i>
PDGF	Factor de crescimento derivado das plaquetas
pH	Potencial de hidrogénio
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
PSH	Grupo sulfidrilo de proteínas
PSSG	Dissulfidos
R-X	Substrato electrofílico
RFLP	Polimorfismos de comprimento do fragmento de restrição, <i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RNS	Espécies reactivas de azoto
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
rpm	Rotações por minuto

RTM	Redutase transmembranar
SIDA	Síndrome de imunodeficiência adquirida
SNP	Polimorfismo de nucleótido simples
SOD	Superóxido dismutase
SP1	<i>Specifity protein 1</i>
ST	Estrogénio sulfatase
SULT	Sulfotransferase
Taq	Taq DNA Polimerase ou Taq Polimerase (EC 2.7.7.7)
TDAM	Transtorno do déficite de atenção com hiperactividade
U	Unidades
UGT	UDP-glucoronil-transferases
V	Volts
UTR	Regiões não codificantes
XO	Xantina oxidase
α	Classe alpha de GSTs citosólicas
γGT	γ -glutamilo transferase
ϵ	Coeficiente de absorvidade do ferricianeto
ζ	Classe zeta de GSTs citosólicas
θ	Classe theta de GSTs citosólicas
κ	Classe kappa de GSTs citosólicas
μg	Micrograma
μ	Classe miu de GSTs citosólicas
μl	Microlitro
μM	Micromolar
π	Classe pi de GSTs citosólicas
ρg	Picograma
ρmol	Picomol
σ	Classe sigma de GSTs citosólicas
λem	Comprimento de onda de emissão
λex	Comprimento de onda de excitação
χ^2	Qui-quadrado
Ω	Classe omega de GSTs citosólicas

Índice de Figuras

Figura 1. Fotografias de leiomiomas uterinos	3
Figura 2. Esquema demonstrativo dos diferentes tipos de leiomiomas uterinos	4
Figura 3. Esquema representativo das vias de síntese dos estrogénios (E1 e E2)	10
Figura 4. Esquema representativo da via metabólica de transformação dos estrogéneos em CE	11
Figura 5. Esquema representativo da acção de defesa da MPO	16
Figura 6. Esquema representativo da estrutura do gene que codifica para a MPO	17
Figura 7. Esquema representativo da localização estrutural dos genes que codificam para as classes μ e θ	21
Figura 8. Esquema representativo da síntese, metabolismo e mecanismos de acção do GSH	24
Figura 9. Esquema do sistema da RTM dependente de NADH	27
Figura 10. Esquema das sequências de reconhecimento e local de corte da enzima de restrição AcI	35
Figura 11. Perfil electroforético de uma reacção de PCR-RFLP para o polimorfismo G463A do Gene da MPO	46
Figura 12. Perfil electroforético de uma reacção de hidrólise enzimática com a enzima AcI, de produto de PCR-RFLP para o polimorfismo G463A do gene da MPO	46
Figura 13. Perfil electroforético de uma reacção de PCR Multiplex para os polimorfismos dos genes da GSTM1 e GSTT1	49
Figura 14. Esquema demonstrativo da localização do gene que codifica para a MPO	80
Figura 15. Esquema demonstrativo da localização do gene que codifica para a GSTM1	80
Figura 16. Esquema demonstrativo da localização do gene que codifica para a GSTT1	80
Figura 17. Representação gráfica da recta padrão da curva para o ferrocianeto	80
Figura 18. Representação gráfica da recta padrão para o GSH	81
Figura 19. Representação gráfica da recta padrão para o GSSG	81

Índice de Tabelas

Tabela I. Distribuição da idade nos grupos de estudo	45
Tabela II. Frequências genótípicas e alélicas para o polimorfismo G463A do gene da MPO para os grupos de estudo	47
Tabela III. Análise do risco por “Odds Ratio” dos diferentes genótipos do polimorfismo G463A do gene da MPO, nos grupos de estudo, para o desenvolvimento dos leiomiomas uterinos	48
Tabela IV. Análise do risco por “Odds Ratio” dos alelos G e A para o polimorfismo G463A do gene da MPO, nos grupos de estudo, para o desenvolvimento dos leiomiomas uterinos	48
Tabela V. Frequências genótípicas dos polimorfismos dos genes da GSTM1 e GSTT1 para os grupos de estudo	50
Tabela VI. Análise do risco por “Odds Ratio” dos genótipos do polimorfismo do gene da GSTT1 nos grupos de estudo, para o desenvolvimento dos leiomiomas uterinos	50
Tabela VII. Frequências das diferentes combinações genótípicas possíveis para os polimorfismos dos genes das GSTM1 e GSTT1 para os grupos de estudo	51
Tabela VIII. Análise do risco por “Odds Ratio” das diferentes combinações genótípicas possíveis entre os polimorfismos dos genes da GSTM1 e GSTT1, para o desenvolvimento dos leiomiomas uterinos	52
Tabela IX. Análise descritiva da actividade da RTM eritrocitária, nos grupos de estudo	52
Tabela X. Análise descritiva das concentrações plasmáticas de GSHt, GSSG e razão GSHt/GSSG para os dois grupos de estudo	53
Tabela XI. Análise descritiva da concentração de E2 circulante nos grupos de estudo	54
Tabela XII. Diferentes diluições de uma solução de ferrocianeto de potássio utilizadas no ensaio da determinação da recta de calibração do ferrocianeto de potássio	78
Tabela XIII. Diferentes diluições de uma solução-padrão de GSH utilizadas no ensaio da determinação da recta de calibração do GSH	78
Tabela XIV. Diferentes diluições de uma solução-padrão de GSSG utilizadas no ensaio da determinação da recta de calibração do GSSG	78
Tabela XV. Poder e tamanho da amostra para os polimorfismos em estudo	78

INTRODUÇÃO

1

1.1. Neoplasias: Características Gerais e Etiologia

A palavra neoplasia com origem no grego *neo* = novo + *plasia* = formação (1, 2), designa as formas de crescimento anormal e descontrolado de tecidos cujas células perderam a capacidade de se diferenciarem ou sofrerem apoptose, em consequência de alterações (mutações) nos genes que regulam o processo normal de diferenciação, crescimento, proliferação e morte celular (1, 2, 3). As neoplasias são comumente designadas por tumor, uma palavra que tem origem no latim *tumore* e que significa “inchaço”.

De acordo com o seu comportamento biológico as neoplasias podem ser agrupadas em dois tipos: as benignas (*e.g.* leiomiomas uterinos) e as malignas (2, 3). Alguns autores fazem ainda a distinção de um terceiro tipo, as pré-malignas (2) ou os tumores *in situ* (3). Um dos pontos mais importantes no estudo das neoplasias reside justamente no estabelecimento dos critérios que permite a diferenciação de cada uma destas lesões, o que por vezes é dificultado devido à sua biologia e morfologia (2).

As neoplasias benignas são tumores que se caracterizam por terem um crescimento por expansão, permanecendo no seu local de origem geralmente inclusos em cápsulas fibrosas, sem infiltrarem ou invadirem tecidos adjacentes normais ou se espalharem para outras partes do corpo e formarem metástases (1, 2, 4). Por sua vez, as neoplasias malignas são tumores invasivos que têm a capacidade não só de infiltrar tecidos adjacentes normais como também, outros tecidos e órgãos à distância desenvolvendo metástases, sendo devido a esta propriedade, os únicos designados convenientemente por cancro (1, 2, 4).

Genericamente, a maioria das neoplasias benignas têm um crescimento lento e as malignas um crescimento rápido, no entanto, alguns tumores benignos podem apresentar um crescimento mais acelerado que alguns tumores malignos, sendo que o ritmo de crescimento depende não só do tipo de tumor, bem como de alguns factores como o suprimento sanguíneo e a acção de hormonas como os estrogénios (1). Os estrogénios desempenham um papel preponderante no desenvolvimento de neoplasias em alguns tecidos que manifestam uma grande sensibilidade às hormonas esteroídes sexuais, como são os casos dos tecidos mamário e uterino, estando associados a mais de 30 % de todos os cancros diagnosticados nos homens e 40 % nas mulheres (5, 6). A exposição excessiva cumulativa aos estrogénios é o agente decisivo que liga entre si os diversos factores de risco para o desenvolvimento de cancro nestes tecidos (7).

1.2. Leiomiomas Uterinos

1.2.1. Características gerais

Os leiomiomas uterinos (leio + mio + -oma, “tumor do músculo liso”), por vezes também designados por miomas, fibróides, fibromiomas, leiomiofibromas ou fibroleiomomas, são tumores benignos monoclonais e não pré-malignos, e embora a sua transformação em formas malignas seja possível, é extremamente rara (8, 9, 10, 11, 12). Normalmente, originam-se de células da musculatura lisa do miométrio do útero (8, 9, 10, 11), porém, em alguns casos a fonte de origem dos leiomiomas é a musculatura lisa dos vasos sanguíneos uterinos (11).

Os leiomiomas consistem de tecido muscular liso uterino bem como de uma quantidade aumentada de tecido conjuntivo fibroso, sendo envoltos por uma fina pseudocápsula de tecido areolar e fibras musculares comprimidas (Fig. 1) (8) (9) (11).



Figura 1. Fotografias de leiomiomas uterinos onde é possível observar a sua forma capsular e natureza fibrosa (13).

1.2.2. Tipos de Leiomiomas Uterinos

Os leiomiomas de acordo com a sua localização na parede do útero, podem ser classificados em três tipos diferentes (Fig. 2):

- Intramurais - desenvolvem-se dentro da parede muscular do útero, podendo atingir dimensões suficientemente grandes ao ponto de distorcerem a cavidade uterina e a superfície serosa;
- Submucosos - derivam de células miométriais que se localizam logo abaixo do endométrio, crescendo frequentemente para a cavidade uterina;

- Subserosos – localizam-se na superfície externa do útero, projectando-se para a cavidade abdominal.

Os leiomiomas submucosos e subserosos podem ainda crescer de maneira a ficarem presos apenas por um pedúnculo, tomando a designação de leiomiomas pedunculados (9, 11, 14).

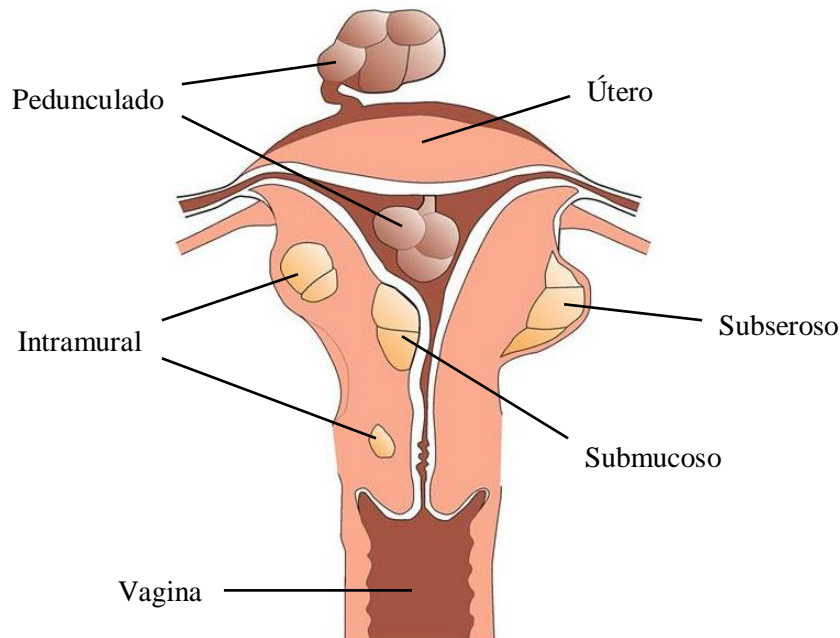


Figura 2. Esquema demonstrativo dos diferentes tipos de Leiomiomas uterinos.

1.2.3. Epidemiologia e Patologia dos Leiomiomas Uterinos

Os leiomiomas uterinos são actualmente os tumores benignos ginecológicos mais frequentes nas mulheres com idade fértil, estimando-se que acometam mais de 30% das mulheres que se encontram em período reprodutivo (8, 11, 15, 16, 17). Não obstante, a sua real frequência é muito difícil de aquilatar já que na sua grande maioria os leiomiomas uterinos são assintomáticos (8, 10, 15). Este facto torna-se muito relevante, já que, a ausência de sintomas tem uma menor atenção do ponto de vista clínico e consequentemente os leiomiomas não são diagnosticados em muitos casos (8).

Relativamente aos casos sintomáticos, calcula-se que entre 20 a 50 % dos leiomiomas produzam sintomas, sendo a sua gravidade dependente de factores tais como, o tamanho, localização, número de nódulos ou ainda de alterações degenerativas concomitantes (10, 11, 12, 18). Os principais sintomas associados aos leiomiomas uterinos são irregularidades menstruais, predominantemente menorragia, tendo como principal consequência a anemia (10, 15, 19). Outros sintomas comumente observados são o aumento do volume uterino que leva ao aumento da

pressão pélvica e conseqüentemente ao aparecimento de dores nessa mesma região e compressão de outras estruturas como o recto e a bexiga, causando por sua vez obstipação e incontinência urinária (8, 10, 15, 16, 17, 19, 20, 21).

Como referido anteriormente, os leiomiomas uterinos ocorrem sobretudo em mulheres que se encontram em idade reprodutiva, com maior frequência para a faixa etária compreendida entre os 30 e os 40 anos, sendo relativamente raros em mulheres muito jovens ou no período pós-menopausa. Começam a surgir após a menarca, podendo aumentar durante a gestação, apresentando uma tendência para regredirem parcialmente após a menopausa (10, 12, 15, 17, 21). São igualmente frequentemente identificados em pacientes que são inférteis, que sofreram perdas gestacionais ou que tiveram complicações durante a gravidez (19).

Dados recolhidos de vários estudos revelaram a existência de alguns factores de risco associados ao desenvolvimento dos leiomiomas uterinos (8, 10, 18, 19). O mais significativo é a etnia, já que, há uma predisposição maior (duas a três vezes) entre as mulheres de etnias pigmentadas ou suas descendentes, principalmente a africana, relativamente às mulheres de etnias europeias (8, 10, 15, 19). Outros factores de risco possíveis são a predisposição familiar (história de casos em familiares próximos), obesidade, nuliparidade, idade (a partir dos 40 anos), hipertensão e subfertilidade (8, 10, 18, 19, 21). É possível ainda citar alguns factores de baixo risco, como são os casos do estado de pós-menopausa, da ocorrência de mais de cinco gravidezes, do tabagismo e do uso prolongado de contraceptivos orais (18, 19).

1.2.4. Diagnóstico e Tratamento dos Leiomiomas Uterinos: Técnica de Embolização das Artérias Uterinas

O diagnóstico dos leiomiomas uterinos é fácil de efectuar e baseia-se essencialmente na história clínica da paciente (sinais e sintomas), no toque vaginal bimanual e na ultra-sonografia (9, 21).

O tratamento de pacientes com leiomiomas uterinos deve ser individualizado, levando-se em consideração a idade da paciente (proximidade da menopausa), os sintomas apresentados, o tamanho e localização dos leiomiomas e o desejo das pacientes relativamente à gestação (9, 16, 21). A maioria dos leiomiomas por serem assintomáticos não requer qualquer tratamento, apenas acompanhamento e exame ginecológico de rotina (9, 16, 22).

Nos sistemas de saúde da maior parte dos países, os leiomiomas uterinos são a principal indicação para histerectomia, havendo ainda outras alternativas cirúrgicas, como a miomectomia, de intervenção, como a embolização das artérias uterinas, ou farmacológicas, como a administração de anticoncepcionais orais, progestagénios e antiprogestagénios, análogos da

hormona libertadora das gonadotrofinas (GnRH) e anti-inflamatórios não esteróides (9, 17, 22, 23).

Por se apresentar como uma alternativa minimamente invasiva comparativamente à histerectomia e à qual se associa uma menor morbidade relativamente aos tratamentos cirúrgicos convencionais, a embolização das artérias uterinas é um procedimento que ganhou imensa popularidade desde que foi descrita em 1995, sendo anualmente realizadas aproximadamente 25000 em todo o mundo (20, 22).

A embolização das artérias uterinas, realizada sob sedação intravenosa consciente, utiliza uma abordagem femoral e consiste essencialmente na introdução de um microcatéter nas artérias uterinas, através do qual um agente oclusivo, geralmente o álcool polivinílico, é injectado com o intuito de cortar o fornecimento de sangue aos leiomiomas e assim provocar uma redução no seu volume (11, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 24). Apesar de este procedimento ter uma eficácia de aproximadamente 90% no alívio dos sintomas e um baixo período de internamento, não está livre de efeitos secundários e complicações (11, 15, 21).

1.3. Estrogénios

1.3.1. Características Gerais e Formas de Estrogénio: 17 β -estradiol (E2)

Os estrogénios, conhecidos como as hormonas sexuais primárias femininas, são hormonas esteróides -C18 formadas a partir de colesterol, presentes tanto na mulher como no homem, e que desempenham um papel importante, sobretudo no desenvolvimento, no crescimento, no controlo dos ciclos reprodutivos e na diferenciação das características sexuais secundárias femininas (6, 25, 26, 27), estando ainda envolvidos noutros efeitos biológicos como a vasodilatação arterial, a manutenção da densidade óssea e acções neuroprotectoras (28).

Os estrogénios são produzidos principalmente pelas gónadas, pela placenta e glândulas supra-renais, mas também em vários outros tipos de tecidos como o tecido mamário, o ósseo, o vascular e o adiposo, a pele e em vários locais do cérebro (27, 29). O tempo de exposição aos estrogénios durante o ciclo de vida é variável, sendo a sua síntese e secreção reguladas pelo eixo hipotálamo-hipófise, havendo ainda factores como a dieta e o exercício físico que podem igualmente influenciar essa exposição, sendo importante ressaltar o papel dos estrogénios na regulação da gordura corporal (30, 31).

Apenas três formas de estrogénio estão presentes no nosso organismo em quantidades significativas: a estrona (E1), o 17 β -estradiol (E2) e o estriol (E3) (6, 30, 32). Destas, o E2 é não só a mais abundante, mas igualmente a mais potente, sendo doze vezes mais forte que a E1 e

oitenta vezes mais forte que o E3. Com excepção da fase folicular inicial do ciclo menstrual, o E2 é a forma de estrogénio predominante durante o período reprodutivo na mulher, tanto em termos de níveis séricos como de actividade estrogénica, sendo que durante a menopausa e a gravidez, a E1 e o E3, são as formas predominantes em termos de níveis séricos, respectivamente **(6, 30)**.

Nas mulheres os níveis séricos de estradiol reflectem principalmente a actividade dos ovários. Como tal, a sua determinação apresenta uma utilidade na detecção do patamar de estrogénio em mulheres com amenorreia ou disfunção menstrual e de estados hipoestrogénicos e da menopausa, permitindo igualmente demonstrar a sua presença a níveis elevados em indivíduos com tumores associados à produção de estrogénio **(18, 33)**. Além disso, a monitorização dos níveis de estrogénio durante a terapia de fertilidade avalia o crescimento folicular e é útil no acompanhamento do tratamento **(18)**.

O estradiol também está presente nos homens em níveis séricos comparáveis aos de mulheres pós-menopausicas, sendo um produto metabólico activo da testosterona **(31)**.

1.3.1. Relação entre os Leiomiomas Uterinos e os Estrogénios

Não são ainda claras as causas do seu aparecimento nem como é que os leiomiomas uterinos crescem e se desenvolvem. No entanto, apesar de os estudos efectuados não clarificarem esse processo exacto, desde há muito que existem evidências experimentais sobre o papel das hormonas esteróides (*e.g.* estrogénios e progesterona) no crescimento e desenvolvimento dos leiomiomas uterinos, sendo estes, extremamente hormono-dependentes em particular de estrogénios sexuais e dos seus respectivos receptores **(11, 18, 19, 26, 33, 34)**. Esta dependência hormonal dos leiomiomas pode ser confirmada pelo facto destes serem diagnosticados na sua grande maioria durante o período reprodutivo da mulher, depois da ocorrência da menarca até ao período de menopausa **(11, 19, 33, 34, 35, 36)**. Daí que, os leiomiomas apareçam muito raramente antes da menarca e tendam a crescer rapidamente durante a gravidez devido aos níveis extra de estrogénio produzidos, e a regredir em tamanho ou desaparecer após a menopausa, devido à interrupção na produção de estrogénio **(33, 36)**.

A utilização de agonistas de estrogénio é igualmente associada à incidência de leiomiomas e a hormona de crescimento aparentemente age sinergisticamente com o E2 no sentido de afectar o seu crescimento. Contrariamente às anteriores, a progesterona aparenta ter um papel inibitório no crescimento dos leiomiomas **(19, 33)**.

Consistente com a influência das hormonas estrogénicas no crescimento dos leiomiomas é o papel desempenhado pelos GnRH. Estes agonistas interferem com as vias de sinalização do eixo hipotálamo-hipófise induzindo uma infra-regulação dos receptores de GnRH e a redução das

hormonas de luteinização e de estimulação folicular, bem como da inibição das hormonas sexuais nos seus órgãos-alvo, diminuindo portanto, a síntese e secreção num tratamento a longo termo das hormonas sexuais, resultando na indução de um ambiente farmacológico hipoestrogénico subsequente. Desta forma, não é estranho observar-se a interrupção ou reversão do crescimento dos leiomiomas após o tratamento com agonistas de GnRH **(18, 26, 33)**.

Os efeitos do estrogénio no crescimento dos leiomiomas estão na base do uso clínico dos agonistas de GnRH para reduzir o seu volume e controlar alguns sintomas como menorragia, anemia, dismenorreia e pressão pélvica, sobretudo antes de ser efectuado um procedimento cirúrgico para tratar dos leiomiomas. Embora os agonistas de GnRH sejam eficazes, a sua utilização em tratamentos de longa duração não é prática devido aos efeitos perniciosos que o estado hipoestrogénico tem nos tecidos normais, desde perda de osso a outros sintomas que estão associados à menopausa, limitando assim a aplicação destes agonistas em tratamentos pré-cirúrgicos **(18, 26, 33, 34)**.

As hormonas esteroídes sexuais parecem mediar a sua acção nos leiomiomas também através dos efeitos autócrino e parácrino dos factores de crescimento produzidos localmente por fibroblastos e células musculares lisas, tais como os factores de crescimento epidermais (EGF e EGF-R), os factores de crescimento semelhantes à insulina (IGF e IGF-R) e o factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) **(18, 33, 36)**.

Outras evidências que suportam a dependência dos estrogénios é o aumento da expressão dos receptores de estrogénio (ER) e a diminuição do metabolismo dos estrogénios, observados em leiomiomas **(18, 33, 35, 36)**. O efeito do estrogénio no crescimento e desenvolvimento de leiomiomas é mediado dois factores de transcrição que regulam a expressão do gene-alvo: o receptor de estrogénio α (ER α) e o receptor de estrogénio β (ER β) **(18, 33, 35, 36)**. Em estudos efectuados, verificou-se que os receptores de estrogénio estão presentes em concentrações mais elevadas nos leiomiomas relativamente ao miométrio adjacente, tendo-se observado que se ligam a 20 % mais E2 por miligrama de proteína citoplasmática que o miométrio adjacente normal **(11, 36)**. Esta característica aparenta assim representar um factor de predisposição importante no desenvolvimento e crescimento dos leiomiomas.

1.3.3. Mecanismo de Acção dos Estrogénios

Os ER são um grupo de proteínas activadas por estas hormonas, existentes no interior das células e que funcionam como um componente importante nos mecanismos de acção dos estrogénios, ligando-se a estes para iniciarem as respostas do tecido **(25, 32, 33, 37)**.

Os estrogénios possuem duas classes diferentes de receptores: os ER, que fazem parte da família de receptores intracelulares de hormonas nucleares, e que apresentam duas formas diferentes - o ER α e o ER β , e o receptor acoplado à proteína G (GPR30), que faz parte da família dos receptores acoplados à proteína G (25, 27, 32, 33, 37). Os ER α e ER β são codificados por dois genes diferentes, o ESR1 e o ESR2, e que se localizam nos cromossomas 6 (6q25.1) e 14 (14q23.2), respectivamente (25, 27).

A entrada do estrogénio na célula-alvo é supostamente feita por difusão, onde se liga ao ER, que se encontra primeiramente no núcleo, embora possa associar-se com outros organelos celulares como a membrana plasmática (25, 32). O estrogénio por ser uma hormona esteroíde, consegue passar facilmente através da membrana fosfolipídica da célula, não sendo extremamente necessária a ligação a um ER para poder entrar na célula (25).

Uma vez activado pelo estrogénio, o ER desloca-se para o núcleo dando-se a formação do complexo estrogénio-ER nuclear, que activa a expressão de genes-alvo, sequências específicas de DNA que codificam para funções biológicas importantes, sendo estes conhecidos como elementos de resposta ao estrogénio (ERE) (25, 37).

Além deste mecanismo de acção do estrogénio, existem mais dois. O primeiro é um mecanismo indirecto conhecido por mecanismo de transcrição do gene receptor nuclear, que não requiere a ligação directa do DNA, mas sim uma interacção com factores de transcrição, envolvendo grupos de genes únicos em momentos diferentes. O segundo é um mecanismo não genómico que ocorre em apenas alguns minutos após a exposição aos estrogénios. Os componentes deste mecanismo celular são os próprios ER, adjacentes ou localizados na membrana plasmática, envolvendo interacções com proteínas adaptadoras (*e.g.* caveolina-1) ou com a GPR30, resultando em respostas celulares (25, 33).

1.3.4. Biossíntese e Metabolismo dos Estrogénios

Os estrogénios são produzidos por meio de duas vias. A primeira é através da síntese *de novo* a partir do colesterol, que tem como reacção final a síntese dos estrogénios (E1 e E2) a partir dos androgénios (Andronestediona e Testosterona) por acção da aromatase ou CYP19A1, sendo que os estrogénios E1 e o E2 podem converter-se um no outro por acção da 17 β -hidroxisteroíde desidrogenase (HSD17B1). Esta via possibilita uma boa regulação dos níveis de estrogénio. A segunda via dá-se através da dessulfatação dos sulfatos de estrogénio por acção das estrogénio sulfatase (Fig. 3) (6, 18, 25, 28, 32, 38).

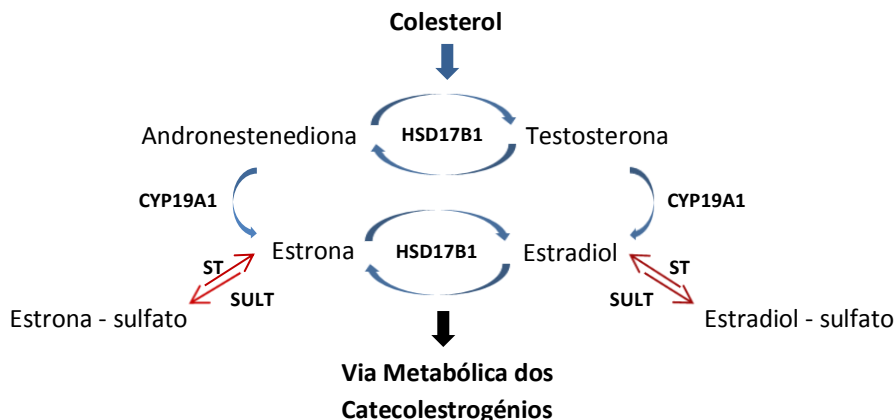


Figura 3. Esquema representativo das vias de síntese dos estrogénios (E1 e E2). A azul é representada a via de síntese *de novo* dos estrogénios a partir do colesterol. A vermelho é representada a via da dessulfatação dos sulfatos de estrogénio. ST - Estrogénio sulfatase; SULT - Sulfotransferase; HSD17B1 - 17 β -hidroxisteroide desidrogenase; CYP19A1 - Aromatase.

Nas mulheres pré-menopausicas, os ovários, bem como as glândulas adrenais e o tecido adiposo numa menor extensão, são as principais fontes de estradiol. Após a menopausa, o ovário pára de produzir estrogénios e as glândulas supra-renais e o tecido adiposo tornam-se as principais fontes de estradiol, facto que se reflecte nos níveis de estrogénio que se encontram no plasma e nos tecidos (6).

O metabolismo dos estrogénios divide-se em duas fases. A primeira fase consiste na hidroxilação dos estrogénios a catecolestrogénios (CE) por acção de várias enzimas, entre as quais se destacam a CYP1A1, responsável pela hidroxilação dos estrogénios na posição 2 a 2-hidroxiestrogénios (2-OHCE) e na posição 4 a 4-hidroxiestrogénios (4-OHCE), a CYP1B1, que por ser altamente específica, cataliza a hidroxilação dos estrogénios apenas na posição 4, e as isoenzimas CYP3A4 e CYP3A5, que hidroxilam os estrogénios nas posições 2 e 4. A segunda fase consiste na destoxicação dos CE previamente formados (2-OHCE e 4-OHCE), por acção da catecol-o-metiltransferase (COMT), uma enzima de segunda fase que cataliza a O-metilação dos referidos compostos a 2-metoxiestrogénio (2-Me-OE) e 4-metoxiestrogénio (4-Me-OE). Esta reacção inactiva o potencial anti-estrogénico dos CE impedindo-os de sofrerem oxidações sucessivas a quinonas e semiquinonas (CE-Q), que são compostos altamente reactivos e que através de ciclos redox podem levar à formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS), como o anião superóxido ($O_2^{\cdot -}$), que pode causar lesões no DNA. A reacção de O-metilação é competitiva com a oxidação catalítica de CE a CE-Q (Fig. 4) (6, 18, 25, 28, 32, 38, 39, 40, 41).

Além da O-metilação, existem mais duas vias de inactivação dos CE que consistem na sua conjugação com sulfato ou glucuronida, em reacções que são catalizadas pelas sulfotransferases

(SULT) e pelas UDP-glucoronil-transferases (UGT), respectivamente (Fig. 4) (6, 18, 32, 39, 40). Quando não se verifica a inactivação dos CE, estes podem entrar num ciclo redox e serem convertidos a CE-Q, que depois por conjugação com o glutathione (GSH) por acção das glutathione-s-transferases (GST), são inactivados (6, 37, 38, 40). Uma vez inactivados, os estrogénios são excretados pela urina e pelas fezes (Fig. 4) (6, 28).

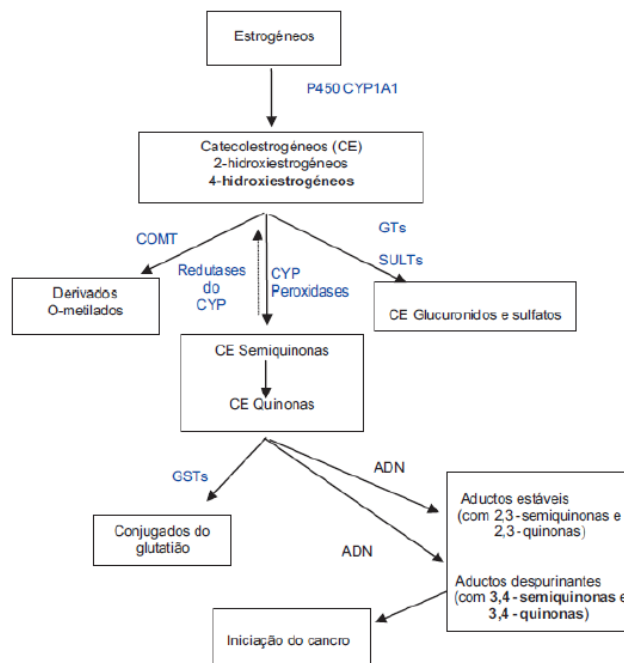


Figura 4. Esquema representativo da via metabólica de transformação dos estrogénios em catecolestrogénios, com a sua transformação em compostos capazes de iniciar o cancro, as quinonas e semiquinonas. SULT - sulfotransferases; GT - glucoronil-transferases; GSTs - glutathione-s-transferases (39).

1.3.5. Estrogénios e o Processo de Cancerigénese

Perante tudo o que foi descrito anteriormente relativamente ao metabolismo e à acção dos estrogénios, é evidente o papel determinante que os estrogénios podem desempenhar no processo de cancerigénese. Têm sido vários os estudos que têm associado níveis circulatórios aumentados de estrogénio com o risco do desenvolvimento de cancro, sobretudo em tecidos com exposição aos estrogénios, como são os casos do tecido mamário, endométrio, ovário e próstata (28, 33, 41). Estes dados sugerem que um dos maiores factores de risco para o desenvolvimento destes cancros associadas aos estrogénios é de facto a prolongada e excessiva exposição a estas hormonas (28).

Actualmente são dois os mecanismos propostos que explicam o papel chave que os estrogénios desempenham na cancerigénese. O primeiro consiste na acção dos estrogénios como promotor do cancro pela activação de processos mediados pelos ER. A ligação dos ER aos

estrogénios resulta na estimulação de oncogenes que promovem a transformação e proliferação celular (6, 28, 41). O aumento da proliferação celular e consequentemente da replicação de DNA, aumenta as probabilidades de erro na replicação e reparação do DNA, aumentando consequentemente a frequência de mutações (6, 28). Quando estas ocorrem em genes críticos, a sua acumulação pode provocar um crescimento neoplásico (6).

O segundo mecanismo consiste na acção dos estrogénios como agente procarcinogénico através dos seus metabolitos genotóxicos, que podem induzir danos a macromoléculas celulares como o DNA (6, 28, 41, 42). As vias de biossíntese e metabolismo dos estrogénios além de gerarem radicais livres a partir de ciclos redox, formam ainda alguns compostos como as CE-Q, que são carcinogénicas e que podem causar lesões nas células por oxidação das proteínas celulares e do DNA em determinados tecidos (7, 28, 37). Os estrogénios podem ainda indirectamente afectar a função de células, *e.g.* neutrófilos polimorfonucleares (PMN), que desempenham um papel importante na defesa do nosso organismo, produzindo elevadas quantidades de espécies reactivas de oxigénio quando estimuladas ou aumentar a actividade de enzimas, como a MPO, que produz ROS (43).

É de salientar ainda o facto de todas as enzimas que participam na síntese dos estrogénios apresentarem polimorfismos genéticos associados a diferentes riscos de susceptibilidade para o desenvolvimento de neoplasias malignas (39, 42).

1.4. “Stress” Oxidante

As células que compõem os tecidos e órgãos do corpo humano estão constantemente expostas a ataques de natureza oxidativa que podem ter uma fonte endógena (intracelular), como os processos metabólicos ou de sinalização celular, ou exógena, por meio da exposição do organismo a xenobiontes como agentes químicos oxidantes, radiações ionizantes ou luz ultravioleta (44, 45, 46). Durante esta exposição, pode dar-se a formação de radicais livres e metabolitos reactivos que podem desempenhar um papel duplo nos sistemas biológicos, já que, podem ser prejudiciais ou benéficos para os mesmos (46). As espécies reactivas podem ser classificadas em quatro grupos dependendo do principal átomo envolvido, sendo as ROS - principalmente, e as espécies reactivas de azoto (RNS), as mais abundantemente produzidas (47).

Entre os radicais livres, responsáveis pelas principais lesões verificadas, encontram-se o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o óxido nítrico (NO^{\cdot}). Entre os metabolitos reactivos, que se formam devido à participação dos radicais livres anteriores em reacções subseqüentes, encontram-se o radical hidroxilo (HO^{\cdot}), que é o mais reactivo, e moléculas não radicais como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o singlete de oxigénio (1O_2) e o ácido hipocloroso ($HOCl$) (44, 48).

De forma a combater uma produção excessiva destes radicais e metabolitos, o organismo desenvolveu sistemas de protecção e mecanismos antioxidantes contra os seus efeitos tóxicos, que estão organizados em três níveis (46, 48, 49). No primeiro nível, estes sistemas actuam no sentido de prevenir a formação dos radicais livres, por acção de inibidores de enzimas (*e.g.* alopurinol que inibe a xantina oxidase (XO) que produz o radical superóxido) que catalizam as reacções que formam estes radicais. No segundo nível, quando a protecção anterior é insuficiente e os radicais já se formaram, entram em acção os compostos antioxidantes não enzimáticos, que incluem *e.g.* GSH, a L-carnitina, a metalotionina e a melatonina e enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPX) e a GST, que actuam no sentido de aprisionar os radicais livres formados, transformando-os em formas não radicais e não tóxicas, eliminando assim a sua elevada reactividade. No terceiro nível, quando os níveis de protecção anteriores falham, entram em acção os sistemas de reparação que reconhecem e decompõem as moléculas que foram danificadas, como são os casos das proteinases com as proteínas que sofreram oxidação, as lipases com os lípidos que sofreram oxidação, e do sistema de reparação do DNA com as bases de DNA que sofreram modificações (47, 48, 49, 50). Relativamente aos compostos referidos no segundo nível é de referir que são todos de origem endógena, sendo possível a obtenção de outros antioxidantes que desempenham o mesmo papel que estes (*e.g.* ácido ascórbico, tocoferol e β -caroteno) por meio da alimentação (47, 48). É de salientar ainda o papel de outras enzimas, como a mieloperoxidase (MPO), que podem desempenhar uma actividade moduladora do “stress” oxidativo (51).

Dado tudo o que foi anteriormente mencionado, pode-se afirmar que o “stress” oxidante é um processo muito complexo e que em termos químicos consiste num desequilíbrio redox celular, reflexo de um balanço desfavorável entre a produção de espécies reactivas e da acção do sistema de defesa antioxidante (47, 48, 49, 52). Uma célula é normalmente capaz de superar os efeitos nefastos do “stress” oxidante se as perturbações no equilíbrio redox forem pequenas, bastando para isso restabelecer o equilíbrio normal intracelular. Porém, se estas perturbações forem de maior escala e ao ponto de provocarem lesões massivas a nível celular associados à peroxidação lipídica e a modificações nas proteínas e ácidos nucleicos, podem desencadear a apoptose celular (47, 48, 52).

Enquanto que as espécies reactivas, entre outros factores, induzem danos celulares que podem levar à morte celular, as enzimas antioxidantes que actuam em conjunto, inibem-na. A CAT, GPX, GST, SOD e MPO fazem parte de um sistema de defesa eficaz contra o “stress” oxidante, podendo ainda providenciar resistência contra os efeitos da radiação e da quimioterapia (45, 47). Vários factores podem ter impacto na efectividade destas enzimas, incluindo alterações na sua estrutura ou ainda a acção de toxinas ou doenças que provocam uma depleção dos seus

níveis. A existência de polimorfismos funcionais nos genes que codificam para estas enzimas é igualmente susceptível de alterar a actividade destas enzimas, facto que despertou um grande interesse relativamente às doenças que têm sido associadas ao “stress” oxidante (50). Entre elas encontram-se a aterosclerose, doenças cardiovasculares (*e.g.* distrofia muscular), doenças neurodegenerativas (*e.g.* Alzheimer, Parkinson e esclerose amiotrófica), diabetes, doenças inflamatórias (*e.g.* artrite reumatóide), alergias, disfunções no sistema imunitário, doenças do foro psíquico (*e.g.* esquizofrenia e transtorno do déficite de atenção com hiperatividade - TDAH), e sobretudo o cancro, cuja associação ao “stress” oxidante tem sido muito estudada, pelo possível envolvimento que os radicais activos de oxigénio podem ter no processo de carcinogénese (47, 48, 50, 53).

O “stress” oxidante pode interagir com as três fases do processo de cancerigénese, iniciação, promoção e progressão, onde as ROS desempenham um papel importante. Relativamente à fase de iniciação, o “stress” oxidante pode provocar danos ao nível do DNA mediante a activação de carcinogénios que podem produzir mutações genéticas e alterações estruturais do DNA. Em relação à fase de promoção, a acção do “stress” oxidante pode contribuir ao nível de uma expressão genética anormal, um bloqueio na comunicação intercelular e uma modificação dos sistemas secundários de mensageiros, resultando no aumento da proliferação celular ou no decréscimo da apoptose da nova população de células formadas, contribuindo assim para a expansão clonal das lesões pré-neoplásicas. Quanto à fase de progressão, o “stress” oxidante pode proporcionar alterações no DNA da população de células iniciada, que por sua vez pode provocar alterações na actividade de várias enzimas, tornando estas lesões resistentes ao controlo do crescimento normal (52).

Processos fisiológicos como o envelhecimento foram também associados à acção dos radicais livres e seus metabolitos e dos antioxidantes (26, 48).

1.5. Biomarcadores

Cada tipo celular tem uma determinada assinatura molecular, designada por biomarcadores ou marcadores biológicos, e que representam características como níveis ou actividades de uma miríade de genes, proteínas ou outro tipo de moléculas e que podem ser medidas e analisadas objectivamente como indicadores de processos biológicos normais ou patogénicos ou de uma resposta a um agente farmacológico como parte de um processo terapêutico de intervenção (54, 55).

Os biomarcadores são utilizados na prática clínica como ferramenta de diagnóstico ou para identificar riscos de ocorrência de doenças, podendo ainda providenciar informações sobre a

gravidade ou progressão de uma determinada doença e prever um prognóstico ou a monitorização da resposta a uma determinada terapia (55, 56, 57). Consequentemente, com as informações recolhidas respeitantes à etiologia e aos mecanismos pelos quais se processam as doenças, é possível agir no sentido da prevenção das doenças (57, 58).

Os biomarcadores podem ser de diversos tipos, tais como células específicas, moléculas, genes, enzimas ou hormonas. Os que apresentam maior relevância na investigação médica são provavelmente os marcadores bioquímicos, já que, podem ser obtidos com relativa facilidade a partir de fluídos corporais. No entanto, os marcadores genéticos são os que têm sido alvo de maior atenção, em particular os polimorfismos genéticos que podem afectar o metabolismo e a resposta celular aos agentes xenobióticos (56, 58).

1.5.1. Polimorfismos Genéticos

O estudo de polimorfismos genéticos permite avaliar a sua associação ao desenvolvimento e progressão de doenças (50). Vários polimorfismos genéticos têm sido relacionados e implicados em vários tipos de cancro (59, 60) e ao desenvolvimento de vários tipos de tumores, como os leiomiomas uterinos (18). Entre os demais, encontram-se os polimorfismos nos genes que codificam para a MPO e a GST e que são objecto de estudo deste trabalho de investigação.

1.5.1.1. Gene da MPO

1.5.1.1.1. Caracterização e Acção da MPO

A MPO (EC 1.11.2.2) é um enzima de fase I, membro da família das peroxidases e que é expresso predominantemente (2/3 da quantidade total) nos grânulos azurófilos primários de PMN, e em menor quantidade nos monócitos e em certos tipos de macrófagos nos locais de inflamação durante a fagocitose (43, 59, 61, 62, 63).

A MPO é uma proteína glicosilada altamente catiónica, que contém um grupo heme e que apresenta um peso molecular de aproximadamente 146 kDa. Consiste em dois dímeros idênticos ligados por uma ligação simples de persulfureto, cada um constituído por uma subunidade leve (com aproximadamente 14.5 kDa) e uma subunidade pesada (com aproximadamente 58.5 kDa), com 108 e 466 aminoácidos, respectivamente (43, 61, 63).

O significado funcional da MPO está geralmente associado ao mecanismo de defesa inato através da capacidade que este enzima tem de formar uma grande variedade de oxidantes e

espécies reactivas (43, 63). Adicionalmente, estados activados do enzima, têm também a capacidade de oxidar diferentes substratos (62).

Após a sua activação, a MPO catalisa a reacção entre o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o anião cloreto (Cl^-), originando ácido hipocloroso (HOCl) e outros ROS (Fig. 5) (61, 62, 63). Além dessa reacção, a MPO oxida a tirosina a radical de tirosil utilizando igualmente o H_2O_2 como agente oxidante (Fig. 5) (62). Como o ácido hipocloroso e o radical tirosilo têm um grande potencial citotóxico, são utilizados pelos neutrófilos contra uma ampla variedade de microorganismos durante a resposta imune inata, podendo ainda actuar como agentes tumoricidas (43, 62). A MPO e os seus produtos reactivos podem levar à modificação oxidativa de bases de DNA, podendo colateralmente inibir os mecanismos de reparação de DNA (63).

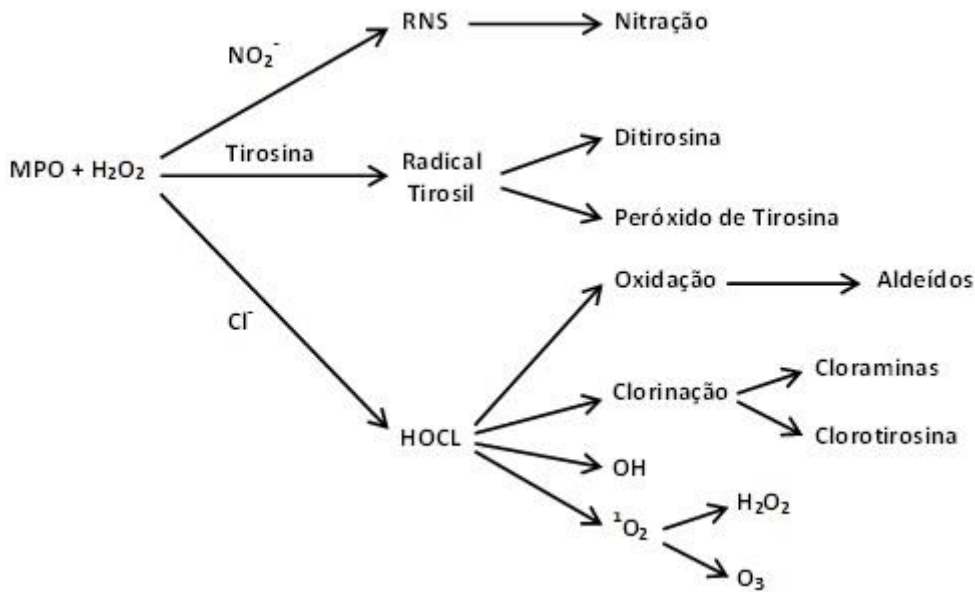


Figura 5. Representação esquemática das reacções químicas que compõem a acção de defesa da MPO e dos seus produtos respectivos. Cl^- - Cloreto; H_2O_2 - Peróxido de hidrogénio; HOCl - Ácido hipocloroso; NO_2^- - Dióxido de azoto; 1O_2 - Singleto de Oxigénio; O_3 - Ozono; OH - Hidróxido; RNS - Espécies reactivas de azoto (Adaptado de 62).

Por tudo o que foi dito anteriormente, pode-se afirmar que a mieloperoxidase é um enzima multifuncional envolvida tanto na defesa do hospedeiro, como dos danos dos tecidos em locais inflamatórios. Não produz apenas equivalentes oxidativos, mas principalmente contribui para a regulação em resposta geral a microorganismos invasores (63).

1.5.1.1.2. Caracterização e Expressão do gene da MPO

O gene que codifica para o enzima MPO localiza-se no braço longo do cromossoma 17 na posição 23.1 (17q23.1) (Anexo C - Fig. 14) sendo constituído por 12 exões e 11 exões (Fig. 6), correspondente a um tamanho total de 11080 pb (**61, 62, 59**).

São conhecidos vários polimorfismos para este gene, embora a concentração de MPO pareça estar associada com dois polimorfismos funcionais descritos na região promotora do gene, onde se liga o factor de transcrição SP1 (“Specificity Protein 1”) (**56**). Destes dois, o mais comum e que tem sido associado a diversas doenças por vários estudos, é um polimorfismo de nucleótido simples (SNP) e que se localiza a 463 pb a montante do gene, caracterizando-se pela substituição de um nucleótido de guanina (G) por um de adenina (A) (Fig. 6) (**59, 64, 65, 66, 67**).

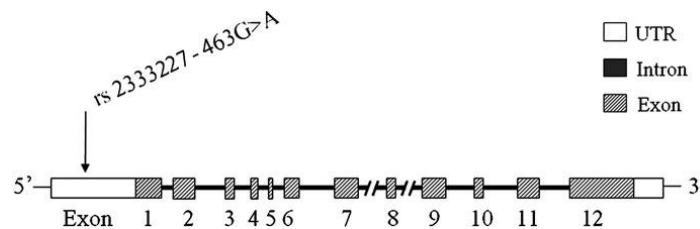


Figura 6. Representação esquemática da estrutura do gene que codifica para o enzima MPO e a respectiva localização do polimorfismo G463A. UTR - Regiões não codificantes (“Untranslated regions”) (Fonte: **64**).

Esta substituição de um único nucleótido está associada ao decréscimo da actividade transcripcional do gene, devido à perda do local de ligação do factor de transcrição SP1, já que o alelo A tem menor afinidade de ligação para este (**51, 64, 66, 67, 68, 69**), tendo-se verificado que o alelo A confere uma actividade transcripcional até 25 vezes inferior do que o alelo G (**51, 68, 69, 70**). Consequentemente, a baixa actividade do alelo A provoca uma menor produção de ROS, diminuindo assim o risco relativamente a algumas doenças como as cardiovasculares e o cancro de pulmão (**67, 68, 71**), bexiga, fígado e ovário (**71**). A situação inversa verifica-se relativamente a indivíduos com problemas ao nível do sistema imunitário e que se tornam mais susceptíveis a possíveis infecções, bem como, aos indivíduos infectados com *H. pylori*, cujo risco para o desenvolvimento de cancro de estômago é aumentado (**70**).

Apesar de este polimorfismo provocar uma alteração na taxa de transcrição do gene da MPO, são poucos os estudos que indicam uma alteração correspondente na proteína ou na actividade do enzima. Este sistema da MPO estimula a actividade dos neutrófilos, podendo catalizar a conversão de certos pré-carcinogénicos para a sua forma carcinogénica, contribuindo desta forma para o desenvolvimento de neoplasias (**62**).

1.5.1.2. Genes das GSTs

1.5.1.2.1. Caracterização e Acção das GSTs

As GSTs (EC 2.5.1.18) constituem uma superfamília multigénica de isoenzimas ubíquas de fase II que catalizam o ataque nucleofílico do GSH a uma grande variedade de compostos exógenos e endógenos electrofílicos com potencial genotóxico, reduzindo a sua reactividade (*e.g.* produtos do “stress” oxidante, poluentes ambientais e carcinogénios) (59, 60, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83).

As GSTs compreendem três famílias de proteínas que se encontram largamente distribuídas na natureza em virtualmente todas as espécies examinadas, incluindo animais, plantas e bactérias, e que exibem actividade de transferase do glutationo (73, 78). As citosólicas, que representam a maior família de transferases e que possuem actividades que são únicas deste grupo de enzimas, e as mitocondriais, são solúveis e apenas distantemente relacionadas. A terceira família inclui as microssomais, conhecidas como proteínas de membrana associadas ao metabolismo de eicosanoides e GSH (MAPEG), e que se encontram na membrana plasmática, no retículo endoplasmático e na membrana externa mitocondrial (73, 76, 80, 82).

Nos humanos, com base nas sequências proteicas, na especificidade para substratos, e nas propriedades físicas, imunológicas, estruturais e catalíticas, as GSTs foram divididas em nove classes, uma classe de enzimas microssomais e designada também por MAPEG e oito citosólicas que partilham 30 % da mesma sequência e que são designadas por letras gregas: α (alpha), ζ (zeta), κ (kappa), θ (theta), μ (miu), π (pi), σ (sigma) e Ω (omega) (59, 60, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82). Estas classes de GSTs consistem em um ou mais isoenzimas e são normalmente referidas pelas letras maiúsculas correspondentes no alfabeto romano: A, Z, K, T, M, P, S e O, respectivamente (78).

As GSTs citosólicas têm todas em comum o facto de serem proteínas diméricas com subunidades de peso molecular entre os 22 e 29 kDa, com 199 a 244 aminoácidos cada uma (73, 75, 76, 81). Cada subunidade das GSTs tem um sítio activo composto por duas regiões funcionais distintas: um sítio-G hidrofílico no domínio amino-terminal da proteína, que se liga ao GSH e um sítio-H no domínio carboxi-terminal da proteína, que se liga aos substratos hidrofóbicos estruturalmente diversos. O sítio G é altamente conservado entre as GSTs devido à sua elevada especificidade, enquanto que o sítio H apresenta alguma divergência entre as diferentes GSTs, exibindo uma especificidade de ligação ao substrato variável (73, 75, 76, 78).

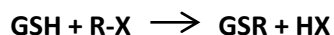
As GSTs citosólicas têm actividade catalítica como proteínas homo ou heterodiméricas (os das classes A e M formam ambos) permitindo a formação de um grande número de enzimas a

partir de um número limitado de genes, embora, a dimerização esteja limitada a subunidades da mesma classe (75, 76). Pelo menos dezasseis subunidades de GST citosólicas foram identificadas em humanos (73, 76).

Uma grande diversidade de compostos químicos serve de substrato às diferentes GSTs, que apesar de apresentarem especificidades para o substrato distintas entre si, possuem uma sobreposição de alguns substratos relativamente a outros isoenzimas. Isto, aliado ao facto de haver uma grande diversidade de compostos químicos que servem de substrato às GSTs, permite que na ausência de um isoenzima, haja uma compensação por parte da acção de outro isoenzima, relativamente ao mesmo substrato (59, 74, 78, 81, 83). Devido a este facto, as GSTs apresentam um dos maiores mecanismos pelo qual as células são protegidas contra os efeitos carcinogénicos de vários compostos endógenos e exógenos e produtos do “stress” oxidante (59).

As GSTs catalizam inúmeras reacções nas quais o glutationo sob a forma de anião tiolato (GS⁻) actua como um nucleófilo. A acção das GSTs facilita a formação ou estabilização do GS⁻ com um composto que contenha átomos de carbono, azoto, enxofre e oxigénio electrófilos, promovendo a ligação do GSH e do substrato electrofílico ao sítio activo da proteína. Desta forma, o grupo sulfidrilo do GSH é activado, permitindo o ataque nucleofílico do GSH ao substrato electrofílico, convertendo-os em conjugados de glutationo menos reactivos e mais facilmente excretáveis (73, 78).

A reacção geral que as GSTs cataliza é:



onde, R-X é o substrato electrofílico e o GSR o conjugado do GSH com o substrato (78).

Vários tipos de reacções catalíticas foram associados à acção das GSTs, que incluem *e.g.* reacções de substituição nucleofílicas aromáticas, isomerizações, abertura dos anéis de epóxidos, e para algumas GSTs, reacções de peroxidase (78).

O avanço do conhecimento da acção das GSTs ao longo dos últimos anos tem revelado um papel mais vasto para estas enzimas, tendo sido descoberto estarem envolvidos na biossíntese e metabolismo de prostaglandinas, esteróides e leucotrienos, na regulação de produtos tóxicos da oxidação lipídica e das proteínas que sofreram a s-glutationilação por acção do “stress” oxidante e na aquisição de resistência a agentes quimioterapêuticos. Devido ao seu papel citoprotector e ao seu envolvimento no desenvolvimento da resistência a agentes anti-cancro, as GSTs tornaram-se alvos apetecíveis para novos medicamentos (76).

1.5.1.2.2. Caracterização e Expressão dos Genes das GSTs

Vários estudos demonstraram que os diferentes isoenzimas de GSTs humanos fazem parte de um sistema genético complexo, sendo que, os genes que codificam para cada uma destas classes se localizam em diferentes cromossomas (59, 73, 75, 78, 83). Devido ao facto das classes α , μ , θ e π apresentarem níveis de expressão mais elevados, têm sido estudadas com maior frequência que as restantes classes de GST humanas (81).

As GSTs apresentam uma elevada expressão no fígado onde constituem até 4 % de proteína total, podendo igualmente serem encontradas noutros tecidos (60, 78, 79). A expressão das diferentes classes de GSTs varia entre os tecidos e com o estágio de desenvolvimento do indivíduo (76). A regulação da expressão das GSTs difere entre os diferentes tecidos, de tal forma que nem todas as isoformas são expressas em todos os tecidos (78). Por exemplo, as GSTs da classe α são predominantemente expressas no fígado, testículos e rins e os seus níveis de expressão são semelhantes tanto no feto como no indivíduo adulto. Em contraste, as GSTs da classe π , são encontrados principalmente no cérebro, pulmão e coração, sendo que a sua expressão no fígado é elevada durante o desenvolvimento embriónico, tornando-se muito reduzida nos tecidos adultos. As GSTs da classe μ são expressos principalmente no fígado (76, 84).

As diferenças na expressão de certas isoformas podem ser um determinante importante na sensibilidade em alguns órgãos-alvo. Contudo, devido à diferença genética entre indivíduos, ao complexo dos GSTs, ao padrão de expressão dos GSTs específico em tecidos, e à modulação pela dieta e xenobióticos, é difícil prever com precisão a extensão da expressão de qualquer um dos genes das GSTs num determinado tecido (78).

Até à data, foram identificados vários polimorfismos nos genes que codificam para cada classe de GSTs citosólicos, como a μ e a π , que têm sido relacionadas com a susceptibilidade para o desenvolvimento de várias doenças (74, 75, 76, 83, 85). Nestas classes os polimorfismos mais estudados e melhor caracterizados são os dos genes que codificam para os isoenzimas GSTM1 e GSTT1 (74, 86).

A classe μ ou M é codificada por cinco genes diferentes organizados na seguinte ordem e orientação no cromossoma 1 na região p.13.3 (Fig.7, Anexo C - Fig. 15): 5' GSTM4-GSTM2-GSTM1-GSTM5-GSTM3 3' (72, 73, 74, 79, 85). Nos humanos o gene GSTM1 é constituído por sete exões e é polimórfico, apresentando três formas alélicas: dois alelos activos, os GSTM1*A e GSTM1*B e um alelo não funcional, o GSTM1*0, que é resultado de uma deleção. Os dois primeiros diferem numa substituição C \rightarrow G na posição 534, que resulta na troca de uma lisina por uma asparagina no aminoácido 172, não se verificando qualquer diferença em termos funcionais entre eles (60, 72, 73, 79).

A homozigotia ou a heterozigotia resultantes da presença de GSTM1*A e GSTM1*B, bem como, a heterozigotia em que um dos alelos é GSTM1*A ou GSTM1*B e o outro é GSTM1*0, são responsáveis por um genótipo positivo ou activo. A homozigotia resultante da presença de GSTM1*0, é responsável por um genótipo nulo que corresponde à ausência de actividade do enzima para o qual este gene codifica (60, 72, 73, 79, 85).

O gene GSTM1 é flanqueado por duas regiões quase idênticas de aproximadamente 4.2 kb. O alelo GSTM1*0 é originado por recombinação homóloga entre estas duas regiões, resultando numa deleção de 16 kb contendo o gene GSTM1 por inteiro. O GSTM1 é precisamente excisado, deixando intactos os genes adjacentes GSTM2 e GSTM5 (Fig. 7) (72, 79).

A classe θ ou T, é codificada por dois genes diferentes, GSTT1 e GSTT2, que se localizam no cromossoma 22 na região q11.2 (Fig. 7, Anexo C - Fig. 16), estando separados entre si por apenas 50 pb (72, 73, 74, 79, 85). Esta classe é em termos evolutivos a mais recente, diferindo significativamente dos isoenzimas das classes α , μ e π (73). Ambos os genes são compostos por cinco exões, apresentando uma estrutura idêntica e uma relação intrão/exão semelhante, embora partilhem apenas 55 % da identidade de aminoácidos entre si (72, 73, 79, 85).

Tal como o gene GSTM1, o GSTT1 é polimórfico nos humanos, apresentando duas formas alélicas: uma funcional ou positiva, a GSTT1*1 e uma não funcional ou nula, a GSTT1*0, que corresponde a uma deficiência na actividade do enzima para o qual este gene codifica (72, 73, 79, 85). O gene GSTT1 é flanqueado por duas regiões com mais de 90% de homologias entre eles, a HA3 e a HA5, que contêm uma repetição idêntica de 403 pb e que foram identificadas como regiões de deleção no genótipo nulo do GSTT1. À imagem do que se sucede no GSTM1, o alelo GSTT1*0 é originado por uma recombinação homóloga envolvendo estas repetições, resultando numa deleção de 54 kb que contém o gene GSTT1 por inteiro (Fig. 7) (72, 79).

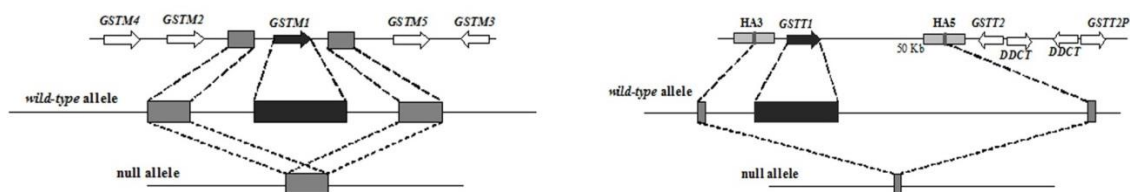


Figura 7. Esquema representativo da localização estrutural do gene que codifica para as subfamílias μ no cromossoma 1p13.3 (esquerda) e θ no cromossoma 22q11.2 (direita). Em ambas as figuras está representada a recombinação homóloga que causa a deleção do respectivo gene (genótipo nulo) (Fonte: 79).

Os polimorfismos que provocam a deleção dos genes GSTM1 e GSTT1 são comuns na população humana (72, 81). No entanto, os valores estimados da sua frequência, obtidos em

diversos estudos, são muito variáveis, tendo-se verificado diferenças geográficas e étnicas (**59, 80, 83**). Na população europeia, o genótipo nulo do GSTM1 apresenta uma frequência de 40 a 50 % e o genótipo nulo do GSTT1, de 15 a 40%. Relativamente às populações africana e asiática, os valores percentuais variam, sendo de 23 a 48 % e de 33 a 63 %, respectivamente, para o GSTM1 e de 24 a 38 % e de 60 a 65 %, respectivamente, para o GSTT1 (**73**).

As deleções dos genes GSTM1 e GSTT1 caracterizam-se por uma redução na actividade enzimática das GSTs totais, provocando assim um decréscimo na capacidade dos tecidos de destoxicarem os compostos reactivos aos quais são expostos, o que pode levar à sua acumulação, aumentando assim o risco de susceptibilidade para o desenvolvimento de algumas doenças como o cancro (**59, 72, 74, 79, 82, 84, 85, 87**). A possível associação entre o desenvolvimento do cancro e estes dois polimorfismos tem sido extensivamente estudada, e diversos estudos demonstraram a existência de uma relação entre eles e o desenvolvimento de vários tipos de cancro como pulmão, mama, bexiga, tracto aerodigestivo, e cólon (**74, 87, 88, 89**). Isto deve-se igualmente às diferenças na expressão dos diferentes GSTs em diferentes tecidos e na especificidade a determinados substratos, já que algumas das GSTs são específicas para determinados carcinogénios que estão envolvidos em alguns tipos de cancro. Um destes exemplos é a GSTT1 que apresenta uma especificidade para carcinogénios presentes no tabaco e cuja ausência nos tecidos onde é expressa (*e.g.* pulmão), aumenta o risco para o desenvolvimento do cancro nos mesmos (**59, 74, 81**). Portanto, a determinação em simultâneo de todos os genótipos de GST é imprescindível para uma interpretação mais correcta e abrangente sobre o papel da família das GSTs no desenvolvimento do cancro (**72**).

1.5.2. Parâmetros Bioquímicos de Variação Contínua

O estudo de parâmetros bioquímicos permite verificar a existência de biomarcadores circulantes no sangue, cujas variações ao nível da sua concentração e actividade sejam o reflexo de algum distúrbio metabólico ou mecanismo de acção que esteja implicado no desenvolvimento ou progressão de uma determinada doença (**50**). Dado o papel que o “stress” oxidante pode desempenhar nos processos de tumorigénese e cancerigénese, são vários os parâmetros bioquímicos que podem ser estudados, tais como a concentração plasmática de GSH e a actividade da redutase transmembranar eritrocitária (RTM), dois compostos que fazem parte do sistema antioxidante celular, onde desempenham um papel importante.

1.5.2.1. GSH

1.5.2.1.1. Características gerais

O glutationo é um tripéptido solúvel em água, composto por glutamato, cisteína e glicina, e que além de ser o principal antioxidante celular, é também o tiol não proteico mais abundante nas células eucarióticas, onde actua na protecção dos componentes celulares contra os danos provocados pelos ROS como os radicais livres e os peróxidos (90, 91, 92). O grupo tiol é um agente redutor potente, sendo o principal responsável pelas muitas funções biológicas que o GSH desempenha (46, 53, 73, 91, 93).

A sua importância é evidente pelo facto de se encontrar amplamente distribuído em células animais, vegetais e microorganismos, e ser ubiquamente detectado em todos os tipos de tecidos. E embora seja sintetizado por quase todos os tipos celulares na sua forma reduzida, é preferencialmente produzido no fígado (53, 73, 94).

O GSH está envolvido na primeira linha de defesa de sobrecarga oxidante celular, onde desempenha as suas duas funções básicas, que são a destoxicação de compostos exógenos e endógenos (*e.g.* compostos electrofílicos e radicais livres) através da formação de conjugados de GSH e de derivados do ácido mercaptúrico, e a regulação da homeostase redox (53).

O GSH desempenha um papel importante em muitos outros processos celulares evidenciando-se: a regulação da transdução de sinal e da proliferação celular; protecção contra a apoptose; regulação da resposta imunitária; modulação da actividade de diversas enzimas; síntese de desoxirribonucleótidos; transporte de aminoácidos através de membranas celulares; armazenamento e transporte de cisteína entre os diversos órgãos divisão celular; regulação da transcrição do DNA; síntese de prostaglandinas e leucotrienos e cofactor de diversas enzimas (53, 73, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96).

1.5.2.1.2. Biossíntese, Metabolismo e Mecanismo de Acção do GSH

O GSH pode existir intracelularmente sob duas formas: a reduzida, GSH e a oxidada, GSSG. A forma reduzida é a que existe em maior concentração nas células, sendo a sua presença em níveis adequados, essencial na função protectora contra radicais livres e xenobióticos através do seu papel como agente redutor em reacções de oxidação. A forma oxidada é formada por dois GSH unidos por uma ligação persulfureto, sendo resultado do papel protector do GSH (53, 91, 94). A forma reduzida durante o “stress” oxidante é convertida à forma oxidada, podendo utilizar-se a medição dos valores de GSH e da razão GSH/GSSG como um importante indicador do estado redox nos sistemas biológicos (46, 53, 91, 92, 95, 97, 98).

A oxidação da forma reduzida é realizada por interacção com radicais livres ou mais frequentemente quando o GSH age como um cofactor para enzimas antioxidantes, como as glutathione peroxidases (GPx), durante a redução do H₂O₂ e de hidroperóxidos. O GSSG forma-se ainda quando a glutaredoxina (Grx) usa GSH para reduzir a ligação persulfureto (Fig. 8) (53, 91, 95).

Os níveis celulares de GSH são fortemente regulados por diferentes enzimas relacionadas com o balanço redox celular, podendo ser mantidos por dois sistemas. O primeiro é a síntese *de novo* de GSH a partir dos seus três aminoácidos constituintes, glutamato, cisteína e glicina, através de duas reacções enzimáticas que ocorrem no citosol. Na primeira dá-se a formação de γ -glutamilcisteína a partir de L-glutamato e L-cisteína, numa reacção catalizada pela γ -glutamilcisteína sintetase (GCS), também conhecida por glutamato cisteína ligase (GCL). Na segunda, dá-se a formação de GSH a partir de γ -glutamilcisteína e L-glicina, numa reacção catalizada pela glutathione sintetase (GS). O segundo sistema, constitui um sistema de reciclagem envolvendo a glutathione redutase (GR) que reduz o GSSG a GSH, às custas de NADPH (Fig.8) (53, 73, 91, 94, 95). A reciclagem do GSH intracelular pode ainda ser realizada às custas do GSH extracelular, que pode ser sequencialmente quebrado pela γ -glutamilo transferase (γ GT) e pela cis-gli dipeptidase (DP) fora da célula, em glutamato, e em cisteína e glicina, respectivamente, e que são depois transportados para dentro da célula onde estarão disponíveis para a síntese *de novo* do GSH (Fig. 8) (53).

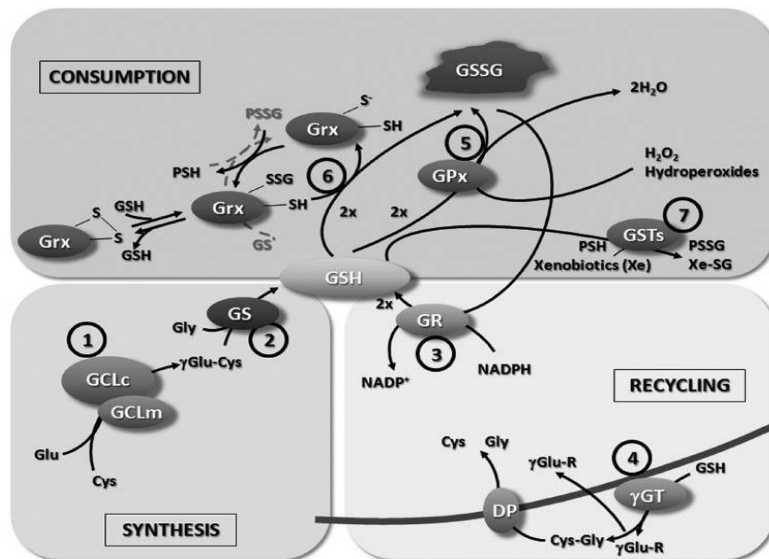


Figura 8. Representação esquemática da síntese, metabolismo e mecanismos de acção do GSH. DP – Dipeptidase; GCL - Glutamilo-cisteína-ligase; GPx - Glutathione peroxidase; GR - Glutathione redutase; Grx - Glutaredoxina; GS - Glutathione sintetase; GS⁻ - Anião tiolato; GSH - Glutathione; GSSG - Forma dissulfido do glutathione; GSTs - Glutathione-s-transferases; PSH - Grupos sulfidrilo de proteínas; PSSG - Disulfidos; γ GT - γ -glutamilo transferase (Fonte: 53).

A destoxicação dos xenobióticos, que consiste na conjugação destes com o GSH, pode ser efectuada de forma espontânea ou por acção das GSTs, podendo posteriormente ser excretados de forma intacta na bÍlis ou metabolizados a ácidos mercaptúricos nos rins onde são excretados na urina. A via dos ácidos mercaptúricos envolve uma sequência de três reacções que converte o conjugado GSH-xenobiótico em ácido mercaptúrico. Inicialmente, dá-se a quebra sequencial de glutamato e glicina do glutationo por acção da γ GT e DP, respectivamente. Na reacção final, dá-se a N-acetilação do grupo amina da cisteína por acção de uma N-acetilo transferase (53, 73).

Por tudo o que foi dito anteriormente relativamente à homeostase do GSH, é natural que a manutenção destes valores seja crítica para a sobrevivência das células, sendo imperativa a existência de um sistema de regulação eficaz (91).

Deficiências nos níveis de GSH têm sido associadas a diversas patologias, entre as quais se destacam o cancro, doenças neurogenerativas (*e.g.* Parkinson e Alzheimer), fibrose cística, isquémia, desordens imunológicas, SIDA, aceleração da patogénese de doenças virais, enfarte e doenças metabólicas (*e.g.* diabetes e obesidade) (91, 92, 96). Existem ainda casos de tumores que mostraram níveis elevados de GSH, enfatizando assim a ligação entre a desregulação da homeostase do GSH na doença (92). O papel do metabolismo do GSH no cancro é complicado, pois o GSH apesar de ser importante na destoxicação de carcinogénios, quando presente a níveis elevados, pode também aumentar a resistência à quimio e radioterapia em vários tipos de tumor (97).

1.5.2.2. Redutase Transmembranar (RTM) dependente do NADH

O estudo das membranas celulares, da sua estrutura e função é uma área de estudo ainda com muito por explorar, no entanto, nas últimas décadas têm sido dados contributos importantes de forma a compreender melhor o seu papel na dinâmica celular (99).

A membrana citoplasmática é uma estrutura metabolicamente activa e dinâmica, onde um conjunto variado de proteínas dispostas no seu interior ou a si associadas desempenha funções importantes no metabolismo celular, sendo que, algumas destas proteínas fazem parte de sistemas de oxidação/redução que possibilitam o transporte de electrões do interior para o exterior das células (100).

Os processos de oxidação/redução da membrana plasmática de muitos tipos de células têm sido alvo de um grande interesse e estudo, daí que, tenham sido já identificados em vários tipos celulares, que incluem *e.g.* eritrócitos, hepatócitos, células do coração, leucócitos totais, neutrófilos, monócitos, plaquetas, células tumorais, células vegetais, bactérias e protozoários, sendo possivelmente uma característica comum a todas as células (99, 100, 101).

Os eritrócitos, devido à sua função de transporte de O_2 e CO_2 , encontram-se expostos a ROS. Por não apresentarem núcleo ou mitocôndrias, não podem voltar a sintetizar nenhuma enzima antioxidante, estando a sua estabilidade e capacidade antioxidante assegurada por meio do transporte membranar de electrões, cujos aceitadores fisiológicos dos sistemas de transportes são pouco conhecidos **(94)**.

Não se conhece exactamente a estrutura interna da cadeia transportadora de electrões na membrana celular, mas sabe-se que em cada uma parece haver um sistema de transporte de electrões, semelhante ao de todas as outras já estudadas, existindo pelo menos um sistema transmembranar de transporte de electrões, nomeadamente a redutase que utiliza o NADH **(102, 103)**. Este enzima transfere electrões do NADH intracelular do metabolismo glicolítico para oxidantes externos não permeantes como o ferricianeto **(104)**.

Este sistema redox, denominado por redutase transmembranar (RTM) do ferricianeto dependente do NADH e já identificado na membrana dos eritrócitos, onde se verificam as actividades mais elevadas de RTM, consiste num complexo multienzimático transmembranar de peso molecular de aproximadamente 40 kDa **(94)**. A RTM do ferricianeto apresenta uma preferência pelo coenzima NADH, sendo o ferricianeto um produto que tem um efeito inibidor não competitivo da actividade do enzima **(100, 105)**. Por outro lado, o ferricianeto actua como inibidor competitivo devido à formação de um complexo inactivo entre este e o enzima, sendo este efeito dependente da concentração de NADH **(100)**.

A maioria das actividades destas redutases é atribuída a enzimas redox que utilizam tanto o NADH como o NADPH como dadores de electrões **(106)**. As reacções de transferências de electrões catalizadas por estes enzimas têm sido implicadas numa grande variedade de respostas fisiológicas **(106)**, desempenhando igualmente papéis essenciais no organismo, como o controlo do desenvolvimento e de funções celulares **(94)**.

As redutases são enzimas que utilizam duas moléculas como substrato. Uma delas, a dadora de electrões, é oxidada enquanto a outra, a receptora de electrões, é reduzida. O “timing” das reacções de oxidação e de redução não é conhecido, contudo, é certo que nenhuma reacção deste género prosseguirá se um dos dois substratos ou o próprio enzima estiverem ausentes da mistura de reacção **(106)**. A RTM oxida o NADH (com origem na glicólise) num local de ligação na face interna da membrana celular, na presença de um receptor de electrões no exterior da célula (*e.g.* ferricianeto de potássio) num local de ligação da face externa da membrana, e que ao receber o electrão é reduzido (Fig. 9) **(101)**.

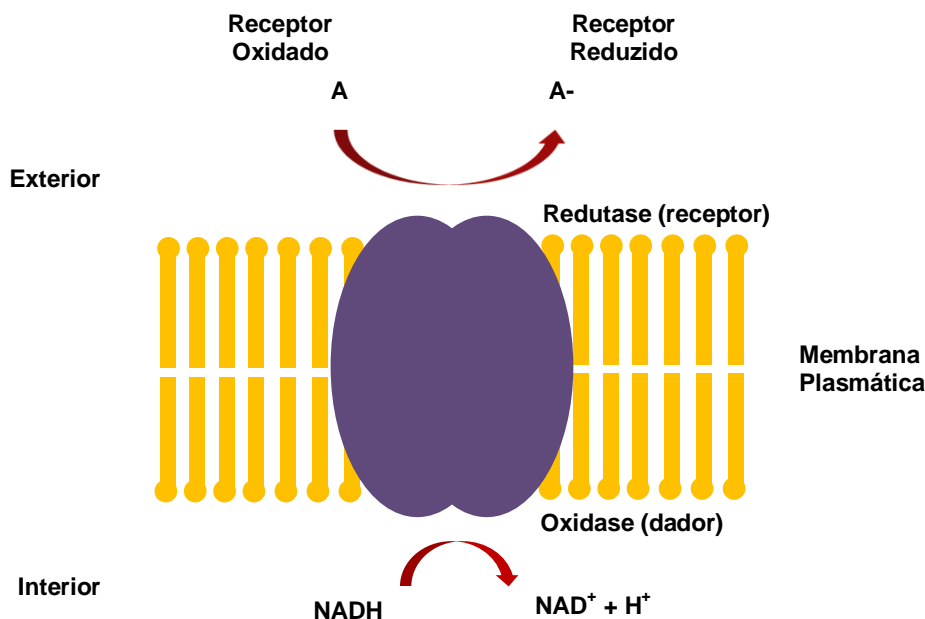


Figura 9. Esquema representativo do sistema da redutase transmembranar (RTM) dependente do NADH (Adaptado de **94**).

A RTM pode oxidar o NADH na presença de outros aceitadores de electrões, como a transferrina, o ferricitocromo c e o oxigénio, só que o ferricianeto é o aceitador mais potente, razão pela qual é normalmente utilizado no estudo deste sistema (**100**).

Não é conhecido nenhum aceitador fisiológico da RTM, pelo que para determinar a sua actividade, é utilizado o ferricianeto como aceitador de electrões, que eleva a actividade do sistema. Na presença do oxigénio, a actividade deste sistema é quase nula, todavia, tanto o oxigénio como compostos contendo ferro, *e.g.* transferrina, são possíveis candidatos a aceitadores naturais de electrões (**100**).

Este sistema desempenha um papel importante na manutenção do equilíbrio redox nos eritrócitos já que remove electrões ao nível da membrana, sendo que uma diminuição da actividade do enzima resulta no aumento da sobrecarga oxidante a nível celular (**94**). O mesmo parece verificar-se com os processos de controlo de “stress” oxidante, apoptose e envelhecimento (**106**).

Suspeita-se ainda sobre uma possível associação da RTM com receptores de membrana para a ligação de hormonas, sugerindo uma ligação entre os sistemas redox e hormonal, indicando assim que após estímulo hormonal possam ocorrer respostas antioxidantes e anti-apoptóticas, podendo a RTM ser activada nos eritrócitos, por acção dos estrogénios E1 e E2 (**104**).

OBJECTIVOS 2

Como referido no capítulo anterior, existe desde há algum tempo a evidência clínica experimental de que os leiomiomas uterinos são extremamente hormono-dependentes de estrogéneos sexuais e dos seus respectivos receptores, sendo que a síntese e metabolismo destes estrogéneos endógenos são mediados através de várias vias metabólicas complexas que requerem a presença de vários enzimas que apresentam polimorfismos funcionais como as GST e a MPO, cujas actividades inactivam ou impedem a formação de produtos derivados com acção mutagénica e tumorigénica. Assim sendo, o objectivo principal deste trabalho de investigação foi averiguar a influência da variação polimórfica dos genes destas proteínas no desenvolvimento dos leiomiomas uterinos.

Adicionalmente, pretendeu-se igualmente, determinar os níveis circulantes de estradiol e glutatióno total no plasma, bem como, observar a actividade da RTM dos eritrócitos e avaliar sobre uma possível relação destes parâmetros bioquímicos com o desenvolvimento dos leiomiomas uterinos.

A nível nacional não existe uma base de dados com informações relativas aos leiomiomas uterinos. Com os resultados obtidos neste trabalho, em conjunto com outros obtidos noutros trabalhos de investigação efectuados no mesmo laboratório e com a recolha de vários dados associados a pacientes com leiomiomas, foi possível dar início à criação de uma base de dados respeitante a esta neoplasia.

MATERIAL E MÉTODOS

3

3.1. Grupos de Estudo

Na realização deste estudo de associação caso-controlo, utilizaram-se dois grupos de mulheres. O primeiro, correspondente ao grupo das doentes, foi composto por 190 mulheres com leiomiomas uterinos que recorreram ao serviço de Radiologia de Intervenção do Hospital Saint-Louis em Lisboa, onde foram seguidas pelo Professor Doutor João Martins Pisco. Todas as pacientes encontravam-se em idade reprodutora (entre 23 e 57 anos) e foram submetidas à terapêutica de embolização das artérias uterinas para tratamento pré-operatório ou para redução dos leiomiomas uterinos. As amostras de sangue total periférico utilizadas no estudo, provenientes das pacientes que compuseram este grupo, foram obtidas mediante o seu consentimento informado.

O segundo grupo, correspondente ao grupo controlo, foi composto por 409 mulheres com idades compreendidas entre os 19 e 77 anos, que não apresentavam leiomiomas uterinos evidenciáveis ou com sintomatologia associada à sua ocorrência, ou antecedentes conhecidos de ocorrência de leiomiomas uterinos, provenientes de quatro grupos diferentes de dadoras voluntárias: um grupo de 105 dadoras do Instituto Português do sangue; um grupo de 211 mulheres pós-menopausica participantes do projecto “Mexa-se mais” da Faculdade de Motricidade Humana; um grupo de 50 mulheres participantes de um estudo relacionado com pré-obesidade e obesidade e um grupo de 43 mulheres participantes de um estudo relacionado com antecedentes de doença hipertensiva da gravidez. Todas as voluntárias participantes destes grupos realizaram um inquérito totalmente confidencial e que possibilitou um rastreio a fim de determinar a sua elegibilidade como controlo para este estudo.

3.1.1. Caracterização dos Grupos de Estudo

Aquando da inclusão das pacientes no estudo, registaram-se quando disponíveis, vários dados relativos a parâmetros importantes como a idade, país de origem, número de gravidezes e filhos, número de leiomiomas e respectivas dimensões e volumes, antes e depois da realização da embolização das artérias uterinas. Relativamente às mulheres que constituíram o grupo controlo, tal como referido anteriormente, registaram-se vários dados clínicos a fim de determinar se eram elegíveis para o presente estudo, bem como alguns dados demográficos (*e.g.* idade).

Todas as mulheres foram convenientemente identificadas através da atribuição de um código alfanumérico e as informações recolhidas correspondentes a cada uma foram registadas numa base de dados confidencial.

3.2. Metodologia

3.2.1. Colheita das Amostras de Sangue dos Grupos de Estudo

A colheita das amostras de sangue periférico total das pacientes foi efectuada no Hospital Saint-Louis após a realização da técnica de embolização das artérias uterinas. Relativamente às amostras de sangue dos controlos, a sua colheita foi efectuada no Instituto Português do Sangue (IPST).

O sangue colhido foi transferido para tubos de vidro rolhados de 10 ml próprios para o efeito, devidamente identificados e contendo um anticoagulante, o K₃EDTA.

No que diz respeito às amostras de sangue que foram utilizadas apenas para genotipagem quanto aos polimorfismos em estudo, foram armazenadas a - 20° C até ao momento da sua utilização para a extracção de DNA.

Quanto às amostras de sangue utilizadas na determinação da actividade da RTM, foram mantidas refrigeradas a 4° C até 24 horas depois da sua colheita, para se proceder à separação dos glóbulos vermelhos do plasma. Efectuada a separação, armazenou-se a - 20° C o buffycoat e as alíquotas de plasma recolhidas para posteriormente serem utilizadas na determinação das concentrações plasmáticas de glutatono total (GSht) e E2.

3.2.2. Extracção de DNA

O DNA genómico foi extraído a partir de sangue periférico total, colhido nas condições anteriormente descritas. O método utilizado foi o da extracção não enzimática de DNA de leucócitos obtidos directamente de sangue periférico, um método adaptado a partir do descrito por Lahiri & Nurnberger (1991) (107).

Este método, que se trata de uma técnica rápida e de fácil execução, não utiliza solventes agressivos e tem como princípio básico o “salting-out” de proteínas, podendo ser dividido em seis etapas distintas: lise das células, separação do DNA, precipitação do DNA, solubilização do DNA, avaliação da extracção de DNA e conservação do DNA.

É de salientar, que este método além de permitir uma boa recuperação do DNA, fá-lo com uma garantia de grau de pureza suficiente para que se possam efectuar as técnicas de PCR e PCR-RFLP.

3.2.2.1. Método Experimental

Inicialmente, transferiram-se 3 ml de sangue para um tubo de polipropileno rolhado e graduado de 10 ml, devidamente identificado. Adicionou-se o mesmo volume de TKM X-100 (Anexo A.3) em relação ao volume de sangue, tendo havido o cuidado de adicionar parte desta solução ao tubo de onde o sangue foi transferido, de forma a se evitarem desperdícios.

Adicionaram-se 25 µl de IGEPAL CA 630 por cada ml de sangue utilizado, com o objectivo de lisar as células, provocando assim a libertação do DNA e outros constituintes celulares. Agitaram-se os tubos por inversão vigorosa, entre quatro a cinco vezes, e em seguida centrifugaram-se os tubos a 2200 rpm à temperatura de 4° C durante 15 minutos, numa centrífuga refrigerada de alta velocidade, com o travão desta regulado para o valor 0.

Rejeitaram-se os sobrenadantes e ao pellet que continha entre outros constituintes, o DNA, adicionou-se 1 ml de tampão TKM1 (Anexo A.3) por cada de ml de sangue utilizado. Centrifugaram-se novamente os tubos desta vez a 1600 rpm, à temperatura de 4° C e durante 10 minutos, tendo-se repetido os passos de rejeição do sobrenadante e adição posterior de tampão TKM1. Este passo foi repetido duas vezes, de modo a obter-se um pellet branco, evitando assim perdas excessivas de DNA.

Ressuspendeu-se o pellet obtido em tampão TKM2 (Anexo A.3), numa proporção de 160 µl por ml de sangue utilizado e adicionaram-se 10 µl de SDS 10 % por cada ml de sangue utilizado, tendo depois ressuspendido a mistura com o auxílio da micropipeta. Incubaram-se os tubos num aparelho de banho-maria a 55° C durante 10 minutos.

Transferiu-se o conteúdo de cada tubo para um tubo de reacção de 1,5 ml, ao qual se juntaram 60 µl de NaCl 6M por cada ml de sangue utilizado. Neste momento, foi possível visualizar de imediato a precipitação de proteínas existentes na suspensão de DNA e que formaram uma fase branca opaca distinta de uma outra fase completamente transparente.

Agitaram-se os tubos num vórtex e em seguida centrifugaram-se os mesmos numa microcentrífuga a 12000 rpm à temperatura ambiente (aproximadamente 20° C) durante 30 minutos num processo denominado “salting-out”. Verceu-se o sobrenadante (que contém o DNA) resultante da centrifugação anterior para um tubo de plástico rolhado de 5 ml, ao qual se adicionaram aproximadamente dois volumes de etanol absoluto gelado relativamente ao volume de sangue utilizado (previamente colocado a - 20° C). Taparam-se os tubos com a respectiva tampa e inverteram-se os mesmos suavemente, entre duas a três vezes, até se verificar a precipitação do DNA.

Com o auxílio da ponta da micropipeta, transferiu-se e ressuspendeu-se o DNA em 200 µl de tampão TE (Anexo A.3) previamente colocados num novo tubo de reacção de 1,5 ml devidamente identificado.

Finalmente, procedeu-se à quantificação do DNA (em ng/µl) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm e à determinação do seu grau de pureza (através das razões entre absorvâncias 260/280 nm e 230/260 nm) num espectrofotómetro de espectro completo. A conservação das amostras de DNA extraídas foi efectuada por armazenamento dos tubos a 4° C podendo estas manterem-se nestas condições até um período de vários anos sem que haja degradação do DNA.

3.2.3. Análise genética: Genotipagem dos Grupos de Estudo

Efectuou-se a genotipagem dos grupos controlo e das doentes relativamente aos polimorfismos em estudo para os genes da MPO e da GST.

A identificação do polimorfismo G463A do gene da MPO foi efectuada através da técnica de PCR-RFLP. Esta técnica detecta a presença de alterações pontuais que originam o aparecimento ou desaparecimento do local de restrição, permitindo assim, diagnosticar a ocorrência de mutações, traduzida na prática pelo aparecimento de fragmentos de diferentes tamanhos após a hidrólise dos produtos amplificados por enzimas de restrição (RFLP - *Restriction fragment length polymorphism*).

Relativamente aos polimorfismos dos genes da GSTM1 e GSTT1, a sua identificação foi efectuada em simultâneo por meio da utilização da técnica de PCR-Multiplex, uma modificação de uma PCR normal e que por meio de múltiplos conjuntos de “primers” na mesma mistura de reacção, permite detectar rapidamente deleções ou duplicações de um gene. A identificação destes polimorfismos, neste caso por deleção total do gene, foi determinada pela presença (genótipo positivo ou não) ou ausência (genótipo nulo) da respectiva banda, na electroforese.

Ambas as técnicas utilizadas haviam sido anteriormente optimizadas noutros trabalhos de investigação no Laboratório de Genética do Instituto de Medicina Molecular, onde o presente trabalho de investigação foi igualmente desenvolvido.

3.2.3.1. Identificação do Polimorfismo G463A do Gene da MPO

Este polimorfismo que ocorre na região promotora do gene da MPO envolve a substituição de uma guanina por uma adenina na posição 463. O estudo deste polimorfismo, como referido anteriormente, envolveu a amplificação dos fragmentos de DNA dos dois grupos de estudo, seguida de digestão com a enzima *AciI*.

O par de “primers” utilizado, forward e reverse respectivamente, foi 5' - CCGTATAGGCACACAATGGTAG - 3' e 5' - GCAATGGTTCAAGCGATTCTTC - 3', para a amplificação de um fragmento com 350 pb.

Inicialmente, pipetaram-se 200 ng da amostra de DNA para tubos de reacção de 200 µl devidamente identificados e adicionou-se água desionizada até perfazer 10 µl (quando necessário). Depois colocaram-se os tubos num termociclador a 94° C, durante dois minutos, para se proceder à desnaturação do DNA (“Hot start”).

Preparou-se e adicionou-se a cada um dos tubos contendo as amostras de DNA, a seguinte mistura reaccional, para um volume final de 50 µl: 20 pmol de cada “primer”; Dream Taq Green PCR MasterMix contendo 1X Tampão (NH₄)₂SO₄, 0.2 mM mistura de nucleótidos para PCR, 25 mM MgCl₂ e 2 U Taq Polimerase.

Colocaram-se os tubos no termociclador, submetendo-os ao seguinte programa de 35 ciclos de PCR: 1 minuto a 94° C (desnaturação), 1 minuto a 59° C (emparelhamento), 1 minuto a 72° C (extensão). Após o último ciclo, acrescentou-se uma extensão de 5 minutos a 72° C.

Analisaram-se 10 µl de produto amplificado num gel de agarose 3% (m/v) em 50 ml tampão TAE 1X (Anexo A.3), contendo brometo de etídio 1 µg/ml, a 80 V num aparelho de electroforese durante 30 minutos. Visualizaram-se os géis de agarose num transiluminador de luz ultravioleta.

A substituição de um G pelo A na posição 436 altera a sequência de corte que é reconhecida pela enzima de restrição AclI (Fig. 10), não havendo digestão.

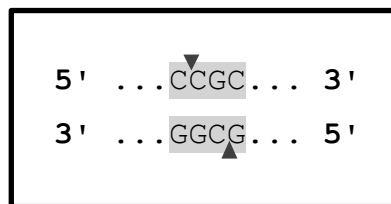


Figura 10. Esquema representativo das sequências de reconhecimento (sombreado) e local de corte (setas) da enzima de restrição AclI.

Através da utilização desta enzima, procedeu-se à digestão das amostras amplificadas, preparando em tubos de reacção de 200 µl, a seguinte mistura reaccional: 20 µl de produto de PCR, 1X de Tampão R⁺ e 5U de AclI. Incubaram-se os tubos numa estufa a 37° C durante 16 horas para efectuar a digestão.

Analisaram-se 10 µl de produto da digestão num gel de agarose 3% (m/v) em 50 ml tampão TAE 1X (Anexo A.3), contendo brometo de etídio 10 µg/ml, a 85 V num aparelho de electroforese durante 90 minutos. Visualizaram-se os geis de agarose num transiluminador de ultravioleta.

É de salientar, que em cada reacção de PCR e posteriormente nas reacções de hidrólise enzimática respectivas, incluiu-se um controlo negativo (água desionizada) e um controlo positivo que correspondeu a um dador que havia sido genotipado para este polimorfismo num outro estudo efectuado no laboratório de genética. Nas electroforeses efectuadas utilizou-se um marcador de peso molecular com o intuito de confirmar o tamanho das bandas amplificadas e obtidas após a digestão e desta forma identificar o polimorfismo em estudo.

3.2.3.2. Identificação dos Polimorfismos dos genes das GSTM1 e GSTT1

A identificação em simultâneo dos polimorfismos por deleção total do gene dos enzimas GSTM1 (classe µ) e GSTT1 (classe θ), através da técnica PCR-Multiplex, envolveu a utilização de dois pares de “primers”, um par específico para cada polimorfismo. Adicionalmente, utilizou-se mais um par de “primers” para o enzima GSTM4 (classe µ) que pelo facto de não possuir polimorfismos, serviu de controlo interno para a própria reacção de PCR, sendo um indicativo da amplificação do gene pretendido.

Os “primers” utilizados tinham as seguintes sequências:

- 5' - GCCATCTTGTGCTACATTGCCCG - 3' (P1 - GSTM1/M4);
- 5' - ATCTTCTCCTCTTCTGTCTCCCC - 3' (P2 - GSTM1/M4);
- 5' - TTCTGGATTGTAGCAGATCATGCCC - 3' (3 - GSTM1);
- 5' - TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC - 3' (P4 - GSTT1);
- 5' - TCACCGGATCATGGCCAGCA - 3' (P5 - GSTT1).

O par composto pelos “primers” P1 e P3 amplificam um fragmento de 230 pb específico para o polimorfismo da GSTM1 (o “primer” P3 liga-se especificamente a sequências do GSTM1), o par composto pelos “primers” P1 e P2 amplificam um fragmento de 157 pb para o GSTM4 (ambos podem ligar-se ao GSTM1 ou GSTM4), e o par composto pelos “primers” P4 e P5 amplificam um fragmento de 480 pb para o polimorfismo GSTT1.

Inicialmente, pipetaram-se para tubos de reacção de 200 µl devidamente identificados, 200 ng da amostra de DNA e adicionou-se água desionizada até perfazer 10 µl (quando necessário). Depois, colocaram-se os tubos no termociclador a 94° C durante dois minutos, para se proceder à desnaturação do DNA (“Hot start”).

Preparou-se e adicionou-se a cada um dos tubos contendo as amostras, a seguinte mistura reaccional, para um volume final de 50 µl: 5% DMSO, 20 pmol de cada “primer”; Dream Taq Green PCR MasterMix contendo 1X Tampão (NH₄)₂SO₄, 0.2 mM mistura de nucleótidos para PCR, 25 mM MgCl₂ e 2 U Taq Polimerase.

Colocaram-se os tubos no termociclador, submetendo-os ao seguinte programa de 40 ciclos de PCR: 45 segundos a 94° C (desnaturação), 45 segundos a 59° C (emparelhamento), 45 segundos a 72° C (extensão). Após o último ciclo, acrescentou-se uma extensão de 5 minutos a 72° C.

Analisaram-se 10 µl de produto amplificado num gel de agarose 3% (m/v) em 50 ml tampão TAE 1X (Anexo A.3), contendo brometo de etídio 1 µg/ml, a 85 V num aparelho de electroforese durante 90 minutos. Visualizaram-se os géis de agarose num transiluminador de ultravioleta.

Tal como no polimorfismo anterior, incluiu-se em cada reacção de PCR um controlo negativo (água desionizada) e um controlo positivo, que tal como referido anteriormente, foi o GSTM4. Nas electroforeses efectuadas utilizou-se um marcador de peso molecular com o intuito de confirmar o tamanho das bandas amplificadas e desta forma identificar não só as bandas relativas aos polimorfismos em estudo, bem como a banda relativa ao controlo interno.

3.2.4. Determinação da Actividade da RTM Eritrocitária

A RTM, como referido num capítulo anterior, é uma proteína presente na membrana citoplasmática dos glóbulos vermelhos e que pode utilizar o ascorbato como principal dador de electrões intracelular. A actividade deste complexo enzimático pode ser determinada através do seguimento da redução do aceitador de electrões artificial ferricianeto de potássio a ferrocianeto por meio de espectrofotometria.

Esta técnica baseia-se na reacção enzimática onde o ferricianeto é convertido a ferrocianeto através da reacção com uma mistura reaccional, por acção da redutase transmembranar, a qual consiste na adição de Fe³⁺ que é reduzido a Fe²⁺, sendo o Fe²⁺ complexado em pH ácido com batofenantrolina formando um composto (cromóforo) com pico de absorção nos 535 nm, podendo assim ser quantificado por espectrofotometria.

A utilização do ferrocianeto de potássio como aceitador de electrões exógeno prende-se com o facto deste potenciar a actividade do sistema RTM - NADH que é baixa na presença de aceitadores endógenos.

3.2.4.1. Método Experimental

3.2.4.1.1. Determinação da Curva de Calibração do Ferrocianeto

De forma a determinar a actividade da RTM, foi necessário calcular o coeficiente de absorvidade do ferrocianeto (ϵ). Este valor foi obtido através de uma curva de calibração, que é efectuada sempre que é preparada uma nova solução de cloreto férrico ou de batofenantrolina (Fig. 17). Para tal, dissolveram-se 0,002 g de ferrocianeto de potássio em 100 ml de água desionizada e prepararam-se várias diluições desta solução em tubos de ensaio de 10 ml, para um volume final ajustado de 700 μ l (Anexo B – Tabela XII). Neste ensaio efectuaram-se duplicados.

Preparou-se uma mistura reaccional numa proporção de 2:2:1:1 (Anexo A.3) e adicionaram-se a cada um dos tubos, 300 μ l desta mesma mistura, agitando-os no vórtex e colocando-os depois ao escuro durante 5 minutos. Realizou-se a leitura da conversão de ferricianeto a ferrocianeto das diferentes soluções a 535 nm num espectrofotómetro e registaram-se os valores verificados, efectuando posteriormente a curva de calibração, sendo que, o valor do coeficiente de absorvidade do ferrocianeto foi dado pelo declive da recta obtida.

3.2.4.1.2. Determinação da Actividade da RTM

Primeiramente, procedeu-se à separação dos glóbulos vermelhos do plasma através da centrifugação do sangue a 2000 rpm durante 10 minutos a 4° C numa centrífuga refrigerada de alta velocidade. Retirou-se o sobrenadante (plasma) e efectuaram-se três lavagens do concentrado de glóbulos vermelhos com NaCl 0.9% (v/v) com o mesmo programa de centrifugação anterior. Em cada uma das lavagens, descartou-se o sobrenadante.

Para efectuar a determinação da actividade da RTM, colocaram-se em tubos de ensaio de 10 ml devidamente rotulados com B₀, T₀, B₂₀ e T₂₀, 700 μ l de tampão fosfato salino 0.1 M (Anexo A.3) e 37.5 μ l de glóbulos vermelhos, obtidos no passo anterior.

Colocaram-se os tubos de ensaio numa incubadora durante 5 minutos a 37° C com agitação constante. Terminada a incubação, adicionaram-se 12.5 μ l de Ferricianeto de Potássio 0.1 M em NaCl 0.9 % (v/v) aos tubos T₀ e T₂₀ e centrifugaram-se os tubos B₀ e T₀ a 2000 rpm durante 10 minutos a 4° C. Retiraram-se 350 μ l de sobrenadante dos tubos B₀ e T₀ para um novo tubo de ensaio devidamente identificado.

Enquanto se procedia ao passo anterior, continuou-se a incubação com agitação constante dos tubos B₂₀ e T₂₀ por mais 20 minutos. Terminado este período de incubação, centrifugaram-se

estes tubos a 2000 rpm durante 10 minutos a 4° C. Retiraram-se 350 µl de sobrenadante dos tubos B₂₀ e T₂₀ para um novo tubo de ensaio devidamente identificado.

Adicionaram-se 6.25 µl de Ferricianeto de Potássio 0.1 M em NaCl 0.9 % (v/v) aos novos tubos de ensaio contendo o sobrenadante de B₀ e B₂₀. Incubou-se o tubo de B₂₀ durante 20 minutos a 37° C com agitação constante e armazenaram-se os tubos contendo os sobrenadantes de B₀, T₀ e T₂₀ a 4° C.

Para efectuar as leituras da actividade da RTM, colocaram-se 700 µl de água destilada e 300 µl de mistura reaccional (proporção de 2:2:1:1) (Anexo A.3) num tubo de ensaio correspondente ao branco (referência) e 600 µl de água destilada, 300 µl de mistura reaccional e 100 µl do respectivo sobrenadante em tubos de ensaio devidamente identificados como R₀, T₀, R₂₀ e T₂₀. Para cada amostra, fez-se um duplicado de R₀, T₀, R₂₀ e T₂₀.

Agitaram-se os tubos, colocando-os em seguida no escuro durante 5 minutos.

Leram-se as absorvâncias a 535 nm num espectrofotómetro e registaram-se os valores observados. Determinou-se a quantidade de ferrocianeto formado através da seguinte fórmula:

$$\text{ActRTM} = \frac{1 - \left(\frac{\text{hematócrito}}{20} \right)}{\left(\frac{\text{hematócrito}}{20} \right)} \times 3 \left(\frac{(T_{20} - B_{20}) - (T_0 - T_{20})}{\varepsilon (\text{ferrocianeto})} \right)$$

sendo que, ε (ferrocianeto) corresponde ao coeficiente de correlação do ferrocianeto que foi determinado a partir da curva de calibração (declive da recta da curva de calibração) (Fig. 17).

Os valores obtidos a partir da fórmula são expressos em mmol ferrocianeto/l/h.

Os resultados foram apresentados sob a forma de média ± desvio padrão.

3.2.4.1.3. Hematócrito

Efectuou-se a determinação do hematócrito fazendo passar a solução de glóbulos vermelhos lavados no início do método experimental, por um tubo capilar específico para hematócrito. Centrifugaram-se os capilares a 15250 g, durante 7 minutos numa microcentrífuga e determinou-se o volume das células relativamente ao volume total de suspensão, comparando a altura da coluna de células com a altura da coluna de líquido, com o auxílio de um cartão de leitura manual de hematócrito.

3.2.5. Determinação da concentração plasmática de GSht e da razão GSht/GSSG

Determinou-se para ambos os grupos de estudo a concentração plasmática de GSht, bem como, a razão GSht/GSSG, que pode ser utilizada como um indicador do estado redox das células.

Em situações anormais ou de sobrecarga oxidante, existe uma maior concentração de GSSG e consequentemente, a razão GSht/GSSG apresenta valores mais baixos. Pelo contrário, em condições normais ou estáveis, uma menor quantidade de GSH é convertida em GSSG, pelo que a razão GSht/GSSG apresenta valores superiores.

Este método, adaptado do apresentado por Hissin & Hilf (1976) (108), baseia-se na utilização de um reagente fluorescente, o orto-ftaldeído (OPT), em reacção com o GSH e o GSSG. O OPT tem a capacidade de interagir com diversos aminoácidos e proteínas, originando conjugados que emitem fluorescência. Mas, pelo facto de não ser específico para o GSH, é necessário efectuar a precipitação das proteínas plasmáticas de modo a evitar a sua interacção com o OPT, podendo interferir na determinação das unidades de fluorescência e assim falsear os resultados. Adicionalmente, no ensaio do GSSG utiliza-se um composto, o N-etilmaleimida (NEM), que evita a oxidação do GSH em GSSG, impedindo deste modo, a adulteração dos resultados.

3.2.5.1. Método Experimental

3.2.5.1.1. Cálculo das curvas de calibração de GSH e GSSG

Preparou-se uma solução padrão de GSH 5 µg/ml (Anexo A.3) e uma solução padrão de GSSG 5 µg/ml (Anexo A.3). Diferentes quantidades destas soluções foram adicionadas a 100 µl de uma solução de *o*-ftaldialdeído (OPT) (Anexo A.3) e o volume final foi ajustado para 2 ml, com tampão fosfato 0.1 M - EDTA 0.005 M, pH 8.0 para a solução padrão de GSH (Anexo B - Tabela XIII) e com NaOH 0.1 M para a solução padrão de GSSG (Anexo B - Tabela XIV).

As soluções foram agitadas no vórtex e incubadas à temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, aplicaram-se 200 µl de cada uma das soluções em diferentes poços de uma microplaca de fundo plano e mediram-se as suas intensidades de fluorescência a um comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) de 340 nm e um comprimento de onda de emissão (λ_{em}) de 430 nm, num espectrofluorímetro. Com os valores obtidos respectivamente, efectuou-se a curva de calibração para as duas soluções (Fig. 18 e 19).

3.2.5.1.2. Precipitação das Proteínas para Determinar as Concentrações Plasmáticas de GSH e de GSSG

Em tubos de reacção de 1,5 ml, a 50 µl de plasma adicionaram-se 50 µl de ácido metafosfórico (25 % m/v) (Anexo A.3) e 187.5 µl de tampão fosfato 0.1M-EDTA 0.005 M pH 8.0. Centrifugaram-se os tubos a 10.000 rpm durante 30 minutos à temperatura ambiente. Do sobrenadante obtido após a centrifugação, retiraram-se para novos tubos de reacção de 1.5 ml devidamente identificados, 50 µl para efectuar o doseamento do GSH e 50 µl para efectuar o doseamento do GSSG.

3.2.5.1.3. Determinação da Concentração Plasmática de GSH

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 em tubos de ensaio de 3 ml devidamente identificados, 1900 µl Tampão Fosfato 0.1M - EDTA 0.005 M (pH 8.0) e 100 µl de OPT 1mg/ml em metanol 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 correspondentes às amostras. Este ensaio foi realizado em triplicado.

Agitaram-se e incubaram-se os tubos de ensaio durante 15 minutos à temperatura ambiente para que a reacção ocorresse e posteriormente aplicaram-se 200 µl de cada uma das soluções em diferentes poços numa microplaca de fundo plano, procedendo depois à leitura da intensidade de fluorescência das amostras, a um comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) de 340 nm e um comprimento de onda de emissão (λ_{em}) de 430 nm, num espectrofluorímetro.

3.2.5.1.4. Determinação da Concentração Plasmática de GSSG

Incubaram-se 50 µl do sobrenadante com 20 µl de NEM 0.04 M durante 30 minutos à temperatura ambiente. Diluíu-se a solução efectuada anteriormente em 430 µl de NaOH 0,1 M, obtendo uma nova solução com uma diluição de 1/10.

Para proceder à determinação do GSSG colocaram-se em tubos de ensaio de 3 ml devidamente identificados, 1900 µl de NaOH 0.1 M e 100 µl de OPT correspondente ao branco e 1800 µl NaOH 0.1 M, 100 µl de OPT e 100 µl de sobrenadante anteriormente diluído, correspondentes às amostras. Este ensaio foi realizado em triplicado.

Agitaram-se e incubaram-se os tubos de ensaio durante 15 minutos à temperatura ambiente para que a reacção ocorresse e posteriormente aplicaram-se 200 µl de cada uma das soluções em diferentes poços numa microplaca de fundo plano, procedendo depois à leitura da intensidade de fluorescência das amostras, a um comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) de 340 nm e um comprimento de onda de emissão (λ_{em}) de 430 nm, num espectrofluorímetro.

3.2.5.1.5. Cálculo da Concentração Plasmática de GSht, GSSG e da Razão GSht/GSSG

Para determinar a concentração plasmática de GSht, inicialmente calculou-se o valor médio das absorvâncias dos triplicados para cada um dos ensaios. Em seguida, calcularam-se as concentrações de GSH e GSSG em µg/ml a partir das respectivas equações das rectas das curvas de calibração (Fig. 18 e 19), sabendo que:

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

sendo que, **A** é o valor da absorvância de cada amostra (média dos triplicados), **b** é o valor da ordenada na origem no gráfico da recta de calibração e **m** o declive da recta de calibração.

Os valores obtidos na equação foram multiplicados pelo factor de diluição (57.5) e convertidos de µg/ml a µM, ou seja, µmol/dm³.

Os resultados foram apresentados sob a forma de média ± desvio padrão.

3.2.6. Determinação da Concentração Plasmática de E2

A determinação da concentração plasmática de E2 foi efectuada através do protocolo fornecido pelo “kit” de ELISA utilizado neste ensaio e que está disponível em <http://www.rndsystems.com/Products/kge014/AssayProcedure>.

Esta técnica baseia-se num princípio de ligação competitiva anticorpo-antigénio associada à fluorescência através da utilização de anticorpos monoclonais específicos para o E2, sendo depois adicionada uma solução de substrato para determinar a actividade da enzima que se ligou aos anticorpos, por espectrofotometria.

Neste “kit” em particular, o anticorpo monoclonal específico para o E2 liga-se ao anticorpo anti-rato que se encontra na microplaca. Após uma lavagem para remoção do excesso de anticorpos monoclonais, o E2 presente na amostra compete com uma quantidade pré-definida de E2 associada à HRP (“horseradish peroxidase”). A HRP é uma enzima com a capacidade de

catalizar uma reacção que produz fluorescência e ao adicionar-se uma solução de substrato de HRP aos poços da microplaca, pode-se determinar a quantidade de enzima ligada ao anticorpo por espectrofotometria. A intensidade da cor é inversamente proporcional à concentração de E2 na amostra.

Os valores obtidos a partir da fórmula são expressos em pg/ml.

Os resultados foram apresentados sob a forma de média \pm desvio padrão.

3.3. Análise estatística dos resultados obtidos

De modo a facilitar a análise estatística, construiu-se uma base de dados no programa informático SPSS, que continha todos os resultados obtidos. Esta foi efectuada nos softwares SPSS e Primer of Biostatistics, tendo-se estabelecido o nível de significância de $p < 0.05$.

Relativamente aos dados discretos, neste caso a identificação dos polimorfismos em estudo e que permitiu determinar as frequências genotípicas e alélicas respectivas para cada variante polimórfica, utilizou-se o teste do qui-quadrado de Pearson (χ^2) para avaliar se os dois grupos de estudo se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e para verificar se havia uma diferença significativa estatística nas frequências genotípicas e alélicas entre ambos. Adicionalmente, para determinar o risco relativo dos diferentes genótipos para o desenvolvimento de leiomiomas calculou-se o “Odds Ratio”.

No que se refere aos parâmetros com variáveis contínuas, como é o caso da actividade da RTM e das concentrações plasmáticas de GSht e E2, realizou-se o teste de normalidade “Kolmogorov-Smirnov” para os dois grupos de estudo, para determinar se a sua distribuição era normal ou não. Procedeu-se ainda à realização do teste “t-student” ou de “Mann-Whitney”, para avaliar as diferenças entre os grupos dos casos e dos controlos.

RESULTADOS

4

Neste trabalho de investigação, através de um estudo de associação caso/controlo em que se utilizaram dois grupos de mulheres, um composto por mulheres com leiomiomas (grupo das doentes) e outro composto por mulheres dadoras voluntárias de sangue que não apresentavam leiomiomas uterinos evidenciáveis ou com sintomatologia associada à sua ocorrência, ou antecedentes conhecidos de ocorrência de leiomiomas uterinos (grupo controlo), averiguou-se sobre a possível existência de uma associação relativa entre os polimorfismos em estudo e o desenvolvimento de leiomiomas uterinos.

Adicionalmente, determinaram-se alguns parâmetros bioquímicos de variação contínua para os dois grupos de estudo, como a actividade da RTM eritrocitária, as concentrações plasmáticas de E2, GSht e a razão plasmática GSht/GSSG.

4.1. Caracterização dos Grupos de Estudo

Os resultados obtidos derivaram de uma amostra populacional constituída pelas 190 pacientes que corresponderam aos critérios de selecção mencionados no capítulo anterior e que compuseram o grupo das doentes, e pelas 409 dadoras voluntárias de sangue elegíveis para o decorrente estudo, que compuseram o grupo controlo.

Relativamente à variável idade, verificou-se que para o grupo das doentes a idade média foi de 38.42 ± 6.49 e para o grupo controlo foi de 44.14 ± 13.58 . Realizou-se o teste “t-Student” para avaliar se para a variável idade, que segue uma distribuição normal, havia uma diferença significativa entre as médias dos dois grupos de estudo ($\alpha = 0.05$). Como $p < 0.001$ pôde-se afirmar positivamente a existência de uma diferença significativa (Tabela I).

Tabela I. Distribuição da idade nos grupos de estudo.

Variável	Grupo das Doentes (N = 190)	Grupo Controlo (N = 409)	Diferença Estatística
Idade	38.42 ± 6.49	44.14 ± 13.58	$p < 0.001^a$

^a Nível de significância de 95% para o test “t-student” ($\alpha = 0.05$)

4.2. Identificação do Polimorfismo G463A do gene da MPO

A mutação genética que caracteriza este polimorfismo resulta na troca de uma guanina por uma adenina na posição 463 do gene da MPO, tendo uma implicação na redução da actividade transcripcional do gene e na produção de ROS.

Das 190 pacientes que faziam parte do grupo das doentes, 109 foram genotipadas eficazmente para o polimorfismo G463A do gene da MPO. Quanto ao grupo controlo obteve-se a genotipagem de 119 indivíduos. Tal como esperado, o fragmento obtido nas reacções de PCR foi de 350 pb (Fig. 11).

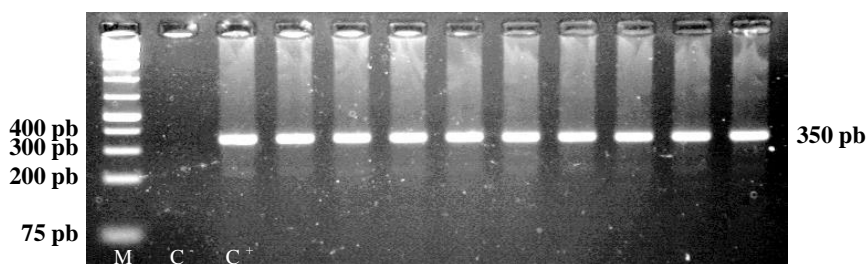


Figura 11. Perfil electroforético de uma reacção de PCR-RFLP para o polimorfismo G463A do gene da MPO, de nove indivíduos do grupo das doentes. **M** - Marcador de peso molecular Gene Ruler 1 Kb; **C⁻** - Controlo negativo; **C⁺** - Controlo positivo.

Na identificação deste polimorfismo, encontraram-se em ambos os grupos de estudo, os três genótipos possíveis (Fig. 12):

- GG - Homozigótico sem mutação, caracterizado por três bandas com 169, 120 e 61pb;
- GA - Heterozigótico, caracterizado por quatro bandas com 289, 169, 120 e 61 pb;
- AA - Homozigótico com mutação, caracterizado por duas bandas com 289 e 61 pb.

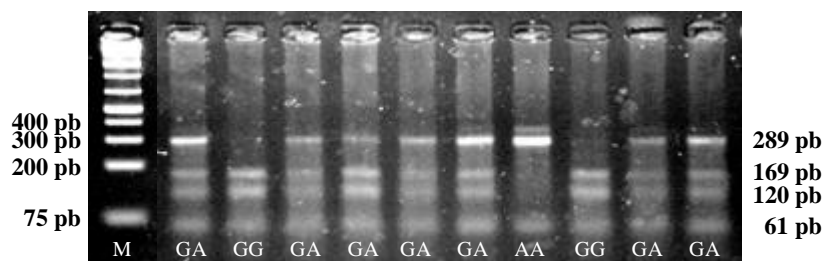


Figura 12. Perfil electroforético de uma reacção de hidrólise enzimática com a enzima de restrição *AciI*, de produto de PCR-RFLP para o polimorfismo G463A do gene da MPO, de nove indivíduos do grupo das doentes, onde se observa a presença dos três genótipos: AA - Homozigótico com mutação, GA - Heterozigótico, GG - Homozigótico sem mutação. **M** - Marcador de peso molecular Gene Ruler 1 Kb. O primeiro genótipo do gel corresponde ao controlo positivo da Figura 11 (**C⁺**).

Na tabela II encontra-se exposta a distribuição estatística dos genótipos para este polimorfismo nos dois grupos de estudo. No grupo controlo, obtiveram-se para os genótipos GG, GA e AA as frequências de 44.6 %, 44.6 % e 10.8 %, respectivamente. Relativamente ao grupo das doentes, para os mesmos genótipos GG, GA e AA, obtiveram-se as frequências de 31.2 %, 64.2 % e 4.6 %, respectivamente.

Efectuou-se o teste do qui-quadrado de Pearson (χ^2) para testar se os dois grupos se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). Verificou-se que o grupo controlo estava em equilíbrio, pois $\chi^2 = 0.01$ e $p = 0.92$, e que o grupo das doentes não estava em equilíbrio, pois $\chi^2 = 15.93$ e $p < 0.001$.

Realizou-se o teste do qui-quadrado para averiguar se havia uma diferença estatisticamente significativa nos valores das frequências genotípicas para este polimorfismo, entre os dois grupos de estudo, tendo-se verificado que sim, já que $p = 0.008 < \alpha = 0.05$. O mesmo teste foi realizado respeitante às frequências alélicas, tendo-se verificado a ausência de uma diferença significativa estatisticamente entre os dois grupos de estudo, já que $p = 0.471$ (Tabela II).

Tabela II. Frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo G463A do gene da MPO para os grupos de estudo.

Grupos	GG	GA	AA	Total	p^a	G	A	p^b
	N (%)	N (%)	N (%)	N		N (%)	N (%)	
Doentes	34	70	5	109	0.008	138	80	0.471
	(31.2 %)	(64.2 %)	(4.6 %)			(63.3 %)	(36.7 %)	
Controlo	54	54	13	121		162	80	
	(44.6 %)	(44.6 %)	(10.8 %)			(66.9 %)	(33.1 %)	

^a Nível de significância de 95% para o teste χ^2 de Pearson para os genótipos ($\alpha = 0.05$)

^b Nível de significância de 95% para o teste χ^2 de Pearson para os alelos ($\alpha = 0.05$)

Uma vez que se observou uma diferença significativa entre as frequências genotípicas dos grupos de estudo, efectuou-se uma análise do “Odds Ratio”, com o intuito de avaliar se algum dos genótipos exerce um efeito protector ou de risco para o desenvolvimento dos leiomiomas (Tabela III). Os resultados obtidos sugeriram que o genótipo GA pode ser considerado um factor de risco para o desenvolvimento dos leiomiomas (OR = 2.227, $p = 0.004$) e que o genótipo GG pode ser considerado um factor protector (OR = 0.562, $p = 0.049$) (Tabela III).

Fez-se ainda uma análise “Odds Ratio” para as associações entre os genótipos GG+GA e GA+AA, a fim de avaliar se alguma delas, à imagem do genótipo GA, poderia ser igualmente um factor de risco para o desenvolvimento dos leiomiomas uterinos, tendo-se verificado que não, pois apesar dos valores de OR terem sido superiores a 1, os valores de p não foram inferiores a 0.05 (Tabela III).

No que diz respeito aos alelos, verificou-se que o alelo A demonstrou uma tendência no sentido de poder constituir um factor de risco e o alelo G um factor protector no desenvolvimento dos leiomiomas uterinos, já que os valores de OR foram de 1.174 e 0.852, respectivamente. No entanto, para ambos os alelos $p = 0.471 > \alpha = 0.051$ (Tabela IV).

Tabela III. Análise do risco por “Odds Ratio” dos diferentes genótipos para o polimorfismo G463A do gene da MPO nos grupos de estudo, para o desenvolvimento dos leiomiomas.

Genótipos	Doentes (%) (N = 109)	Controlo (%) (N = 121)	OR	IC (95 %)	p ^a
GG	34 (31.2 %)	54 (44.6 %)	0.562	0.327 – 0.966	0.049
GA	70 (64.2 %)	54 (44.6 %)	2.227	1.310 – 3.787	0.004
AA	5 (4.6 %)	13 (10.8 %)	0.399	0.138 – 1.160	0.136
GG + GA	104 (95.4 %)	108 (89.2 %)	2.504	0.862 – 7.270	0.136
AA + GA	75 (68.8 %)	67 (55.4 %)	1.778	1.035 – 3.054	0.051

^a Significativo para $p < 0.05$

Tabela IV. Análise do risco por “Odds Ratio” dos alelos G e A para o polimorfismo G463A do gene da MPO, nos grupos de estudo, para o desenvolvimento dos leiomiomas.

Alelos	Casos (%)	Controlos (%)	OR	IC (95 %)	p ^a
G	138 (63.3 %)	162 (66.9 %)	0.852	0.580 – 1.251	0.471
A	80 (36.7 %)	80 (33.1 %)	1.174	0.799 – 1.724	0.471

^a Significativo para $p < 0.05$

4.3. Identificação dos Polimorfismos dos genes das GSTM1 e GSTT1

A identificação dos polimorfismos M1 e T1 do gene do GST é efectuada por detecção total do gene, sendo que, a presença da respectiva banda na electroforese é indicadora de um genótipo positivo ou não nulo (+), enquanto que a sua ausência é indicadora de um genótipo nulo (0).

Das 190 pacientes que faziam parte do grupo das doentes, 123 foram genotipadas eficazmente para estes dois polimorfismos. Quanto ao grupo controlo obteve-se a genotipagem de 160 mulheres. Tal como esperado, os fragmentos obtidos nas reacções de PCR foram de 157 pb para GSTM4, 230 pb para GSTM1 e 480 pb para GSTT1 (Fig. 13).

Na identificação destes polimorfismos, encontraram-se em ambos os grupos de estudo, os dois genótipos possíveis para cada um deles, o positivo (+) e o nulo (0) (Fig. 15). Observou-se ainda, a presença de todas as combinações possíveis entre os dois genótipos dos dois polimorfismos: (+/+) - Genótipos positivos para GSTM1 e GSTT1; (+/0) - Genótipo positivo para GSTM1 e nulo para GSTT1; (0/+) - Genótipo nulo para GSTM1 e positivo para GSTT1 e (0/0) - Genótipos nulos para GSTM1 e GSTT1 (Fig. 13).

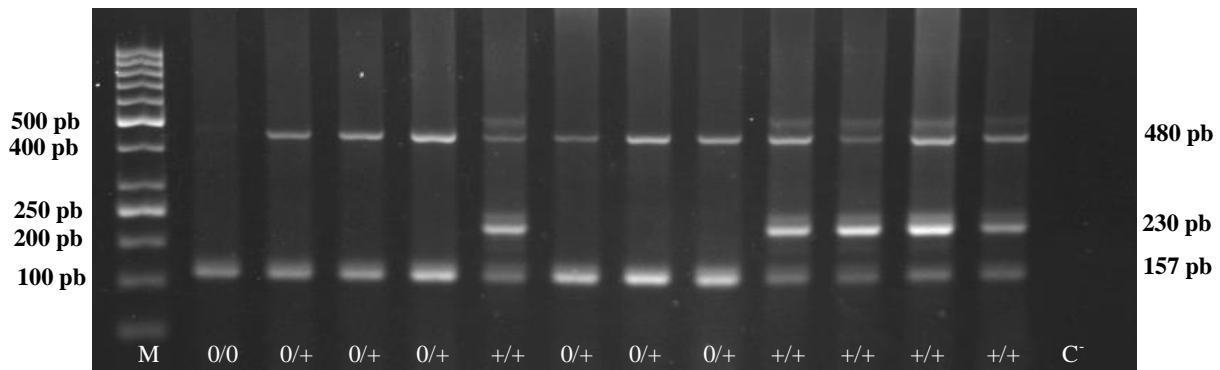


Figura 13. Perfil electroforético de uma reacção de PCR Multiplex para os polimorfismos dos genes das GSTM1 e GSTT1, de doze indivíduos do grupo das doentes. **M** - Marcador de peso molecular Gene Ruler 50 bp DNA Ladder; **C⁻** - Controlo negativo; (+/+) - Genótipos positivos para M1 e T1; (+/0) – Genótipo positivo para M1 e nulo para T1; (0/0) – Genótipos nulos para M1 e T1 .

Na tabela V encontra-se exposta a distribuição dos genótipos possíveis para estes polimorfismos, nos dois grupos de estudo. No grupo controlo, obtiveram-se para os genótipos positivo e nulo do polimorfismo do GSTM1 as frequências de 63.1 % e 36.9 %, respectivamente, e para os genótipos positivo e nulo do polimorfismo do GSTT1 as frequências de 68.1 % e 31.9 %, respectivamente. Relativamente ao grupo das doentes, para os mesmos genótipos positivo e nulo do polimorfismo do GSTM1, obtiveram-se as frequências de 61 % e 39 %, respectivamente, e para os genótipos positivo e nulo do polimorfismo do GSTT1 as frequências de 81.3 % e 18.7 %, respectivamente.

Realizou-se o teste do qui-quadrado de Pearson para averiguar se havia uma diferença significativa nos valores das frequências genótípicas destes dois polimorfismos, entre os dois grupos de estudo. Verificou-se que para o polimorfismo do GSTM1 não houve uma diferença significativa já que $p = 0.806 > \alpha = 0.05$, o mesmo não acontecendo para o polimorfismo do GSTT1 que apresentou uma diferença significativa das frequências genótípicas entre os dois grupos de estudo, pois $p = 0.018 < \alpha = 0.05$ (Tabela V).

Uma vez que se observou uma diferença significativa entre as frequências genótípicas entre os dois grupos de estudo para o polimorfismo do GSTT1, efectuou-se uma análise do “Odds Ratio”, com o intuito de avaliar se algum dos genótipos exerce um efeito protector ou de risco para o desenvolvimento dos leiomiomas (Tabela VI). Os resultados obtidos demonstraram que o genótipo positivo pode ser considerado um factor de risco (OR = 2.034, $p = 0.018$) e que o genótipo nulo pode ser considerado um factor protector (OR = 0.492, $p = 0.018$) para o desenvolvimento dos leiomiomas (Tabela VI).

Tabela V. Frequências genótípicas para os polimorfismos dos genes das GSTM1 e GSTT1 para os grupos de estudo.

Grupos	GSTM1		p^a	GSTT1		p^a	Total N
	Positivo (%)	Nulo (%)		Positivo (%)	Nulo (%)		
Doentes	75 (61 %)	48 (39 %)	0.806	100 (81.3 %)	23 (18.7 %)	0.018	123
Controlo	101 (63.1 %)	59 (36.9 %)		109 (68.1 %)	51 (31.9 %)		160

^a Nível de significância para o teste χ^2 de Pearson para os genótipos ($\alpha = 0.05$)

Tabela VI. Análise do risco por “Odds Ratio” dos genótipos do polimorfismo do gene da GSTT1 nos grupos de estudo, para o desenvolvimento dos leiomiomas.

Genótipos	Doentes (%) (N = 123)	Controlo (%) (N = 160)	OR	IC (95 %)	p^a
Positivo (+)	100 (81.3 %)	109 (68.1 %)	2.034	1.160 – 3.569	0.018
Nulo (0)	23 (18.7 %)	51 (31.9 %)	0.492	0.280 – 0.862	0.018

^a Significativo para $p < 0.05$

4.4. Interação epistática entre os polimorfismos dos genes das GSTM1 e GSTT1

Dado o facto de ambos os polimorfismos dos genes das GSTM1 e GSTT1, terem sido associados e implicados por vários autores em vários tipos de cancro e tumores, bem como em outras patologias, tentou-se aferir sobre uma possível interação epistática e um possível efeito acumulativo que a associação entre estes dois polimorfismos pudesse desempenhar no desenvolvimento dos leiomiomas.

Para isso, determinou-se a partir das frequências genótípicas obtidas anteriormente para os dois polimorfismos, as frequências das diferentes combinações possíveis entre os dois genótipos para os dois polimorfismos nos grupos de estudo. Sendo assim, obtiveram-se para o grupo das doentes as seguintes frequências de combinações entre os dois polimorfismos: (+/+) - 50.4 %; (+/0) - 10.6 %; (0/+) - 30.9 % e (0/0) - 8.1 %. Quanto ao grupo controlo, obtiveram-se os seguintes valores: (+/+) - 41.2 %; (+/0) - 21.9 %; (0/+) - 26.9 % e (0/0) - 10% (Tabela VII).

Efectuou-se uma análise comparativa das diferentes combinações genótípicas possíveis entre os dois polimorfismos, tendo-se realizado o teste do qui-quadrado de Pearson, comparando as suas frequências para ambos os grupos de estudo. Verificou-se a ausência de uma diferença significativa entre os dois grupos de estudo já que $X^2 = 7.187$; $p = 0.086 > \alpha = 0.05$ (Tabela VII). Apesar disso, efectuou-se na mesma uma análise de “Odds Ratio”, com o intuito de avaliar se alguma das combinações genótípicas demonstrava uma tendência no sentido de exercer um efeito protector ou de risco para o desenvolvimento dos leiomiomas uterinos (Tabela VIII). Os resultados obtidos demonstraram que a combinação genotípica entre o genótipo positivo para o polimorfismo da GSTM1 e o genótipo nulo para o polimorfismo da GSTT1 pode ser considerado um factor protector (OR = 0.422, $p = 0.019$).

Tabela VII. Frequências das diferentes combinações genótípicas possíveis entre os polimorfismos dos genes das GSTM1 e GSTT1 (GSTM1/GSTT1) para os grupos de estudo.

Grupos	(+/+)	(+/0)	(0/+)	(0/0)	Total (n)	p ^a
Doentes	62 (50.4 %)	13 (10.6 %)	38 (30.9 %)	10 (8.1 %)	123	0.086
Controlo	66 (41.2 %)	35 (21.9 %)	43 (26.9 %)	16 (10 %)	160	

^a Nível de significância para o teste χ^2 de Pearson para os genótipos ($\alpha = 0.05$)

Tabela VIII. Análise do risco por “Odds Ratio” das diferentes combinações genóticas possíveis entre os polimorfismos dos genes da GSTM1 e GSTT1 (GSTM1/GSTT1) nos grupos de estudo, para o desenvolvimento dos leiomiomas uterinos.

Combinações Genótipos	Doentes (%) (N = 123)	Controlo (%) (N = 160)	OR	IC (95 %)	p ^a
(+/+)	62 (50.4 %)	66 (41.2 %)	1.448	0.902 – 2.324	0.157
(0/+)	13 (10.6 %)	35 (21.9 %)	1.216	0.725 – 2.042	0.543
(+/0)	38 (30.9 %)	43 (26.9 %)	0.422	0.213 – 0.838	0.019
(0/0)	10 (8.1 %)	16 (10 %)	0.796	0.348 – 1.822	0.740

^a Significativo para $p < 0.05$.

4.5. Determinação da Actividade da RTM Eritrocitária

Para efectuar a determinação da actividade da RTM, foram utilizados 18 plasmas de pacientes e 173 de controlos.

Inicialmente, foi necessário averiguar se a população total e os grupos de estudo apresentavam uma distribuição normal, utilizando para isso o teste de normalidade “Kolmogorov-Smirnov”. Constatou-se que ambos os grupos de estudo apresentavam uma distribuição normal, tendo-se verificado para o grupo das doentes que $p = 0.720 > \alpha = 0.05$ e para o grupo controlo que $p = 0.077 > \alpha = 0.05$. O mesmo não se verificou com a população total, que não apresentava uma distribuição normal ($p = 0.046 < \alpha = 0.05$).

Em seguida, procedeu-se à realização do teste não paramétrico de “Mann-Whitney” para avaliar se havia uma diferença estatisticamente significativa entre os dados descritivos obtidos para os dois grupos de estudo, tendo-se verificado que sim, já que $p = 0.016 < \alpha = 0.05$ (Tabela IX). Na tabela IX é apresentada uma análise descritiva dos resultados obtidos na determinação da actividade da RTM.

Tabela IX. Análise descritiva da actividade da Redutase Transmembranar de ferricianeto dependente do NADH nos grupos de estudo, com os resultados a serem apresentados sob a forma de média \pm desvio padrão.

Grupos de Estudo	N	Média \pm Desvio Padrão (mmol ferr./L cél/hora)	Máximo (mmol ferr./L cél/hora)	Mínimo (mmol ferr./L cél/hora)	p ^a
Doentes	18	5.50 \pm 3.77	15.87	0.22	0.016
Controlo	173	3.56 \pm 2.54	13.23	0.08	

^a Nível de significância para o teste de “Mann-Whitney” ($\alpha = 0.05$)

4.6. Determinação da Concentração Plasmática de GSHt e da Razão GSHt/GSSG

Para efectuar a determinação da concentração plasmática de GSHt e da razão plasmática GSHt/GSSG, foram utilizados 42 plasmas de pacientes e 94 de controlos.

Inicialmente, averiguou-se se a população total e os grupos de estudo apresentavam uma distribuição normal, por meio do teste de normalidade “Kolmogorov-Smirnov”. Constatou-se que para ambos os grupos de estudo, as variáveis GSHt e GSSG apresentaram uma distribuição normal ($p_{\text{GSHt (doentes)}} = 0.532$, $p_{\text{GSHt (controlo)}} = 0.231$, $p_{\text{GSSG (doentes)}} = 0.950$, $p_{\text{GSSG (controlo)}} = 0.812$) o mesmo não acontecendo com a variável razão GSHt/GSSG que não apresentou uma distribuição normal para ambos os grupos de estudo ($p = 0.030$ para o grupo das doentes e $p = 0.045$ para o grupo controlo). Relativamente à população total verificou-se que apenas a variável GSSG apresentou uma distribuição normal ($p_{\text{GSHt (total)}} = 0.043$, $p_{\text{GSSG (total)}} = 0.546$, $p_{\text{razãoGSHt/GSSG (total)}} = 0.012$).

Efectuou-se uma análise descritiva de modo a obter a média e desvio padrão para as três variáveis. Obteve-se para o grupo das doentes, valores médios de $17.20 \pm 5.30 \mu\text{M}$, $7.13 \pm 2.25 \mu\text{M}$ e $2.53 \pm 0.76 \mu\text{M}$, para GSHt, GSSG e razão GSHt/GSSG, respectivamente. Relativamente ao grupo controlo, os valores médios foram de $28.74 \pm 11.22 \mu\text{M}$, $5.62 \pm 2.27 \mu\text{M}$ e $5.70 \pm 2.79 \mu\text{M}$, para GSHt, GSSG e razão GSHt/GSSG, respectivamente (Tabela X). A fim de averiguar se existia uma diferença significativa para estes valores entre os dois grupos de estudo, efectuou-se o teste paramétrico “t-student” para as variáveis normais e o teste não-paramétrico “Mann-Whitney” para a variável não normal. Os resultados obtidos revelaram a existência de uma diferença significativa entre os dois grupos de estudo para as três variáveis ($p = 0.000$) (Tabela X).

Tabela X. Análise descritiva das concentrações plasmáticas de GSHt e GSSG e da razão plasmática GSHt/GSSG para os grupos de estudo, com os resultados a serem apresentados sob a forma de média \pm desvio padrão.

Grupos de Estudo	Variáveis	N	Média \pm Desvio Padrão (μM)	Máximo (μM)	Mínimo (μM)	p ^a
Doentes	GSHt	42	17.20 ± 5.30	35.89	7.92	0.000
	GSSG	42	7.13 ± 2.25	11.74	2.34	0.000
	RazãoGSHt/GSSG	42	2.53 ± 0.76	5.13	1.52	0.000
Controlo	GSHt	94	28.74 ± 11.22	62.16	9.62	0.000
	GSSG	94	5.62 ± 2.27	9.62	1.40	0.000
	RazãoGSHt/GSSG	95	5.70 ± 2.79	18.90	1.74	0.000

^a Nível de significância para os testes “t-student” e “Mann-Whitney” ($\alpha = 0.05$)

4.7. Determinação da Concentração Plasmática de E2

Na determinação da concentração plasmática de E2, foram utilizados 41 plasmas de pacientes e 91 de controlos.

Inicialmente, foi necessário verificar se a população total e os grupos de estudo apresentavam uma distribuição normal, utilizando para isso o teste de normalidade “Kolmogorov-Smirnov”. Observou-se que a população total e o grupo controlo não apresentavam uma distribuição normal, já que em ambas $p < 0.001$, tendo-se observado o oposto para o grupo das doentes, que apresentava uma distribuição normal, já que $p = 0.196$.

Finalmente, procedeu-se à realização do teste não paramétrico de “Mann-Whitney” para avaliar se havia uma diferença significativa entre os dados descritivos obtidos para os dois grupos de estudo, tendo-se obtido uma resposta positiva, já que $p < 0.001 < \alpha = 0.05$ (Tabela XI).

Tabela XI. Análise descritiva da concentração de E2 circulante nos grupos de estudo, com os resultados a serem apresentados sob a forma de média \pm desvio padrão.

Grupos de Estudo	N	Média \pm Desvio Padrão (pg/ml)	Máximo (pg/ml)	Mínimo (pg/ml)	p ^a
Doentes	41	255.22 \pm 18.08	532.99	55.86	< 0.001
Controlo	91	32.51 \pm 7.85	412.22	2.43	

^a Nível de significância do teste de “Mann-Whitney” $\alpha = 0.05$

DISCUSSÃO 5

Os leiomiomas uterinos, que são um tipo de neoplasia benigna, constituem um dos tumores ginecológicos benignos mais frequentes em mulheres em idade reprodutiva, sendo que em cerca de 25% destas mulheres, as manifestações clínicas apresentadas são causadoras de apreciável morbidade pelo que os custos económicos e os efeitos na sua qualidade de vida são substanciais. Daí que exista um considerável interesse em tentar compreender os mecanismos genéticos e moleculares que estão na base do desenvolvimento destes tumores.

Embora não se conheçam as causas, existem evidências de que os leiomiomas uterinos são extremamente hormono-dependentes dos estrogénios sexuais e dos seus respectivos receptores, sendo por isso, diagnosticados na sua grande maioria depois da ocorrência da menarca até ao período de menopausa (4, 9).

E isso pôde ser confirmado pelas amostras populacionais que constituíram os dois grupos de estudo, daí que se tenha verificado uma diferença estatisticamente significativa na variável idade entre estes grupos (Tabela I). O grupo das doentes era apenas composto por mulheres em idade reprodutora entre os 23 e os 57, enquanto que o grupo controlo foi composto por mulheres entre os 19 e os 77, um intervalo de idades mais abrangente, compreendendo também mulheres em estado pós-menopausa.

Tal como foi referido no primeiro capítulo, a síntese dos estrogénios endógenos é efectuada por meio de vias metabólicas complexas que requerem a presença de vários enzimas, entre os quais se encontram a MPO e as GSTs, cujas actividades inactivam ou impedem a formação de produtos derivados com acção mutagénica e tumorigénica. Os genes que codificam para estes enzimas apresentam polimorfismos funcionais que têm sido relacionados e implicados em vários tipos de cancro e no desenvolvimento de vários tipos de tumores, bem como em outras patologias (59).

A MPO é uma enzima multifuncional envolvida tanto na defesa do hospedeiro, como em processos inflamatórios. Não produz apenas equivalentes oxidativos, mas principalmente contribui para a regulação do organismo em resposta geral a microorganismos invasores. O seu polimorfismo mais comum e estudado neste trabalho de investigação é o G463A e localiza-se na região promotora do gene onde se liga o factor de transcrição SP1.

O objectivo deste trabalho, no que concerne ao polimorfismo G463A da MPO, foi averiguar sobre uma hipotética influência deste no desenvolvimento dos leiomiomas uterinos. No que diz respeito à distribuição dos génotipos, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo ($p = 0.008$) (Tabela II), tendo a análise de risco por “odds ratio” demonstrado que o génotipo GA poderia representar um factor de risco relativamente ao

desenvolvimento dos leiomiomas uterinos (Tabela III). Adicionalmente, efectuou-se a análise de risco por “odds ratio” para as associações entre os genótipos GG + GA e GA + AA, tendo-se verificado a ausência de qualquer tipo de efeito de risco ou protector para ambas (Tabela III).

O alelo G funciona como um local de ligação do factor de transcrição SP1, reagindo com este de modo a aumentar a actividade transcripcional de MPO, sendo que a alteração do alelo G para um alelo A provoca uma diminuição da ligação SP1 e consecutivamente uma menor actividade transcripcional do gene da MPO e uma menor produção de ROS (64).

A maior actividade da MPO associada ao alelo G, responsável pelo aumento da produção de ROS foi ligada a várias doenças (66), enquanto a baixa actividade associada ao alelo A, responsável pela diminuição da produção de ROS e PAHs, foi ligada a uma diminuição do risco de várias doenças, tais como, a doença de Alzheimer, doenças cardiovasculares, esclerose múltipla e cancro do pulmão e do esófago (69).

No que diz respeito aos alelos, a análise de risco por “odds ratio” não identificou nenhum como podendo representar um factor de risco ou de protecção, o que é inconsistente com o que foi dito anteriormente relativamente à interacção dos dois alelos com o factor de transcrição SP1 e posterior influência na actividade transcripcional do gene (Tabela IV).

A actividade da MPO produz ROS, que são necessárias em pequenas quantidades para vários mecanismos importantes a nível celular. Todavia, a ocorrência de um desequilíbrio na quantidade de ROS em células normais pode conduzir ao desenvolvimento de processos oncogénicos nestas. Algo semelhante passa-se em células cancerígenas, que necessitam no entanto de uma maior quantidade de ROS para manterem a sua elevada taxa de proliferação, sendo que uma quantidade de ROS excessiva poderá levar à apoptose da própria célula cancerígena (61). Isto sugere que uma elevada actividade de MPO ao gerar uma grande quantidade de ROS poderia ser benéfica para os leiomiomas uterinos, pela possibilidade de provocar a apoptose das células tumorais, explicando assim o factor de risco associado ao genótipo GA mas não ao genótipo GG.

Em consequência da mutação de G para A os indivíduos portadores dos genótipos GA e AA apresentam uma diminuição na expressão de MPO comparativamente ao genótipo GG. Dados os resultados obtidos e em conformidade com os verificados em vários estudos e apresentados anteriormente, pode-se afirmar que o genótipo GA tem um efeito de risco e o genótipo AA um efeito protector, relativamente ao desenvolvimento dos leiomiomas uterinos. O facto do genótipo GG representar um aumento da expressão da MPO, gerando níveis elevados de ácido hipocloroso que em condições fisiológicas funciona como um agente antimicrobica contra vários tipos de microorganismos, e de ROS que podem agir como um agente na eliminação de células tumorais, conferire-lhe um efeito protector por razões distintas das do genótipo AA (63).

Tal como referido no capítulo da introdução, as GST são uma família de enzimas citoplasmáticas envolvidas na metabolização de compostos xenobióticos e substâncias endógenas. Duas das enzimas que compõem esta família, a GSTM1 e a GSTT1, apresentam polimorfismos não funcionais nos quais se verifica a deleção total ou parcial do gene e que se traduz na prática pela ausência da actividade da enzima por ele codificada, predispondo assim os seus portadores para neoplasias em que estejam envolvidos xenobióticos ou substâncias endógenas, como carcinogénios, por meio do aumento da sobrecarga oxidante (81).

A maioria dos polimorfismos que afectam os genes que estão envolvidos no metabolismo de carcinogénios são SNPs. As deleções são menos comuns e a completa ausência de um gene sob a forma de alelo nulo é um fenómeno raro, sendo esta a razão pela qual os génotipos nulos da GSTM1 e GSTT1 têm atraído muita atenção e se tornado o foco de imensos estudos. A hipótese que está por detrás da maioria destes estudos é a de que a actividade normal ou aumentada das GSTs pode proteger os tecidos susceptíveis de mutações no DNA por destoxicação dos carcinogénios electrofílicos, sendo expectável que as deleções homozigóticas dos genes GSTM1 e GSTT1 provoquem uma redução na habilidade dos tecidos em eliminarem metabolicamente os compostos carcinogénios, colocando assim os indivíduos com génotipo nulo em maior risco para desenvolver cancro (79).

No que diz respeito a este trabalho, o objectivo foi averiguar uma possível relação entre as frequências dos polimorfismos dos genes das GSTM1 e GSTT1, e a susceptibilidade para o desenvolvimento e progressão dos leiomiomas uterinos.

Relativamente ao polimorfismo da GSTM1, não se verificou uma diferença estatisticamente significativa nas frequências genotípicas obtidas entre os grupos das doentes e o grupo controlo (Tabela V). Mas comparando estes resultados com dados estatísticos relativos a outros estudos em diversas populações, observou-se uma variação nos valores das frequências deste polimorfismo (73). Quanto ao polimorfismo da GSTT1, verificou-se a existência de uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de estudo (Tabela V), sendo o valor de 81.3 % obtido para o génotipo positivo ou não nulo no grupo das doentes muito acima do intervalo previsto (10-64 %) (92). A análise do risco por “odds ratio” revelou que este génotipo poderia ser considerado um factor de risco para o desenvolvimento dos leiomiomas uterinos (Tabela VI), podendo ser indicativo de que o génotipo não nulo ou positivo do GSTT1 pode estar relacionado com uma predisposição ou aumento de susceptibilidade para o desenvolvimento dos leiomiomas uterinos.

Na prática, estes resultados indicam que o aumento da actividade do GSTT1 pode conduzir a uma depleção de GSH, que sendo o principal antioxidante celular, a sua diminuição leva ao aumento da carga oxidante a nível celular, entre os quais se encontram os

catecolestrogéneos **(60)**. Os resultados obtidos em vários estudos implicaram os genótipos nulos das GSTM1 e GSTT1 na sensibilidade à quimioterapia em sobreviventes de cancro do ovário, contrariando assim o que era expectável para estes polimorfismos **(109)**.

As deleções nos genes da GSTM1 e GSTT1 são relativamente comuns na população geral **(72, 73, 79)**. E embora sejam objecto de uma extensa investigação, o aumento esperado para o risco de cancro associado a estes dois polimorfismos não tem sido consistente entre os resultados obtidos nos diversos estudos. Contudo, a genotipagem em que se baseiam os estudos não discrimina os genótipos homozigóticos positivos dos heterozigóticos. A aplicação de novas técnicas que permitem separar estes genótipos, demonstraram um aumento do risco para o desenvolvimento do cancro da mama para os genótipos homozigóticos selvagens em comparação com o genótipo nulo **(72)**.

A RTM é um enzima componente do sistema redox transmembranar dos eritrócitos e que reduz o ferricianeto de potássio na dependência de NADH intracelular.

A análise aos resultados obtidos para a determinação da actividade da RTM mostrou uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0.018$) entre o grupo das doentes e o grupo controlo, sendo os valores da actividade desta enzima antioxidante maiores para o grupo das doentes (Tabela IX). Estes dados sugerem uma possível associação entre a actividade da RTM e o desenvolvimento dos leiomiomas uterinos, se bem que recorre o problema da amostragem utilizada ser pequena (18 doentes contra 173 de controlos), sendo assim necessário aumentar o número de amostras de doentes de forma a obterem-se dados mais representativos e com uma maior validade.

Estes resultados podem ser explicados com o facto de a RTM nos eritrócitos poder ser activada pela acção dos estrogénios e poder estar associada a locais específicos na membrana celular, os receptores, para a ligação de hormonas, possibilitando assim uma ligação entre o sistema redox e o sistema hormonal, ocorrendo uma resposta antioxidante e anti-apoptótica após estímulo hormonal **(104)**.

Desconhece-se ainda o processo de iniciação dos leiomiomas uterinos, no entanto, é sabido que o E2 é um promotor do desenvolvimento deste tipo de tumores, sendo esta dependência hormonal corroborada pelo facto dos leiomiomas serem diagnosticados durante a idade reprodutiva da mulher, aumentarem de tamanho na gravidez e regredirem após a menopausa, acontecimentos que coincidem com alterações nos níveis desta hormona.

No que se refere à determinação da concentração de E2, observou-se que o grupo das doentes apresentava níveis superiores desta hormona no sangue relativamente ao grupo controlo,

tendo-se verificado uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0.001$) nos dados descritivos obtidos entre os dois grupos de estudo (Tabela XI). Aliás, o facto da concentração de E2 ser muito superior no grupo das doentes comparativamente ao grupo controlo é revelador da dependência que este tipo de tumores tem relativamente a esta hormona sexual.

Tendo em conta o que tem sido referido em vários estudos em relação não só ao E2, mas de uma forma geral a todos os estrogénios, nomeadamente sobre o seu efeito tumorigénico, quer pela sua acção directa no crescimento e proliferação celular quer pela sua acção indirecta via seu metabolismo, por meio dos seus metabolitos, estes resultados eram expectáveis. Na verdade, algumas evidências sobre a dependência dos leiomiomas uterinos de E2 haviam sido já descritas, tais como: o aparecimento dos leiomiomas uterinos apenas depois da puberdade, a regressão dos leiomiomas devido à redução dos níveis circulantes de E2 como resultado da menopausa ou tratamento com agonistas de GnRH, a diminuição na proliferação dos leiomiomas induzida por E2 com antagonistas de receptores de estrogénio e a inibição do crescimento dos leiomioma com receptores de estrogénio inactivos ou sub-regulados (110).

O GSH desempenha um papel importante no sistema antioxidante que é requerido para manter o balanço redox intracelular, na defesa contra radicais livres e na desintoxicação de compostos tóxicos. Durante o stress oxidativo, a forma reduzida de glutatióno (GSH) pode ser convertida em glutatióno oxidado (GSSG), sendo a razão GSHt:GSSG um determinante crítico do estado redox celular (homeostase), bem como um indicador útil para o risco de contrair doenças.

O GSH é conhecido como um factor de quimioresistência em células cancerígenas, tendo vários tipos de tumores, como o cancro do fígado e da mama, apresentando elevados níveis de GSH, que enfatizam assim a ligação entre a desregulação da homeostase do GSH com o desenvolvimento da doença (93). No entanto, relativamente ao cancro, o metabolismo do glutatióno, pode desempenhar tanto um papel protector como um papel patogénico (97).

Neste estudo, observou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0.000$) nas três variáveis GSHt, GSSG e razão GSHt:GSSG, entre o grupo das doentes e o grupo controlo, tendo esses valores sido inferiores no grupo das doentes, parecendo deste modo, reflectir a existência de uma associação entre a concentração plasmática de GSH e o desenvolvimento dos leiomiomas uterinos.

Esta diferença nos níveis de GSH plasmáticos pode ser explicada devido ao aumento da capacidade de desintoxicação e de defesa contra o stress oxidativo na presença de uma sobrecarga oxidante e que provocou uma depleção na quantidade de GSH (111). E o facto de ter sido demonstrado que o E2 induz a expressão da GRX, que utiliza GSH, e da γ -glutamylcisteína sintetase, um enzima que regula a velocidade da via de biossíntese de GSH (26), associado ao

terem-se verificado níveis elevados de E2 para o grupo das doentes, como descrito anteriormente, ajudaria a explicar uma depleção do GSH e consecutivamente os resultados obtidos neste estudo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6

É conhecido o papel promotor preponderante que os estrogénios podem desempenhar no desenvolvimento de alguns tipos de tumores e cancro, embora o mecanismo pelo qual ocorra, permaneça por esclarecer. Como tal, o principal objectivo deste trabalho incidiu no estudo da possível contribuição que determinados polimorfismos nos genes que codificam para os enzimas MPO, GSTM1 e GSTT1, envolvidos em mecanismos de defesa do organismo contra o “stress” oxidante e que podem ser activados pelo estrogénio, e biomarcadores circulantes RTM, GSH e E2, podem desempenhar no desenvolvimento de leiomiomas uterinos.

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- No polimorfismo G463A da MPO, o genótipo heterozigótico GA é um factor de risco para o desenvolvimento dos leiomiomas uterinos, e que o genótipo homozigótico AA pode exercer um factor protector;
- Nos polimorfismos dos genes GSTM1 e GSTT1, o genótipo positivo do GSTT1 pode exercer um papel de risco no desenvolvimento dos leiomiomas uterinos, sendo necessário aumentar a amostragem de modo a melhorar o poder de amostra, que foi muito baixo para estes dois genes (Anexo B - Tabela XV) e consequentemente obter resultados mais representativos e válidos;
- No estudo sobre uma possível interacção epistática entre os polimorfismos do GSTM1 e GSTT1 no desenvolvimento dos leiomiomas uterinos, a combinação genotípica (+/0) pode ser considerada um factor protector, no entanto, acresce o mesmo problema que para o estudo dos dois polimorfismos em separado, que é a necessidade de aumentar a amostragem de modo a obter resultados mais representativos e válidos;
- A diferença estatística significativa das doentes relativamente aos controlos, verificada nos níveis circulantes de E2, significa que este pode servir como biomarcador para os leiomiomas uterinos, corroborando a hipótese de estes serem estrogénio dependentes;
- A diferença estatística significativa dos controlos relativamente às doentes, verificada nos níveis circulantes de GSHt, e das doentes relativamente aos controlos, verificada na determinação da actividade da RTM, sugerem que houve uma activação de uma resposta ao “stress” oxidante nas doentes. Contudo, carece novamente o facto de ser necessário aumentar a amostragem de forma a tornar os resultados mais representativos e válidos, principalmente no que diz respeito à RTM, que tinha uma amostra populacional de doentes muito baixa (n = 18).

Os resultados referentes aos últimos dois parâmetros, em conjunto com os resultados verificados para o estradiol, podem indicar um papel indirecto deste no desenvolvimento dos leiomiomas uterinos. No entanto, é necessário não só um estudo mais abrangente em termos clínicos e estatísticos, que promova não só um aumento do número de amostras, mas também na quantidade de sangue colhida, de forma a poder efectuar os diferentes métodos experimentais em número significativo e para os mesmos indivíduos e assim poder relacionar a actividade da RTM

e a concentração plasmática de GSht com os níveis circulantes de estradiol e assim aferir sobre uma relação entre eles.

Seria interessante e igualmente relevante fazer uma associação entre a actividade dos enzimas com os respectivos polimorfismos genéticos, bem como, estudar o efeito de outros factores de risco para o desenvolvimento dos leiomiomas uterinos, como a etnia, idade ou obesidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7

1. Cooper, G.M. (1992) *Elements of Human Cancer*. Jones & Bartlett Learning, pp. 354.
2. Weinberg, R.A. (2007) *The Biology of Cancer*. Taylor & Francis Group, 2nd edition, pp. 960.
3. Radic, S., Stanojevic, Z. and Dindic, B. (2004) The pathogenesis of neoplasia. *Arch. Oncol.*, 12, 1 - 3.
4. Ruddon, R. (2007) *Cancer Biology*. Oxford University Press, 4th edition, pp. 545.
5. Roy, D., Cai, Q., Felty, Q. and Narayan, S. (2007) Estrogen-induced generation of reactive oxygen and nitrogen species, gene damage, and estrogen-dependent cancers. *J. Toxicol. Env. Heal. B.*, 10 (4), 235–57.
6. van Duursen, M.B.M. (2005) Estrogen metabolizing enzymes. *Tese de Mestrado*, pp. 143.
7. Yager, J. D. (2000) Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 27, 67–73.
8. Zimmermann, A., Bernuit, D., Gerlinger, C., Schaefer, M. and Geppert, K. (2012) Prevalence, symptoms and management of uterine fibroids: an international internet-based survey of 21,746 women. *BMC Women's Health*, 12 (6), 1 - 11.
9. Corleta, H.E., Chaves, E.B.M., Krause, M.S. and Capp, E. (2007) Tratamento atual dos miomas. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, 29 (6), 324 - 8.
10. Gomes, M.T.V., Castro, R.A., Silva, I.D.C.G., Baracat, E.C., Lima, G.R. and Girão, M.J.B.C. (2006) Análise da patogênese do leiomioma do útero. *Femina*, 34 (6), 381-387.
11. Wallach, E.E. and Vlahos, N.F. (2004) Uterine myomas: An overview of development, clinical features, and management. *Obstet. Gynecol.*, 104(2), 393 - 406.
12. Canevari, R.A. and Rogatto, S.R. (2007) Uterine leiomyoma: Updates in cytogenetics and molecular analysis. *Aust-Asian. J. Cancer*, 1 (6), 15 - 28.
13. Philip, P. C., Tse, K.Y. and Tam, K.F. (2010) Uterine smooth muscle tumors other than the ordinary leiomyomas and leiomyosarcomas: A review of selected variants with emphasis on recent advances and unusual morphology that may cause concern for malignancy. *Adv. Anat. Pathol.*, 17, 91 - 112.
14. Olotu, E.J., Osunwoke, E.A., Ugboma, H.A. and Odu, K.N. (2008) Age prevalence of uterine fibroids in south-southern Nigeria: A retrospective study. *Sci. Res. Essays*, 3 (9), 457- 459.
15. Bozzini, N., Borsari, R., Donadio, N., Guedes, R.C., Messina, M.L., Bonduki, C., Aoki, T., Airoso, P. and Baracat, E.C. (2002) *Miomatose Uterina*. Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia, pp. 15.
16. Lefebvre, G., Vilos, G., Allaire, C. and Jeffrey, J. (2003) The management of Uterine Leiomyomas. *J. Obstet. Gynaecol. Can.*, 25 (5), 396 - 405.
17. Bradley, L.D. (2009) Uterine fibroid embolization: a viable alternative to hysterectomy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 127 - 135.

18. Flake, G.P., Andersen, J. and Dixon, D. (2003) Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: A review. *Environ. Health Persp.*, 111 (8), 1037 - 1054.
19. Evans, P. and Brunzell, S. (2007) Uterine fibroid tumors: Diagnosis and treatment. *Am. Fam. Physician*, 75(10), 1503-1508.
20. Goodwin, S.C., Spies, J.B., Worthington-Kirsch, R., Peterson, E., Pron, G., Li, S. and Myers, E.R. (2008). Uterine artery embolization for treatment of leiomyomata: Long-term outcomes from the fibroid registry. *Obstet. Gynecol.*, 111 (1), 22 - 33.
21. Northington, G.M. and Arya, L.A. (2006) Uterine leiomyoma. *Obstet. Gynecol.*, 10 (1), 1 - 12.
22. Cheng, M.H., Chao, H.T. and Wang, P.H. (2008) Medical treatment for uterine myomas. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.*, 47 (1), 18 - 23.
23. Rougier-Chapman, D., Key, S.M. and Ryan, J.M. (2001) Uterine artery embolization for the treatment of symptomatic fibroid disease. *Applied Radiology*, 11 - 17.
24. Lupatelli, T., Basile, A., Garaci F.G. and Simonetti G. (2005) Percutaneous uterine artery embolization for the treatment of symptomatic fibroids: current status. *Eur. J. Radiol.*, 54, 136 - 147.
25. Findlay, J.K., Liew, S.H., Simpson, E.R. and Korach, K.S. (2010) Estrogen signaling in the regulation of female reproductive functions, in *Fertility Control - Handbook of Experimental Pharmacology 198*. Springer, pp. 29 - 37.
26. Urata, Y., Ihara, Y., Murata, H., Goto, S., Koji, T., Yodoi, J., Inoue, S. and Kondo, T. (2006) 17β - Estradiol protects against oxidative stress - induced cell death through the glutathione/glutaredoxin - dependent redox regulation of akt in myocardic H9c2 cells. *J. Biol. Chem.*, 281 (19), 13092 - 13102.
27. Nelson, L.R. and Bulun, S.E. (2001) Estrogen production and action. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 45 (3), 116 - 124.
28. Tsuchiya, Y., Nakajima, M. and Yokoi, T. (2005) Cytochrome P450 - mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett.*, 227, 115 - 124.
29. Simpson, E.R. (2003) Sources of estrogen and their importance. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 86, 225 - 230.
30. Ignacio, D.L., Frakenfeld, T.G.P., Fortunato R.S., Vaisman, M., Werneck-de-Castro J.P.S. and Carvalho D.P. (2009) Body mass regulation by estrogen and physical activity. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, 53 (3), 310 - 317.
31. Simpson, E., Rubin, G., Clyne, C., Robertson, K., O'Donnell, L., Jones, M. and Davis, S. (2000) The role of local estrogen biosynthesis in males and females. *TEM*, 11 (5), 184 - 188.
32. Huhtinen, K., Stahle, M., Perheentupa, A. and Poutanen, M. (2012) Estrogen biosynthesis and signaling in endometriosis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 358, 146 - 154.

33. Maruo, T., Ohara, N., Wang, J. and Matsuo, H. (2004) Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Hum. Reprod.*, 10 (3), 207 - 220.
34. Wei, T., Geiser, A.G., Qian, H., Su, C., Helvering, L.M., Kulkarni, N.H., Shou, J., Cho, M.N., Bryant, H.U. and Onyia, J.E. (2007) DNA microarray data integration by ortholog gene analysis reveals potential molecular mechanisms of estrogen - dependent growth of human uterine fibroids. *BMC Women's Health*, 7 (5), 1 - 12.
35. Villanova, F.E., Andrade, P.M., Otsuka, A.Y., Gomes, M.T.V., Leal, E.S., Castro, R.A., Girão, M.J.B.C., Nishimura, E., Baracat, E.C. and Silva, I.D.C.G. (2006) Estrogen receptor alpha polymorphism and susceptibility to uterine leiomyoma. *Steroids*, 71, 960 – 965.
36. Blake, R.E. (2007) Leiomyomata uteri: Hormonal and molecular determinants of growth. *J. Natl. Med. Assoc.*, 99 (10), 1170 - 1184.
37. Martínez-Ramírez, O.C., Pérez-Rosales, R., Casto, C., Flores-Días, A., Soto-Cruz, K.E., Astorga-Ramos, A., Gonsebatt, M.E., Casas, L., Valdés-Flores, M. and Rubio, J. (2013) Polymorphisms of catechol estrogens metabolism pathway genes and breast cancer risk in mexican women. *The Breast*, 22, 335 - 343.
38. Mitrunen, K. and Hirvonen, A. (2003) Molecular epidemiology of sporadic breast cancer - The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutation Research*, 544, 9 - 41.
39. Bicho, M.C.G.F.P. (2011) Contribuição para o estudo de biomarcadores e co - factores no cancro do colo do útero. *Tese de Doutoramento*, pp. 204.
40. Reding, K.W., Weiss, N.S., Chen, C., Li, C.I., Carlson, C.S., Wilkerson, H., Farin, F.M., Thummel, K.E., Daling, J.R. and Malone, K.E. (2009) Genetic polymorphisms in the catechol estrogen metabolism pathway and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 18 (5), 1461 – 1467.
41. Cavalieri, E.L., Stack, D.E., Devanesan, P.D., Todorovic, R., Dwivedy, I., Higginbotham, S., Johansson, S.L., Patil, K.D., Gross, M.L., Gooden, J.K., Ramanathan, R., Cerny, R.L. and Rogan E.G. (1997) Molecular origin of cancer: Catechol estrogen - 3, 4 - quinones as endogenous tumor initiators. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 10937 - 10942.
42. Kristensen, V. N., Hure, E.H., Erikstein, B., Harada, N. and Borrensens-Dale, A.L. (2001) Genetic susceptibility and environmental estrogen-like compounds. *Mutation Research*, 482, 77 - 82.
43. Kindzelski, A.L., Clark, A.J., Espinoza, J., Maeda, N., Aratani, Y., Romero, R. And Petty, H.R. (2006) Myeloperoxidase accumulates at the neutrophil surface and enhances cell metabolism and oxidant release during pregnancy. *Eur. J. Immunol.*, 36, 1619 - 1628.

44. Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P. and Georgakilas, A.G. (2011) Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 711, 193 - 201.
45. Noda, N. and Wakasugi, H. (2001) Cancer and Oxidative Stress. *Journal of the Japan Medical Association*, 44 (12), 535 - 539.
46. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress - induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 160, 1 - 40.
47. Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H. and Lleonart, M. (2013) Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing. Res. Rev.*, 12, 376 - 390.
48. Durackova, Z. (2010) Some current insight into oxidative stress. *Physiol. Res.*, 59, 459 - 469.
49. Vieira, F.G.K., Pietro, P.F., Boaventura, B.C.B., Ambrosi, C., Rockenbach, G., Fausto, M.A., Crippa, C.G. and Silva, E.L. (2011) Factors associated with oxidative stress in women with breast cancer. *Nutr. Hosp.*, 26 (3), 528 - 536.
50. Crawford, A., Fassett, R.G., Geraghty, D.P., Kunde, D.A., Ball, M.J., Robertson, I.K. and Coombes, J.S. (2012) Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. *Gene*, 501, 89 - 103.
51. Park, S., Lee, K., Kang, D., Lee, K., Ha, E. and Hong, Y. (2006) Effect of genetic polymorphisms of MnSOD and MPO on the relationship between PAH exposure and oxidative DNA damage. *Mutation. Res.*, 593, 108 - 115.
52. Klaunig, J.E., Xu, Y., Isenberg, J.S., Bachowski, S., Kolaja, K.L., Jiang, J., Stevenson, D.E. and Walborg, E.F. (1998) The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ. Health Persp.*, 106 (1), 289 - 295.
53. Sánchez-Gómez, F.J., Espinosa-Díez, C., Dubey, M., Dikshit, M. and Lamas, S. (2013) S-glutathionylation: relevance in diabetes and potential role as a biomarker. *Biol.Chem.* 394 (10), 1263 - 1280.
54. Kumar, M. and Sarin S.K. (2009) Biomarkers of diseases in medicine. *Current Trends in Science*, 403 - 417.
55. Bhatt, A.N., Mathur, R., Farooque, A., Verma, A. and Dwarakanath, B.S. (2010) Cancer biomarkers - Current perspectives. *Indian J. Med. Res.*, 132, 129 - 149.
56. Norppa, H. (2004) Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol. Lett.*, 149, 309 - 334.
57. Bonassi, S. and Au, W.W. (2002) Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutat. Res.*, 511, 73 - 86.
58. Griffiths, H.R., Moller, L., Bartosz, G., Bast, A., Bertoni - Freddari, C., Collins, A., Cooke, M., Coolen, S., Haenen, G., Hoberg, A.M., Loft, S., Lunec, J., Olinski, R., Parry, J.,

- Pompella, A., Poulsen, H., Verhagen, H. and Astley S.B. (2002) Biomarkers. *JMAM*, 23, 101 - 208.
59. Gresner, P., Gromadzinska, J. and Wasowicz, W. (2007) Polymorphism of selected enzymes involved in detoxification and biotransformation in relation to lung cancer. *Lung Cancer*, 57, 1 - 25.
60. Hatagima, A. (2002) Genetic polymorphisms and metabolism of endocrine disruptors in cancer susceptibility. *Cad. Saúde Pública*, 18 (2), 357 - 377.
61. Malle, E., Furtmuller, P.G., Sattler, W. and Obinger, C. (2007) Myeloperoxidase: a target for new drug development?. *Br. J. Pharmacol.*, 152, 838 - 854.
62. Klebanoff, S.J. (2005) Myeloperoxidase: Friend or foe. *J. Leukocyte. Biol.*, 77, 598 - 625.
63. Arnhold, J. (2004) Free radicals, friends or foes? Properties, functions and secretion of human myeloperoxidase. *Biochem.*, 69 (1), 8 - 15.
64. Chu, H., Wang, M., Wang, M., Gu, D., Wu, D., Zhang, Z., Tang J. and Zhang, Z. (2010) The MPO -463 G>A polymorphism and cancer risk: A meta-analysis based on 43 case-control studies. *Mutagenesis*, 25 (4), 389 - 395.
65. Rothkrantz-Kos, S., Drent, M., Rutgers, A., Heeringa, P., De Vries, J., Dieijen-Visser, M.P. and Tervaert, J.W.C. (2003) Relationship between myeloperoxidase promotor polymorphism and disease severity in sarcoidosis. *Eur. J. Intern. Med.*, 14, 296 - 301.
66. Schabath, M.B., Spitz, M.R., Hong, W.K., Delclos, G.L., Reynolds, W.F., Gunn, G.B., Whitehead, L.W. and Wu, X. (2002) A myeloperoxidase polymorphism associated with reduced risk of lung cancer. *Lung.Cancer.*, 37, 35 - 40.
67. Marchand, L., Seifried, A., Lum, A. and Wilkens, L.R. (2000). Association of the Myeloperoxidase -463GA polymorphism with lung cancer risk. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.*, 9, 181 - 184.
68. Cajas-Salazar, N., Sierra-Torres, C.H., Salama, S.A., Zwischenberger, J.B. and Au, W.W. (2003). Combined effect of MPO, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on chromosome aberrations and lung cancer risk. *Int. J. Hyg. Environ. Health.*, 206, 473 - 483.
69. Bewick, M.A. and Conlon, M.S.C. (2008) Polymorphisms in manganese superoxide dismutase, myeloperoxidase and glutathione - s - transferase and survival after treatment for metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 111, 93 - 101.
70. Hsu, P., Jwo, J., Yang, C., Hsu, P., Yang, H., Lai, K., Chen, I., Chuah, D., Wu, D. and Chen, A. (2008) Association of the myeloperoxidase polymorphism with the risk of gastric cancer. *Anticancer. Res.*, 28, 1317 - 1324.

71. Yang, J., Ambrosino, C.B., Hong, C., Ahn, J., Rodriguez, C., Thun, M.J. and Calle, E.E. (2007). Relationships between polymorphisms in NOS3 and MPO genes, cigarette smoking and risk of post - menopausal breast cancer. *Carcinogenesis*, 28 (6), 1247 - 1253.
72. Parl, F.F. (2005) Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Lett.*, 221 (2), 123 - 129.
73. Alho, I.M.P.M. (2005) Associação genótipo/fenótipo do enzima transferase do glutathione em diferentes patologias relacionadas com a sobrecarga oxidante. *Tese de Licenciatura*, pp. 145.
74. Reszka, E. and Wasowicz, W. (2001) Significance of genetic polymorphisms in glutathione s-transferase multigene family and lung cancer risk. *Int. J. Occup. Environ. Med.*, 14 (2), 99 - 113.
75. Tew, K.D., Manevich, Y., Grek, C., Xiong, Y., Uys, J. and Townsend, D.M. (2011) The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer. *Free Radic. Biol. Med.*, 55, 299 - 313.
76. Laborde, E. (2010) Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ.*, 17, 1373 - 1380.
77. Townsend, D.M. and Tew, K.D. (2003) The role of glutathione-s-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22, 7369 - 7375.
78. Eaton, D.L. and Bammler, T.K. (1999) Concise review of the glutathione s-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sci.*, 49, 156 - 164.
79. Teixeira, R.L.F., Lopes, M.Q.P., Suffys, P.N. and Santos, A.R. (2013) Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis and Management. *Intech*, 6, 105 - 126.
80. Hayes, J.D., Flanagan, J.U. and Jowsey, I.R. (2005) Glutathione Transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 51 - 88.
81. Josephy, P.D. (2010) Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. *Hum. Genom. Proteomics.*, 1 - 14.
82. Li, J., Long, J., Hu, Y., Tan, A., Guo, X. and Zhang, S. (2012) Glutathione S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms and thyroid cancer risk: A meta-analysis. *Cancer Epidemiol.*, 36, 333 - 340.
83. Wang, J., Jiang, J., Zhao, Y., Gajalakshmi, V., Kuriki, K., Suzuki, S., Nagaya, T., Nakamura, S., Akasaka, S., Ishikawa, H. and Tokudome, S. (2011) Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase genes and susceptibility to colorectal cancer: A case-control study in an Indian population. *Cancer Epidemiol.*, 35, 66 - 72.
84. Voho, A., Impivaara, O., Jarvisalo, J., Metsola, K., Vainio, H. And Hirvonen, A. (2006) Distribution of glutathione S-transferase M1, P1 and T1 genotypes in different age-groups of Finns without diagnosed cancer. *Cancer Detect. Prev.*, 30, 144 - 151.

85. Strange, R.C., Jones, P.W. and Fryer, A.A. (2000) Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol. Letters*, 357 - 363.
86. Strange, R.C., Lear, J.T. and Fryer, A.A. (1998) Glutathione S-transferase polymorphisms: influence on susceptibility to cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 111 - 112, 351 - 364.
87. Capoluongo, E., Almadori, G., Concolino, P., Bussu, F., Santonocito, C., Vendittelli, F., Galli, J., Zuppi, C., Ameglio, F., Paludetti, G. and Giardina, B. (2007) GSTT1 and GSTM1 allelic polymorphisms in head and neck cancer patients from Italian Lazio region. *Clin. Chim. Acta*, 376, 174 - 178.
88. Choi, S.C., Yun, K.J., Kim, T.H., Kim, H.J., Park, S.G., Oh, G.J., Chae, S.C., Oh, G., Nah, Y.H., Kim, J.J. and Chung, H.T. (2003) Prognostic potential of glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes for gastric cancer progression. *Cancer Lett.*, 195, 169 - 175.
89. Baclig, M.O., Alvarez, M.R., Lozada, X.M.R., Mapua, C.A., Lozano-Kuhne, J.P., Dimamay, M.P.S., Natividad, F.F., Gopez-Cervantes, J. and Matias, R.R. (2012) Association of glutathione S-transferase T1 and M1 genotypes with chronic liver diseases among Filipinos. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.*, 3 (2), 153 - 159.
90. Ortega, A.L., Mena, S. and Estrela, J.M. (2011) Glutathione in cancer cell death. *Cancers*, 3, 1285 - 1310.
91. Townsend, D.M., Tew, K.D. and Tapiero, H. (2003) The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother.*, 57, 145 - 155.
92. Tew, K.D. and Townsend D.M. (2011) Redox platforms in cancer drug discovery and development. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 15, 156 - 161.
93. Traverso, N., Ricciarelli, R., Nitti, M., Marengo, B., Furfaro, A.L., Pronzatto, M.A., Marinari, U.M. and Domenicotti, C. (2013) Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 1 - 10.
94. Sequeira, R.M. (2009). Factores de risco na insuficiência renal crónica: Estudo de factores genéticos e bioquímicos que possam contribuir para a patologia. Relações com os sistemas de defesa antioxidante e imunitário. *Tese de Mestrado*, pp. 154.
95. Yeh, C., Hou, M., Wu, S., Tsai, S., Lin, S., Hou, L.A., Ma, H. and Tsai, L. (2006) A study of glutathione status in the blood and tissues of patients with breast cancer. *Cell Biochem. Funct.*, 24, 555 - 559.
96. Franco, R., Schoneveld, O.J., Pappa, A. and Panayiotidis, M.I. (2007) The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Arch. Physiol. Biochem.*, 113(4/5): 234 - 258.

97. Balendiran, G.K., Dabur, R. and Fraser, D. (2004) The role of glutathione in cancer. *Cell Biochem. Funct.*, 22, 343 - 352.
98. Wu, G., Fang, Y., Yang, S., Lupton, J.R. and Turner, N.D. (2004) Glutathione metabolism and its implication for health. *Recent Advances in Nutritional Sciences*, 489 - 492.
99. Yeagle, P.L. (1999) Lipid regulation of cell membrane structure and function. *FASEB. J.*, 3, 1833 - 1842.
100. Proença, D. (2006) Associação entre os polimorfismos dos genes CYP1A1 e CYP1A2, com concentrações plasmáticas de 17 β -estradiol e com a actividade do redutase transmembranar do ferricianeto dependente do NADH, em diferentes patologias. *Tese de Licenciatura*, pp. 90.
101. Coutinho, C.H.R.M.V. (2002) Papel dos sistemas redox transmembranares no stress oxidativo e no crescimento celular. *Trabalho Complementar para Prova de Doutoramento*, pp. 81.
102. Baker, M.A. and Lawen, A. (2000) Plasma membrane NADH-oxidoreductase system: A critical review of the structural and functional data. *Antioxid. Redox. Signaling.*, 2 (2), 197 - 212.
103. May, J.M., Qu, Z. and Whitesell, R.R. (1995) Ascorbate is the major electron donor for a transmembrane oxidoreductase of human erythrocytes. *Bioch. Biophys. Acta.*, 1328, 127-136.
104. Marques, F. and Bicho, M. P. (1997) Activation of a NADH Dehydrogenase in the human erythrocyte by Beta-Adrenergic agonists: possible involvement of a G protein in enzyme activation. *Biol. Signal.*, 6, 52-61.
105. Larm, J.A., Vaillant, F., Linnane, A.W. and Lawen, A. (1994) Up-regulation of the plasma membrane oxidoreductase as a prerequisite for the viability of human mammary cells. *J. Biol. Chem.*, 269 (48), 30097 - 30100.
106. Berezi, A. and Asard, H. (1995) NAD(P)H-utilizing oxidoreductases of the plasma membrane - An overview of presently purified proteins. *Protoplasma*, 184, 140-144.
107. Lahiri, D.K. and Nurnberger, J.I. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.*, 19(19), 5444.
108. Hissin, P.J. and Hilf, R. (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.*, 74(1), 214 - 226.
109. Nagle, C.M., Chenevix-Trench, G., Spurdle, A.B. and Webb, P.W. (2007) The role of glutathione-s-transferase polymorphisms in ovarian cancer survival. *Eur. J. Cancer*, 43, 283 - 290.
110. Nierth-Simpson, E.N., Martin, M.M., Chiang, T.C., Melnik, L.I., Rhodes, L.V., Muir, S.E., Burow, M.E. and McLachlan J.A. (2009) Human Uterine Smooth Muscle and Leiomyoma

Cells Differ in Their Rapid 17-Estradiol Signaling: Implications for Proliferation. *Endocrinology*, 150 (5), 2436–2445.

111. Chih-Ching, Y., Ming-Feng, H., Szu-Hsien, W., Shih-Meng, T., Shu-Kai, L., Linda Ann, H., Hsu, M. and Li-Yu, T. (2006) A study of glutathione status in the blood and tissues of patients with breast cancer. *Cell Biochem. Funct.*, 24 (6), 555-559.

ANEXO A - Material, Reagentes e Soluções

8

1. Equipamento de laboratório

Extracção de DNA:

- Centrífuga refrigerada de alta velocidade 3K1S (Sigma);
- Aparelho de banho-maria SS30 (Grant Instruments);
- Microcentrífuga Heraeus FRESCO 17 (Thermo Scientific);
- Espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific).

Identificação dos Polimorfismos em Estudo:

- Termociclador 2720 (Applied Biosystems);
- Sistema de electroforese (Amersham Pharmacia Biotech);
- Transiluminador de Ultravioleta GenoSmart (VWR).

Determinação da Actividade da RTM:

- Centrífuga refrigerada de alta velocidade 5804 R (Eppendorff)
- Incubadora GLS Aqua 18 Plus (Grant Instruments);
- Capilares para hematócrito (MEDLAB);
- Microcentrífuga para hematócrito 1-14 (Sigma);
- Espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Scientific).

Determinação da Concentração Plasmática de GSHt:

- Microcentrífuga Heraeus FRESCO 17 (Thermo Scientific);
- Microplacas de fundo plano (SARSTEDT);
- Espectrofluorímetro Infinite V200 (TECAN).

Determinação da Concentração Plasmática de E2:

- Espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Scientific).

2. Reagentes

Extracção de DNA:

- IGEPAL CA-630 - octilfenoxi polietoxietanol (Sigma-Aldrich).

Identificação dos Polimorfismos em Estudo:

- Dream Taq Green PCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific);
- “Primers” específicos para os genes da MPO, GSTM1, GSTM4 e GSTT1 (Invitrogen);
- DMSO - Dimetil Sulfoxido (Merck);
- Enzima de restrição Acil (Thermo Scientific);
- Agarose Seaken LE (Lonza);
- Brometo de etídio 10 mg/ml (Promega);
- Marcador de peso molecular Gene Ruler 1 Kb (Thermo Scientific);
- Marcador de peso molecular Gene Ruler 50 bp DNA Ladder, 50-1000 bp (Thermo Scientific).

3. Soluções

Extracção de DNA:

- TKMX-100: 2,5 % (v/v) Triton X-100 diluído em tampão TKM1;
- Tampão TKM1: 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM EDTA;
- Tampão TKM2: 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 0,4 M NaCl;
- SDS 10%;
- NaCl 6M;
- Tampão TE: 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA.

Identificação dos Polimorfismos em Estudo:

- Tampão TAE 1X - 0.004 M Tris-acetato, 0.1 mM EDTA pH 8.0 (produzido a partir de uma solução stock 10X concentrada).

Determinação da Actividade da RTM:

- Solução de acetato de sódio 3M pH 6.0 (acertado com ácido acético 0,1 M);
- Solução de ácido cítrico 0,2 M;
- Solução de cloreto férrico 0,0033 M (em ácido acético 0,1 M);
- Batofelantrolina 6.74×10^{-3} M;
- Solução de NaCl 0.9 % (v/v);
- Tampão fosfato salino 0,1 M pH 7.4 10 mM com glucose;
- Ferricianeto de potássio 0,1 M em NaCl 0,9 % (v/v);

- Mistura Reaccional (proporção de 2:2:1:1): 2 proporções de acetato de sódio 3M pH 6.0, 2 proporções de ácido cítrico 0,2 M, 1 proporção de cloreto férrico 0,0033 M (em ácido acético 0,1 M) e 1 proporção de Batofelantrolina 6.74×10^{-3} M.

Determinação da Concentração Plasmática de GSHt:

- Tampão fosfato 0.1 M - EDTA 0.005 M pH 8.0 (acertado com 1 M NaOH);
- Solução de NaOH 0,1 M;
- Solução padrão de GSH 5 µg/ml diluída em tampão fosfato 0.1 M – 0.005 M EDTA pH 8.0;
- Solução padrão de GSSG 5 µg/ml diluída em 0,1 M NaOH;
- Solução de OPT 1 mg/ml diluída em metanol absoluto;
- Ácido metafosfórico 25% (m/v);
- Solução de NEM 0.04 M.

4. “Kits”

Determinação da Concentração Plasmática de E2:

- “Kit” de ELISA – Estradiol Parameter Assay Kit KGE014 (R&D Systems).

5. Programas Informáticos

Análise Estatística:

- SPSS Statistics, Version 20 (IBM);
- Primer of Biostatistics, Fifth edition (Glantz).

ANEXO B - Tabelas

Tabela XII. Diferentes diluições de uma solução-padrão de ferrocianeto de potássio utilizadas na realização do ensaio da determinação da recta de calibração do ferrocianeto de potássio, para um volume final de 700 μl .

	Volumes necessários de solução-padrão de ferrocianeto de potássio para cada diluição (em μl)						
Ferrocianeto (μl)	-	20	60	120	200	400	600
H₂O (μl)	700	680	640	580	500	300	100

Tabela XIII. Diferentes diluições de uma solução-padrão de GSH utilizadas na realização do ensaio da determinação da recta de calibração do GSH, para um volume final de 2000 ml.

	Volumes necessários de solução-padrão de GSH para cada concentração (em ml)							
	0 μg	0,01 μg	0,025 μg	0,05 μg	0,1 μg	0,25 μg	0,5 μg	1 μg
GSH (5 $\mu\text{g/ml}$)	-	0,002	0,005	0,01	0,02	0,05	0,1	0,2
Tampão Fosfato 0,1 M – EDTA 0,005 M	1,9	1,898	1,895	1,89	1,88	1,85	1,8	1,7
OPT (1mg/ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Tabela XIV. Diferentes diluições de uma solução-padrão de GSSG utilizadas na realização do ensaio da determinação da recta de calibração do GSSG, para um volume final de 2000 ml.

	Volumes necessários de solução-padrão de GSSG para cada concentração (em ml)							
	0 μg	0,01 μg	0,025 μg	0,05 μg	0,1 μg	0,25 μg	0,5 μg	1 μg
GSSG (5 $\mu\text{g/ml}$)	-	0,002	0,005	0,01	0,02	0,05	0,1	0,2
NaOH 0,1 M	1,9	1,898	1,895	1,89	1,88	1,85	1,8	1,7
OPT (1mg/ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Tabela XV. Poder da amostra do qui-quadrado de Pearson (χ^2) para o polimorfismo G463A do gene da MPO e para os polimorfismos M1 e T1 do gene do GST.

Polimorfismos	Tamanho da Amostra	Poder da Amostra
G463A MPO	228	0.804
GSTM1	15441	0.065
GSTT1	338	0.721

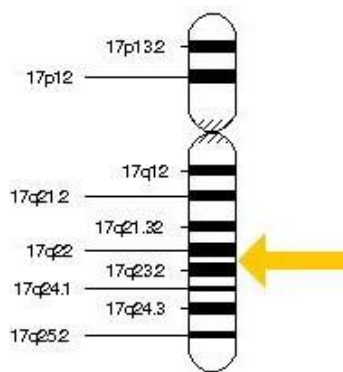


Figura 14. Esquema demonstrativo da localização do gene que codifica para o enzima MPO no cromossoma 17 (Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov>).

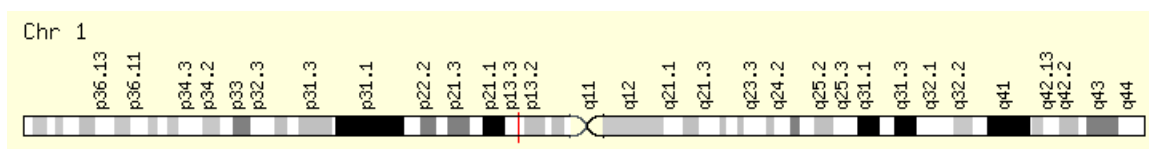


Figura 15. Esquema demonstrativo da localização do gene que codifica para a GSTM1 no cromossoma 1 (Fonte: <http://www.genecards.org>).

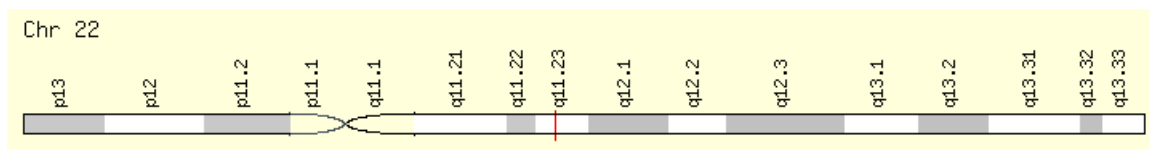


Figura 16. Esquema demonstrativo da localização do gene que codifica para a GSTT1 no cromossoma 22 (Fonte: <http://www.genecards.org>).

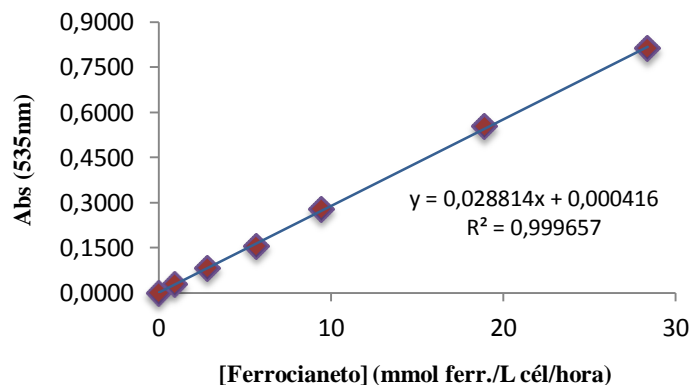


Figura 17. Representação gráfica da recta padrão para o ferrociâneto de potássio, utilizada na determinação da actividade da RTM eritrocitária, efectuada a uma intensidade de fluorescência de $\lambda = 535 \text{ nm}$.

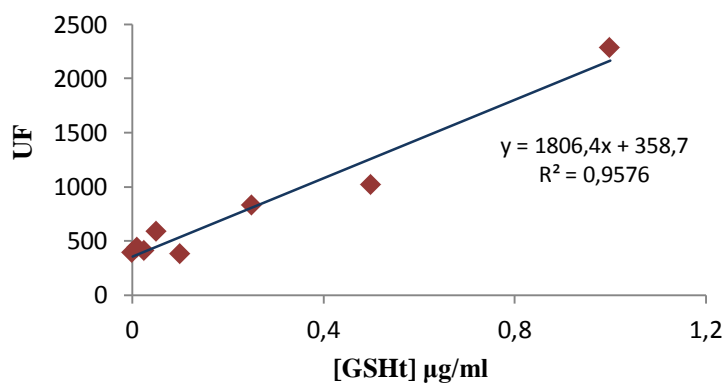


Figura 18. Representação gráfica da recta padrão da solução de GSH para a determinação da concentração plasmática de GSH, realizada às intensidades de fluorescência de $\lambda_{em} = 430$ nm e $\lambda_{ex} = 340$ nm.

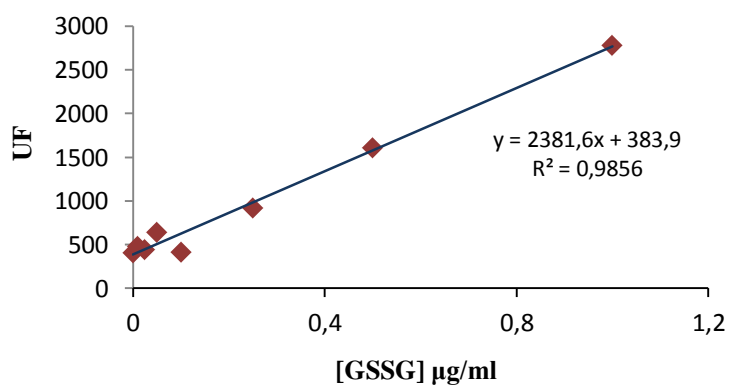


Figura 19. Representação gráfica da recta padrão da solução de GSSG para a determinação da concentração plasmática de GSSG, realizada às intensidades de fluorescência de $\lambda_{em} = 430$ nm e $\lambda_{ex} = 340$ nm.